



CAMILA BASTOS RIBEIRO

**ESTRATÉGIAS PARA OBTENÇÃO DE DUPLO-
HAPLOIDES E PROGÊNIES INDUTORAS DE
HAPLOIDIA EM MILHO**

LAVRAS-MG

2016

CAMILA BASTOS RIBEIRO

**ESTRATÉGIAS PARA OBTENÇÃO DE DUPLO - HAPLOIDES E
PROGÊNIES INDUTORAS DE HAPLOIDIA EM MILHO**

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

Prof. Dr. João Cândido de Souza
Orientador

LAVRAS - MG

2016

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

Ribeiro, Camila Bastos.

Estratégias para obtenção de duplo – haploides e progênies
indutoras de haploidia em milho / Camila Bastos Ribeiro. – Lavras:
UFLA, 2016.

113 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador: João Cândido de Souza.

Bibliografia.

1. Citometria de fluxo. 2. *Zea mays*. 3. Haploides. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CAMILA BASTOS RIBEIRO

**ESTRATÉGIAS PARA OBTENÇÃO DE DUPLO - HAPLOIDES E
PROGÊNIES INDUTORAS DE HAPLOIDIA EM MILHO**

**STRATEGIES FOR OBTAINING DOUBLE HAPLOIDS AND HAPLOID
INDUCING PROGENIES IN MAIZE**

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

APROVADA em 07 de Junho de 2016.

Prof. Dr. João Bosco dos Santos	UFLA
Dra. Ângela de Fátima Barbosa Abreu	EMBRAPA
Prof. Dr. Júlio de Sousa Bueno Filho	UFLA
Prof. Dr. Marcos Ventura Faria	UNICENTRO

Prof. Dr. João Cândido de Souza
Orientador

LAVRAS - MG

2016

Aos meus pais Roberto e Elisa, e ao meu esposo Breno

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar fé de que tudo daria certo e me consentir passar por vários desafios que me permitiram obter muito aprendizado.

À minha família, principalmente aos meus pais, Roberto e Elisa e a meu irmão Roberto Filho, por me ensinarem as coisas que realmente importam nesta vida; por darem valor e me apoiarem em minha formação, também, como exemplo de pessoas e profissionais, ao valorizarem a Genética e o Melhoramento.

Ao meu esposo Breno, por ser meu companheiro na profissão e na vida, ensinando-me, apoiando-me e, principalmente, servindo de exemplo para mim.

À Sinira, por todo seu amor, carinho e atenção.

Aos meus sogros, Procópio e Maisa e toda sua família, que me acolheram e me deram muito suporte.

Aos meus cunhados que são pessoas muito especiais em minha vida e me trazem muito carinho.

Ao meu orientador, João Cândido de Souza, a minha admiração e gratidão por todo ensinamento e suporte nos momentos mais importantes. Pela sua compreensão.

À minha orientadora, Natalia de Leon, do doutorado sanduíche e a seu grupo de pesquisa, por todo o conhecimento que adquiri, durante o período em que estive em Madison e pela oportunidade em trabalhar com o seu grupo.

À Universidade Federal de Lavras e seus professores, por todo o conhecimento que me transmitiram e permitiram-me obter essa formação tão especial em minha vida. Em especial, os professores do Departamento de Biologia e seus atenciosos funcionários, Lilian, Dona Eron, Du (in memoriam), Raffa e Zélia.

Aos amigos do GEN por todos os incontáveis momentos diários de convivência, paciência, troca de conhecimento e apoio.

Ao grupo melhoristas, pelo suporte na condução dos experimentos, momentos de risadas, nas extensas horas de trabalho e pela amizade.

Ao professor Julio Bueno e ao Éder por todo o suporte nas análises estatísticas e ideias na tese.

Ao professor João Bosco e Lamartine pela grande e essencial ajuda e trabalho desenvolvido em seu laboratório.

A várias pessoas do laboratório de Citogenética Vegetal, principalmente, à professora Vânia e aos alunos de doutorado, Cris, Laiane, Guilherme, Thais, Katia, Natalia e Giselly, por todo aprendizado que me deram em qualquer momento de que eu precisei.

Aos pesquisadores da Pioneer com os quais tive a oportunidade de trabalhar, pelo incentivo e apoio em realizar esta Pós-Graduação.

Aos meus amigos de Guarapuava, pelo apoio e momentos de alegria.

Neste momento, o que predomina é a gratidão por todas as amizades feitas e momentos especiais que passamos juntos.

RESUMO GERAL

Uma das limitações da produção de linhagens duplo - haploides *in vivo* é realizar uma identificação de haploides com baixa frequência de falsos positivos e posterior duplicação cromossômica. A obtenção de indutores de haploidia com elevadas taxas de indução, também, é um ponto bastante importante que facilita muito a utilização dessa tecnologia. O objetivo deste estudo foi identificar haploides pelo marcador R-navajo, comprimento e coloração da raiz, vigor de plantas, citometria de fluxo, contagem cromossômica e marcadores moleculares microssatélites e, também, obter linhagens duplo - haploides. Além disso, foram avaliadas 14 progênies $S_{0:1}$ e 7 progênies $S_{2:3}$ de milho quanto à taxa de indução de haploidia, para comparar a seleção de indivíduos por diferentes estratégias, envolvendo a seleção entre, entre e dentro e somente dentro das progênies indutoras, bem como o efeito da seleção indireta para plantas com endosperma roxo na indução de haploides. Os experimentos foram conduzidos na área experimental do Departamento de Biologia da UFLA, em Lavras-MG, nos anos agrícolas 2012/2013 e 2014/2015. Foi conduzido um experimento em cada safra e o delineamento utilizado, em ambos, foi o inteiramente casualizado, com uma e duas repetições, na safra 2012/2013 e 2014/2015, respectivamente. Foram avaliadas as características indução de haploidia e endosperma roxo, das progênies em cruzamento com o híbrido simples GNZ9501. Foram obtidos 552 e 260 haploides, na safra 2012/2013 e 2014/2015, respectivamente. Os haploides identificados por citometria foram submetidos a um protocolo de duplicação cromossômica. Depreende-se que marcadores morfológicos podem resultar em uma alta proporção de falsos positivos na identificação de haploides. O uso da citometria de fluxo e de marcadores moleculares codominantes de DNA são os mais recomendados para a confirmação dos haploides. Foi possível a obtenção de linhagens duplo- haploides com o protocolo utilizado. As progênies 2 e 6 se mostraram efetivas na indução de haploides em ambas as safras. A seleção entre e dentro de progênies para haploides e, também, para plantas com endosperma roxo apresentaram maiores ganhos genéticos para a indução de haploidia.

Palavras-chave: Citometria de fluxo. *Zea mays*. Haploides. Seleção entre e dentro de progênies. SSR.

GENERAL ABSTRACT

One of the limitations of the double haploid lines development in vivo is to perform a haploid identification with low frequency of false positives and subsequent chromosome duplication. Obtaining haploid inducers with high induction rates is also a very important point that greatly facilitates the use of this technology. The aim of this study was to identify the haploid R-Navajo marker, length and root color, vigor of plants, flow cytometry, chromosome counting and microsatellite markers and also obtain double haploid lines. In addition, we evaluated 14 S0:1 progenies and seven S2:3 progenies of maize in relation to their haploid induction rate. After that we compared the selection of individuals for different strategies involving selection among, between and within and only within progenies and also the effect of indirect selection for plants with purple endosperm instead of the haploid induction. The experiments were conducted in the experimental area of the Biology Department of UFLA in Lavras, Minas Gerais, in the agricultural years 2012/2013 and 2014/2015. An experiment was conducted in each year, and the design used in both was completely randomized, with one and two replications in the 2012/2013 and 2014/2015, respectively. The haploid and purple induction were evaluated in the cross between the progenies and the simple hybrid GNZ9501. We found 552 and 260 haploid in 2012/2013 and 2014/2015, respectively. The haploid identified by flow cytometry, were subjected to a chromosome doubling protocol. It appeared that morphological markers can result in a high proportion of false positives in haploid identification. The use of flow cytometry and DNA codominant molecular markers, are the most recommended for haploid confirmation. It was possible to obtain a double-haploid line with the protocol used. Progenies 2 and 6 proved effective in haploid induction in both years. The selection among and within progenies for haploid and purple induction showed higher genetic gains.

Key-words: Flow citometry. *Zea mays*. Haploids. Selection between and within progênies. SSR.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Figura 1 - Boxplot do valor genotípico das plantas dentro de cada progênie, da taxa de indução de haploidia, avaliada na safra 2012/2013 e 2014/2015, respectivamente.70

CAPÍTULO 3

- Figura 1 - Classificação das sementes pelo marcador R1-navajo. Exemplo de semente diploide e haploide colhida na safra 2012/2013 e safra 2014/2015.89
- Figura 2 - Expressão fenotípica do marcador R-navajo, avaliada nas sementes obtidas nas safras 2012/2013 e 2014/2015.96
- Figura 3 - Avaliação do comprimento de raiz para haploide e diploide de acordo com o marcador R-navajo, safra 2012/2013.....98
- Figura 4 - Avaliação do comprimento de raiz para haploide e diploide de acordo com o marcador R-navajo, safra 2014/2015.....98
- Figura 5 - Histogramas das ploidias detectadas em citometria de fluxo em plantas selecionadas como possíveis haploides pelo marcador R-navajo, obtidas na safra 2012/2013. A) Histograma da planta 1 da progênie 6 com o padrão externo *Pisum sativum*. B) Histograma da planta 2 da progênie 6. C) Histograma da planta 3 da progênie 6. D) Histograma do genitor feminino diploide, GNZ9501.99
- Figura 6 - Classificação das plantas obtidas na safra 2014/2015, de acordo com o vigor, avaliado 20 dias após a semeadura em casa de vegetação. A sete vermelha indica as plantas consideradas como haploides.101

Figura 7 -	Histogramas das ploidias detectadas em citometria de fluxo em plantas de milho, safra 2014/2015. A) Histograma da planta L7R1 e do padrão interno ervilha (<i>Pisum sativum</i>). B) Histograma da planta L7R2.....	102
Figura 8 -	Histograma do genitor diploide feminino, GNZ9501, e do padrão interno ervilha (<i>Pisum sativum</i>), obtido em citometria de fluxo, da safra 2014/2015.	102
Figura 9 -	Metáfase C de plantas diploides obtidas na safra 2012/2013 (A) e 2014/2015 (B).	104
Figura 10 -	Primer 1233. Amostras: GNZ9501, Genitor P6, Diploide, Diploide, Diploide, haploide, haploide, haploide.....	105
Figura 11 -	Histogramas das ploidias detectadas em citometria de fluxo em plantas de milho, safra 2012/2013. A) Histograma da planta 6.1, pós-duplicação, B) Histograma da planta 6.2, pós-duplicação. C) Histograma da planta 6.3, pós-duplicação.	107

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Comparação entre o método tradicional e o DH (via linhagens duplo-haploides) de obtenção de linhagens em milho, em relação ao tempo e mão de obra necessária.	21
---	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Média ponderada e tamanho amostral (N) da taxa de indução de haploidia das 14 progênies avaliadas na safra 2012/2013 e 7 avaliadas em 2014/2015.....	66
Tabela 2 - Resultado da análise de deviance da taxa de indução de haploidia de quatorze progênies $S_{0:1}$ indutoras, avaliada na safra 2012/2013 e sete progênies $S_{2:3}$, safra 2014/2015.....	68
Tabela 3 - Valor genotípico e correlação de Spearman das 14 e 7 progênies avaliadas em relação à indução de haploidia na safra 2012/2013 e 2014/2015.	69
Tabela 4 - Progênies dispostas da melhor para a pior em termos de indução de haploidia e estimativas dos ganhos preditos com a seleção da indução de haploidia para as diferentes estratégias de seleção, avaliada na safra 2012/2013.	72
Tabela 5 - Resultado da análise de deviance da indução de roxos, herdabilidade (h^2) e correlação genética e ambiental da indução de haploidia e de roxos, de sete progênies $S_{2:3}$ indutoras, avaliada na safra 2014/2015.	74

Tabela 6 - Ganhos preditos com duas estratégias de seleção entre e dentro de progênies $S_{2:3}$, em relação à indução de haploides (%) e de roxos (%), considerando a seleção com base no índice clássico (IHS), com pesos 3 para indução de haploides e 1 para roxos.....	75
--	----

CAPÍTULO 3

Tabela 1 - Número de sementes selecionadas com base no marcador R1-navajo e haploide de acordo com a coloração do endosperma, total de sementes obtidas e média ponderada da indução de haploidia.	95
Tabela 2 - Número de sementes selecionadas pelo marcador R-navajo e haploides confirmados pela citometria de fluxo.	103

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL	15
1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1	Obtenção de linhagens num programa de melhoramento de milho	19
2.2	Indução in vivo de haploidia em milho	23
2.3	Identificação dos haploides	26
2.3.1	Marcador morfológico R-navajo.....	27
2.3.2	Contagem cromossômica	29
2.3.3	Citometria de fluxo	30
2.3.4	Uso de marcadores moleculares de DNA.....	32
2.4	Duplicação cromossômica em haploides de milho	33
2.5	Estratégias de seleção utilizadas no melhoramento do milho.....	35
2.6	Seleção indireta de caracteres	37
3	CONCLUSÕES.....	39
	REFERÊNCIAS	41
	CAPÍTULO 2 ESTRATÉGIAS DE SELEÇÃO DE HAPLOIDIA EM MILHO TROPICAL USANDO O MARCADOR R-navajo	51
1	INTRODUÇÃO	53
2	MATERIAL E MÉTODOS	55
2.1	Área experimental e genótipos avaliados	55
2.2	Análise estatística dos dados	57
2.3	Comparação entre estratégias de seleção	59
2.4	Estimativas dos parâmetros genéticos e fenotípicos	59
2.5	Ganhos preditos com a seleção	60
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
3.1	Análise estatística dos dados	65
3.2	Estratégias de seleção	70
3.2.1	Seleção indireta de caracteres	73
4	CONCLUSÕES.....	77
	REFERÊNCIAS	79
	CAPÍTULO 3 IDENTIFICAÇÃO DE HAPLOIDES E OBTENÇÃO DE LINHAGENS DUPLO-HAPLOIDES EM MILHO.....	83
1	INTRODUÇÃO	85
2	MATERIAL E MÉTODOS	87
2.1	Área experimental e genótipos avaliados	87
2.2	Obtenção e identificação de haploides	89
2.2.1	Marcador morfológico R-navajo.....	89

2.2.2	Avaliação do vigor das plantas	89
2.2.3	Comprimento e coloração das raízes	89
2.2.4	Citometria de fluxo	90
2.2.5	Contagem cromossômica	91
2.2.6	Uso de marcadores microssatélites de DNA	91
2.3	Duplicação cromossômica	93
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	95
3.1	Identificação e caracterização de haploides por meio da avaliação do marcador R-navajo, comprimento e coloração de raiz, vigor, citometria de fluxo, contagem cromossômica e marcadores moleculares SSR.	95
3.2	Duplicação cromossômica em haploides de milho	106
4	CONCLUSÕES	109
	REFERÊNCIAS	111

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

Para a obtenção de linhagens elites, em programas de melhoramento de milho, os melhoristas podem utilizar o processo tradicional ou a tecnologia de duplo - haploides. A adoção dessa tecnologia tem aumentado, principalmente, pelas empresas privadas. O processo tradicional implica sucessivas autofecundações na população que é utilizada como fonte de linhagens, até que a homozigose quase completa seja atingida, por, aproximadamente, 6 a 7 gerações. Já a obtenção, via duplo – haploides, é uma alternativa disponível na cultura do milho, para acelerar a obtenção de linhagens. Além disso, os programas de melhoramento vêm utilizando essa tecnologia em razão de outros ganhos diretamente relacionados ao melhoramento. Esta técnica consiste na produção de linhagens homozigotas com apenas uma geração, pelo uso de haploides duplicados, também, conhecidos como duplo-haploides (DH) ou di-haploides (CHASE, 1952).

Atualmente, na cultura do milho, o método *in vivo* é o mais utilizado para obtenção de linhagens DH. Esse método baseia-se no cruzamento de linhagens indutoras de haploides com um genótipo doador, seguido da duplicação cromossômica e autofecundação das DH. Geralmente, em empresas de melhoramento, opta-se pelos indutores gimnogenéticos, uma vez que este sistema alia as maiores taxas de indução dos indutores modernos com a praticidade. Os genótipos a serem induzidos, utilizados como fêmeas, podem ser plantados em um único campo isolado, separados pelo indutor, utilizado como macho. Antes do florescimento, as plantas utilizadas como fêmeas são despendoadas e a polinização pelo indutor ocorre naturalmente (FRITSCHENETO; GARBUGLIO; BORÉM, 2012). Esse processo tem sido facilitado pela tropicalização dos indutores, uma vez que germoplasmas tropicais normalmente

apresentam maior altura, facilitando a polinização natural entre as plantas (CHAIKAM; MAHUKU; PRASANNA, 2012).

Um ponto chave para a aplicação da indução *in vivo* em escala comercial é a diferenciação adequada de plantas haploides e diploides. Essas plantas podem ser diferenciadas das diploides por características como folhas eretas, pouco vigor e maior esterilidade, principalmente, de pólen no pendão, que ocorre, principalmente, no caso de haploides androgenéticos, coloração de radícula (BATISTELLI et al., 2013; COUTO et al., 2013; ROTARENCO; ADICU; SARMANIUC, 2009). O marcador arroxeadado das sementes, mais conhecido como R-navajo, é o mais utilizado até hoje para a discriminação dos haploides devido à sua facilidade de aplicação e alta eficiência quando utilizado em escala comercial (FRITSCHÉ-NETO; GARBUGLIO; BORÉM, 2012). No entanto pela discriminação não eficiente desse marcador, ao background genético utilizado e condições ambientais, outras características vêm sendo analisadas (PRIGGE; MELCHINGER, 2012).

Alguns métodos laboratoriais têm sido utilizados e podem ser mais eficientes, como a citometria de fluxo que permite a quantificação do DNA das plantas (BATISTELLI et al., 2013; COUTO et al., 2013, 2015). A contagem cromossômica (IVANOV et al., 2010) e o uso de marcadores moleculares codominantes, como os microssatélites, permitem a distinção dos haploides, que apresenta o perfil de bandas somente de um dos pais, dos diploides, que apresentam bandas de ambos os pais (BATTISTELLI et al., 2013; COUTO et al., 2013, 2015; LI et al., 2009; RABEL, 2008).

O uso da tecnologia DH no melhoramento de milho, baseada na indução *in vivo* de haploides, é reconhecida pelo mundo inteiro por aumentar a eficiência no melhoramento de linhagens e a qualidade na obtenção de híbridos. Nos últimos 10 a 15 anos, essa tecnologia tem sido utilizada em vários programas de melhoramento de milho na Europa (SCHMIDT, 2003), América do Norte

(SEITZ, 2005), China (CHEN; LI; LI, 2009) e, principalmente, em ambientes temperados (PRIGGE; MELCHINGER, 2012). No entanto vários programas de melhoramento de milho tropical, nas instituições do setor público, em países da América Latina, África e Ásia, ainda têm muito que fazer, principalmente, em termos de melhoramento dos indutores em ambiente tropical, que apresentem características agronômicas desejáveis. O CYMMIT, no México, dispõe de linhagens e híbridos indutores adaptados a esse tipo de ambiente, com taxas de indução de até 10% (PRASANNA, 2012). São poucas as informações sobre parâmetros genéticos e de estratégias de melhoramento referente a indutores tanto tropicais, quanto temperados. Shatskaya (2010) avaliou três ciclos de seleção intrapopulacional de irmãos germanos, para a obtenção de indutores com alta taxa de indução, no Instituto de Agricultura de Khadzhinov, na Rússia. E observou que três ciclos de seleção foram o suficiente para a obtenção de linhagens e populações indutoras com 6 a 13% de indução de haploidia.

Do exposto, o seguinte trabalho tem como objetivos identificar haploides pela coloração roxa das sementes, comprimento e coloração da raiz, vigor de plantas, citometria de fluxo, contagem cromossômica e marcadores moleculares microssatélites, bem como obter linhagens duplo-haploides. Também visa comparar os ganhos genéticos obtidos por meio de diferentes estratégias de seleção de progênies para a obtenção de linhagens indutoras de haploidia em milho.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Obtenção de linhagens num programa de melhoramento de milho

A produção de híbridos com alto desempenho necessita do cruzamento entre linhagens elites (PATERNIANI; CAMPOS, 1999). O processo tradicional para obter linhagens implica sucessivas autofecundações na população que é utilizada como fonte de linhagens, em que os descendentes de cada planta são semeados em linhas, formando progênies. As progênies são avaliadas e os melhores indivíduos de cada família são autofecundados. Esse processo se repete até que a homozigose quase completa seja atingida por, aproximadamente, seis a sete gerações.

Indivíduos haploides são portadores de uma única cópia de cada cromossomo característico da espécie e apresentam, no tecido somático, o número n de cromossomos típicos dos gametas do organismo. Assim, uma planta haploide é considerada em estágio esporofítico, entretanto com número de cromossomos de estágio gametofítico. Podem ser utilizados diferentes métodos para a obtenção de duplo-haploides (DH), tais como: *in vivo* pelo uso de cruzamentos com a presença do gene indutor da haploidia, cultura de anteras e micrósporos e cruzamentos interespecíficos (FRITSCHÉ-NETO; GARBUGLIO; BORÉM, 2012). Na cultura do milho, o uso do método *in vivo* é o mais empregado pela sua maior eficiência. Chase (1947, 1951, 1952, 1969) foi o pioneiro de estudos sobre monoploides, sinônimo de haploide, no caso do milho e, também, no uso de linhagens DH no melhoramento.

Chase (1947), inicialmente, considerou a indução de haploidia e duplicação cromossômica espontânea, no entanto, logo percebeu que não seria possível aplicar em escala comercial pela baixa frequência de indução e duplicação de, aproximadamente, 0,01%. O início do uso da indução de haploides *in vivo* foi quando Coe (1959) observou que a linhagem Stock 6

possui uma alta frequência de obtenção de haploides, quando utilizada em cruzamentos de, aproximadamente, 2,3%. Posteriormente, um grupo de linhagens foi desenvolvido e descoberto como potenciais indutores de haploidia.

Uma alternativa disponível na cultura do milho, para acelerar a obtenção de linhagens, consiste na produção de linhagens homozigotas instantâneas pelo uso de haploides duplicados, que são denominados, então, de duplo-haploides ou di-haploides (DH) (CHASE, 1952). Neste método, é possível a obtenção de linhagens com apenas dois ciclos da cultura, um para a obtenção dos haploides e o outro para a autofecundação das linhagens DH obtidas. No entanto, em certos locais, podem-se plantar três safras de milho por ano. Dessa forma, a obtenção de linhagens duplo-haploides não se mostra tão vantajosa quanto a um menor tempo utilizado em relação ao método convencional, mas, sim, quanto à redução do volume de mão de obra, o que pode ser facilmente visualizado na Tabela 1. Mas vale ressaltar que essa tecnologia apresenta muitas outras vantagens que serão comentadas a seguir, justificando, assim, a sua grande utilização pelos programas comerciais de melhoramento de milho.

Tabela 1 - Comparação entre o método tradicional e o DH (via linhagens duplo-haploides) de obtenção de linhagens em milho, em relação ao tempo e mão de obra necessária.

Método tradicional				
Ano	Gerações			
	Semeadura	Colheita	% de locos em homozigose	⊗ ¹
1	Cruzamentos, F1, F2	F1, F2, F3	0%, 50% e 75%	1,2
2	F3,F4, F5	F4, F5, F6	87.50%, 93.75%, 96.88%	3,4,5
3	F6,F7	F7,F8	98.44% e 99%	6 e 7
Método duplo-haploide (DH)				
Ano	Gerações			
	Semeadura	Colheita	% de locos em homozigose	Cruzam. ²
1	Cruzamentos (F1 x Indutor), DH	Haploides e DH	100%	1,2

¹Número de autofecundações

²Número de cruzamentos

O uso de linhagens DH, na obtenção de híbridos de milho, atende, facilmente, os requisitos necessários ao registro de cultivares, de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade (DHE) pela sua homozigosidade e uniformidade completa (GEIGER; GORDILLO, 2009).

Além de vantagens sob o ponto de vista logístico, há, também, aquelas relacionadas ao melhoramento em si. Uma delas está relacionada à maior exploração da variância aditiva. Para explicar isso, considerando apenas dois pares de locos independentes segregando entre os genitores com genótipo AAbb e aaBB, o genótipo recessivo aabb ocorre com uma frequência de 1/16, em uma população F₂, considerando um processo normal de autofecundação. Entretanto com a indução da haploidia e posterior duplicação cromossômica, o mesmo genótipo ocorrerá com uma frequência maior de ¼ na população. Isso ocorre pela ausência dos heterozigotos, prevalecendo, assim, apenas os genótipos

AABB, AAbb, aaBB e aabb (PIERRE et al., 2011). Dessa maneira, a variância aditiva é maximizada e a seleção de características quantitativas pode ser facilitada (BORDES et al., 2006). Segundo Prasanna (2012), por isso, pode-se, também, acelerar o desenvolvimento de híbridos superiores pela rápida piramidação de alelos favoráveis para caracteres poligênicos como a produtividade e a resistência a estresses ambientais. Outra grande vantagem da utilização dessa tecnologia é que a eficiência e precisão da seleção, para alguns caracteres agrônômicos, pode ser melhor (GEIGER; GORDILLO, 2009; ROBER; GORDILLO; GEIGER, 2005), especialmente, quando combinada com o uso de marcadores moleculares (PRASANNA, 2012). Além disso, facilita o acesso à germoplasma presente dentro de linhagens femininas e masculinas de híbridos de milho, principalmente, com o auxílio de marcadores moleculares (HECKENBERGER; BOHN; MELCHINGER, 2005) e fornece oportunidade de estudos de associação de QTLs, introgressão de genes via marcadores moleculares (FORSTER; THOMAS, 2005), estudos de genômica funcional, citogenética molecular e engenharia genética (FORSTER et al., 2007; WIJNKER et al., 2007).

A utilização de linhagens duplo-haploides em milho pode ser mais vantajosa, também, em programas de seleção recorrente. Uma média de ganho por ciclo para produção de grãos, utilizando linhagens oriundas do método convencional, pode variar de 2 a 4% (HALLAUER; MIRANDA, 1988). Já uma seleção recorrente envolvendo plantas DH, foi desenvolvida para melhorar duas populações sintéticas denominadas de SP e AS quanto à produção de grãos. Observou-se um ganho maior, resultando em um aumento na produção de grãos de mais de 10% por ciclo (CHALYK; ROTARENCO, 1999; ROTARENCO; CHALYK; EDER, 2004).

Rotarenco et al. (2012), também, avaliaram a seleção recorrente, utilizando 4 ciclos de seleção de 27 populações sintéticas da Universidade de

Iowa dos Estados Unidos, oriundas de plantas haploides, para obter ganhos nos caracteres produção de grãos, altura de planta, comprimento de espiga e número de fileiras por espiga. Neste estudo, foi possível observar que utilizando haploides é possível identificar bons genótipos e, também, acumular alelos com efeitos aditivos favoráveis no genótipo que está sendo melhorado. No entanto o uso de haploides e DH requer mais atenção e cuidado dos pesquisadores, na condução dos experimentos, uma vez que, em geral, as linhagens duplo-haploides apresentam menor vigor, sendo assim mais sensíveis às mudanças nas condições ambientais.

2.2 Indução in vivo de haploidia em milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma planta tipicamente diploide ($2n = 20$), mas já foi observada a ocorrência de haploides naturais ($n=10$). No entanto estes indivíduos ocorrem em uma taxa muito baixa. Segundo Chase (1963), esta taxa é de uma em cada mil plantas. Sendo assim, muito ineficiente para ser utilizada em programas de melhoramento de milho. Para contornar esse problema, tem sido utilizado o método in vivo.

O método in vivo é realizado, por meio da indução genética e baseia-se na utilização de linhagens indutoras de haploides em cruzamento com o genótipo doador, ou seja, aquele em que se deseja obter uma linhagem. Posteriormente a duplicação cromossômica é efetuada.

Esse método tem sido melhorado, drasticamente, nos últimos 30 anos com o uso de linhagens indutoras mais eficientes em relação à taxa de indução, a qual era de, aproximadamente, 2,3%, no início dos anos 60 (COE, 1959) e passou para 3-5% (LASHERMES; BERKERT, 1988) e 6% (SARKAR et al., 1994) no início dos anos 90. Com a linhagem europeia RWS, foi possível obter uma taxa de indução de 8% (ROBER; GORDILLO; GEIGER, 2005).

Inicialmente duas linhagens indutoras de haploidia se destacaram, a Stock 6 e a W23. A linhagem Stock 6 foi desenvolvida a partir de uma variedade denominada Stock 6 (COE, 1959), que, quando autofecundada, produziu uma frequência de haploides em torno de 3,2%. Esta linhagem gera haploides de origem materna, denominados como gimnogenéticos. Já a outra linhagem, a W23, conhecida como Wisconsin 23, gera haploides denominados de androgenéticos a uma taxa de, aproximadamente, 1 a 3% (KERMICLE, 1969, 1973).

Os mecanismos moleculares da indução de haploidia em milho não são totalmente compreendidos (SILVA et al., 2009). Dentre as razões para a indução, Zhang et al. (2008) comentam que a anormalidade na microsporogênese e na fertilização podem ser a razão para tal fato ocorrer.

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

Os haploides androgenéticos, segundo Kermicle (1973), podem ser gerados por influência de uma mutação espontânea em razão da presença do alelo recessivo, gametófito indeterminado (ig). Este alelo ig causa algumas

alterações no desenvolvimento do saco embrionário (LASHERMES; BECKERT, 1988). Quando ocorre uma megasporogênese normal, ocorrem três mitoses sucessivas resultando em um saco embrionário com oito núcleos. Sob a ação do gene *ig*, algumas megasporogêneses sofrem quatro ou mais mitoses, resultando em um saco embrionário com uma quantidade anormal de núcleos, com 16 núcleos ou mais. Por essas divisões mitóticas adicionais, o indivíduo mutante que apresenta o alelo *ig1* exibe uma heterofertilização. Segundo Lin (1981), provavelmente, os sacos embrionários com oosfera degenerada favorecem o desenvolvimento de um núcleo reprodutivo de grão de pólen, sem que tenha ocorrido a fertilização, dando origem a um embrião haploide.

Geralmente, em empresas de melhoramento, opta-se pelos indutores gimnogenéticos, uma vez que este sistema alia as maiores taxas de indução dos indutores modernos com a praticidade. Esta maior praticidade ocorre, porque, quando se utiliza um indutor gimnogenético, o manejo no campo de indução torna-se mais fácil pelo fato de se poder induzir diferentes materiais simultaneamente. Os materiais a serem induzidos (genótipos doadores), utilizados como fêmeas, podem ser plantados em um único campo isolado, separados pelo indutor, utilizado como macho. Antes do florescimento, as plantas a serem induzidas são despendoadas e a polinização pelo indutor ocorre naturalmente (FRITSCHÉ-NETO; GARBUGLIO; BORÉM, 2012). O uso de indutores tropicais gimnogenéticos é, ainda, melhor uma vez que essas plantas possuem, em geral, alturas maiores, facilitando a polinização aberta (CHAIKAM; PRASANNA; MAHUKU, 2012).

Apesar do processo de indução não ser bem compreendido, várias iniciativas foram realizadas com o intuito de aumentar a frequência de indução de haploides com indutores melhorados. Um grande número de linhagens indutoras gimnogenéticas de alta taxa de indução e utilização comercial tem sido derivada da Stock 6. A WS14, desenvolvida pelo cruzamento entre as linhagens

W23ig x Stock6 (LASHERMES; BERKERT, 1988); a MHI (EDER; CHALYK, 2002), derivada do cruzamento entre KMS x ZMS (ambas derivadas da Stock6); RWS, descendente do cruzamento KEMS x WS14 (ROBER; GORDILLO; GEIGER, 2005); UH400, citada por Chang e Coe (2009), desenvolvida na Universidade de Hohenheim a partir da KEMS (SHATSKAYA et al., 1994); CAUHOI, obtida na Universidade de Agricultura da China por um cruzamento entre a Stock 6 com a população Beijing High Oil (LI et al., 2009) e a PHI, derivada de um cruzamento entre a MHI e a Stock 6 (ROTARENCO et al., 2010).

Desde 2007, o programa de milho do CIMMYT tem trabalhado com a otimização da tecnologia DH, especialmente, para ambientes tropicais e subtropicais, em parceria com a Universidade de Hohenheim, na Alemanha (PRASANNA, 2012). Linhagens tropicais com taxas que variam de 8 a 10% de indução de haploidia já foram desenvolvidas com essa parceria (PRIGGE et al., 2011). Além disso, híbridos simples indutores tropicais, também, foram obtidos a partir dessas linhagens indutoras. A W23 tem sido bastante utilizada, nos programas de melhoramento de milho em condições tropicais de cultivo, como no Brasil, para a produção de outras linhagens indutoras de haploides androgenéticos, adaptadas às condições ambientais, como resistência ao ataque de doenças, sensibilidade ao calor e ao fotoperíodo (BATISTELLI, 2012). Dessa maneira, é possível a obtenção de linhagens tropicais com taxas de indução relevantes, que permitam a utilização em ampla escala dessa tecnologia.

2.3 Identificação dos haploides

A identificação dos haploides pode ser realizada utilizando-se caracteres morfológicos, citogenéticos ou moleculares, como descrito a seguir.

2.3.1 Marcador morfológico R-navajo

Um ponto chave para a aplicação da indução *in vivo* em escala comercial é um screening bem feito que permita ao melhorista diferenciar grãos ou seedlings haploides, daqueles formados a partir da fertilização regular. O marcador, para a identificação dos haploides, mais eficiente até hoje, é o denominado “navajo”, codificado por um alelo mutante dominante R1-nj, que expressa coloração roxa (GEIGER; GORDILLO, 2009). A utilização de linhagens DH, em escala comercial, só é possível por essa marcação morfológica nas sementes de milho (FRITSCHÉ-NETO; GARBUGLIO; BORÉM, 2012).

Nanda e Chase (1966) foram os primeiros a utilizar o marcador R1-nj seletivo de experimentos de indução de haploides. Chase e Nanda (1965) descreveram esse sistema de marcador fenotípico, baseado na pigmentação por antocianina, determinado pelo gene R-navajo (R1-nj), em que ocorre a pigmentação do endosperma e, também, do embrião nas sementes diploides. Enquanto nas haploides, a pigmentação ocorre somente no endosperma. Isso ocorre, porque como se observa, o endosperma é um tecido triploide formado por um conjunto haploide do parental masculino e dois do parental feminino. Já o embrião é formado por um tecido diploide. Como o marcador R1-navajo é dominante em um cruzamento, expressa um pigmento de coloração roxa 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 marcador R1-navajo pode apresentar desvantagens em, basicamente, três situações distintas: a) a sua expressão pode ser inibida completamente por genes inibidores de coloração; b) o R1-navajo pode estar segregando dependendo das fontes de germoplasma utilizadas nos cruzamentos; c) a expressão do marcador é fraca pela intensidade de antocianina ou área marcada.

Um estudo com 897 linhagens tropicais demonstrou completa inibição do marcador R1-navajo, em 30% das linhagens, pela presença de outro marcador, o C1-I inibidor da coloração (CHAIKAM et al., 2016). Dessa maneira, o uso do R1-navajo não é eficiente dependendo, principalmente, da fonte de germoplasma.

O uso do gene R1-navajo, para identificar prováveis haploides, deve ser feito com cautela pela subjetividade desse método, além de que alguns genótipos doadores apresentam a coloração de antocianina nos grãos. Assim, outros marcadores fenotípicos podem ser utilizados para minimizar a classificação errada de possíveis haploides. Por exemplo, para complementar o uso desse marcador, dois outros marcadores de antocianina, baseados na coloração roxa do colmo e vermelha da raiz, podem ser considerados na discriminação dos haploides (LI et al., 2009; ROBER; GORDILLO; GEIGER, 2005; ROTARENCO et al., 2010). Recentemente, Chaikam et al. (2016) avaliaram esses marcadores adicionais em germoplasma tropical. Os haploides são identificados pela não coloração nas radículas. Já os diploides apresentam essa pigmentação. Esse marcador pode ser bastante eficiente uma vez que a coloração na radícula ou raiz não é frequente nos genótipos de milho. Estima-se que ele ocorre em, aproximadamente, 8,6% do germoplasma de milho. Mesmo nos genótipos de milho sintético azul e vermelho, a coloração vermelha da raiz foi eficiente para identificar os haploides.

A concentração de óleo nos grãos, também, já foi avaliada como possível característica para distinguir haploides de diploides por Rotarenco, Kirtoca e Jacota (2007). Os autores observaram que grãos com embrião haploide possuem uma concentração menor de óleo do que aqueles com embrião diploide. Isto é explicado pelo tamanho reduzido de embriões haploides quando comparado com os diploides. No entanto, de acordo com Geiger e Gordillo (2009), a eficácia dessa metodologia depende de uma média a elevada

concentração de óleo, nos grãos dos genótipos indutores, dificultando a ampla utilização dessa característica.

Outro tipo de método de identificação que tem sido bastante utilizado, principalmente, nas empresas comerciais, é o vigor das plantas. Um dos grandes motivos para isso é que os pesquisadores das empresas têm amplo conhecimento do germoplasma no qual será utilizado para a obtenção das linhagens DH. Assim, linhagens DH que não apresentam características esperadas e que, além disso, demonstram maior vigor, já são eliminadas (BATISTELLI, 2013; COUTO, 2013). Essa característica é de fácil utilização e pode ter alta eficiência uma vez que plantas haploides, geralmente, apresentam menor vigor.

2.3.2 Contagem cromossômica

Outra maneira de verificar a haploidia em milho é a realização da análise mitótica. Dentre as ferramentas citogenéticas, a mais simples é a contagem cromossômica. Essa é uma técnica que não necessita de equipamentos e reagentes de alto custo, é bastante confiável, uma vez que é possível visualizar a quantidade de cromossomos do indivíduo em estudo. Contudo exige habilidade na confecção das lâminas.

Os estudos com contagem cromossômica em milho iniciaram-se há muito tempo. Kuwada (1911) observou uma variação no número cromossômico, de 12 e 10, para variedades de grãos doces e amarelos, respectivamente. No entanto o milho (*Zea mays* L.) é considerado uma planta tipicamente diploide ($2n = 20$), que pode apresentar algumas variações naturais, como, por exemplo, a ocorrência de haploides ($2n=10$).

A maioria dos estudos, envolvendo o uso da colchicina, diz respeito à duplicação cromossômica dos haploides para o desenvolvimento das plantas DH (BATISTELLI et al., 2013; COUTO et al., 2015; HANTZSCHEL; WEBER, 2010). Não encontramos relatos sobre a obtenção de lâminas para a contagem

cromossômica de haploides em milho. Para a realização da contagem cromossômica, é importante realizar preparações citológicas com alta frequência de metáfases. Dessa maneira, torna-se necessário o estabelecimento de protocolos de contagem cromossômica de haploides em milho.

2.3.3 Citometria de fluxo

Com o objetivo de aumentar a eficiência e a acurácia na identificação da ploidia das plantas, a citometria de fluxo vem sendo utilizada em diversas espécies de plantas, como *Medicago sativa* (BRUMMER; CAZCARRO; LUTH, 1999), *Bromus ssp.* (TUNA et al., 2001) e *Dioscorea alata* (EGESI, 2002).

O primeiro estudo foi realizado para a quantificação de DNA em células humanas (KAMENTSKY; MELAMED; DERMAN, 1965). Posteriormente, foram feitas tentativas em vegetais, no entanto, inicialmente, os pesquisadores encontraram algumas dificuldades no ajuste de protocolos para o preparo de suspensões. A primeira citometria de fluxo com sucesso em vegetais foi realizada em feijão por Heller (1973).

A citometria de fluxo é bastante precisa e permite a quantificação de dezenas de amostras por dia (FRITSCHÉ-NETO; GARBUGLIO; BORÉM, 2012). Além disso, a quantificação de DNA por citometria de fluxo é um método não destrutivo e é capaz de detectar mixoploidias (LOUREIRO; SANTOS, 2004).

A técnica de citometria de fluxo é baseada na análise de propriedades óticas, como a dispersão da luz e a fluorescência de partículas, como núcleos, organelas, células e cromossomos, que fluem em uma suspensão líquida. As partículas em suspensão movem-se no tampão de extração, no interior de um capilar, dentro do citômetro de fluxo. Essas partículas interceptam, uma a uma, um feixe de laser, ocorrendo um processo de dispersão da luz ou emissão de fluorescência. Dessa forma, verificam-se, simultaneamente, as distribuições dos

valores da frequência ou densidade de cada parâmetro. Os sinais gerados pelas partículas são convertidos em valores digitais, armazenados e exibidos na forma de histogramas (DOLEZEL, 1997).

O nível de ploidia é avaliado por esta técnica uma vez que se pode mensurar o conteúdo de DNA dos núcleos, fazer comparações intra e interespecíficas do tamanho nuclear, avaliar o teor de DNA de cada cromossomo do complemento de uma dada espécie, realizar estudos do ciclo celular, fazer análises de citogenotoxicidade, entre outros (HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2001).

Os histogramas são obtidos no citômetro de fluxo a partir de um pico referente à fase G1 e G2 do ciclo celular. Nos eucariontes, o crescimento e a divisão celular são processos cíclicos. Basicamente, o tempo entre cada mitose encontra-se dividido em três fases: G1, S e G2. Durante a fase G1, período de crescimento celular, uma célula diploide apresenta um conteúdo 2C, apresentando, assim, duas cópias de cada cromossomo. Durante a fase S, ocorre a duplicação do genoma nuclear, apresentando, assim, um conteúdo 4C. Na fase seguinte, denominada de G2, em que ocorre o segundo período de crescimento celular, o conteúdo de DNA é mantido (4C). Em seguida, ocorre a mitose, denominada fase M, em que a célula se divide formando duas células filhas, cada uma com um conteúdo 2C de DNA (RAMALHO; FERREIRA; OLIVEIRA, 2012). Quando uma planta está em desenvolvimento, com as células em divisão, o número de núcleos na fase G1 é maior do que na G2. Assim, quando os citômetros realizam as leituras, os histogramas são obtidos de maneira que se observa um pico de maior intensidade em razão da fase G1 do ciclo celular, enquanto, normalmente, a fase G2 apresenta um pico de menor intensidade.

A quantificação do nível de ploidia por citometria de fluxo é realizada por meio da intensidade de fluorescência emitida pelos núcleos corados com

fluorocromos específicos para DNA. E a estimativa do nível de ploidia é realizada, comparando-se os picos G1 do histograma de uma amostra, com o pico de uma amostra de planta padrão com o nível de ploidia conhecido (DOLEZEL, 1997). Esta técnica é uma das mais empregadas em estudos envolvendo DH em milho (BELICUAS et al., 2004; DANG et al., 2012; GEIGER; SCHONLEBEN, 2011; RABEL, 2008). Batistelli et al. (2013) utilizaram a citometria de fluxo e marcadores moleculares microsatélites para confirmar a ploidia de indivíduos DH. Observaram que todas as plantas confirmadas como haploides pela citometria de fluxo foram, também, assim identificadas por meio dos SSR.

2.3.4 Uso de marcadores moleculares de DNA

Os marcadores moleculares podem ser uma ferramenta bastante útil para o melhoramento vegetal, especialmente, quando há interesse do estudo em nível de DNA. Por exemplo, a única maneira de confirmar a ploidia das plantas seria por meio de técnicas laboratoriais, de quantificação de DNA ou contagem cromossômica, como comentado anteriormente. Ou, então, visualizar as bandas desse DNA e comparar com os genótipos parentais dessa planta para confirmar se essas plantas apresentam bandas somente de um ou de ambos os genitores.

Os microsatélites, ou Simple Sequence Repeats (SSR), correspondem a um grupo de marcadores de amplificação, o qual utiliza a técnica denominada de polymerase chain reaction (PCR). Essa técnica envolve a síntese enzimática in vitro de múltiplas cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase e posterior visualização em gel de agarose ou poliacrilamida sob eletroforese. Além disso, as sequências de DNA que flanqueiam esses marcadores são, geralmente, conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, permitindo a seleção de primers específicos que amplificam fragmentos contendo o DNA repetitivo em todos os genótipos.

Assim, cada SSR constitui um loco genético altamente variável, multialélico e de grande conteúdo informativo (SILVA, 2009).

Os SSR possuem de 1 a 6 nucleotídeos repetidos de 10 a 60 vezes em tandem, ao longo da molécula de DNA, amplamente distribuídas nos genomas eucariotos, que são flanqueadas por regiões conservadas entre indivíduos da mesma espécie (BORÉM; CAIXETA, 2009). A preferência por estes marcadores deve-se à agilidade da PCR. Além disso, são codominantes, permitindo distinguir locos heterozigotos de homozigotos e estão espalhados, ao acaso no genoma, com uma frequência relativamente alta. Por isso e pela estabilidade da herança mendeliana dos locos SSR, é possível que este seja uma alternativa interessante na diferenciação de indivíduos haploides dos F1 heterozigotos. Belicuas et al. (2007), Couto et al. (2013) e Rabel (2008) realizaram a identificação de haploides em milho com o uso desses marcadores. Já Battisteli (2012) e Couto (2013) a utilizaram para confirmação da obtenção de linhagens duplo-haploides.

2.4 Duplicação cromossômica em haploides de milho

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

A duplicação cromossômica espontânea ocorre numa frequência muito baixa e depende muito do background genético (CHAIKAM; MAHUKU, 2012).

Normalmente esta taxa é de 0 a 10%. Para que a duplicação cromossômica tenha alta frequência, plantas haploides são tratadas com compostos químicos denominados de inibidores mitóticos. Esses compostos químicos alteram a mitose de tal forma que uma única célula com o dobro do número de cromossomos é resultado da divisão celular.

Um composto químico bastante utilizado nesse caso é a colchicina, a qual é um alcaloide solúvel em água, produzido pelos bulbos da espécie *Colchicum autumnale*. Na presença de colchicina, a replicação cromossômica ocorre, normalmente, durante a interfase. Mas, durante a metáfase, a colchicina se liga à tubulina e inibe a polimerização dos microtúbulos 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).

A duplicação cromossômica era considerada uma restrição, na produção de linhagens DH, em escala comercial. Mas muitos métodos de duplicação cromossômica têm sido publicados. Um importante avanço no protocolo de duplicação foi realizado por Deimling, Rober e Geiger (1997) e Gayen et al. (1994), que reduziram o comprimento das raízes das plântulas haploides e deixaram-nas submersas em solução contendo colchicina e dimetilsulfóxido (DMSO). Outro método utilizado para duplicação foi proposto por Zabirova et al. (1996), em que se injetou na planta a solução de colchicina, a cerca de 3 a 5 mm do ápice da planta.

Batistelli et al. (2013) e Chalyk (2000), utilizando haploides maternos de milho, compararam a eficiência dos métodos citados e avaliaram, também, a porcentagem de linhagens DH com pendão fértil, para verificar se a fertilidade das plantas é alterada, após a exposição das plantas ao agente químico de duplicação. Ambos os estudos concluíram que o método proposto por Deimling, Rober e Geiger (1997) permitiu uma maior obtenção de haploides férteis

duplicados em ambos os estudos. Batistelli et al. (2013) e Chalyk (2000) observaram uma taxa de duplicação de 29% a 32% e 59% a 80%, respectivamente.

Couto et al. (2015) testaram dois protocolos de duplicação. Um deles foi o sugerido por Chaikam e Mahuku (2012), em que se sugere a utilização de uma solução com 0,04% de colchicina e 0,5% de DMSO, para mergulhar as plantas por 12 horas, no escuro a 20°C. No segundo protocolo, somente as raízes são submersas, em uma solução contendo 0,1% de colchicina, 0,1% de DMSO e 0,1% de Tween 20, por um período de 6 horas, na presença de luz, em temperatura média de 22°C. Couto et al. (2015) observaram uma maior taxa de plantas duplicadas, para o segundo protocolo, de 69,33%, quando comparado ao protocolo 1, de 51,32%.

2.5 Estratégias de seleção utilizadas no melhoramento do milho

A identificação de progênies indutoras de haploidia superiores requer métodos de seleção eficientes, visando à maximização dos ganhos genéticos para a característica de interesse. Além disso, esses métodos permitem a predição de ganhos a serem obtidos por cada estratégia de melhoramento. Diversos métodos de seleção podem ser empregados em milho, com destaque para a seleção entre e dentro de famílias de meios-irmãos (LEMOS et al., 1990; MIRANDA et al., 1977), seleção recorrente intrapopulacional em famílias de meios-irmãos (RANGEL et al., 2011; SANTOS, 2007), seleção recorrente recíproca para obtenção de híbridos (FARIA et al., 2008; RAPOSO; RAMALHO, 2004; REIS, 2009), entre outros.

Em experimentos de avaliação de progênies, pode-se adotar a seleção em dois estágios distintos. Na seleção entre e dentro de progênies, denominado por Paterniani (1967), inicialmente, selecionam-se as melhores progênies e, em seguida, os melhores indivíduos dentro delas. Segundo esses autores, deve-se

obter o ranking das médias das progênie, procedendo-se à seleção das melhores. Posteriormente, realiza-se o ranqueamento dos indivíduos dentro de cada progênie.

Uma das críticas que se pode fazer a esse tipo de seleção é o fato de que indivíduos superiores de progênie intermediárias ou indivíduos intermediários de progênie superiores não sejam eventualmente considerados na seleção. Além disso, com o aumento da endogamia, a eficiência da seleção entre progênie diminui, por causa da menor proporção da variância aditiva entre. Uma alternativa a isso é realizar a seleção dos melhores indivíduos independentemente da progênie, o que podemos denominar de seleção dentro. Arnhold e Soriano (2007) avaliaram esse tipo de seleção e obtiveram ganhos maiores para capacidade de expansão e produtividade de grãos em milho pipoca.

Outra alternativa seria considerar a seleção das melhores progênie e levar, para a geração seguinte, todas as plantas das melhores progênie. Vilarinho et al. (2003) analisaram a eficiência da seleção de famílias S_1 e S_2 de milho-pipoca, visando à obtenção de linhagens e recomendaram o uso do índice de Mulamba e Mock na seleção simultânea em capacidade de expansão e produção. Santos et al. (2004), também, avaliaram a eficiência de diferentes estratégias de seleção de famílias S_2 de milho-pipoca, sendo a melhor, com base em ganhos preditos, a seleção entre e dentro de famílias, simultaneamente, em capacidade de expansão e produção de grãos, com o auxílio do índice Mulamba e Mock. Arnhold e Soriano (2007) analisaram os ganhos preditos para capacidade de expansão e produção de grãos na seleção de 35 e 70 famílias S_4 de milho-pipoca. Nesse estudo, os autores verificaram um maior ganho predito na seleção das 35 melhores famílias para ambos os caracteres.

2.6 Seleção indireta de caracteres

Geralmente os diversos caracteres de importância econômica estão correlacionados entre si, em magnitude e sentido variados. Tal fato implica que a seleção em um caráter pode proporcionar alterações em outros, cujo sentido pode ser de interesse do melhoramento. Assim, a quantificação dos efeitos indiretos da seleção de uma característica sobre outras secundárias é fundamental para que se possa orientar os programas de melhoramento para se obter ganhos em caracteres de grande importância, mas por questões de complexidade, facilidade de identificação e, ou, mensuração, a seleção é praticada em caracteres secundários. Um dos caracteres mais avaliados em trabalhos envolvendo duplo-haploides é o marcador morfológico das sementes R1-navajo. Dessa forma, levar em consideração esse caráter na seleção, independentemente da coloração do embrião, pode levar a ganhos genéticos no caráter de maior interesse, indução de haploidia.

Para tal objetivo, a utilização de índices de seleção parece ser uma alternativa eficiente, pois permite combinar as múltiplas informações contidas na análise experimental, de modo que seja possível a seleção com base em um complexo de variáveis que reúna vários atributos de interesse econômico. Smith (1936) propôs o uso de índice de seleção, nos programas de melhoramento de plantas, como critério de seleção simultânea de duas ou mais características correlacionadas. Este procedimento foi adaptado ao ramo animal por Hazel (1943). Segundo esses autores, para se estabelecer o índice de seleção, são necessários o valor econômico relativo de cada característica, as variâncias genotípica e fenotípica de cada característica e as covariâncias fenotípica e genotípica entre cada par de características. Tal índice passou a ser reconhecido como Índice Clássico.

Os componentes da produção de grãos em milho, como comprimento de espiga, número de fileiras de grãos por espiga, número de grãos por planta, entre

vários outros, correspondem a um dos exemplos mais comuns, em que são levados em consideração na seleção para se ter ganhos na produtividade de grãos. Ribeiro, Ramalho e Prado (2014) e Toledo et al. (2011) observaram que o número de grãos por planta é um dos componentes da produção que mais influencia na produtividade de grãos de milho. Outro exemplo bastante comum em milho é o caso da capacidade de expansão e produtividade de grãos em milho-pipoca. Arnhold e Soriano (2007) avaliaram o efeito da seleção para produção de grãos na capacidade de expansão de milho-pipoca e vice-versa. Esses autores concluíram que é justificável realizar a seleção na produção de grãos para também se ter ganho na capacidade de expansão, dependendo do critério de seleção utilizado.

3 CONCLUSÕES

Além do marcador morfológico R-navajo, outras características podem ser utilizadas para a identificação de haploides, como a coloração, comprimento de raiz e vigor das plantas.

A citometria de fluxo, contagem cromossômica e uso de marcadores moleculares podem ser potenciais ferramentas para confirmação de haploides e diploides em milho.

A utilização de protocolos de duplicação cromossômica de plantas de milho utilizando a colchicina pode ser eficiente.

A avaliação de diferentes estratégias de seleção de progênies e de plantas deve ser levada em consideração na obtenção de linhagens indutoras de haploidia.

O uso da seleção indireta para caracteres complexos, como a indução de haploidia, pode ser uma boa alternativa para obtenção de ganhos genéticos.

REFERÊNCIAS

ARNHOLD, E.; SORIANO, V. J. M. Eficiência da seleção dentro de famílias S de milho-pipoca, visando à obtenção de linhagens. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 54, n. 312, p. 108-112, 2007.

BATISTELLI, G. M. **Estratégias para obtenção e identificação de duplo-haplóides em milho tropical**. Lavras: Ed. UFLA, 2012. 61 p.

BATISTELLI, G. M. et al. Production and identification of doubled haploids in tropical maize. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, p. 4230-4242, Apr. 2013.

BELICUAS, P. R. et al. Androgenetic haploids and SSR markers as tools for the development of tropical maize hybrids. **Euphytica**, Wageningen, v. 156, n. 1, p. 95-102, July 2007.

BELICUAS, P. R. et al. Obtenção de identificação de haploides androgenéticos em plantas de milho. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 25., 2004, Cuiabá. **Anais...** Cuiabá, 2004. 1 CD-ROM.

BORDES, J. et al. Doubled haploid versus S1 family recurrent selection for testcross performance in a maize population. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 112, n. 6, p. 1063-1072, Sept. 2006.

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2009. 532 p.

BRUMMER, E. C.; CAZCARRO, P. M.; LUTH, D. Ploidy determination of alfalfa germplasm accessions using flow cytometry. **Crop Science**, Madison, v. 39, p. 1202-1207, 1999.

BYLICH, V. G.; CHALYK, S. T. Existence of pollen grains with a pair of morphologically different sperm nuclei as a possible cause of the haploidinducing capacity in ZMS line. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 70, p. 33, 1996.

CHAIKAM, V. et al. Analysis of effectiveness of R1-nj antocyanin marker for in vivo haploid identification in maize and molecular markers for predicting the inhibition of R1-nj expression. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 128, n. 1, p. 159-171, 2016.

CHAIKAM, V.; MAHUKU, G. Chromosome doubling of maternal haploids. In: _____. **Doubled haploid technology in maize breeding theory and practice**. Mexico: CIMMYT, 2012. p. 24-29.

CHAIKAM, V.; MAHUKU, G.; PRASANNA, B. M. Design and implementation of maternal haploid induction. In: _____. **Doubled haploid technology in maize breeding theory and practice**. Mexico: CIMMYT, 2012. p. 14-19.

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

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

CHALYK, S. T.; ROTARENCO, V. A. Using maternal haploid plants in recurrent selection in maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 73, p. 56-57, 1999.

CHANG, M. T.; COE, E. H. Doubled haploids. In: _____. **Molecular genetic approaches to maize improvement**. Berlin: Springer Verlag, 2009. p. 127-142. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 63).

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

CHASE, S. S. Monoploids and monoploid: derivatives in maize (*Zea mays* L.). **The Botanical Reviews**, New York, v. 35, p. 117-167, 1969.

CHASE, S. S. **Monoploids in maize**. Ames: Iowa State College Press, 1952. 399 p.

CHASE, S. S. Production of monozygous diploids of maize from monoploids. **Agronomy Journal**, Madison, v. 44, p. 263-267, 1951.

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

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

CHEN, S.; LI, L.; LI, H. **Maize doubled haploid breeding**. Beijing: China Agricultural University Press, 2009. 384 p.

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

COUTO, E. **Indução de haploides e duplicação cromossômica em milho**. Lavras: Ed. UFLA, 2013. 104 p.

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

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

DANG, N. C. et al. Inducer line generated double haploid seeds for combined waxy and opaque 2 grain quality in subtropical maize (*Zea mays* L.). **Euphytica**, Wageningen, v. 183, n. 4, p. 153-160, Apr. 2012.

DEIMLING, S.; ROBER, F.; GEIGER, H. H. Methodik und genetic der in-vivo-Haploideinduktion bei mais. **Vortrage fur Pflanzenzuchtung**, Quedlinburg, v. 38, p. 203-224, 1997.

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

EDER, J.; CHALYK, S. T. In vivo haploid induction in maize. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 104, n. 20, p. 703-708, Aug. 2002.

EGESI, C. N. Ploidy analysis in water yam, *Dioscorea alata* L. germplasm. **Euphytica**, Wageningen, v. 128, n. 2, p. 225-230, Nov. 2002.

FARIA, V. R. et al. Seleção recorrente recíprova na obtenção de híbridos interpopulacionais de milho-pipoca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 12, p. 1749-1755, dez. 2008.

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

FORSTER, B. P.; THOMAS, W. T. B. Doubled haploids in genetics and plant breeding. **Plant Breeding Reviews**, New York, v. 25, n. 3, p. 57-88, Mar./Apr. 2005.

FRITSCHÉ-NETO, R.; GARBUGLIO, D. D.; BORÉM, A. Duplo-haploides. In: BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. (Ed.). **Biotechnologia aplicado ao melhoramento de plantas**. Viçosa, MG: UFV, 2012. p. 267-301.

GAYEN, P. et al. Chromosome doubling in haploids through colchicine. **Maize Genetics Cooperation News Letter**, Columbia, v. 68, n. 1, p. 65, 1994.

GEIGER, H. H.; GORDILLO, G. A. Doubled haploids in hybrid maize breeding. **Maydica**, Bergamo, v. 54, n. 1, p. 485-499, Jan. 2009.

GEIGER, H. H.; SCHONLEBEN, M. Incidence of male fertility in haploid elite dent maize germplasm. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 85, n. 7, p. 35, 2011.

HALLAUER, A. R.; MIRANDA, F. J. B. **Quantitative genetics in maize breeding**. Ames: Iowa State University Press, 1988. 468 p.

HANTZSCHEL, K. R.; WEBER, G. Blockage of mitosis in maize root tips using colchicine-alternatives. **Protoplasma**, Karlsruhe, v. 241, n. 1, p. 99-104, May 2010.

HAZEL, H. N. The genetic basis for constructing selection indexes. **Genetics**, Menasha, v. 28, n. 6, p. 476-490, 1943.

HECKENBERGER, M.; BOHN, M.; MELCHINGER, A. E. Identification of essentially derived varieties obtained from biparental crosses of homozygous lines: I, simple sequence repeat data from maize inbreds. **Crop Science**, Madison, v. 45, n. 2, p. 1120-1131, Feb. 2005.

HELLER, F. O. DNS-Bestimmung an Keimwurzeln von *Vicia faba* L. mit Hilfe der Impulscytophotometrie. **Bericht der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, Holtfreter, v. 86, p. 437-441, 1973.

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

IVANOV, C. B. et al. Cell division activation in the Quiescent Center of Excised Maize Root Tip. **Russian Journal of Developmental Biology**, New York, v. 42, n. 5, p. 357-362, Sept. 2011.

KAMENSKY, L. A.; MELAMED, M. R.; DERMAN, H. Spectrophotometer: new instrument for ultrarapid cell analysis. **Science**, New York, v. 150, p. 630-631, 1965.

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

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

KUWADA, Y. Meiosis in the pollen mother cells of *Zea Mays* L. **Botanical Magazine**, Tokyo, v. 25, p. 163-181, 1911.

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

LEMOS, M. A. et al. Seleção entre e dentro de famílias de meio-irmãos no milho Dentado Composto visando resistência à *Spodoptera frugiperda* e à *Heliothis zea*; II ciclo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 1, p. 95-101, jan. 1990.

LI, L. et al. Morphological and molecular evidence for DNA introgression in a haploid induction via high oil inducer CAUHOI in maize. **Planta**, Berlin, v. 230, n. 1, p. 367-376, May 2009.

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

LOUREIRO, J.; SANTOS, C. Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal. **Boletim de Biotecnologia**, São Paulo, v. 77, n. 1, p. 18-29, jan. 2004.

MIRANDA, L. T. et al. Oito ciclos de seleção entre e dentro de famílias de meios irmãos no milho IAC-1. **Bragantia**, Campinas, v. 36, n. 18, p. 187-196, 1977.

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

PATERNIANI, E. Selection among and within half-sib families in a Brazilian population of maize (*Zea mays* L.). **Crop Science**, Madison, v. 7, p. 212-216, 1967.

PATERNIANI, E.; CAMPOS, M. S. Melhoramento do milho. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa, MG: UFV, 1999. p. 429-485.

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

PRASANNA, B. M. Doubled haploid (DH) technology in maize breeding: an overview. In: _____. **Doubled haploid technology in maize breeding theory and practice**. Mexico: CIMMYT, 2012. p. 1-8.

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

PRIGGE, V.; MELCHINGER, A. E. Production of haploids and doubled haploids in maize. **Methods in Molecular Biology**, New Jersey, v. 877, n. 4, p. 161-172, Apr. 2012.

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

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

RANGEL, R. M. et al. Análise biométrica de ganhos por seleção em população de milho pipoca de quinto ciclo de seleção recorrente. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 2, p. 473-481, abr./jun. 2011.

RAPOSO, F. V.; RAMALHO, M. A. P. Componentes de variância genética de populações derivadas de híbridos simples de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 3, n. 3, p. 402-413, 2004.

REIS, M. C. Progresso genético com a seleção recorrente recíproca para híbridos interpopulacionais de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 12, p. 1667-1672, dez. 2009.

RIBEIRO, C. B.; RAMALHO, M. A. P.; PRADO, P. E. R. Contribuição dos caracteres vegetativos e reprodutivos da planta de milho para a heterose na produção de grãos. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 13, n. 1, p. 59-68, 2014.

ROBER, 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. 2, p. 275-283, Feb. 2005.

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

ROTARENCO, V. A.; CHALYK, S. T.; EDER, J. Utilization of maize haploids plants in a recurrent selection procedure. **Journal of Genetics Breeding**, Pakistan, v. 58, n. 3, p. 61-72, Mar. 2004.

ROTARENCO, V. A.; EDER, J. Possible effects of heterofertilization on the induction of maternal haploids in maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 77, n. 2, Feb. 2003. Disponível em: <<http://www.maizegbd.org>>. Acesso em: 10 mar. 2015.

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

ROTARENCO, V. A. et al. Selection and breeding experiments at the haploid level in maize (*Zea mays* L.). **Journal of Plant Breeding and Crop Science**, Victoria, v. 4, n. 5, p. 72-79, Mar. 2012.

ROTARENCO, V. A.; KIRTOCA, I. H.; JACOTA, A. G. Possibility to identify kernels with haploid embryo by oil content. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 81, n. 2, Mar. 2007. Disponível em: <<http://www.agron.missouri.edu/mnl/81/mnl81.pdf>>. Acesso em: 1 mar. 2016.

SANTOS, F. S. Predição de ganhos genéticos por índices de seleção na população de milho-pipoca UNB-2U sob seleção recorrente. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 3, p. 389-396, 2007.

SANTOS, J. F. et al. Efficiency of S2 progeny selection strategies in popcorn. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 5, n. 2, p. 183-191, June 2004.

SARKAR, K. R. et al. Stabilization of high haploid inducer lines. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 68, n. 1, p. 64-65, 1994.

SCHMIDT, W. Hybrid maize breeding at KWS SAAT AG. In: BERICHT UBER DIE ARBEITSTAGUNG DER VEREINIGUNG DER PFLANZENZUCHTER UND SAATGUTKAUFLEUTE OSTERREICHS, 2003, Gumpenstein. **Proceedings...** Gumpenstein, 2003. p. 1-6.

SEITZ, G. The use of doubled haploid in corn breeding. In: ANNUAL ILLINOIS CORN BREEDERS' SCHOOL, 41., 2005, Urbana. **Proceedings...** Urbana, 2005. p. 1-7.

SHATSKAYA, O. A. Haploinductors isolation in maize: three cycles of selection on high frequency of induction of matroclinal haploids. **Agricultural Biology**, Krasnodar, n. 5, p. 79-86, Aug. 2010.

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

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

SMITH, H. F. A discriminant function for plant selection. **Annals of Eugenics**, London, v. 7, p. 240-250, 1936.

TOLEDO, F. H. R. B. et al. Inheritance of kernel row number, a multicategorical threshold trait of maize ears. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 10, n. 3, p. 2133-2139, 2011.

TUNA, M. et al. DNA content and ploidy determination of bromegrass germoplasm accessions by flow cytometry. **Crop Science**, Madison, v. 41, p. 1629-1634, May 2001.

VILARINHO, A. A. et al. Eficiência da seleção de progênies S1 e S2 de milho-pipoca, visando à produção de linhagens. **Bragantia**, Campinas, v. 62, n. 1, p. 9-17, jan. 2003.

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

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

ZHANG, Z. et al. Chromosome elimination and in vivo haploid production induced by Stock 6-derived inducer line in maize (*Zea mays* L.). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 27, n. 12, p. 1851-1860, Sept. 2008.

CAPÍTULO 2 ESTRATÉGIAS DE SELEÇÃO DE HAPLOIDIA EM MILHO TROPICAL USANDO O MARCADOR R-NAVAJO

RESUMO

O objetivo foi comparar a seleção de indivíduos por diferentes estratégias envolvendo a seleção entre, entre e dentro e somente dentro das progênies indutoras, bem como o efeito da seleção indireta para plantas com endosperma roxo na indução de haploides. Foram avaliadas 14 progênies $S_{0:1}$ e 7 progênies $S_{2:3}$ de milho quanto à taxa de indução de haploidia. Os experimentos foram conduzidos na área experimental do Departamento de Biologia da UFLA, em Lavras-MG, no ano agrícola 2012/2013 e 2014/2015. Foi conduzido um experimento em cada safra e o delineamento utilizado, em ambos, foi o inteiramente casualizado, com uma e duas repetições, na safra 2012/2013 e 2014/2015, respectivamente. Foram avaliadas as características indução de haploidia e endosperma roxo, das progênies em cruzamento com o híbrido simples GNZ9501. As progênies 2 e 6 se mostraram efetivas na indução de haploides em ambas as safras. A seleção entre e dentro de progênies apresentou maiores ganhos genéticos para a indução de haploidia. Os resultados obtidos mostraram que as plantas dentro das progênies possuem grande variabilidade genética para indução de haploidia e endosperma roxo. Dessa forma, é possível conduzir a seleção indireta para plantas com endosperma roxo e indução de haploidia.

Palavras-chave: Milho tropical. *Zea mays*. Haploides. Seleção entre e dentro de progênies. Indução de haploidia.

ABSTRACT

The objective was to compare the selection of individuals for different strategies involving selection among, between and within and only within the inducer progenies as well as the effect of indirect selection for purple induction. Fourteen $S_{0:1}$ progenies and seven $S_{2:3}$ were evaluated in relation to their haploid and purple induction rate in a cross with the GNZ9501 simple hybrid. The experiments were conducted in the experimental area of the Department of Biology of UFLA in Lavras, Minas Gerais, in the agricultural year 2012/2013 and 2014/2015. An experiment was conducted in each year, and the design used in both was completely randomized, with one and two replications in the 2012/2013 and 2014/2015, respectively. Progenies 2 and 6 proved effective in haploid induction in both years. The selection among and within progenies showed higher genetic gains for haploid induction. The results showed that the plants within progenies have high genetic variability for haploid and purple induction. Thus, it is possible to lead to indirect selection for plants with purple endosperm and haploid induction.

Palavras-chave: Tropical maize. *Zea mays*. Haploids. Selection between and within progeny. Haploid induction.

1 INTRODUÇÃO

Na cultura do milho, o método in vivo é o mais utilizado para obtenção de linhagens duplo-haploides. Essa metodologia envolve, basicamente, três etapas principais: identificação e duplicação cromossômica dos haploides e autofecundação dos duplo-haploides. No entanto cada uma dessas etapas pode ser ineficiente, se não conduzida de maneira adequada, resultando em um processo ineficaz.

Uma das maneiras de aumentar a eficiência desse processo é aumentar a taxa de indução de haploidia. A indução haploide in vivo em milho tem tido muito sucesso e tem sido utilizada extensivamente nos programas de melhoramento de milho comercial (CHAIKAM, 2012). Inicialmente, os haploides ocorriam naturalmente em plantações de milho numa frequência de 0,01% (CHASE, 1951). A descoberta das linhagens Stock 6 e W23 (COE, 1959), além de outras atuais linhagens indutoras, como a ZMS, KMS e MHI (CHALYK, 1999), por exemplo, revolucionaram a aplicação da tecnologia DH no melhoramento de milho, principalmente, porque foi possível a obtenção de taxas de até 8% de indução.

Para a obtenção de linhagens indutoras com performance superior, é importante a utilização de eficientes estratégias para obtenção de progressos genéticos expressivos para a característica considerada.

Muitos estudos de herança mostraram que a indução in vivo de haploides maternos possui controle poligênico (DEIMLING; ROBER; GEIGER, 1997; LASHERMES; BECKERT, 1988; RÖBER; GORDILLO; GEIGER, 2005). Além disso, nas populações segregantes, foi demonstrado que a expressão do alelo responsável da haploidia possui penetrância incompleta (BARRET; BRINKMANN; BECKERT, 2008). Uma das estratégias de seleção consiste na seleção direta entre progênies, a entre e dentro, simultaneamente, e a outra é efetuar a seleção dentro das progênies avaliadas. Estes três tipos de

seleção consistem em uma excelente alternativa para os programas de melhoramento, pois é possível comparar a seleção realizada entre as melhores progênies quanto aos melhores indivíduos dentro das progênies (MARTINS et al., 2005).

A eficiência da seleção, também, pode ser maximizada pelo uso de procedimentos estatísticos robustos, como a análise de modelos binomiais mistos, especialmente em casos de experimentos de avaliação com elevado desbalanceamento de dados (RESENDE, 2002), frequentemente, encontrada no caso da indução haploidia uma vez que é uma característica dependente da fertilização adequada e de vários outros fatores ambientais. Além disso, especificamente no caso de modelos binomiais, o seu uso se intensificou (BATISTELLI et al., 2013; COUTO, 2013) pela característica dos dados.

Apesar de relatos sobre melhores indutores de haploidia com taxas de até 8%, são poucas as informações sobre parâmetros genéticos, bem como sobre estratégias de melhoramento para obtenção de linhagens e/ou híbridos com boas taxas de indução. Neste contexto, foi realizado o presente trabalho, com o objetivo de comparar a seleção de indivíduos por diferentes estratégias envolvendo a seleção entre, entre e dentro e a dentro de progênies indutoras $S_{0:1}$ e $S_{2:3}$ de haploidia em milho tropical.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área experimental e genótipos avaliados

Os experimentos foram conduzidos na área experimental do Departamento de Biologia do município de Lavras (MG), da Universidade Federal de Lavras (UFLA), situada a 918m de altitude, nas coordenadas 21°14'30'' de latitude Sul e a 45°00'10'' de longitude Oeste, em duas safras 2012/2013 e 2014/2015.

Na safra 2012/2013, 14 progênies indutoras de haploidia, gimnogenéticas, da geração $S_{0:1}$, foram avaliadas quanto à indução de haploidia no híbrido GNZ9501, em um experimento em delineamento inteiramente casualizado com uma repetição. Essas progênies foram selecionadas a partir de uma população S_0 indutora, oriunda do cruzamento da linhagem KEMS (SHATSKAYA et al., 1994) com outras linhagens de origens diversas. A semeadura das progênies e do híbrido foi feita, no dia 23 de Novembro de 2012 e foram distribuídas duas sementes por cova, em linhas de 3 metros, espaçadas de 80 centímetros (cm) e 50 cm entre plantas. Aproximadamente, 25 dias após a emergência das plantas, foi realizado o desbaste, deixando-se apenas uma planta por cova ou duas plantas por metro linear.

Cada progênie $S_{0:1}$ foi autofecundada e cruzada com o híbrido simples GNZ9501. As progênies indutoras foram utilizadas como parental masculino, uma vez que apresentam o sistema gimnogenético de indução de haploidia. Para garantir a sincronia de florescimento, as sementes do híbrido simples foram semeadas em quatro datas diferentes, 23 e 30 de Novembro e 7 e 14 de Dezembro de 2012, ou seja, com intervalo de uma semana entre cada data. Todas as plantas indutoras foram identificadas de acordo com sua progênie e data de semeadura. Dessa maneira, quando cada cruzamento foi realizado, foram anotadas informações de planta, progênie e data de plantio.

Na safra 2013/2014, as melhores progênie foram novamente autofecundadas. Portanto obteve-se, assim, a geração $S_{2:3}$. Na safra de 2014/2015, foi conduzido outro experimento, em um delineamento inteiramente casualizado com duas repetições, para avaliação da indução de haploidia dessas 7 melhores progênie $S_{2:3}$ com o híbrido simples GNZ9501. As repetições consistiram na polinização de duas plantas diferentes do GNZ9501 com o pólen de uma mesma planta indutora $S_{2:3}$. Cada planta $S_{2:3}$ foi, também, autofecundada. Todas as plantas indutoras foram identificadas de acordo com sua progênie. Dessa maneira, quando cada cruzamento foi realizado, foram anotadas informações de planta e progênie.

Esse experimento foi instalado, no dia 28 de Novembro de 2014, quando ocorreu a semeadura. Foram distribuídas duas sementes por cova, em linhas de 6 metros, com espaçamento entre linhas de 80 cm e entre plantas de 60 cm. Foi realizado o desbaste, 25 dias após a semeadura, para manter uma população de uma planta por cova. Para garantir a sincronia de florescimento, as sementes do híbrido simples GNZ9501 foram semeadas, em quatro datas diferentes, com intervalo de uma semana entre cada uma, ou seja, nos dias 28 de Novembro, 5, 12 e 19 de Dezembro de 2014.

Em ambas as safras, foi realizada a adubação de semeadura de 500 kg/ha do formulado 10-30-10 e, em cobertura, foram aplicados 500kg/ha de 20-0-20 após o desbaste. Os demais tratos culturais foram realizados conforme recomendação para a cultura do milho.

As sementes provenientes dos cruzamentos com o híbrido comercial GNZ9501 foram avaliadas quanto à coloração roxa do endosperma e do embrião. Sementes com endosperma roxo e embrião branco foram consideradas haploides, conforme metodologia descrita por Chase e Nanda (1965). Também foram contabilizadas as sementes com endosperma e embrião roxo, consideradas como sementes roxas, bem como as sementes que não apresentaram a coloração

roxa, para que fosse possível a obtenção do número total de sementes obtidas por planta. As sementes que estavam muito cobertas por fungo foram eliminadas uma vez que dificulta a discriminação da coloração do endosperma. Dessa maneira, foram avaliadas duas características diferentes:

Característica 1: Indução de haploidia = (número de sementes haploides/número total de sementes) x 100.

Em que:

Número de sementes haploides = sementes com endosperma roxo e embrião branco.

Número total de sementes = sementes haploides + sementes roxas + sementes sem coloração roxa.

Característica 2: Indução de roxos = (número de sementes roxas/número total de sementes) x 100.

Em que:

Número de sementes roxas: sementes com endosperma roxo e embrião roxo.

Número total de sementes = sementes haploides + sementes roxas + sementes sem coloração roxa.

2.2 Análise estatística dos dados

As análises foram realizadas utilizando-se a abordagem de modelos lineares generalizados mistos (MLGM). Para avaliação dos dados de indução de haploidia da safra 2012/2013 e 2014/2015, foram empregados, respectivamente, os seguintes modelos MLGM binomiais com a função de ligação *logit*:

$$\text{Logit}(p) = \log\left(\frac{\pi_{ij}}{1 - \pi_{ij}}\right) = \mu + p_j + e_{ij}$$

Em que:

μ é o intercepto;

p_j é o efeito aleatório da família ou progênie j;

e_{ij} é o efeito aleatório da interação entre indivíduo i e progênie j;

$$\text{Logit}(p) = \log\left(\frac{\pi_{ij}}{1 - \pi_{ij}}\right) = \mu + p_j + p(d_i)_j + r_{k+}(e)_{ijk}$$

Em que:

μ é o intercepto;

p_j é o efeito aleatório da progênie j;

$p(d_i)_j$ é o efeito aleatório de planta i dentro de progênie j;

r_k é o efeito aleatório de repetição k;

$(e)_{ijk}$ é o efeito aleatório da interação tripla entre o indivíduo i, repetição k e progênie j;

$$\text{Sendo que: } R_{ij} / u_{ij} \sim \frac{\text{Binomial}(m_{ij}, \pi_{ij})}{m_i}$$

Em que

R_{ij} / u_{ij} corresponde à proporção observada na parcela que recebeu o indivíduo i da progênie j;

m_{ij} : número de haploides;

π_{ij} : indução de haploides/ número total de sementes;

m_i : número total de sementes;

Utilizando os dados das gerações $S_{0:1}$ e $S_{2:3}$, foi realizada a análise de deviance pelo método dos modelos lineares generalizados mistos, como comentado anteriormente e obtidas as predições BLUP. A significância dos efeitos dos modelos foi testada pelo teste qui-quadrado (X^2) a 5% de probabilidade.

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

2.3 Comparação entre estratégias de seleção

Com os dados obtidos, foram comparadas estratégias utilizando diferentes intensidades de seleção. As metodologias comparadas foram:

Seleção entre progênies - a partir da análise de deviance utilizando o modelo binomial, foi obtido o valor genotípico (BLUP) das 14 e 7 progênies da safra 2012/2013 e 2014/2015, respectivamente. Foram selecionadas as 6 melhores progênies, em ambas as safras, de maneira que fosse possível comparar a mesma quantidade de progênies. Todas as plantas de cada progênie foram consideradas.

Seleção entre e dentro de progênies - o valor genotípico (BLUP) das progênies foi novamente utilizado para o cálculo do ganho predito. Foram utilizadas duas intensidades de seleção diferentes em cada safra. Na safra 2012/2013, foi selecionado o melhor indivíduo dentro das 12 melhores progênies (12x1) e os 3 melhores indivíduos dentro das 3 melhores progênies (3x3). Nos dados da safra 2014/2015, foi selecionado o melhor indivíduo dentro das 6 melhores progênies (6x1), as 3 melhores progênies e as 3 melhores plantas dentro (3x3).

Seleção dentro de progênies – o valor genotípico individual (BLUP) foi considerado para estimar o ganho predito com a seleção. Três intensidades de seleção, 50%, 10% e 20% do total de plantas, foram consideradas em ambas as safras. Neste caso, as progênies foram desconsideradas, ou seja, as melhores plantas independentemente de qual progênie foram escolhidas.

2.4 Estimativas dos parâmetros genéticos e fenotípicos

- a) Variância ambiental

Na análise dos dados da safra 2012/2013, a variância ambiental corresponde à variância da interação progênie x planta. Já, na análise da safra 2014/2015, esta variância é igual à variância da interação progênie x planta x repetição.

b) Variância genética dentro de progênies (σ_{Gd}^2)

Somente para a safra 2014/2015, foi possível a obtenção da variância genética dentro de progênies que corresponde às diferenças genéticas entre plantas dentro das progênies.

c) Herdabilidade dentro de progênies

$$h_d^2 = \sigma_{Gd}^2 / \sigma_d^2$$

d) Herdabilidade entre médias de progênies

$$h_{mp}^2 = \sigma_{progênies}^2 / \sigma_{Ftotal}^2$$

2.5 Ganhos preditos com a seleção

Os ganhos preditos com a seleção (GS), considerando cada uma das estratégias, foram estimados de acordo com as seguintes expressões:

a) Seleção entre progênies

$$GS_{entre} = ds_{BLUPentre} \times h_{mp}^2$$

em que

$ds_{BLUPentre}$: valor genotípico das melhores progênies (número dependente da intensidade de seleção adotada) menos o valor genotípico médio de todas as progênies.

h_{mp}^2 : herdabilidade entre médias de progênies

b) Seleção entre e dentro de progênes

Safra 2012/2013:

$$GS_{total} = GS_{entre} + GS_{dentro}$$

$$GS_{entre} = ds_{BLUP_{entre}} \times h_{mp}^2$$

em que

$ds_{BLUP_{entre}}$: valor genotípico das melhores progênes menos o valor genotípico médio de todas as progênes.

h_{mp}^2 : herdabilidade entre médias de progênes

$$GS_{dentro} = ds_{BLUP_{dentro}}$$

$ds_{BLUP_{dentro}}$: valor genotípico dos melhores indivíduos menos o valor genotípico médio de todas as progênes. Considerando que, no caso de se utilizar o BLUP individual, a herdabilidade é considerada igual a um.

Safra 2014/2015:

$$GS_{total} = GS_{entre} + GS_{dentro}$$

$$GS_{entre} = ds_{BLUP_{entre}} \times h_{entre}^2$$

em que

$ds_{BLUP_{entre}}$: valor genotípico das melhores progênes menos o valor genotípico médio de todas as progênes.

h_{entre}^2 : herdabilidade entre médias de progênes

$$GS_{dentro} = ds_{BLUP_{dentro}} \times h_{dentro}^2$$

$ds_{BLUP_{dentro}}$: valor genotípico dos melhores indivíduos menos o valor genotípico médio de todos os indivíduos.

h_{dentro}^2 : herdabilidade dentro de progênes.

c) Seleção dentro de progênes

Safra 2012/2013:

$$GS_{dentro} = ds_{BLUP_{dentro}}$$

em que

$ds_{BLUPdentro}$: valor genotípico dos melhores indivíduos menos o valor genotípico médio de todos os indivíduos.

Safra 2014/2015:

$$GS_{dentro} = ds_{BLUPdentro} \times h^2_{dentro}$$

$ds_{BLUPdentro}$: valor genotípico dos melhores indivíduos menos o valor genotípico médio de todos os indivíduos.

h^2_{dentro} : herdabilidade dentro de progênies.

d) Seleção indireta

Para a seleção das progênies e indivíduos superiores, o valor genotípico individual e das progênies foi utilizado, para o cálculo do índice clássico de Hazel (1943) e Smith (1936), dos dados da safra 2014/2015, uma vez que somente, nessa safra, foi possível a obtenção das estimativas de variância e covariância entre progênies e individual.

Foram comparadas duas intensidades de seleção na estratégia de seleção entre e dentro de progênies. As intensidades de seleção utilizadas foram: 6 progênies e 1 indivíduo dentro de cada (6x1) e 3 indivíduos dentro das 3 melhores progênies (3x3).

O Programa computacional GENES (CRUZ, 2013) foi empregado para a realização das análises.

Para tanto, foram atribuídos pesos econômicos de 3 para indução de haploides e 1 para roxos. Tais pesos foram escolhidos, aleatoriamente, por meio de tentativas, atentando-se para os ganhos mais favoráveis, para cada característica em questão, com ênfase para a indução de haploidia.

Os cálculos das estimativas dos parâmetros genéticos foram realizados, para serem estimados os ganhos por seleção (GS), pela expressão:

$$GS_{x(y)[ISH]} = DS_{x(y)[ISH]} * h^2_{(x)},$$

Em que:

$GS_{x(y)[ISH]}$ é a resposta em X (indução de haploidia), quando a seleção é praticada em Y (indução de roxos).

$DS_{x(y)[ISH]}$ é o diferencial de seleção do caráter X, quando a seleção com base no índice clássico para o caráter Y.

$h^2_{(x)}$ é a herdabilidade do caráter X.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise estatística dos dados

A indução de haploidia é uma característica dependente da ocorrência da fecundação. Muitos fatores ambientais podem influenciar a taxa de fecundação, como temperatura, umidade, nutrição da planta, entre outros. Em condições de campo, as plantas estão sujeitas a diferentes condições de estresse, como altas temperaturas, que interferem na polinização e na fertilização e, conseqüentemente, na produtividade (THAKUR et al., 2010; ZINN; TUNC-OZDEMIR; HARPER, 2010). No milho, por exemplo, existe um tipo de proteína conhecida como HSPs, a qual é produzida quando as plantas estão em condições de altas temperaturas (DUPUIS; DUMAS, 1990). Essas proteínas podem interferir no desenvolvimento dos tecidos reprodutivos masculinos e femininos da planta. Isto evidencia que a indução de haploidia, normalmente, é desbalanceada, exigindo a adoção de procedimentos estatísticos que atenuem isso, como, por exemplo, a análise de modelos binomiais mistos, pelo procedimento BLUP.

Neste capítulo, para a contagem do número de haploides, foi considerada apenas a metodologia de avaliação da coloração do endosperma e do embrião, uma vez que, nos programas de melhoramento privados, esta é a mais empregada.

A média de indução de haploidia é um dos principais parâmetros analisados, para a tomada de decisão num programa de melhoramento de indutores, para obtenção de linhagens duplo-haploides. Dessa maneira, são apresentadas as médias da taxa de indução por progênie (TABELA 1).

Tabela 1 - Média ponderada e tamanho amostral (N) da taxa de indução de haploidia das 14 progênes avaliadas na safra 2012/2013 e 7 avaliadas em 2014/2015.

Progênes	% de haploides		Média da progênie
	Safra 2012/2013	Safra 2014/2015	
1	0,86		
2	2,3	0,74	1,52
3	2,5	0,34	1,42
4	0,88	0,52	0,7
6	7,92	2,71	5,32
7	1,56	0	0,78
8	1,76	1,53	1,65
9	2,5		
10	0		
13	0,61	0	0,31
15	0		
18	1,16		
20	0,3		
21	0		
Média	1,60 (1,59-1,65*)	0,84 (0,74-1,05)	1,67 (1,65-1,75)
N	92	148	

*Intervalo de confiança da média (95% de probabilidade).

A média ponderada de indução de haploidia foi diferente entre as safras, tendo reduzido à metade, na segunda safra, quando comparada com a primeira safra. No entanto a média geral está dentro dos limites inferiores e superiores. Entre as 14 progênes avaliadas na primeira safra, a taxa de indução variou de 0% a 7,92%. Já, na safra 2014/2015, o intervalo da indução reduziu bastante, de 0 a 2,71%. As linhagens 7 e 13 que apresentaram uma média de indução de 1,56% e 0,61%, na safra 2012/2013, na safra 2014/2015, esta taxa de indução foi zero, contribuindo para reduzir a média geral dessa última safra. Além disso, a coloração do marcador R1-navajo foi menos intensa, na safra 2014/2015, quando comparada com a safra 2012/2013, como já comentado no capítulo

anterior. Isto pode ter ocorrido, porque as linhagens possuem origem temperada e, portanto apresentaram-se pouco adaptadas às condições tropicais de cultivo, mostrando-se susceptível ao ataque de pragas e doenças, sensível ao calor e ao fotoperíodo. O mesmo foi constatado por Belicuas et al. (2007) e Rabel (2008), na utilização da linhagem W23 em condições tropicais.

A progênie 6 foi a melhor indutora, em ambas as safras, com uma taxa média de 5,31%. Indutores com 6 e 15% de indução estão sendo utilizados em climas temperados (PRIGGE et al., 2012; ROBER; GORDILLO; GEIGER, 2005) e tropicais (KEBEDE et al., 2011; PRIGGE et al., 2011). Uma parceria da Universidade de Hohenheim com o CIMMYT-Mexico concluiu que é possível obter linhagens e híbridos indutores com 8 a 12% de indução, em ambientes tropicais, aliada a características agrônômicas favoráveis, como boa resistência a doenças e insetos. Outra vantagem seria a maior altura dessas plantas, facilitando o seu uso, em campos de polinização aberta para a indução, reduzindo a mão de obra necessária para a polinização (CHAIKAM; MAHUKU; PRASANNA, 2012).

Foi efetuada a análise de deviance da taxa de indução de haploidia (TABELA 2). O efeito de data de semeadura (primeira e segunda data), nos dados da safra 2012/2013, foi não significativo a 5% de probabilidade, portanto foi desconsiderado do modelo estatístico.

Nas duas safras, houve diferença significativa entre as progênies e entre as plantas dentro das progênies, indicando a existência de variabilidade entre elas, condição essa essencial para a seleção (TABELA 2). A herdabilidade entre progênies foi de magnitude maior na safra 2012/2013.

A variabilidade dentro das progênies, também, pode ser confirmada pelas estimativas de herdabilidade (h^2). Na safra 2012/2013, não foi possível estimar a herdabilidade dentro de progênies, pois não se tem repetição da taxa de indução da mesma planta. A estimativa tendo como unidade de seleção as

plantas dentro de progênies apresentou uma magnitude mais elevada na safra 2014/2015 quando comparada com a herdabilidade entre progênies. Esses valores de herdabilidade evidenciam que os valores fenotípicos das plantas são bons preditores dos valores genotípicos e que a seleção dentro das progênies é eficiente. Na literatura são escassos os relatos de herdabilidade para esta característica. Prigge et al. (2011) encontraram uma herdabilidade de 46% para indução de haploidia, avaliada pelo cruzamento entre o híbrido indutor RWSxUH400 com 45 híbridos simples.

Tabela 2 - Resultado da análise de deviance da taxa de indução de haploidia de quatorze progênies $S_{0:1}$ indutoras, avaliada na safra 2012/2013 e sete progênies $S_{2:3}$, safra 2014/2015.

Safra 2012/2013			
FV	GL	Deviance	h^2 (%)
Progênie	13	0,34*	12,73
Progênie x Planta	89	2,33	
Safra 2014/2015			
Progênie	6	0,42*	6,01
Planta/Progênie	196	0,93*	12,4
Repetição	1	0,0001	
Progênie x Planta x Repetição	142	6,57	

*Diferenças significativas, pelo teste χ^2 , com probabilidade de 0,05.

Para fins de ranqueamento e seleção das progênies, foi considerado o valor genotípico (BLUP) para indução de haploidia (TABELA 3). Em ambas as safras, as progênies que mais se destacaram foram a 2 e a 6. A progênie 8, também, foi bastante promissora. No entanto, em geral, de acordo com a estimativa da correlação de Spearman (0,27), o desempenho das progênies não foi consistente entre as safras.

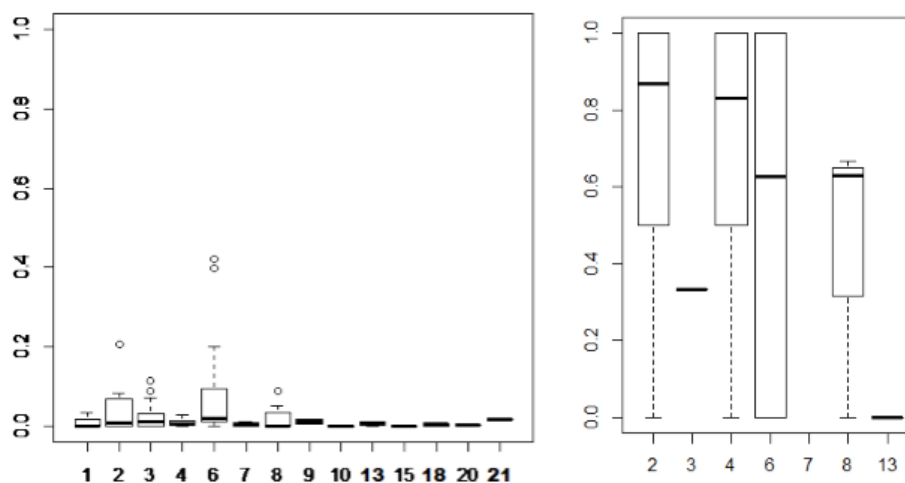
Tabela 3 - Valor genotípico e correlação de Spearman das 14 e 7 progênes avaliadas em relação à indução de haploidia na safra 2012/2013 e 2014/2015.

Prog	BLUP progênie	
	Safra 2012/2013	Safra 2014/2015
1	0,60	
2	1,12	0,15
3	1,12	0,03
4	0,68	0,15
6	1,99	1,39
7	0,47	0,08
8	0,82	0,12
9	0,72	
10	0,67	
13	0,65	0,06
15	0,63	
18	0,52	
20	0,63	
21	0,76	
Geral	0,81	0,28
Correlação de Spearman	0,27 ^{ns}	

^{ns}Não significativa a 5% de probabilidade.

A existência da variabilidade entre as progênes, também, pode ser constatada por meio da distribuição do BLUP da característica nas diferentes safras (FIGURA 1). Na safra 2012/2013, as estimativas do valor genotípico variaram de 0 a 0,8 e de 0 a 1,27 para a safra 2014/2015. Além disso, como se constata na Figura 1, o BLUP individual tende a concentrar o maior número de plantas selecionadas nas progênes de maiores médias. Isto nem sempre acontece, pois o melhor indivíduo de uma progênie pode ser inferior ao segundo, terceiro ou quarto indivíduo de outras progênes.

Figura 1 - Boxplot do valor genotípico das plantas dentro de cada progênie, da taxa de indução de haploidia, avaliada na safra 2012/2013 e 2014/2015, respectivamente.



Depreende-se que é possível obter e explorar a variabilidade genética, para o caráter indução de haploidia, em programas de melhoramento de milho, com o principal objetivo de aumentar a indução e, ao mesmo tempo, selecionar outros caracteres agrônômicos desejáveis, que facilitem a utilização dessas plantas em condições tropicais.

3.2 Estratégias de seleção

Para fins de melhoramento, deve-se utilizar a estratégia de seleção que mais otimize o ganho com a seleção (GS). Como há pouca informação a respeito do melhoramento de indutores de haploidia, neste estudo, comparamos várias estratégias, a entre progênies, entre e dentro e somente dentro de progênies.

Considerando o pressuposto de que as estimativas do BLUP são as que mais se aproximam do verdadeiro valor genotípico (BERNARDO, 2002) e que a ocorrência de desbalanceamento dos dados foi expressiva, para cálculo do diferencial de seleção (DS), utilizou-se o BLUP das progênies e o individual. Na

safra 2014/2015, o DS foi ponderado pela herdabilidade, para a obtenção do GS predito dentro, uma vez que, nesta safra, foi possível a obtenção da variância dentro de progênies como já explicado anteriormente.

Na Tabela 4, estão apresentadas as estimativas de GS preditos das diferentes estratégias. Depreende-se que a magnitude das estimativas de GS preditos foram maiores e consistentes para a seleção entre e dentro de progênies em ambas as safras avaliadas. Além disso, dentro de cada estratégia de seleção, foram avaliadas diferentes intensidades de seleção. Na seleção entre e dentro de progênies, avaliamos a possibilidade de selecionar mais progênies e menos plantas dentro de cada ou de um maior número de plantas em um menor número de progênies. De acordo com o GS predito, a melhor alternativa é selecionar uma maior quantidade de plantas dentro das melhores progênies. No caso da safra 2012/2013, 6 progênies e 3 plantas ($GS=0,156$) e, da safra 2014/2014, 3 progênies e 3 plantas ($GS=0,172$).

Deve ser enfatizado, entretanto, que, embora a magnitude das estimativas dos GS tenham sido pequenas, utilizar a seleção dentro de progênies com uma alta intensidade de seleção, também, é uma boa opção em casos de plantas com menos endogamia, como no caso da geração $S_{0:1}$. Isso pode ter ocorrido, porque, nesta geração, há 0,5 de Variância aditiva (V_A) dentro, e na geração $S_{2:3}$, somente 0,125 de V_A dentro. Assim, justifica-se a seleção dentro de progênies $S_{0:1}$.

A intensidade de seleção de 10% foi melhor quando comparada com a de 20 e 50%. Isso ocorreu, porque as progênies 2 e 6 possuem plantas muito superiores em relação às demais como já comentado no tópico anterior. Em milho pipoca, isso, também, foi observado por Arnhold e Soriano (2007) que obtiveram um maior ganho na capacidade de expansão e na produção de grãos com a seleção dentro de progênies S_4 . Então, com base nos ganhos preditos, é

justificável praticar seleção dentro de progênies $S_{0:1}$ considerando a indução de haploidia.

Tabela 4 - Progênies dispostas da melhor para a pior em termos de indução de haploidia e estimativas dos ganhos preditos com a seleção da indução de haploidia para as diferentes estratégias de seleção, avaliada na safra 2012/2013.

Estratégias de seleção	Safra 2012/2013	
	Progênies selecionadas	GS
Entre (6 progênies)	6,2,3,8,21,9	0,005
Entre e dentro (12x1) ¹	6,2,3,8,21,9,1,15,20,13,10,4	0,078
Entre e dentro (6x3) ²	6,2,3,8,21,9	0,156
Dentro (50% ou 46 melhores)		0,036
Dentro (20% ou 18 melhores)		0,132
Dentro (10% ou 9 melhores)		0,244
	Safra 2014/2015	
	Progênies selecionadas	GS
Entre (6 progênies)	6,4,2,8,7,13	0,0001
Entre e dentro (6x1) ³	6,4,2,8,7,13	0,024
Entre e dentro (3x3) ⁴	6,4,2	0,172
Dentro (50% ou 74 plantas)		0,005
Dentro (20% ou 28 plantas)		0,020
Dentro (10% ou 14 plantas)		0,027

¹ (12x1) – seleção das 12 melhores progênies e do melhor indivíduo dentro de cada progênie;

² (5x3) – seleção das 5 melhores progênies e dos 3 melhores indivíduos dentro de cada progênie;

³ (6x1) – seleção das 6 melhores progênies e do melhor indivíduo dentro de cada progênie;

⁴ (3x3) – seleção das 3 melhores progênies e dos 3 melhores indivíduos dentro de cada progênie;

Levando em consideração as baixas magnitudes de herdabilidade observadas para a taxa de indução de haploidia, em ambas as safras, recomenda-se que o tamanho amostral seja o maior possível, consequentemente, a intensidade de seleção a ser utilizada pode ser mais intensa.

3.2.1 Seleção indireta de caracteres

Em virtude da alta complexidade genética e grande influência ambiental sob a indução de haploidia dos genótipos indutores, torna-se interessante estudos de ganhos genéticos indiretos, para aumentar a indução de haploidia, quando a seleção é feita para endosperma roxo (indução de roxos). Isso se justifica, principalmente, porque haploides selecionados num programa de melhoramento devem, necessariamente, possuir endosperma roxo. Dessa maneira, a obtenção de estimativas de correlação genética entre haploides e roxos, bem como da resposta correlacionada à seleção, podem ser bastante interessantes e informativas.

Para calcular a resposta correlacionada à seleção (RC) e estabelecer índices de seleção, é preciso ter, em mãos, estimativas de variância e covariância genéticas e ambientais (RAMALHO; FERREIRA; OLIVEIRA, 2012). Por esse motivo, foram obtidas estimativas de RC do número de haploides e de roxos da safra 2014/2015.

Na Tabela 5, estão os resultados da análise de deviance, estimativas de herdabilidade, correlação genética e ambiental, do caráter número de sementes com endosperma roxo da safra 2014/2015. A fonte de variação plantas dentro de progênies foi altamente significativa ($P < 0.001$). Dessa forma, existe variabilidade genética para o caráter em questão.

As estimativas da correlação genética e ambiental entre haploides e roxos, também, estão apresentadas na Tabela 5. Como se constata, a correlação genética entre haploides e roxo foi alta e positiva, quando avaliada em nível de plantas ($r_G = 0,69$). Uma alta correlação genética indica que os caracteres envolvidos são controlados pelos mesmos genes ou são genes ligados (FALCONER; MACKAY, 1996). Isso favorece a utilização da seleção indireta. A correlação ambiental ($r_E = 3,46$), também, foi alta e positiva e, por isso,

entende-se que os dois caracteres são influenciados pelas mesmas variações ambientais (CRUZ; REGAZZI; CARNEIRO, 2004).

Tabela 5 - Resultado da análise de deviance da indução de roxos, herdabilidade (h^2) e correlação genética e ambiental da indução de haploidia e de roxos, de sete progênies $S_{2:3}$ indutoras, avaliada na safra 2014/2015.

FV	GL	Safra 2014/ 2015		
		Deviance	h^2 (%)	Correlação
Progênie	6	$9,81 \times 10^{-6}$	8×10^{-5}	$3,13 \times 10^{-5}$
Planta/Progênie	196	0,47***	3,92	0,69
Repetição	1	$1,13 \times 10^{-11}$		
(Progênie x Planta x Repetição)	142	12,00		3,46

***Diferenças significativas, pelo teste χ^2 , com probabilidade de 0,001%.

Como ambas as características apresentam herdabilidade baixa, utilizar a seleção simultânea, para ambas as características, pode ser uma alternativa viável. Para isso, foram obtidas estimativas da RC a haploides e roxos, utilizando as estratégias entre e dentro de progênies com duas intensidades de seleção diferentes, ou seja, das 6 melhores progênies e do melhor indivíduo dentro (6x1) e da seleção das 3 melhores progênies e dos 3 melhores indivíduos dentro (3x3) (TABELA 6). Foram comparadas duas intensidades de seleção, na estratégia de seleção entre e dentro de progênies, uma vez que esta estratégia demonstrou como a melhor para a indução de haploides, como comentado no tópico anterior. A seleção entre e dentro de progênies foi feita, com base no índice clássico, com pesos 3 para haploides e 1 para roxos.

A seleção entre e dentro de progênies, utilizando uma intensidade de seleção menor, foi a melhor alternativa, para obter ganhos genéticos no número de haploides, ao contrário do que ocorreu com o ganho predito pela seleção direta de haploides. Isso pode ser explicado, porque a geração $S_{2:3}$ foi avaliada e, nesse caso, a variância aditiva (VA) dentro é menor. Além disso, a magnitude do

ganho predito, via seleção indireta do número de sementes com endosperma roxo, obteve ganhos, praticamente iguais, quando comparada à seleção direta de haploides.

Arnhold e Soriano (2007), também, obtiveram resultados mais favoráveis, utilizando o índice de Mulamba e Mock, para produção de grãos e capacidade de expansão em milho pipoca.

Tabela 6 - Ganhos preditos com duas estratégias de seleção entre e dentro de progênies $S_{2;3}$, em relação à indução de haploides (%) e de roxos (%), considerando a seleção com base no índice clássico (IHS), com pesos 3 para indução de haploides e 1 para roxos.

$GS_{(x)y} = DS_{x(y)} \times h^2_{(x)}$		
Estratégias de seleção	Haploides (%)	Roxos (%)
Entre e dentro (6x1) ¹	0,20	0,21
Entre e dentro (3x3) ¹	0,08	0,08

¹ (6x1) – seleção das 6 melhores progênies e do melhor indivíduo dentro de cada progênie;

² (3x3) – seleção das 3 melhores progênies e dos 3 melhores indivíduos dentro de cada progênie;

4 CONCLUSÕES

As estimativas de herdabilidade da indução de haploidia e de roxos foram de pequena magnitude.

As progênies 2 e 6 podem induzir haploides em milho tropical.

Considerar a seleção entre e dentro de progênies, para indução de haploides e roxos, é uma boa alternativa para aumentar a eficiência da seleção de haploides.

REFERÊNCIAS

ARNHOLD, E.; SORIANO, V. J. M. Eficiência da seleção dentro de famílias S de milho-pipoca, visando à obtenção de linhagens. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 54, n. 312, p. 108-112, 2007.

BARRET, P.; BRINKMANN, M.; BECKERT, M. A major locus expressed in the male gametophyte with incomplete penetrance is responsible for in situ gynogenesis in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 117, n. 4, p. 581-594. May 2008.

BATES, D. et al. Fitting linear mixed-effects models using lme4. **Journal of Statistical Software**, Los Angeles, v. 67, n. 1, p. 1-48, 2015.

BATISTELLI, G. M. et al. Production and identification of doubled haploids in tropical maize. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, p. 4230-4242, Apr. 2013.

BELICUAS, P. R. et al. Androgenetic haploids and SSR markers as tools for the development of tropical maize hybrids. **Euphytica**, Wageningen, v. 156, n. 1, p. 95-102, July 2007.

BERNARDO, R. **Breeding for quantitative traits in plants**. Woodbury: Stemma, 2002. 368 p.

CHAIKAM, V. In vivo maternal haploid induction in maize. In: _____. **Doubled haploid technology in maize breeding: theory and practice**. Mexico: CIMMYT, 2012. p. 9-13.

CHAIKAM, V.; MAHUKU, G.; PRASANNA, B. M. Design and implementation of maternal haploid induction. In: _____. **Doubled haploid technology in maize breeding theory and practice**. Mexico: CIMMYT, 2012. p. 14-19.

CHALYK, S. T. Creating new haploid-inducing lines of maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 73, n. 1, p. 53-54, Apr. 1999.

CHASE, S. S. Production of monozygous diploids of maize from monoploids. **Agronomy Journal**, Madison, v. 44, p. 263-267, 1951.

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

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

COUTO, E. **Indução de haploides e duplicação cromossômica em milho**. Lavras: Ed. UFLA, 2013. 104 p.

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

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 3. ed. Viçosa, MG: UFV, 2004. v. 1, 480 p.

DEIMLING, S.; ROBER, F.; GEIGER, H. H. Methodik und genetic der in-vivo-Haploideinduktion bei mais. **Vortrage fur Pflanzenzuchtung**, Quedlinburg, v. 38, p. 203-224, 1997.

DUPUIS, I.; DUMAS, C. Influence of temperature stress on in vitro fertilization and heat shock protein synthesis in maize (*Zea mays* L.) reproductive tissues. **Plant Physiology**, Washington, v. 94, p. 665-670, 1990.

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to quantitative genetics**. 4th ed. Essex: Longman, 1996. 480 p.

HAZEL, H. N. The genetic basis for constructing selection indexes. **Genetics**, Menasha, v. 28, n. 6, p. 476-490, 1943.

KEBEDE, A. Z. et al. Effect of source germplasm and season on the in vivo haploid induction rate in tropical maize. **Euphytica**, Wageningen, v. 180, n. 5, p. 219-226, Feb. 2011.

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

MARTINS, I. S. et al. Comparação entre os processos de seleção entre e dentro e o de seleção combinada, em progênies de *Eucalyptus grandis*. **Cerne**, Lavras, v. 11, n. 1, p. 16-24, jan./mar. 2005.

PRIGGE, V. et al. Doubled haploids in tropical maize: I., effects of inducers and source germplasm on in vivo haploid induction rates. **Crop Science**, Madison, v. 51, n. 4, p. 1498-1506, Oct. 2011.

PRIGGE, V. et al. New insights into the genetics of in vivo induction of maternal haploids, the backbone of doubled haploid technology in maize. **Genetics**, Austin, v. 190, n. 2, p. 781-793, Feb. 2012.

R CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2013. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 10 fev. 2014.

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

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

RESENDE, M. D. V. **Genética biométrica e estatística no melhoramento de plantas perenes**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2002. 975 p.

ROBER, 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. 2, p. 275-283, Feb. 2005.

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

SMITH, H. F. A discriminant function for plant selection. **Annals of Eugenics**, London, v. 7, p. 240-250, 1936.

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

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

CAPÍTULO 3 IDENTIFICAÇÃO DE HAPLOIDES E OBTENÇÃO DE LINHAGENS DUPLO-HAPLOIDES EM MILHO

RESUMO

Uma das limitações da produção de linhagens duplo-haploides *in vivo* em milho é a incapacidade em, efetivamente, identificar haploides em uma proporção significativa, principalmente, pela possibilidade da inibição completa ou parcial do uso do marcador de coloração *R1-nj* (Navajo). O objetivo deste estudo foi identificar haploides por outros marcadores, além do marcador R-navajo, o comprimento e coloração da raiz, vigor de plantas, citometria de fluxo, contagem cromossômica e marcadores moleculares microssatélites, bem como caracterizar haploides duplicados pela citometria de fluxo. Foram avaliados 552 e 260 haploides, obtidos pelo cruzamento de progênies indutoras de haploidia $S_{0:1}$ e $S_{2:3}$ com o híbrido simples GNZ9501, na safra 2012/2013 e 2014/2015, respectivamente. Os três haploides identificados por citometria da safra 2012/2013 foram submetidos a um protocolo de duplicação cromossômica. Marcadores morfológicos podem resultar em uma alta proporção de falsos positivos ou, ainda, na não identificação de haploides. O uso da citometria de fluxo e de marcadores moleculares codominantes de DNA são os mais recomendados para a confirmação dos haploides. A duplicação cromossômica para obtenção dos duplo-haploides foi eficiente, no entanto a amostra analisada foi pequena, necessitando que outros estudos sejam realizados para confirmar a eficácia do protocolo.

Palavras-chave: Citometria de fluxo. *Zea mays*. Contagem cromossômica. Duplicação cromossômica. Ploidia.

ABSTRACT

One of the limitations of the in vivo double haploid lines production in maize is the inability to identify a significant proportion of haploid mainly due to the possibility of full or partial inhibition of the use of the color marker R1-nj (Navajo). The aim of this study was to identify haploid using other markers in addition to the R-Navajo marker, length and root color, plant vigor, flow cytometry, chromosome counting and microsatellite molecular markers and characterize haploid and doubled haploids by flow cytometry. We evaluated 552 and 260 haploid obtained by crossing 14 S0:1 and 7 S2:3 haploid-inducing progenies with the simple hybrid GNZ9501 in 2012/2013 and 2014/2015, respectively. Morphological markers can result in a high proportion of false positives or not the identification of haploid. The use of flow cytometry and codominant molecular markers of DNA are the most recommended for haploid confirmation. The three haploid identified by flow cytometry in 2012/2013, have undergone a chromosomal duplication protocol. Chromosome doubling to obtain the double-haploid lines was efficient, however, the analyzed sample was small, requiring further studies to confirm the effectiveness of the Protocol.

Key-words: Flow cytometry. *Zea mays* Chromosome counting. Chromosome doubling. Ploidy.

1 INTRODUÇÃO

A obtenção de híbridos de milho com alto desempenho depende do cruzamento entre linhagens elite (PATERNIANI; CAMPOS, 1999). Normalmente essas linhagens possuem alta capacidade geral de combinação, ou seja, são aquelas que, quando utilizadas em cruzamentos com outros genótipos, possuem uma grande contribuição de alelos favoráveis.

Para a obtenção de linhagens elites, os melhoristas podem utilizar o processo tradicional de sucessivas autofecundações ou a tecnologia de duplo-haploides. A obtenção via duplo-haploides é uma alternativa disponível na cultura do milho, para acelerar a obtenção de linhagens e obter outras vantagens diretamente relacionadas à qualidade na avaliação e obtenção de híbridos. Esta técnica consiste na produção de linhagens homozigotas com apenas uma geração, pelo uso de haploides duplicados, também, conhecidos como duplo-haploides ou di-haploides (CHASE, 1952).

Na cultura do milho, o método *in vivo* é o mais utilizado. Esse método baseia-se na utilização de linhagens indutoras de haploides, seguida da duplicação cromossômica (GEIGER; GORDILLO, 2009). Além disso, a linhagem indutora, que gera haploides de origem materna, também, é a mais interessante, principalmente, para as empresas de sementes, uma vez que este sistema alia as maiores taxas de indução dos indutores modernos com a praticidade da possibilidade, na utilização de campos abertos de polinização, principalmente, quando se trata de indutores tropicais, os quais possuem maior porte. Além disso, é possível induzir a haploidia em diferentes genótipos simultaneamente (FRITSCHÉ-NETO; GARBUGLIO; BORÉM, 2012).

Um ponto chave para a aplicação da indução *in vivo* em escala comercial é um screening eficiente que permita ao melhorista diferenciar grãos ou seedlings haploides, daqueles formados a partir da fertilização regular. O marcador morfológico R-navajo, presente nos indutores de haploidia, expressa a

coloração roxa no endosperma e no embrião e é o mais utilizado até hoje para a discriminação dos haploides (FRITSCHÉ-NETO; GARBUGLIO; BORÉM, 2012). Sementes haploides apresentam a coloração roxa somente no endosperma, uma vez que o embrião não possui o DNA do parental indutor. No entanto, em virtude da discriminação não eficiente desse marcador, principalmente, em genótipos que não possuem a coloração natural de antocianina, outras características vêm sendo analisadas. Uma delas é a citometria de fluxo que permite a quantificação do DNA das plantas (BATISTELLI et al., 2013; COUTO et al., 2013, 2015), além do uso de marcadores moleculares codominantes, como os microssatélites, que permitem distinguir os haploides dos diploides (BATTISTELLI et al., 2013; COUTO et al., 2013, 2015; LI et al., 2009; RABEL, 2008). Várias outras características morfológicas foram avaliadas em estudos, principalmente, pela sua facilidade de aplicação, como coloração (CHAIKAM et al., 2016) e comprimento de radícula (ROTARENCO et al., 2010), vigor (BATTISTELLI et al., 2013; ROTARENCO; ADICU; SARMANIUC, 2009), além da viabilidade polínica (COUTO et al., 2015), uma vez que indivíduos haploides não apresentam divisões meióticas regulares e, conseqüentemente, podem apresentar reduzida viabilidade do pólen.

Do exposto, o trabalho tem como objetivos identificar haploides pelo marcador R-navajo, comprimento e coloração da raiz, vigor de plantas, citometria de fluxo e marcadores moleculares microssatélites. Estabelecer protocolos para a contagem cromossômica de haploides, além de obter linhagens duplo-haploides.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área experimental e genótipos avaliados

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação do Departamento de Biologia do município de Lavras (MG), situado a 918m de altitude, nas coordenadas 21°14'30'' de latitude Sul e a 45°00'10'' de longitude Oeste, em duas safras 2012/2013 e 2014/2015.

A análise mitótica das plantas obtidas na safra 2012/2013 e 2014/2015 foram realizadas no laboratório de Citogenética Vegetal. As atividades, para o uso de marcadores moleculares SSR, para discriminação dos haploides e dos F1 heterozigotos, obtidos na safra 2014/2015, foram realizadas no laboratório de Genética Molecular. Ambos os laboratórios estão localizados no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG. Já a citometria de fluxo das plantas, obtida na safra 2012/2013, foi conduzida no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Departamento de Agricultura da mesma Universidade. A citometria de fluxo dos prováveis haploides da safra 2014/2015 foi efetuada no Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora – MG.

Primeiramente, foram selecionadas 14 plantas de uma população S_0 indutora, oriunda do cruzamento da linhagem KEMS (SHATSKAYA et al., 1994) com outras linhagens de origens diversas. Na safra 2012/2013, 14 progênies indutoras da geração $S_{0:1}$ foram cruzadas com o híbrido GNZ9501 para a obtenção de haploides. As progênies indutoras foram utilizadas como parental masculino, uma vez que apresentam o sistema gimnogenético de indução de haploidia. Para garantir a sincronia de florescimento, as sementes do híbrido simples foram semeadas, em quatro datas diferentes, 23 e 30 de Novembro e 7 e 14 de Dezembro de 2012, com intervalo de uma semana entre cada data de semeadura.

A safra 2013/2014 foi utilizada somente para avanço de uma geração de endogamia das sete melhores progênies avaliadas na safra anterior, 2012/2013, obtendo-se, assim, a geração $S_{2:3}$.

Na safra de 2014/2015, foi instalado um campo de cruzamento contendo as sete progênies $S_{2:3}$ e o híbrido simples GNZ9501, para a obtenção de sementes haploides. Para garantir a sincronia de florescimento, as sementes do híbrido simples GNZ9501 foram semeadas, em quatro datas diferentes, com intervalo de uma semana entre cada uma, ou seja, nos dias 28 de Novembro, 5, 12 e 19 de Dezembro.

Em ambas as safras, foi realizada a adubação de base e de cobertura, de acordo com as seguintes dosagens: 500 kg/ha do formulado 10-30-10 e 500kg/ha de 20-0-20 após o desbaste. Os demais tratos culturais foram conduzidos conforme recomendações para a cultura do milho.

As sementes provenientes dos cruzamentos com o híbrido comercial GNZ9501 foram avaliadas quanto à indução de haploidia. Para isso, foram separadas, visualmente, de acordo com a metodologia descrita no item 2.3.1. Posteriormente, todas as sementes haploides foram semeadas em vasos, em casa de vegetação, localizada no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras. Após a germinação, as plantas foram avaliadas quanto às características vigor de plantas, comprimento e coloração de radícula, quantidade de DNA pela citometria de fluxo, número de cromossomos e perfil de bandas com o uso de marcadores moleculares SSR, como descrito com detalhes no tópico a seguir. As plantas haploides, confirmados pela citometria de fluxo, foram submetidas à duplicação cromossômica, conforme metodologia descrita no item 2.4.

2.2 Obtenção e identificação de haploides

Os haploides foram identificados de acordo com caracteres morfológicos, citogenéticos e moleculares, como descrito a seguir.

2.2.1 Marcador morfológico R-navajo

As sementes obtidas pelos cruzamentos foram separadas, visualmente, de acordo com a presença da coloração roxa do endosperma e do embrião. Grãos com endosperma roxo e embrião branco foram considerados haploides, conforme metodologia descrita por Chase e Nanda (1965) e demonstrado na Figura 1. As sementes que estavam muito cobertas por fungo foram eliminadas uma vez que dificultam a visualização da coloração do endosperma.

Figura 1 - Classificação das sementes pelo marcador R1-navajo. Exemplo de semente diploide e haploide colhida na safra 2012/2013 e safra 2014/2015.



2.2.2 Avaliação do vigor das plantas

O vigor das plantas foi avaliado 8 e 20 dias após a semeadura das sementes em vasos na casa de vegetação. Plantas que apresentaram, visualmente, alturas e folhas menores em relação às demais foram classificadas como haploides.

2.2.3 Comprimento e coloração das raízes

O comprimento e coloração das raízes foram avaliados 28 dias após a semeadura das sementes obtidas na indução da safra 2012/2013 e 2014/2015.

Para isso, as plântulas foram retiradas do vaso e a presença da coloração roxa na raiz foi avaliada visualmente. Plantas que não apresentaram a coloração roxa foram consideradas haploides. O comprimento da raiz, também, foi mensurado com o auxílio de uma régua. Plantas que apresentaram raiz muito profunda foram consideradas diploides.

2.2.4 Citometria de fluxo

O plantio dos haploides, em vasos em casa de vegetação, colhidos na safra 2012/2013, foi realizado no dia 21 de Novembro de 2014, na casa de vegetação e a citometria de fluxo, realizada 11 a 14 dias, após o plantio, no dia 02 a 05 de Dezembro de 2014. Os haploides da safra 2014/2015, foram semeados no dia 06 de Maio de 2015 e a citometria foi efetuada no dia 17 de Junho de 2015.

Para realização da técnica de citometria de fluxo, foram utilizadas folhas jovens com 20-30 mg de todos os possíveis haploides de cada geração avaliada. Cada amostra dessas plantas da safra 2012/2013 e 2014/2015 foi comparada com aproximadamente, 20-30 mg de folhas jovens da espécie *Pisum Sativum* (9,09 pg/2C), como padrão externo e interno de referência, respectivamente. O tampão de extração foi o LB01, para a obtenção da suspensão nuclear (DOLEZEL, 1997).

Cada suspensão foi analisada no citômetro de fluxo. Os histogramas obtidos foram avaliados pelo software WinMDI 2.8 (2009) para a avaliação dos picos de DNA. A estimativa do conteúdo de DNA nuclear (pg) de cada amostra foi realizada, por meio da comparação da posição do seu pico G1 com o pico G1 do padrão interno ou externo de referência, com conteúdo de DNA conhecido. Para essa comparação foi utilizada a seguinte expressão:

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

Q é a quantidade de DNA da amostra avaliada (pg/2C).

E é a posição do pico G1 da amostra.

S é a posição do pico G1 do padrão de referência.

R é a quantidade de DNA da amostra padrão (9,09 pg/2C).

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

2.2.5 Contagem cromossômica

As radículas das plântulas haploides semeadas na casa de vegetação foram utilizadas, para o preparo das lâminas de mitose, como será descrito com detalhes a seguir.

As pontas das radículas foram cortadas e colocadas em pré-tratamento com colchicina, como bloqueador das fibras do fuso mitótico 0,1% por 5 horas na geladeira. Posteriormente, foram colocadas em Carnoy (etanol-ácido acético, 2:1) e deixadas a -20°C no freezer, até o momento do uso.

A montagem das lâminas da mitose foi efetuada pela técnica de secagem a chama (DONG et al., 2000). A digestão enzimática da parede celular foi realizada com as enzimas Pectinase e Celulase, nas quantidades de 100U e 200U, respectivamente, por 45 minutos. Para a digestão, as amostras foram deixadas em uma estufa a uma temperatura de 37°C. As lâminas foram coradas com Giemsa a 5% e foram analisadas em microscópio óptico com aumento de 100x para a contagem dos cromossomos. Para a determinação do número cromossômico, foi utilizado um total de, aproximadamente, 20 metáfases em relação a todas as lâminas avaliadas.

2.2.6 Uso de marcadores microssatélites de DNA

Para as análises utilizando-se de SSR, foram coletadas amostras foliares de todos os possíveis haploides pré-caracterizados pelo R-navajo, bem como do

parental feminino, o híbrido simples GNZ9501 e dos parentais masculinos, os indutores de haploidia.

A extração de DNA foi realizada de acordo com Doyle e Doyle (1987). Após o precipitado ser secado, foi diluído com 50 µl de água ultrapura com 2µl de RNase (10 mg mL⁻¹), a uma temperatura de 37°C por 1 hora. O DNA foi quantificado em espectrofotômetro GE Nanovue.

Para este estudo, foi utilizado um par de primer SSR aleatório (BNLG1233), já utilizado em trabalhos com a cultura do milho para a mesma finalidade. Para a revelação dos géis, utilizou-se o método de coloração com nitrato de prata. Após a verificação do polimorfismo dos genitores, o primer foi classificado como polimórfico e, então, usado para detectar os haploides gimnogenéticos.

As reações de PCR foram realizadas levando-se em consideração o estudo de Couto et al. (2013) que utilizaram o mesmo primer. Neste estudo, utilizamos 4,5µL de DNA, 0,4µL do primer, 1µL de cada dNTP, 1 µL de tampão, 0,96µL de Taq diluente e 0,6U da enzima Taq polimerase e 2,2 µL de água pura, em um volume total de 33µL. As amplificações utilizadas foram realizadas de acordo com a seguinte 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 52 °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 poliacrilamida 10% por eletroforese a 100 V por 90 minutos.

2.3 Duplicação cromossômica

Os haploides identificados na citometria de fluxo da safra 2012/2013 foram submetidos ao protocolo de duplicação, segundo Couto et al. (2013), 28 dias após a semeadura em vasos em casa de vegetação. O protocolo utilizado foi de imersão das raízes em solução de 0,1% de colchicina, dimetilsulfóxido 0,1% (DMSO) e Tween 20 a 0,1%, por 6 horas, em temperatura ambiente, média de 20°C. Após o tratamento com colchicina, as plântulas foram transferidas para casa de vegetação. Aproximadamente, 14 dias após a aclimação dessas plântulas em virtude da duplicação, foi realizada a citometria de fluxo utilizando o mesmo padrão externo citado, previamente, no item 2.3.5.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Identificação e caracterização de haploides por meio da avaliação do marcador R-navajo, comprimento e coloração de raiz, vigor, citometria de fluxo, contagem cromossômica e marcadores moleculares SSR

A quantidade de sementes obtida e a indução dos potenciais haploides dos cruzamentos do híbrido comercial GNZ9501 com as progênies indutoras de haploidia, da safra 2012/2013 e 2014/2015, estão representadas na Tabela 1. Depreende-se que a indução de haploides foi diferente entre as safras, apresentando uma média de 2,48%.

Tabela 1 - Número de sementes selecionadas com base no marcador R1-navajo e haploide de acordo com a coloração do endosperma, total de sementes obtidas e média ponderada da indução de haploidia.

Safra	Total	Total de sementes selecionadas pelo R-navajo	Número de sementes haploides	Indução de haploides (%)
2012/2013	17603	5279	552	3,14
2014/2015	14270	389	260	1,82

Por meio das avaliações pelo marcador R1-navajo, foi possível separar as sementes dos potenciais haploides dos diploides. No entanto observa-se que a expressão da coloração de antocianina foi diferente entre as safras. Isso pode ser visualizado, na Figura 2, em que, além da expressão desse gene ter sido menos intensa na safra 2014/2015, a sua intensidade de coloração, também, foi reduzida. Isto é interessante uma vez que foi utilizado apenas um genótipo, o GNZ9501, em cruzamento com as plantas indutoras. Belicuas et al. (2007) ressaltam que esse gene R-navajo apresenta expressividade variável e penetrância incompleta. Dessa forma, o marcador não fornece uma indicação

precisa dos haploides, fazendo com que falsos haploides sejam selecionados, bem como haploides não sejam identificados.

Figura 2 - Expressão fenotípica do marcador R-navajo, avaliada nas sementes obtidas nas safras 2012/2013 e 2014/2015.



Essa expressão diferenciada do marcador R1-navajo, de acordo com as condições ambientais e, principalmente, em razão do background genético do genótipo doador, tem sido observada em outros estudos. Isto acontece, principalmente, porque alguns germoplasmas possuem a expressão da antocianina natural no tecido do pericarpo (CHAIKAM et al., 2016), além do tipo de grão poder influenciar nesse caráter, como é o caso do milho que pode apresentar grãos duros ou dentados, por exemplo (EDER; CHALYK, 2002).

Eder e Chalyk (2002) observaram que a indução de haploides, em caso de indutores gimnogenéticos, é bastante influenciada pelo tipo de germoplasma utilizado como parental feminino, considerando o tipo de grãos. Esses autores compararam a indução de haploidia, em 20 genótipos diferentes, populações sintéticas, híbridos simples e híbridos triplos, que possuem grãos duros, dentados e ambas as características (duro x dentado) e observaram que todos os efeitos, como geração segregante e tipo de grãos, influenciaram na indução. A expressão do marcador R1-navajo foi melhor em genótipos dentados e dentados x duros, quando comparada a genótipos com grãos duros.

No presente estudo, o híbrido GNZ9501 apresenta grãos do tipo semiduro. Kebede et al. (2011) observaram uma maior taxa de indução de haploidia, no inverno do México, de 7.37% de indução, quando comparado com o verão, 6,11% de indução. Além disso, concluíram que o background genético bem como as condições ambientais, durante a polinização, também, foram fatores determinantes na obtenção de haploides.

Diversas características morfológicas têm sido testadas para a identificação dos haploides e diploides em milho. Couto et al. (2013) avaliaram comprimento, peso, largura e espessura das sementes dos haploides. No entanto esses autores observaram que estas características não foram eficientes para a sua discriminação. A coloração roxa da radícula tem sido demonstrada como uma característica eficiente para esse tipo de discriminação (CHAIKAM et al., 2016; ROTARENCO; ADICU; SARMANIUC, 2009; ROTARENCO et al., 2010).

A coloração roxa da raiz das plantas foi avaliada para a discriminação dos haploides e diploides. Neste estudo, essa coloração foi observada em alguns diploides, como pode ser observado, na Figura 4, da safra 2012/2013. Na safra 2014/2015, a maioria das raízes não apresentou a coloração roxa. Chaikam et al. (2016) observaram que essa característica só é eficiente em casos em que os indutores apresentam essa coloração na raiz, fazendo com que a característica seja expressa na raiz dos diploides. Para comprimento de raiz, os genótipos não apresentaram diferenças expressivas que permitissem uma distinção entre haploides e diploides, em ambas as safras (FIGURA 3 e 4).

Figura 3 - Avaliação do comprimento de raiz para haploide e diploide de acordo com o marcador R-navajo, safra 2012/2013.



Figura 4 - Avaliação do comprimento de raiz para haploide e diploide de acordo com o marcador R-navajo, safra 2014/2015.

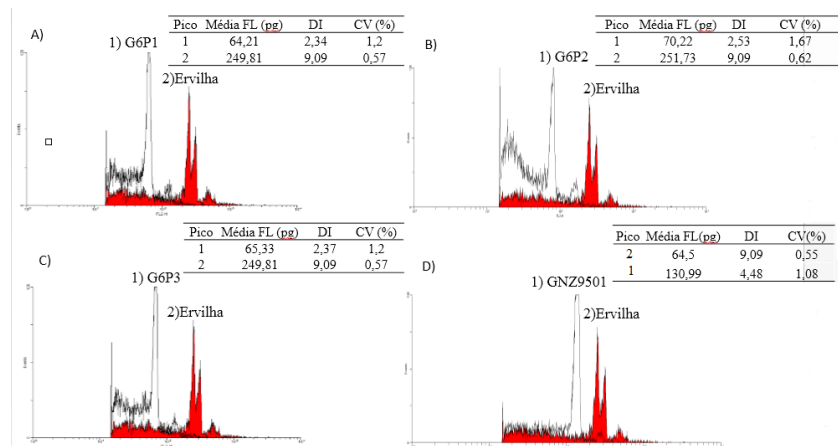


A citometria de fluxo foi realizada, em todos os possíveis haploides da safra 2012/2013, selecionados com base na coloração do endosperma. Para isso, todas as sementes dos possíveis haploides (552 sementes) foram semeadas em vasos em casa de vegetação. A porcentagem de germinação dessas sementes foi de, aproximadamente, 70%, totalizando, assim, 386 plantas possíveis haploides avaliados pela citometria de fluxo. Esta técnica tem sido utilizada em diversos estudos com duplo-haploides pela sua acurácia, rapidez e confiabilidade para

identificá-los (COUTO et al., 2013). Também é de grande utilidade em outras espécies, especialmente, aquelas cultivadas *in vitro*, tais como citros (LATADO et al., 2007), colza (MOHAMMADI et al., 2012) e algumas espécies de brachiaria (PAULA et al., 2013).

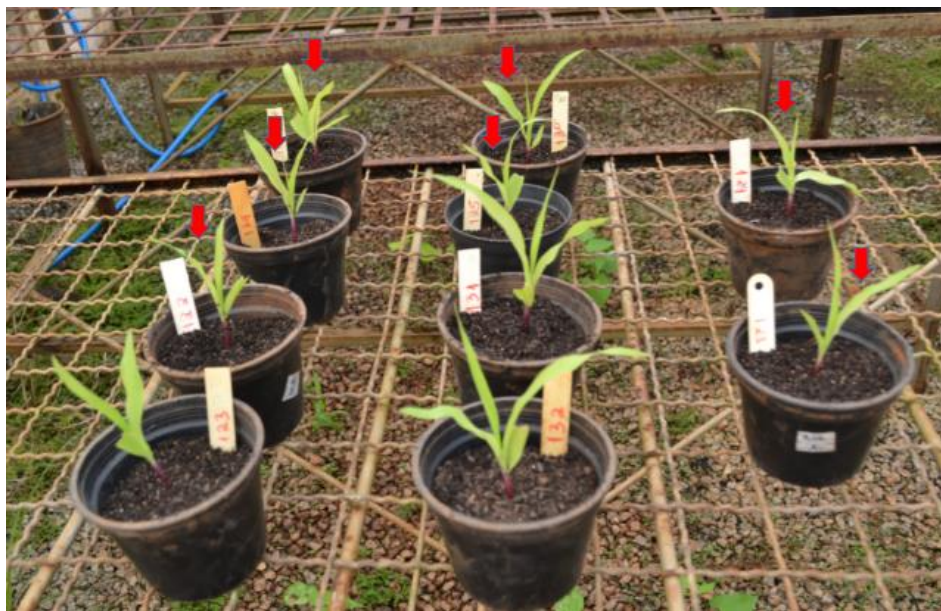
A citometria de fluxo confirmou três haploides, da progênie indutora 6, dos 386 avaliados da safra 2012/2013 (FIGURA 5). As Figuras 5 (A, B e C) são exemplos de histogramas oriundos de plantas haploides. Na Figura 5 (A), é apresentado o pico G1 das células haploides da amostra, com a quantidade de DNA de 2,34 pg/2C, estimada pela comparação com a quantidade de DNA, usando a ervilha (*Pisum sativum*) como padrão, com a quantidade de DNA conhecida de 9,09 pg/2C. Por meio da estimativa da quantidade de DNA da amostra, fica evidente que apresentou, aproximadamente, a metade da quantidade de DNA do híbrido doador. O pico menor próximo ao pico G1 da amostra é considerado como o pico G2 das células haploides.

Figura 5 - Histogramas das ploidias detectadas em citometria de fluxo em plantas selecionadas como possíveis haploides pelo marcador R-navajo, obtidas na safra 2012/2013. A) Histograma da planta 1 da progênie 6 com o padrão externo *Pisum sativum*. B) Histograma da planta 2 da progênie 6. C) Histograma da planta 3 da progênie 6. D) Histograma do genitor feminino diploide, GNZ9501.



A seleção de haploides da segunda safra (2014/2015) foi feita, também, pelo vigor das plantas, além do marcador R-najavo, a fim de identificar falsos haploides (FIGURA 6). Dessa forma, plântulas com menor vigor foram consideradas como haploides. Battistelli et al. (2013) e Rotarenco, Adicu e Sarmaniuc (2009), trabalhando com indutores de haploides maternos, verificaram que, mesmo na presença do gene inibidor de antiocianina Cl-1, é possível substituir o marcador R1-navajo pelo vigor das plantas para a discriminação dos haploides e diploides. Battistelli et al. (2013) e Couto et al. (2013) salientam que, também, é possível eliminar os diploides considerando o vigor em plantas adultas. Battistelli et al. (2013) e Prigge et al. (2011) comentam que a utilização dessa característica, para identificação de haploides, é mais eficaz quando um híbrido simples é utilizado como genótipo induzido, que é o caso deste estudo em que foi utilizado o híbrido simples GNZ9501. Isto é observado, provavelmente, pelo fato de que híbridos simples apresentam vigor maior quando comparado a outras gerações segregantes ou outros tipos de híbridos.

Figura 6 - Classificação das plantas obtidas na safra 2014/2015, de acordo com o vigor, avaliado 20 dias após a semeadura em casa de vegetação. A seta vermelha indica as plantas consideradas como haploides.



O vigor das plantas da safra 2014/2015, pré-selecionadas como potenciais haploides pelo marcador R1-navajo, foi avaliado 8 e 20 dias após o plantio. De acordo com essa característica, foram consideradas 16 plântulas como possíveis haploides e, portanto foi efetuada a citometria de fluxo, análise mitótica e uso de marcadores moleculares SSR para confirmar a sua ploidia.

Por meio das análises de citometria desses possíveis haploides identificados como baixo vigor, foram identificadas somente plantas diploides (FIGURA 7). Na Figura 7 (A e B), é apresentado o histograma de duas repetições de uma das 16 plantas analisadas na citometria. Observa-se que ambas as repetições da planta analisada são diploides. Além disso, essas plantas diploides apresentaram, praticamente, a mesma quantidade de DNA do genótipo doador feminino, que corresponde a um híbrido simples diploide (FIGURA 8).

Figura 7 - Histogramas das ploidias detectadas em citometria de fluxo em plantas de milho, safra 2014/2015. A) Histograma da planta L7R1 e do padrão interno ervilha (*Pisum sativum*). B) Histograma da planta L7R2.

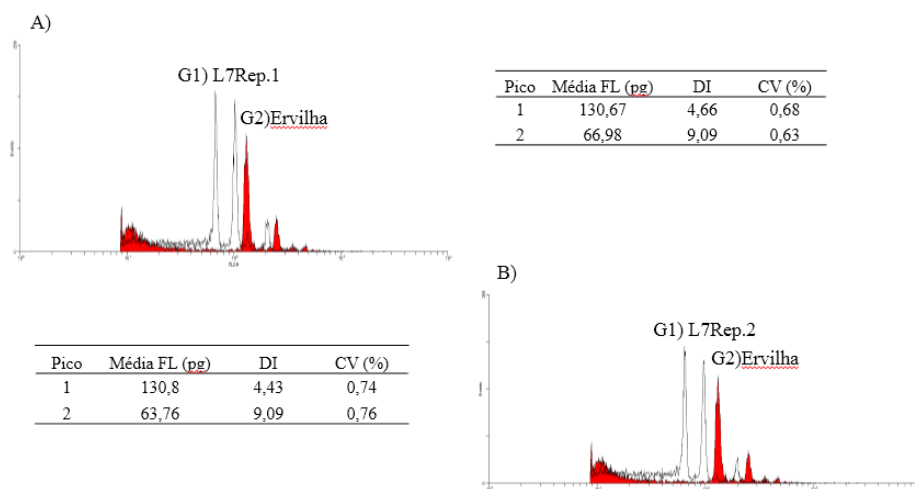
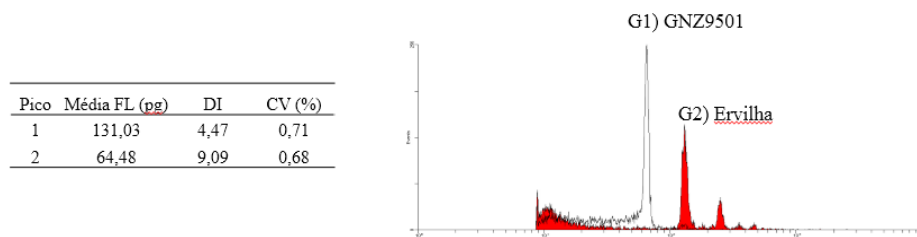


Figura 8 - Histograma do genitor diploide feminino, GNZ9501, e do padrão interno ervilha (*Pisum sativum*), obtido em citometria de fluxo, da safra 2014/2015.



Outro ponto relevante a ser comentado sobre a citometria de fluxo, efetuada nas safras 2012/2013 e 2014/2015, é que a taxa de indução de haploidia, de acordo com a citometria, foi de apenas 0,02% e 0% em relação ao total de sementes obtidas, respectivamente (TABELA 2). Portanto a eficiência da coloração do endosperma foi de apenas 1,41% para a identificação das

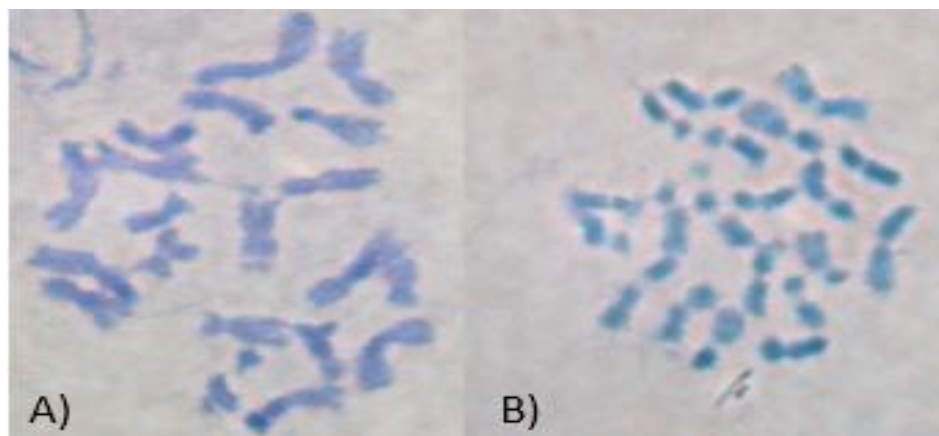
plantas da safra 2012/2013 e de 0% para a safra 2014/2015. No entanto, nesta última safra, é importante ressaltar que foi realizada a citometria de fluxo somente nas plantas que apresentaram menor vigor, que representam apenas 4% das plantas selecionadas como possíveis haploides pelo marcador R-navajo. Belicuas et al. (2007) e Couto et al. (2013) observaram uma eficiência na utilização da coloração do endosperma de 1% e 0,86%, respectivamente. Dessa forma, é de grande importância o estudo de outras características que permitam uma eficaz identificação de haploides de milho.

Tabela 2 - Número de sementes selecionadas pelo marcador R-navajo e haploides confirmados pela citometria de fluxo.

Safra	Total	Total de selecionadas pelo R-navajo	Indução de haploides (%)
2012/2013	17603	5279	0,02
2014/2015	14270	389	0

Além da citometria, foram obtidas algumas lâminas de metáfase C para realizar a contagem cromossômica dos possíveis haploides de ambas as safras (FIGURA 9 A e B). Depreende-se que ambas as metáfases C obtidas correspondem a plantas diploides de milho uma vez que é possível contar 20 cromossomos. Não foi possível a obtenção de lâminas das três plantas haploides, identificadas pela citometria, da safra 2012/2013. Provavelmente isso ocorreu, uma vez que essas plantas possuem baixo vigor e, dessa forma, podem não apresentar alta atividade celular, dificultando a obtenção de lâminas com grandes quantidades de metáfases que permitam uma fácil visualização dos cromossomos. Na literatura, não encontramos relatos da utilização dessa metodologia para a identificação de haploides em milho. Dessa maneira, este estudo foi o primeiro no estabelecimento de protocolos de contagem cromossômica em haploides em milho.

Figura 9 - Metáfase C de plantas diploides obtidas na safra 2012/2013 (A) e 2014/2015 (B).



Os 260 indivíduos selecionados como possíveis haploides pelo R-navajo da safra 2014/2015 foram submetidos a análises moleculares com marcadores microsatélites para confirmar a ploidia dessas plantas. Um primer polimórfico, o BNLG 1233, foi utilizado para detectar os haploides gimogenéticos.

Como os indutores de haploidia apresentavam segregação, foram coletadas folhas de quatro plantas da mesma progênie a fim de obter uma boa representatividade das mesmas. Para saber a quantidade de plantas necessária, para representar as progênies $S_{2:3}$, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$n = \frac{\log(1-p)}{\log(1-P)}, \text{ em que } p \text{ é a probabilidade de 95\% que essa planta ocorra}$$

e P é $7/16$, ou seja, a probabilidade de ocorrência do genótipo desejado na geração $S_{2:3}$. Concluiu-se que cinco plantas seriam suficientes, para representar essas progênies, considerando um gene com dois alelos, assumindo distribuição independente.

O primer polimórfico permitiu distinguir os indivíduos haploides, homozigotos, dos diploides, heterozigotos. Exemplos de padrão de bandas de haploides e diploides, oriundos do cruzamento da progênie 6 indutora com o GNZ9501, estão identificados na Figura 10. Por meio das análises moleculares,

foram considerados haploides aqueles que apresentaram uma banda no gel, proveniente do genitor feminino, GNZ9501, já que os haploides têm herança gimnogenética conhecida. No total, observou-se uma quantidade de 65 haploides. Assim, 25% dos possíveis haploides, assim caracterizados pelo marcador R1-navajo, são realmente haploides, de acordo com o marcador molecular SSR. Outros estudos, também, confirmam uma alta eficiência na utilização desses marcadores com o mesmo primer (BATISTELLI et al., 2013; COUTO et al., 2015). Batistelli et al. (2013) obtiveram os mesmos resultados para diferenciação de haploides e diploides com o uso de marcadores SSR e a citometria de fluxo.

Figura 10 - Primer 1233. Amostras: GNZ9501, Genitor P6, Diploide, Diploide, Diploide, haploide, haploide, haploide.



Assim, dentre as características avaliadas, a utilização de marcadores moleculares de DNA foi a característica que apresentou maior coincidência de resultados quando comparada ao marcador R-navajo. Além disso, é uma ferramenta de fácil utilização. Esses marcadores, por serem codominantes, permitem a fácil visualização e identificação dos indivíduos homozigotos. A citometria de fluxo, também, foi uma técnica de fácil utilização e que deve ser considerada em outros estudos com o mesmo tipo de abordagem.

A obtenção de metáfases C para a contagem cromossômica não foi de fácil utilização em indivíduos haploides, como era esperado. A utilização do

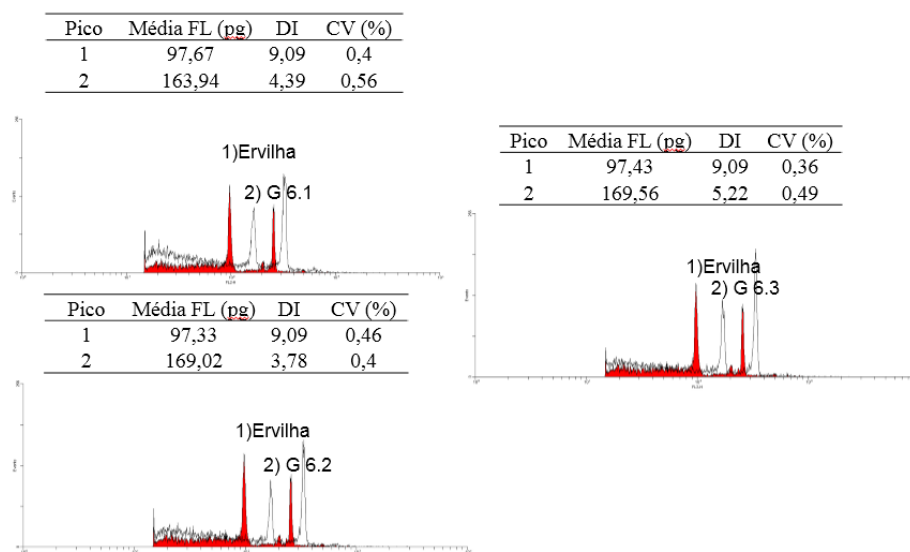
marcador R1-navajo, que é amplamente utilizado na obtenção de linhagens duplo-haploides de milho, pode ser dificultada em função de sua expressividade variável e penetrância incompleta. A avaliação da coloração e comprimento de raiz, bem como o vigor das plantas, devem ser consideradas em condições específicas, dependendo do background genético e da geração segregante em que se encontra o genótipo a ser induzido.

3.2 Duplicação cromossômica em haploides de milho

A tentativa de duplicação cromossômica foi realizada nas 3 plantas haploides identificados pela citometria da safra 2012/2013. O protocolo utilizado para duplicação foi sugerido por Couto et al. (2013), o qual foi aplicado 16 dias após a semeadura em casa de vegetação. Novamente, a citometria de fluxo foi realizada, aos 12 dias após a duplicação, para confirmar se o protocolo foi eficiente.

Os histogramas obtidos pelo citômetro de fluxo demonstram que a duplicação ocorreu, nos três haploides (FIGURA 11), uma vez que as plantas analisadas apresentam a mesma quantidade de DNA de uma planta de milho diploide. Dessa forma, estas plantas são totalmente homozigotas e a sua autofecundação permite a obtenção de linhagens denominadas duplo-haploides.

Figura 11 - Histogramas das ploidias detectadas em citometria de fluxo em plantas de milho, safra 2012/2013. A) Histograma da planta 6.1, pós-duplicação, B) Histograma da planta 6.2, pós-duplicação. C) Histograma da planta 6.3, pós-duplicação.



Mais estudos são necessários para confirmar a eficiência do protocolo de duplicação, utilizando-se uma maior quantidade de plantas. Após a duplicação cromossômica, as plantas foram transplantadas para vasos maiores e foram adubadas, pois, como comentado anteriormente, o objetivo foi realizar a sua autofecundação. No entanto não foi possível colher sementes dessas plantas, uma vez que estas plantas apresentaram dificuldades no desenvolvimento de suas inflorescências tanto femininas, quanto masculinas.

Este fato tem sido observado com bastante frequência nesse tipo de linhagem. Battisteli et al. (2013) avaliaram a porcentagem de linhagens DH que apresentaram fertilidade no pendão e observou que apenas 32% das plantas apresentaram pólen viável. Esse fato, também, foi relatado por Couto et al. (2013), em que compararam a viabilidade de pólen de plantas haploides, DH e diploides. Esses autores relataram que, entre as plantas avaliadas, as DH

apresentam a menor viabilidade polínica, mesmo quando comparadas com plantas haploides. Dang et al. (2012) destacam que essa inviabilidade pode ser pronunciada, porque milhos tropicais são muito sensíveis à temperatura e ao fotoperíodo, principalmente, nos primeiros estágios vegetativos, podendo, assim, dificultar o seu desenvolvimento e reprodução. No entanto é importante ressaltar que a sua autofecundação é possível de ser realizada. Existem algumas práticas que podem ser tomadas, principalmente, por pessoas com experiência em polinização de milho, especialmente, de linhagens.

4 CONCLUSÕES

A expressão do marcador R1-navajo varia em função das condições ambientais, não sendo suficiente para identificar os potenciais haploides.

O comprimento e coloração da raiz não são eficientes para discriminar os haploides, dependendo do germoplasma utilizado em cruzamentos.

A obtenção de lâminas de mitose de indivíduos haploides é dificultada em razão da menor atividade celular desses indivíduos.

O uso da citometria de fluxo e de marcadores moleculares SSR são os mais recomendados para a confirmação dos haploides.

É possível a duplicação cromossômica de haploides de acordo com o protocolo utilizado. No entanto não foi possível a obtenção de sementes das linhagens duplo-haploides.

REFERÊNCIAS

- BATISTELLI, G. M. et al. Production and identification of doubled haploids in tropical maize. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, p. 4230-4242, Apr. 2013.
- BELICUAS, P. R. et al. Androgenetic haploids and SSR markers as tools for the development of tropical maize hybrids. **Euphytica**, Wageningen, v. 156, n. 1, p. 95-102, July 2007.
- CHAIKAM, V. et al. Development and validation of red root marker-based haploid inducers that effectively complement R1-nj (Navajo) marker-based in vivo haploid identification in maize. **Crop Science**, Madison, v. 56, n. 1, p. 1-36, Apr. 2016.
- CHASE, S. S. Production of momozygous diploids of maize from monoploids. **Agronomy Journal**, Madison, v. 44, p. 263-267, 1952.
- CHASE, S. S.; NANDA, D. K. Comparison of variability in inbred lines and monoploid-derived lines of maize (*Zea mays L.*). **Crop Science**, Madison, v. 5, p. 275-276, 1965.
- COUTO, E. G. de O. et al. Identification of haploid maize by flow citometry, morphological and molecular markers. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 37, n. 1, p. 25-31, jan./fev. 2013.
- COUTO, E. G. de O. et al. Verification and characterization of chromosome duplication in haploid maize. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 14, n. 1, p. 6999-7007, Feb. 2015.
- DANG, N. C. et al. Inducer line generated double haploid seeds for combined waxy and opaque 2 grain quality in subtropical maize (*Zea mays L.*). **Euphytica**, Wageningen, v. 183, n. 1, p. 153-160, Jan. 2012.
- DOLEZEL, J. Application of flow cytometry for the study os plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, Olomouc, v. 38, p. 285-302, 1997.
- DONG, F. et al. Development and applications of a set of chromosome-specific cytogenetic DNA markers in potato. **Theorethical Applied Genetics**, Berlin, v. 101, n. 7, p. 1001-1007, Nov. 2000.

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.

EDER, J.; CHALYK, S. T. In vivo haploid induction in maize. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 104, n. 20, p. 703-708, Aug. 2002.

FRITSCHÉ-NETO, R.; GARBUGLIO, D. D.; BORÉM, A. Duplo-haploides. In: BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. (Ed.). **Biotechnologia aplicado ao melhoramento de plantas**. Viçosa, MG: UFV, 2012. p. 267-301.

GEIGER, H. H.; GORDILLO, G. A. Doubled haploids in hybrid maize breeding. **Maydica**, Bergamo, v. 54, n. 1, p. 485-499, Jan. 2009.

KEBEDE, A. Z. et al. Effect of source germplasm and season on the in vivo haploid induction rate in tropical maize. **Euphytica**, Wageningen, v. 180, n. 5, p. 219-226, Feb. 2011.

LATADO, R. R. et al. Plantas autotetraplóides de citros sob tratamento *in vitro* com colchicina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 10, p. 1429-1435, out. 2007.

LI, L. et al. Morphological and molecular evidence for DNA introgression in a haploid induction via high oil inducer CAUHOI in maize. **Planta**, Berlin, v. 230, n. 1, p. 367-376, May 2009.

MOHAMMADI, P. P. et al. Doubled haploid plants following colchicine treatment of microspore derived embryos of oilseed rape (*Brassica napus* L.). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Theran, v. 108, n. 2, p. 251-256, Jan. 2012.

PATERNIANI, E.; CAMPOS, M. S. Melhoramento do milho. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa, MG: UFV, 1999. p. 429-485.

PAULA, C. M. P. et al. Distribution pattern of histone H3 phosphorylation at serine 10 during mitosis and meiosis in *Brachiaria* species. **Journal of Genetics**, Bangalore, v. 92, n. 2, p. 259-266, Aug. 2013.

PRIGGE, V. et al. Doubled haploids in tropical maize: I., effects of inducers and source germplasm on in vivo haploid induction rates. **Crop Science**, Madison, v. 51, n. 4, p. 1498-1506, Oct. 2011.

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

ROTARENCO, V. A.; ADICU, G.; SARMANIUC, M. Induction of maternal haploids in maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 83, n. 1, Jan. 2009. Disponível em: <<http://www.agron.missouri.edu/mnl/83/46rotarenco.htm>>. Acesso em: 10 mar. 2015.

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

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