

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

KLAYTON FLÁVIO MILANI

**Obtenção e avaliação de duas populações tropicais de milho indutoras de
haplóides**

MARINGÁ –2013

KLAYTON FLÁVIO MILANI

Obtenção e avaliação de duas populações tropicais de milho indutoras de
haplóides

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia para a obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Scapim

Co-orientador: Prof. Dr. Ronald José Barth Pinto

MARINGÁ – 2013

Ficha catalográfica

FOLHA DE APROVAÇÃO

KLAYTON FLÁVIO MILANI

Obtenção e avaliação de duas populações tropicais de milho indutoras de
haplóides

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia para a obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Comissão julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA:

Prof.º Dr. Carlos Alberto Scapim
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof.º Dr. Ronald José Barth Pinto
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr^a. Andréa Beatriz Mendes Bonato
Universidade Estadual de Maringá

Prof.º PhD. Leandro Simões Azeredo Gonçalves
Universidade Estadual de Londrina

Aprovada em:
Local de defesa:

“...E você aprende que realmente pode suportar, que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe, mesmo depois de pensar que não se pode mais.”

(O Menestrel – William Shakespeare)

DEDICATÓRIA

À minha família, por sempre me motivar a ir mais além.
Com respeito dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à,

Universidade Estadual de Maringá, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PGA), pelo espaço e oportunidade;

Ao CNPQ, pela bolsa de estudos;

Ao professor Dr. Carlos Alberto Scapim, pela orientação, ajuda e conselhos, não apenas no desenvolvimento do projeto, mas também no aperfeiçoamento profissional;

Ao professor Dr. Ronald José Barth Pinto, pela orientação, ajuda e conselhos no desenvolvimento do trabalho;

À professora Dra. Andréa Beatriz Mendes Bonato, pelo auxílio na parte laboratorial do trabalho, pela amizade e conselhos dados;

À minha família Rubens, Marta, Núbia, Vanessa, Pedro, Josemar e Fernando, pelo apoio e incentivo, sempre;

Aos meus amigos do mestrado, e para toda a vida, Acácio, Lucas (Camacho), Marlon, Vitor (Vitão), José Lidércio, Henrique, Gabriel (Loli), Antonio Augusto (Mineiro), Hingrid, e demais, pelos aprendizados, momentos vividos, conselhos trocados, e experiência adquirida;

Ao Oélcio (Élcio), pelo apoio, ajuda e presença sempre nos momentos de correria e sufoco na parte prática do trabalho;

Ao senhor Antônio Queiroz, pela grande e valiosa ajuda na condução dos campos experimentais;

Aos meus grandes e antigos amigos, Léo, Adriano, Gabriel, Marcelo, Lucas (Lukinha) Peter, e demais, pela amizade, companheirismo e compreensão;

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, e que não foram citados;

Por fim, agradeço a Deus, por apresentar pessoas particularmente essenciais em minha vida, e por me dar força e coragem para superar o(s) desafio(s) proposto(s).

Eternamente agradeço.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT	xiii
1.INTRODUÇÃO	1
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. A CULTURA DO MILHO	3
2.2. MILHO PIPOCA.....	4
2.3. HETEROSE	5
2.4. O MILHO HÍBRIDO NO BRASIL	7
2.5. HAPLÓIDES E DUPLO-HAPLÓIDES	8
2.5.1. HISTÓRICO	8
2.5.2. OBTENÇÃO DE LINHAGENS DH <i>IN VIVO</i>	10
3.MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. LOCAL.....	12
3.2. MATERIAL GENÉTICO.....	12
3.3. OBTENÇÃO DAS POPULAÇÕES TROPICAIS INDUTORAS DE HAPLOIDIA	13
3.4. TESTES DAS NOVAS POPULAÇÕES TROPICAIS INDUTORAS DE HAPLOIDIA	13
3.5. CONTAGEM DE CROMOSSOMOS	17
3.6. TESTE QUI-QUADRADO.....	18
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
5.CONCLUSÕES	32
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número total de sementes possíveis haplóides, selecionadas com base na coloração do endosperma, para as novas populações indutoras de haploidia de milho comum e milho pipoca cruzadas com a linhagem de milho comum-47 e a linhagem de milho pipoca P-9, respectivamente.....	20
Tabela 2: Números de sementes que apresentaram n=10 cromossomos na contagem de cromossomos, e nova taxa de indução das populações indutoras confirmadas pela contagem de cromossomos	22
Tabela 3. Número total de sementes possíveis haplóides, selecionadas com base na coloração com antocianina no endosperma, para as novas populações indutoras de haploidia de milho comum e milho pipoca, cruzadas com o híbrido comercial 2B707.....	26
Tabela 4. Números de sementes que apresentaram n=10 cromossomos na contagem de cromossomos das sementes possíveis haplóides selecionadas do cruzamento entre as novas populações indutoras de haploidia com o híbrido comercial 2B707.....	28
Tabela 5. Resultado do teste qui-quadrado (x^2) para o número de haplóides obtidos e o número de haplóides esperados pela taxa de indução natural.....	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Disposição do campo de polinização das novas populações indutoras com as linhagens L-47 e P-9, e com o híbrido 2 B707.....	14
Figura 2. Espigas colhidas nas parcelas dos genótipos usados como fêmeas.....	16
Figura 3. Separação das sementes de cada espiga de acordo com o padrão de pigmentação por antocianina.	17
Figura 4. Imagens das lâminas de contagem durante a contagem de cromossomos em microscópio ótico.....	24
Figura 5. Sementes com diferentes níveis de coloração por antocianina, causado pela variação na expressão do gene <i>R1-nj</i>	25

RESUMO

MILANI, Klayton Flávio, M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, Junho de 2013.
Obtenção e avaliação de duas populações tropicais de milho indutoras de haplóides.
Professor Orientador: Carlos Alberto Scapim. Professor Conselheiro: Ronald José Barth Pinto.

O milho, em geral, é um alimento bastante apreciado no Brasil, bem como no mundo. O processo de produção de híbridos de linhagens de milho resume-se em três etapas distintas: a) obtenção de linhagens endogâmicas; b) teste de capacidade de combinação das linhagens selecionadas, identificando as melhores combinações; c) produção e comercialização dos híbridos. A etapa de obtenção de linhagens em especial é uma etapa demorada e onerosa, necessitando de vários ciclos sucessivos de autofecundação. Uma proposta alternativa para acelerar essa etapa é a produção de linhagens endogâmicas de forma instantânea, aplicando-se o uso da tecnologia Duplo-Haplóide (DH), por meio de genótipos indutores de haploidia. No entanto, a grande maioria dos genótipos indutores é de origem temperada, não estando adaptados ao clima tropical. Assim, o presente trabalho objetivou transferir o caráter de indução da variedade temperada indutora de haploidia Krasnodar Haploid Inducer (KHI) para dois genótipos tropicais, uma linhagem de milho comum (L-47) e uma linhagem de milho pipoca (P9), formando duas populações indutoras de haploidia adaptadas ao clima tropical. Paralelamente ao estudo, também foi analisada a eficiência da separação de sementes possíveis haplóides apenas pela coloração por antocianina do endosperma, utilizando o método citogenético de contagem de cromossomos para a confirmação dos indivíduos haplóides verdadeiros. As novas populações indutoras foram obtidas pelo método padrão de melhoramento, por meio de cruzamentos e autofecundações, e as mesmas foram testadas quanto à capacidade de indução. As sementes possíveis haplóides foram separadas e submetidas à contagem de cromossomos para a confirmação da condição haplóide. As novas populações indutoras apresentaram-se eficientes na indução de haploidia, formando haplóides de origem materna. A separação de sementes haplóides apenas pela coloração do endosperma mostrou-se ineficiente, sendo necessário método mais apurado, como contagem de cromossomos.

Palavras-chave: Duplo-haplóide, indutor de haplóides, tropicalização.

ABSTRACT

MILANI, Klayton Flávio, M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, June, 2013. **Obtaining and avaluation of two tropical maize population haploid inducers.** Adviser: Carlos Alberto Scapim. Committee members: Ronald José Barth Pinto.

The corn, in general, is a very popular food in Brazil and all world. The production of hybrid maize lines can be summarized in three distinct stages: a) obtaition of inbred lines b) evaluation of combining ability of the selected inbred lines, identifying the best combinations c) production and marketing of hybrids. The first step is a slow and costly stage, requiring several successive cycles of selfing. An alternative approach to accelerate this step is the production of inbred lines, by applying the technology of Double-Haploid (DH) by means of haploidy inducer genotype. However, the vast majority of genotypes are inducers of temperate and are not adapted to tropical climate. Therefore, this study aimed to transfer the haploid inducer character from Krasnodar Haploid Inducer (KHI) to two tropical genotypes, a inbred line of field corn (L-47) and a inbred line of popcorn (P9), forming two populations haploid inducers adapted to the tropical climate. In parallel to the study, was also analyzed the efficiency of the separation of putative haploid seeds only by staining anthocyanin endosperm, and the feasibility of the method of cytogenetic chromosome counts for confirmation of true haploid individuals. The new inducer populations were obtained by the standard breeding method by means of crosses and self pollination, and the same were tested for inducibility. The putative haploid seeds were separated and subjected to chromosome counts for confirming the haploid condition. The new inducing populations showed to be efficient in inducing haploidy, forming haploids from maternal origin. The separation of haploid seed endosperm only by staining proved to be inefficient. The technique of chromosome counts was found to be an efficient method, but time consuming and laborious for confirmation of haploid individuals.

Keywords: Double´haploid, haploid inducers, tropicalization.

1. INTRODUÇÃO

Até o início do século XX a produção de milho era relativamente baixa comparada à atual, pois predominavam o cultivo de variedades de polinização aberta. No final deste período, com divulgação dos resultados de East (1908) e Shull (1908; 1909), o plantio de sementes híbridas de milho ganhou força e ao longo dos anos permitiu o aumento crescente da produtividade desta cultura. Ambos os autores realizaram experimentos com autofecundações em milho e observaram a redução de rendimento e vigor com avanço nas gerações de endogamia. Shull (1908) promoveu o cruzamento entre estas linhagens endogâmicas e constatou imediata e completa restauração do vigor e rendimento, sendo que em muitos casos a produtividade destes híbridos superava os das variedades cuja linhagem foi obtida. Essa superioridade do híbrido em comparação aos seus pais é hoje conhecida como heterose.

No ano seguinte, o mesmo autor sugeriu procedimentos que mais tarde se tornariam padrão em programas de melhoramento de milho (Shull, 1909) a respeito à síntese de híbridos a partir do cruzamento entre duas linhagens endogâmicas, originando plantas com maior potencial produtivo em relação aos seus genitores (ALLARD, 1960).

Pelos métodos convencionais de melhoramento, linhagens endogâmicas de milho são obtidas por meio de sucessivas autofecundações de uma família pré-selecionada de uma espiga, em que o pólen de cada planta é coletado da parte masculina (pendão) e depositado na parte feminina (estigma/espiga) da mesma planta. De modo geral, o processo de obtenção de uma linhagem endogâmica leva cerca de 6 a 8 autofecundações, ou 3 a 4 anos (BUENO et al, 2001). Além disso, a obtenção e avaliação de linhagens endogâmicas de milho são as etapas mais onerosas do processo de formação de híbridos, e o tempo, mão de obra, infraestrutura e recursos financeiros empregados encarecem o produto final. Diante desse complexo processo para obtenção de linhagens, observa-se necessária a busca de técnicas mais sofisticadas, em que linhagens possam ser obtidas em menor período de tempo, e com menor custo. Uma alternativa ao método convencional com diversas autofecundações é a técnica dos haplóides duplicados, conhecida também por duplo-haplóides.

Para formação dos duplo-haplóides *in vivo*, deve-se realizar a indução de um genótipo à haploidia, a partir do cruzamento deste com um material especial capaz de induzir as plantas a herdarem apenas o genoma de um dos pais, com posterior duplicação desse material genético pelo uso de técnicas laboratoriais e o agente antimitótico colchicina,

restaurando a condição diplóide do genótipo. Esse método oferece como vantagem a aceleração do processo de obtenção de linhagens homozigotas, diminuindo assim o tempo de síntese dos híbridos (SILVA, 2009).

A técnica dos haplóides duplicados foi proposta primeiramente por Chase (1952) e atualmente é utilizada por empresas de melhoramento em função da possibilidade de reduzir o tempo e o custo despendidos na obtenção de linhagens, melhorando assim, a eficiência na produção de híbridos. Quando esta tecnologia é empregada, há possibilidade de homozigose completa em apenas duas gerações em milho, além do enriquecimento do *pool* gênico por genes favoráveis e eliminação dos genes desfavoráveis, aliada a capacidade de uso destes materiais como fontes no melhoramento genético.

Atualmente, existem vários genótipos indutores de haploidia com variada taxa de indução. Dentre esses genótipos pode-se citar a linhagem Stock 6, a linhagem W23, a linhagem WS14, a linhagem MHI e a linhagem RWS. Por serem originários de condições climáticas mais amenas (clima temperado), há uma grande dificuldade de se utilizar tais materiais no território brasileiro, onde o clima tropical é predominante (BELICUAS et al., 2007). Estes genótipos indutores apresentam potencial para serem melhorados. A capacidade de indução dos genótipos indutores aumentou de 3.2% da Stock 6 em 1959 para mais de 8% em 2005 (PIERRE et al, 2011).

Entretanto, apesar desse incremento na taxa de indução da haploidia, a seleção de progênies haplóides é uma grande barreira para o avanço desta tecnologia, pois a triagem destas sementes é feita visualmente através de um marcador morfológico presente no genótipo indutor que leva a produção de antocianina no embrião em sementes diplóides, sendo esta pigmentação produto do gene *R1-nj*. Como esta pigmentação pode ser influenciada pelo ambiente ou pelo *background* genético do genótipo induzido, este tipo de separação de haplóides se torna muitas vezes complexo e pouco confiável (GEIGER e GORDILLO, 2009, DANG et al., 2012).

Na literatura consultada não foi encontrada nenhuma informação sobre indutores de haploidia em milho pipoca. A falta de informação e a busca por novos resultados motivaram a realização do trabalho, a fim de observar um possível diferencial em relação aos atuais indutores de milho comum. Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivos: a) transferir a capacidade de indução à haploidia para milho comum e pipoca, ambos de clima tropical; b) observar a eficiência da separação de sementes de milho de haplóides putativos a partir da

coloração dos grãos por antocianina conferida pelo gene *R1-nj*; c) Verificar a viabilidade do método de contagem cromossômica na detecção de haplóides.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A CULTURA DO MILHO

O milho (*Zea mays* L.) é uma gramínea da família Poaceae, subfamília Panicoideae e tribo Maydeae. Seu centro de diversidade genética concentra-se no continente americano, principalmente na América Central, onde se encontram seus parentes silvestres mais próximos, como *Zea mays* Subs. *Mexicana* (teosinte) e *Tripsacum* (PATERNIANI e CAMPOS, 2005). É uma espécie diplóide, com $2n=20$ cromossomos, classificada como uma espécie alógama, com baixa frequência de autogamia (inferior a 5%) e monóica (KRUG et al, 1943).

De acordo com Mangelsdorf (1974), citado por Paterniani e Viégas (1987), Cristóvão Colombo observou pela primeira vez a existência do milho na costa norte de Cuba, em 1492, e, possivelmente, tenha sido ele o responsável por introduzir a cultura na Europa, levando alguns grãos consigo ao regressar à Espanha.

No mundo, o milho ocupa atualmente o terceiro lugar entre os cereais mais cultivados e consumidos, apenas atrás do trigo e do arroz (FAO, 2013). A cultura está espalhada e adaptada a uma vasta região do planeta, desenvolvendo-se em altitudes extremas que vão desde o nível do mar até cerca de 3.000 metros. Segundo o USDA (2014), a produção mundial de milho em 2013 foi estimada em 862.85 milhões de toneladas. Nesse cenário, os EUA figura como maior produtor (273.83 milhões de toneladas), seguidos por China (205.61 milhões de toneladas) e Brasil (81.00 milhões de toneladas). Na safra 2012/2013, o Brasil foi apontado como principal exportador dessa *commodity*, com uma remessa estimada de 25 milhões de toneladas para o exterior, sendo a área no país destinada a esse fim superior a 15,3 milhões de hectares (IBGE, 2013).

2.2. MILHO PIPOCA

O milho pipoca caracteriza-se por apresentar sementes duras e pequenas. A resistência do pericarpo é associada à concentração de óleo e umidade do endosperma que sob a ação do calor, expandem o amido interno, originando a pipoca (HOSENEY et al., 1983).

Assim como o milho comum, o milho pipoca também pertence à espécie *Zea mays* L., e se diferencia morfológicamente pela característica de pipocamento. Este tipo de milho se diferencia dos demais pela capacidade que os grãos têm de estourar, formando a pipoca. Esta característica é denominada capacidade de expansão e é definida pela relação entre o volume expandido e a massa de grãos utilizada para a expansão. Além da capacidade de pipocamento, as populações de milho pipoca também se caracterizam por apresentar plantas menores e prolíficas, com menor número de folhas, pendão maior e espigas menores, situadas numa posição mais alta no colmo, colmos mais finos e fracos, maior suscetibilidade a doenças e menor produtividade (LINARES, 1987).

A base genética do germoplasma de milho pipoca é relativamente estreita quando comparada ao milho de endosperma comum (ZIEGLER e ASHMAN, 1994), dificultando assim a obtenção de novos genótipos. Os genótipos do tipo pipoca são provenientes do germoplasma *flint*, modificado por meio de seleção para maximizar a capacidade de expansão e a qualidade de pipoca (MIRANDA et al., 2008).

Após aprimoramento e barateamento de máquinas pipoqueiras elétricas e do desenvolvimento e fabricação do forno micro-ondas, o consumo de milho pipoca aumentou consideravelmente, resultando no acréscimo do volume de milho pipoca produzido e processado (ANDRADE et al., 2000). O mercado brasileiro, com o arranque da demanda desde a década de 1990, continua em notável expansão, ganhando espaço no cenário mundial, e sendo uma boa opção econômica para os produtores de milho e demais agricultores (SAWAZAKI, 2003).

O potencial de retorno econômico da cultura do milho pipoca tem permitido o seu crescimento a cada ano, sobretudo para os agricultores familiares, tendo em vista o maior valor agregado do produto em relação ao do milho e a das outras culturas anuais como a soja (ANDRADE et al., 2001; ANDRADE et al., 2002; PINTO et al., 2007). O milho apresenta valor comercial superior ao do milho de endosperma comum. Na comercialização deste tipo de milho, genótipos com maiores índices de capacidade de expansão têm maior valor

comercial devido ao maior volume de pipoca que produzem devido a melhor textura e maior maciez do produto (SAWAZAKI et al, 2003).

Apesar de ser um alimento muito apreciado no Brasil, bem como no mundo, até a década passada o milho pipoca ocupava uma área menor do que a requerida pela demanda interna, sendo necessária a importação dos grãos. O volume de grãos importados representava a maior porcentagem do consumo nacional (GALVÃO et al., 2000). Na década atual, foi observada uma grande expansão na produção e comercialização do grão, quando a quantidade comercializada pela CEASA-MG passou de 780 toneladas na última década, para 1.435 toneladas. Esses registros de aumento de produção e de área cultivada incentivaram os produtores para o cultivo desse tipo de milho e ainda contribuíram para a melhoria dos indicadores econômicos dos milhos especiais (EMBRAPA, 2013).

Estudo do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) tem revelado que a produção ainda é limitada no que diz respeito ao mercado potencial da cultura, sendo o principal entrave a limitação de cultivares que reúnam características agronômicas favoráveis (MOTERLE et al., 2012). Segundo o registro nacional de cultivares do MAPA, existe 44 cultivares registradas, sendo a grande maioria pertencente a empresas empacotadoras como a Yoki Alimentos S/A e Pipolino Indústria e Comércio Ltda., que estabelecem acesso restrito de uso com os produtores parceiros, e ao Instituto Agrônomo de Campinas. Entre os materiais de milho pipoca registrados constam: P 622, P 625, P 628, P 630, P 226 HT, AP 2501, AP 4501, AP 22217 HT, IAC 112, IAC 125 e outras (BRASIL, 2014).

2.3. HETEROSE

Charles Darwin, no final do século XIX, realizou estudos sobre a perda de vigor em linhagens de milho ao longo de sucessivas autofecundações sobre determinadas plantas. Embora ideias sobre a manipulação do desempenho das plantas estivessem sendo desenvolvidas, foi somente em 1908 através da divulgação dos resultados de Shull e East sobre a endogamia e heterose, que se tornou possível a proposta de um esquema básico de produção de sementes por meio do cruzamento entre linhagens endogâmicas (SHULL, 1909).

Em 1920, a introdução do milho híbrido no mercado impulsionou a agricultura moderna (PATERNIANI e VIÉGAS, 1987). E até hoje, um dos principais objetivos dos programas de melhoramento de milho é o aumento da produtividade a partir do milho híbrido. A superioridade dos híbridos comparados com variedades de polinização aberta é desde então evidenciada.

Na produção do milho híbrido há três etapas distintas: a) obtenção de linhagens endogâmicas; b) teste de capacidade de combinação das linhagens selecionadas, identificando as melhores combinações; c) produção e comercialização dos híbridos. O conhecimento da possibilidade de superioridade da geração F1 em relação aos pais foi uma das maiores conquistas da ciência. A cultura do milho foi pioneira na utilização dos conhecimentos sobre a heterose, promovendo a criação e o desenvolvimento da indústria sementeira (PIERRE et al, 2011).

Existem várias teorias para explicar a natureza genética da heterose. Duas destas, as mais bem aceitas, são: a teoria da dominância e da sobredominância. A teoria da dominância defende que a heterose ocorreria pelo aumento da proporção dos genes que tenham pelo menos um alelo dominante em cada loco e foi defendida como principal causa da heterose por DAVENPORT (1908) e BRUCE (1910). A segunda teoria foi proposta quase que simultaneamente por Shull e por East em 1908, e considera que a condição heterozigota por si só confere maior vigor do que qualquer condição homozigota, pois supõe a superioridade do heterozigoto sobre o melhor homozigoto.

Os EUA, maior produtor de milho do mundo, foram os primeiros a utilizar sementes de milho híbrido e o aumento da produção observada desde então foi extraordinário. Em 1906, a produtividade média era de 75 milhões de toneladas, aumentando para 150 milhões de toneladas em 1976, após utilização do milho híbrido. Esse número ainda continuou aumentando com avanço do melhoramento associado à alta tecnologia de cultivo, alcançando 220 milhões de toneladas no final do século XX (HALLAUER, 1990, citado por RABEL, 2008) e atualmente, gira em torno de 273.83 milhões de toneladas (USDA, 2014). No Brasil, os resultados a respeito da contribuição do melhoramento genético da cultura do milho para aumento de produtividade, não foram menos expressivos.

2.4. O MILHO HÍBRIDO NO BRASIL

Segundo Viégas e Miranda Filho (1978), o melhoramento genético de milho no Brasil iniciou em 1932. O lançamento do primeiro híbrido duplo ocorreu em 1939, com comercialização em 1947. A partir desse evento, surgiram novos híbridos bem como populações que possibilitaram a extração de novas variedades e linhagens.

Nos últimos anos, o Brasil lidera os investimentos no desenvolvimento de híbridos de milho tropical, sendo este um mercado altamente competitivo. Os híbridos ocupam lugar de destaque entre as contribuições da ciência para a sociedade, e têm sido responsáveis por expressivos aumentos na produtividade dessa importante cultura em todo o mundo. A contribuição desta tecnologia para o desenvolvimento do agronegócio no Brasil é inquestionável (VENCOVSKY e RAMALHO, 2000).

O melhoramento do milho pipoca no país foi iniciado pelo Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas-SP, em 1932. Em decorrência desse trabalho, no ano de 1941 foi lançada a primeira variedade nacional, proveniente de ciclos de seleção massal na população-base denominada *South American Mushroom* (SAM), derivada da população norte-americana *South American* (PACHECO et al., 2001). Atualmente, encontram-se disponíveis no mercado, algumas variedades de polinização livre e de híbridos de milho pipoca. Entre os principais cultivares podem-se citar os híbridos IAC 112 e IAC 125, Zélia, Jade, e as variedades de polinização aberta Barão Viçosa, Angela e RS20.

Diversas metodologias são empregadas nos programas de melhoramento genético de milho, tais como, seleção recorrente, retrocruzamentos, produção de linhagens por autofecundação e a utilização de duplo-haplóides para futura produção de híbridos (BARBOSA, 2009; VILLARINHO et al., 2003). Entretanto, existem diferentes fatores que interferem direta ou indiretamente no progresso a ser obtido por seleção, merecendo destaque a intensidade de seleção, as propriedades genéticas da população e as condições de ambiente (PATERNIANI e MIRANDA FILHO, 1987).

De maneira geral, o sucesso dos programas de melhoramento de milho híbrido depende do desenvolvimento de linhagens. A obtenção destas é um trabalho oneroso e responsável pela maior parte dos custos envolvidos para obtenção do híbrido. As linhagens representam uma fonte fundamental para os estudos em genética e melhoramento. Além de seu uso extensivo na produção de híbridos, as linhagens são importantes nos estudos de

diversidade genética e desenvolvimento de mapas de ligação. Tais considerações permitem concluir que a obtenção de linhagens a serem utilizadas na síntese de híbridos com alto desempenho produtivo representa uma das principais metas do melhoramento de milho (PIERRE et al., 2011).

2.5. HAPLÓIDES E DUPLO-HAPLÓIDES

Uma planta haplóide é assim chamada por possuir apenas metade de seu patrimônio genético, sendo, portanto, estéril. A duplicação do número de cromossomos de uma planta haplóide, de maneira natural ou induzida, recupera a condição diplóide da mesma, originando uma planta Duplo-Haplóide (DH) com capacidade de reprodução (BATTISTELLI et al., 2013). Segundo Moraes-Fernandes (1990), uma planta só pode ser considerada DH caso contenha gametas viáveis, ou seja, que tenha a capacidade de se reproduzir.

2.5.1. HISTÓRICO

De acordo com Sarkar e Coe (1966), o primeiro relato de haploidia em plantas superiores foi reportado em 1922 em *Datura Stramonium*. Subsequentemente, esporófitos haplóides foram descobertos em várias outras espécies de plantas. O primeiro relato de haploidia em milho foi reportado por Stadler e Randolph (1929), citado por Randolph (1932). Desde então, inúmeras pesquisas vêm sendo conduzidas no sentido de detecção da ocorrência de haplóides espontâneos e haplóides induzidos em várias outras espécies vegetais.

Chase (1952) propôs uma alternativa para acelerar o processo de melhoramento para a cultura do milho, em que a produção de linhagens se daria de forma instantânea, aplicando-se o uso da tecnologia Duplo-Haplóide (DH). A vantagem que a técnica proposta por Chase oferecia era a diminuição do tempo para a obtenção de linhagens endogâmicas homozigóticas.

Embora o processo de obtenção de DH apresentasse grande potencial, sua implantação em larga escala não teve grande aceitação até a década de 90, pois a baixa eficiência nas taxas de indução, a dificuldade de separação de sementes haplóides e de duplicação cromossômica limitou o uso dessa ferramenta. Nos últimos anos, os programas de melhoramento investiram no uso da tecnologia que se baseia na geração de plantas a partir de

um conjunto celular haplóide, com posterior duplicação induzida - por meio de técnicas laboratoriais com uso do agente antimitótico colchicina - ou natural de seu genoma (PIERRE et al, 2011).

Segundo Geiger e Gordillo (2009), além de ser um processo mais rápido para obtenção de linhagens, o uso de Duplo-haplóides oferecem outras vantagens como: máxima variância genética entre as linhas de *per se* e em cruzamentos testcross de primeira geração, perfeita distinção, uniformidade, estabilidade para proteção de cultivares, redução dos custos empregados nas sucessivas autofecundações, bem como na manutenção dos genótipos selecionados, além do aumento da eficiência na seleção assistida por marcadores, introgressão de genes, e piramidação genes em linhagens.

O primeiro genótipo com potencial de indução de haploidia em milho foi estudado por Coe (1959) que desenvolveu uma linhagem com capacidade de indução média de 3,2%. Essa linhagem denominada Stock 6 é classificada como indutor gimnogenético, ou seja, forma haplóides de origem materna, em que o indutor é o doador de pólen. Na década seguinte, Kermicle, (1969) desenvolveu uma linhagem indutora de haploidia denominada W23, que gera haplóides de origem paterna, ou seja, androgenéticos. A partir destes materiais adaptados a clima temperado todas as outras linhagens ou populações indutoras foram originadas.

Prigge et al., (2011), estudou a eficiência de indução de haploidia em germoplasmas tropicais no México, por indutores de clima temperado e constatou que a taxa de indução média destes genótipos não foi afetada. No entanto, os autores defenderam a necessidade de desenvolvimento de indutores tropicais mais adaptados às condições tropicais. Outros resultados como os de Kebede et al., (2011) suportaram a necessidade de obtenção de indutores adaptados ao clima tropical. Neste trabalho, constatou-se que a indução de haploidia por meio de indutores paternos é fortemente influenciada pelo *background* do genótipo do germoplasma fonte e pelas condições ambientais no período de indução. Segundo estes autores, a taxa de indução de indutores, originalmente de clima temperado, foi reduzida durante o verão.

2.5.2. OBTENÇÃO DE LINHAGENS DH *IN VIVO*

Para obtenção dos duplo-haplóides (linhagens homozigotas) deve-se realizar a indução de um genótipo à haploidia, a partir do cruzamento desse genótipo com um material especial capaz de induzir as plantas a herdarem apenas o genoma de um dos pais. Este material com capacidade indutora foi descrito por Coe em 1959, denominado de linhagem Stock-6. Essa linhagem é facilmente identificada e diferenciada dos demais materiais pela presença de um marcador morfológico dominante do sistema R-navajo, codificado pelo gene *R1-nj*, que promove a coloração do endosperma e do embrião do genótipo indutor pela síntese de antocianina (DANG et al., 2012).

Segundo Chase (1963), os haplóides em milho ocorrem de maneira natural, porém, com uma taxa de aproximadamente 0,1%, sendo considerada muito baixa. Para que uma taxa de indução maior fosse alcançada, a capacidade de indução foi melhorada geneticamente e alguns métodos foram desenvolvidos para aumentar o número de haplóides gerados em uma espiga, e assim aperfeiçoar o uso da técnica DH (GEIGER et al., 2009).

Quanto à linhagem Stock 6, seu mecanismo de indução à haploidia ainda não é bem conhecido (ROTARENCO et al., 2010). No entanto, para o caso do indutor gimnogenético e seus derivados, os mesmos são doadores de pólen. Há indícios de que o mecanismo responsável pela formação de haplóides gimnogenéticos, na verdade, é uma disfunção durante a dupla fertilização da parte feminina. Durante a fertilização os dois núcleos espermáticos do grão de pólen se desenvolvem em velocidades diferentes, carreando pelo tubo polínico em momentos diferentes.

A primeira fertilização ocorrida é a dos núcleos polares, que originarão um endosperma triploide. A oosfera por sua vez não é fecundada, pois o núcleo polar que faria sua fertilização não chegou até a mesma. Devido a esse atraso, o tubo polínico desidrata, e o núcleo polar não fertiliza a oosfera, mantendo a característica haplóide e formando um embrião com apenas o genótipo feminino (BYLICH e CHALYK, 1996; SILVA, 2009).

Segundo Sarkar e Coe (1966), o sistema de indução à haploidia pela variedade Stock-6 tem uma taxa de indução de cerca de 3%. Este material é originário de condições climáticas mais amenas, típicas de regiões de clima temperado, dificultando significativamente o uso de tais materiais no território brasileiro, onde o clima predominante é o tropical.

A linhagem W23 desenvolvida em Wisconsin é um indutor paterno, ou seja, ela é usada como fêmea no cruzamento. O controle genético do sistema androgenético que possibilita que tal linhagem seja indutora de haploidia é regulado por um gene recessivo denominado gametófito indeterminado (*ig*). A ação do alelo *ig* causa um distúrbio na megasporogênese normal (formação do saco embrionário), resultando em um saco embrionário com 16 núcleos ou mais, no qual o normal seriam oito (LIN, 1981). Com isso, ocorre a degeneração da oosfera, que, no momento da fertilização, não apresenta material genético, originando assim um indivíduo haploide, apresentando apenas o genoma paterno (PIERRE et al., 2011).

Após a obtenção e identificação de possíveis plantas haplóides, é necessário realizar um tratamento na fase de plântula dessas plantas, para que o número de cromossomos seja duplicado e a fertilidade restabelecida. Para isso, essas plântulas devem ser imersas em uma solução com colchicina, a qual impede a formação do fuso mitótico durante a metáfase celular, impedindo a disjunção dos cromossomos, resultando na duplicação dos mesmos (DEIMLINGET et al., 1997).

Várias outras iniciativas foram realizadas no intuito de aumentar as frequências de indução de haplóides das linhagens Stock 6 e W23, como por exemplo, o intercruzamento dessas linhagens. Em condições de clima temperado a partir dessas duas linhagens, foram geradas várias outras, entre elas a WS14 com uma taxa de indução de 3% a 5% (LASHERMES e BECKERT, 1988), a linhagem MHI com taxa de indução de 6,5% (EDER e CHALYK, 2002), e a linhagem RWS com 8% a 10% de taxa de indução (ROBER et al., 2005).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. LOCAL

A condução do experimento e todos os cruzamentos necessários foram realizados na Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI), patrimônio da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

A FEI está localizada no distrito de Iguatemi, Maringá-PR, com coordenadas geográficas 23° 25' S; 51° 57' O, altitude de 550 metros. O solo é classificado como Latossolo Vermelho Distrófico (EMBRAPA, 2006). O município situado na região noroeste do Estado do Paraná apresenta clima mesotérmico úmido, com chuvas de verão e de outono, e verão quente (GODOY et al., 1976). A fase laboratorial foi realizada no Laboratório de Citogenética da UEM, localizado na cidade de Maringá.

3.2. MATERIAL GENÉTICO

Como indutor temperado, foi utilizada a variedade indutora de haploidia KHI (Krasnodar Haploid Inducer), que é um genótipo de domínio público desenvolvido no Krasnodar Institute, na Rússia, a partir da linhagem indutora Stock 6. Charles et al. (2009) citam uma taxa de indução de 5 a 10% para tal genótipo indutor gimnogenético.

Os genótipos tropicais, os quais foram convertidos aos indutores de haploidia, foram as linhagens L-47 (milho comum) e P9 (milho pipoca), pertencentes ao programa de melhoramento da UEM. A linhagem L-47 é um genótipo de milho comum do tipo semi-dentado, de grão amarelo-alaranjado, obtido do híbrido comercial DKB747, na geração S8 de autofecundação. A linhagem P9 é um genótipo de milho pipoca do tipo *flint* de grãos amarelos, obtido do híbrido comercial IAC-125, na geração S7 de autofecundação. Tais genótipos, além de serem convertidos aos indutores de haploidia, também foram utilizados nos cruzamentos apenas como testadores para as novas populações indutoras. Além disso, foi utilizado como testador para as novas populações, o híbrido comercial 2B707, da empresa Dow Agrosiences®, caracterizado por ser um híbrido simples, precoce, com grãos alaranjados e textura semi-dentado.

3.3. OBTENÇÃO DAS POPULAÇÕES TROPICAIS INDUTORAS DE HAPLOIDIA

Na safra 2011/2012, os genótipos tropicais (L-47 e P9) usados como parentais femininos foram cruzados com o indutor de haploidia KHI, utilizado como parental masculino. Para a polinização, bulks de pólen do indutor foram levados até as espigas previamente protegidas.

Na colheita, foram selecionadas apenas as espigas contendo grãos com forte coloração arroxeadada pela presença de antocianina. Dez espigas de cada cruzamento foram selecionadas, debulhadas e seus grãos separados em três categorias: grãos diplóides (com coloração tanto do embrião quanto no endosperma), grãos possíveis haplóides (com coloração apenas no endosperma) e grãos contaminantes (sem nenhuma coloração ou normais).

Nesta etapa, foram selecionados cinquenta grãos com dupla coloração (grãos diplóides) provenientes de cada cruzamento, e estes foram misturados a fim de formar uma população. A coloração encontrada nos grãos deve-se ao fato de estar presente o gene *RI-nj*, cujo produto é um marcador morfológico, indicando que tanto o endosperma quanto o embrião da semente foram fecundados, formando uma semente diplóide e com capacidade de indução à haploidia (NANDA E CHASE, 1966).

3.4. TESTES DAS NOVAS POPULAÇÕES TROPICAIS INDUTORAS DE HAPLOIDIA

Na safrinha 2012, os grãos de cada espiga formada no cruzamento entre o indutor temperado e os genótipos tropicais, agora contendo o gene *RI-nj* e a capacidade de indução à haploidia, foram semeados em parcelas contendo seis linhas de dez metros, com sete sementes por metro, para posterior desbaste em cinco plantas por metro, totalizando trezentas plantas por parcela. Estas plantas foram inter cruzadas em bulk, permitindo a troca de alelos dentro de cada população.

Em cada população, as cinquenta melhores espigas foram colhidas, separadas e selecionadas quanto à coloração de antocianina nos grãos. As sementes F2 foram então selecionadas e separadas nas três categorias mencionadas. Foram selecionadas trinta sementes

com dupla coloração por espiga, e estas foram misturadas, formando apenas uma amostra de sementes de cada população.

Na safra 2012/2013, o campo de polinização final foi realizado. O campo contou com um total de seis parcelas, sendo uma para cada população indutora, uma para a linhagem L-47 e uma para a P-9, e duas para o híbrido 2B707. As parcelas das populações continham seis linhas de dez metros (totalizando trezentas plantas) e as demais continham seis linhas de cinco metros (totalizando cento e cinquenta plantas).

A Figura 1 demonstra a disposição do campo de polinização.



Figura 1. Disposição do campo de polinização das novas populações indutoras com as linhagens L-47 e P-9, e com o híbrido 2 B707.

O espaçamento entre linhas foi de 0,9 metros, com cinco plantas por metro, com espaçamento de 0,20 centímetros entre plantas. Parcelas contendo os genótipos tropicais que formaram as populações foram instaladas a fim da utilização dos mesmos como testadores

específicos para as novas populações indutoras de haploidia. O híbrido 2B707 foi utilizado como testador universal, ou seja, como testemunha para todas as populações indutoras.

As parcelas, contendo as linhagens e o híbrido, foram semeadas em Split, sendo duas linhas doze dias antes, duas linhas seis dias antes, e duas linhas no dia da semeadura das novas populações indutoras, para favorecer a sincronia entre o florescimento masculino das populações indutoras e o florescimento feminino das linhagens e do híbrido testadores.

Durante o estágio vegetativo e no início do reprodutivo foram realizados desbastes brandos nas parcelas das novas populações, a fim de eliminar plantas com caracteres agrônômicos indesejáveis, como porte reduzido, grossura do colmo e tamanho do pendão, a fim de manter a população o mais uniforme possível.

No florescimento foram feitos bulks de pólenes de cada população indutora, e transferido ao seu respectivo testador. O bulk da população indutora proveniente da linhagem L-47 foi utilizado para polinizar as plantas da parcela da linhagem L-47 e o bulk da população proveniente da linhagem de milho pipoca P-9 foi utilizado para polinizar as plantas da parcela da linhagem de milho pipoca P-9. Além disso, o bulk de cada população ainda foi utilizado para polinizar cinquenta plantas da parcela do híbrido 2B707, devidamente identificadas.

Na colheita foram selecionadas dez espigas de cada parcela dos materiais que foram induzidos pelas novas populações, a fim de quantificar a eficiência de indução das novas populações indutoras de haploidia. Foram selecionadas vinte espigas da parcela do híbrido 2B707, sendo dez espigas polinizadas pela população indutora da linhagem L-47 e dez espigas polinizadas pela população indutora derivada da linhagem P-9. No total, foram selecionadas quarenta espigas. A seleção foi realizada com base na forte coloração com antocianina nas sementes de cada espiga. A Figura 2 ilustra algumas das espigas resultantes dos cruzamentos envolvendo as linhagens de milho comum e de milho pipoca.



Figura 2. Espigas colhidas nas parcelas dos genótipos usados como fêmeas. Na bandeja 1 encontram-se as espigas resultantes do cruzamento entre a linhagem P-9 com a população indutora de milho pipoca, e na bandeja 2 o cruzamento entre a linhagem L-47 cruzada com a população indutora de milho comum.

As sementes selecionadas foram separadas pelo padrão de cor, sendo possíveis haplóides, diplóides híbridas entre a população indutora e a linhagem original e as contaminantes. A Figura 3 ilustra como foi realizada a seleção, apresentando algumas das sementes selecionadas.

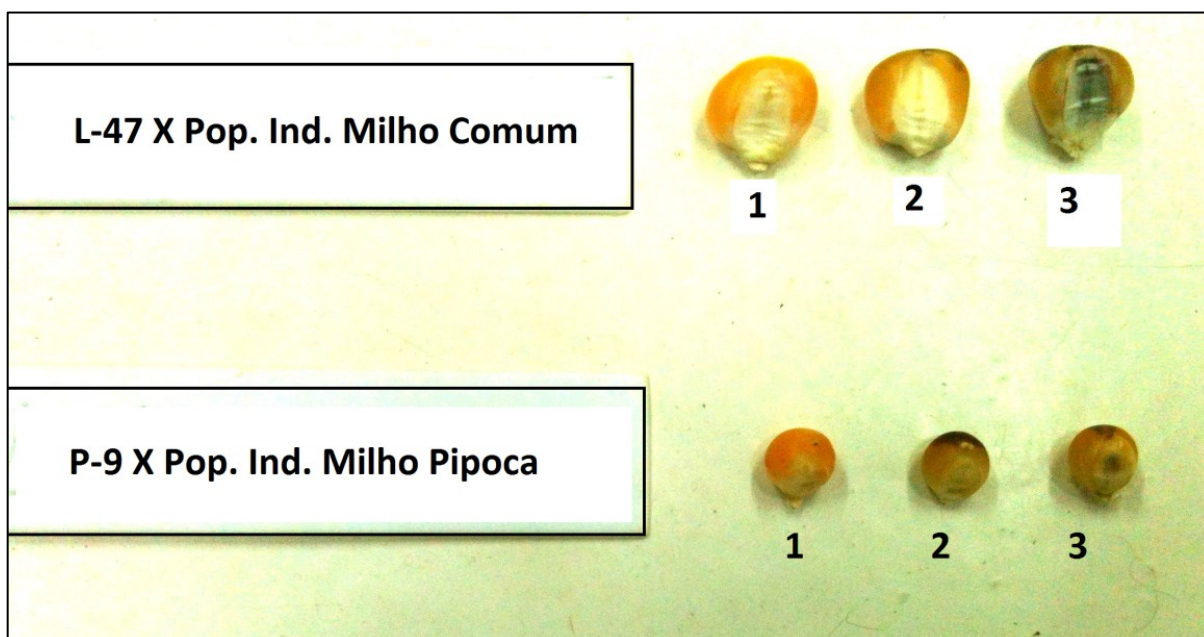


Figura 3. Exemplos de sementes de cada espiga selecionada, separadas de acordo com o padrão de pigmentação por antocianina. O número 1 corresponde às sementes contaminantes, 2 para sementes possíveis haplóides e 3 para sementes híbridas entre as populações indutoras e os genótipos usados como fêmeas.

Por fim, as sementes haplóides putativas foram separadas para posterior submissão à contagem de cromossomos para confirmar a condição haplóide das mesmas.

3.5. CONTAGEM DE CROMOSSOMOS

Para que as sementes possíveis haplóides fossem confirmadas como haplóides verdadeiros, o número de cromossomos das mesmas deveriam ser $n=10$, visto que o milho possui $2n=20$ cromossomos.

Para o procedimento de contagem de cromossomos, as sementes foram colocadas em placas de Petri com papel Germitest a 25°C , por dois ou três dias, até que a raiz primária das mesmas estivessem com cerca de 1 cm de comprimento. As raízes foram então extraídas, e tratadas separadamente em uma solução com 0,05% de colchicina por 2 horas, e fixadas em fixador Carnov-metanol, em uma proporção de 3:1, respectivamente. Após fixação, as radículas foram transferidas para a hidrólise contendo HCL e álcool 95% nas proporções 1:1 por 1 hora, as quais permaneceram por duas horas. A coloração dos cromossomos foi feita

com orceinalacto-acética 1%. Foram então, preparadas lâminas pela técnica de esmagamento com o ápice das radículas, e levadas ao microscópio óptico para contagem dos cromossomos.

3.6. TESTE QUI-QUADRADO

Realizou-se o teste estatístico Qui-Quadrado (χ^2), proposto por Karl Pearson, a fim de contestar se as taxas de indução das novas populações diferiram estatisticamente da taxa de indução natural. O objetivo do teste foi verificar a existência de diferenças significativas entre o número de haplóides observados na indução pelas novas populações e o número de haplóides esperados caso houvesse o cruzamento com qualquer outro fenótipo sem potencial de indução, estado sujeito à indução natural. O teste χ^2 é utilizado para avaliar se as frequências observadas estão próximas das esperadas para justificar sua ocorrência sob hipótese nula (CÂMARA, 2001).

A fórmula do χ^2 é dada por:

$$\chi^2 = \sum \frac{(fo - fe)^2}{fe}$$

Em que:

fo: frequência observada;

fe: frequência esperada.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As duas novas populações obtidas apresentaram superioridade fenotípica quanto ao seu potencial agrônômico diante da variedade temperada KHI, quando comparadas visualmente, contando com plantas mais vigorosas, pendões maiores com maior quantidade de pólen produzido, maior resistência às doenças foliares, espigas e grãos maiores. Quanto ao ciclo, as novas populações apresentaram-se mais precoces, pois a melhor sincronia no florescimento ocorreu quando as linhagens de milho comum e o híbrido foram semeados doze e seis dias antes das novas populações indutoras.

Os resultados obtidos do cruzamento entre as novas populações indutoras de haploidia com as linhagens originais, a fim de testar a capacidade de indução das mesmas estão descritos na Tabela 1. A taxa de indução com base nas sementes possíveis haplóides de cada espiga variou de 0,34% a 4,74% para a população indutora de milho comum e de 1,83 a 20,65% para a população de milho pipoca.

Tabela 1. Número total de sementes possíveis haplóides, selecionadas com base na coloração do endosperma, para as novas populações indutoras de haploidia de milho comum e milho pipoca cruzadas com a linhagem de milho comum-47 e a linhagem de milho pipoca P-9, respectivamente.

População Indutora	Espiga	Número Total de Sementes	Número Sementes Possíveis haplóides	Sementes Possíveis Haplóides (%)
População de Milho Comum Indutora de Haploidia	1	587	2	0,34
	2	533	17	3,19
	3	563	2	0,36
	4	489	5	1,02
	5	600	7	1,17
	6	440	15	3,41
	7	549	26	4,74
	8	403	4	0,99
	9	395	7	1,77
	10	503	6	1,19
Total		5062	91	1,80
População de Milho Pipoca Indutora de Haploidia	1	469	98	20,90
	2	432	78	18,06
	3	463	26	5,62
	4	451	50	11,09
	5	493	9	1,83
	6	405	59	14,57
	7	523	108	20,65
	8	373	96	25,74
	9	312	27	8,65
	10	518	90	17,37
Total		4439	641	14,44

Com base na separação fenotípica das sementes possíveis haplóides, as novas populações indutoras apresentaram uma taxa média de 1,80% para a população de milho comum cruzada com a linhagem L-47 e 14,44% para a população de milho pipoca cruzada com a linhagem de milho pipoca P-9. Este valor obtido para o milho pipoca classifica tal população como um bom indutor de haploidia, porém, trata-se de haplóides em potencial, baseados apenas na coloração do grão.

Herpich et al. (2012) trabalhando com dois indutores de haploidia Stock 6 e KHI, obtiveram resultados parecidos. Induzindo algumas populações para a obtenção de linhagens DH, os pesquisadores obtiveram uma taxa de indução de 0,99% de possíveis haplóides, para as populações de milho comum cruzadas com o indutor Stock 6, e de 1,91% de possíveis haplóides para o indutor KHI. Sarkar et al. (1994) utilizando progênies do cruzamento entre a

linhagem indutora Stock 6 e germoplasmas indianos e russos, obtiveram um genótipo com taxa de indução de 6%. Resultados semelhantes foram obtidos por Chalik (1994), com o cruzamento e retrocruzamentos do indutor Stock 6 com germoplasmas da República da Moldávia, na Europa. Rabel et al. (2008) utilizando o indutor de haploidia W23 como fêmea, converteram algumas linhagens tropicais de milho comum, e obtiveram seis populações indutoras de haploidia, com uma taxa de indução variando de 0 a 82% de sementes possíveis haplóides, dependendo da população. Belicuas et al. (2007), também utilizando o indutor W23 como fêmea, e o híbrido BRS1010 como macho, obtiveram um percentual de 0 a 51% de plantas possíveis haplóides androgenéticos.

Após a contagem cromossômica, os resultados foram drasticamente alterados (Tabela 2), evidenciando que a seleção de haplóides apenas com base no marcador morfológico é ineficiente.

Tabela 2. Números de sementes que apresentaram n=10 cromossomos na contagem de cromossomos, e nova taxa de indução das populações indutoras confirmadas pela contagem de cromossomos.

População Indutora	Espiga	Total de Sementes Produzidas	Total de Possíveis haplóides	Total de Sementes Submetidas à Contagem Cromossômica	Total de Sementes Haplóides (n=10)	% de Sementes Haplóides Verdadeiros
População de Milho Comum Indutora de Haploidia	1	587	2	2	2	0,34
	2	533	17	10	0	0
	3	563	2	2	0	0
	4	489	5	4	0	0
	5	600	7	7	0	0
	6	440	15	13	2	0,23
	7	549	26	19	6	1,1
	8	403	4	2	0	0
	9	395	7	4	0	0
	10	503	6	4	0	0
Total		5062	91	67	10	0,2
População de Milho Pipoca Indutora de Haploidia	1	469	98	81	6	1,28
	2	432	78	65	7	1,62
	3	463	26	24	2	0,43
	4	451	50	45	4	0,89
	5	493	9	4	0	0
	6	405	59	53	4	0,99
	7	523	108	78	5	0,96
	8	373	96	69	6	1,61
	9	312	27	20	5	1,6
	10	518	90	81	6	1,16
Total		4439	641	520	45	1,01

Na Tabela 2, nota-se que o número de sementes possíveis haplóides submetidos à contagem de cromossomos foi menor do que o número total de sementes possíveis haplóides. Uma das causas do fato é porque algumas sementes não germinaram durante o processo de germinação. Eder e Chalik (2002) citam que sementes produzidas por polinização com pólen de uma planta indutora materna de haploidia, podem apresentar um colapso na formação normal do embrião. Os autores supõem que sementes sem embrião são resultados de uma falha no desenvolvimento das células do ovário da fêmea, que inviabiliza a fertilização do mesmo. Além disso, os autores também afirmam que sementes sem embrião podem resultar da existência de um gene mutante letal no genótipo materno, nos quais os haplóides foram obtidos.

Os possíveis haplóides gerados pela população indutora de milho pipoca foram os que mais apresentaram sementes que não germinaram. Isso ocorreu possivelmente pelo fato desta população ter produzido um grande número de sementes possíveis haplóides, estando mais sujeita a um número maior de irregularidades na germinação.

Outro fator que contribuiu para o menor número de sementes submetidas à contagem de cromossomos foi perda de radículas durante o processo de preparação das raízes para a montagem das lâminas, tanto pela presença de fungos durante a germinação, quanto pela inviabilidade da extremidade das radículas para a montagem das lâminas.

Na Figura 4 foi possível identificar indivíduos haplóides e diplóides, por meio das lâminas de contagem de cromossomos.

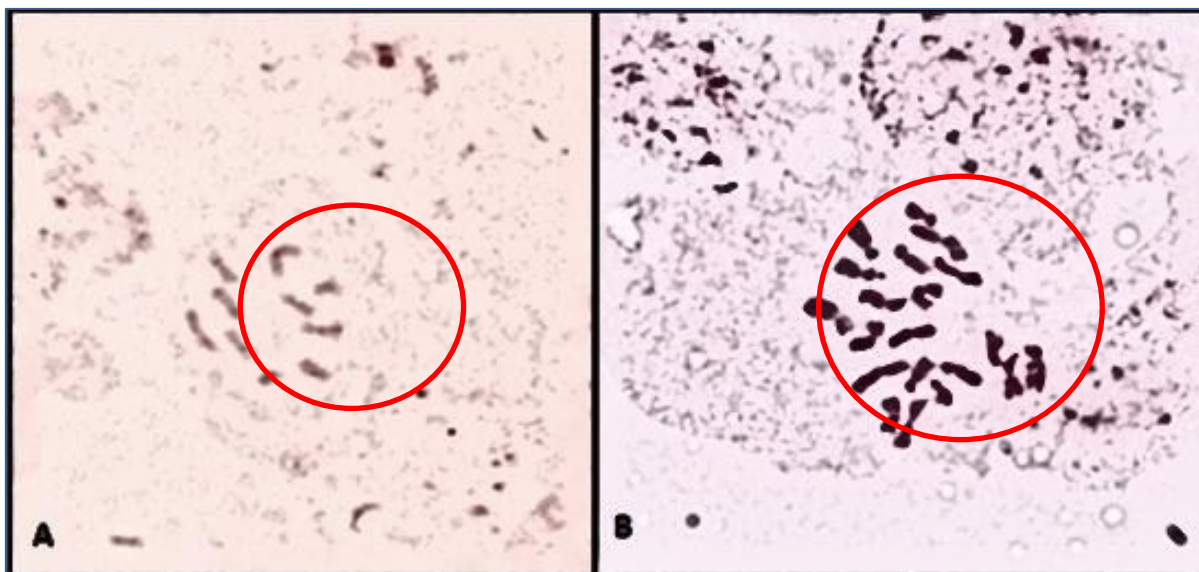


Figura 4. Imagens das lâminas com raízes durante a contagem cromossômica em microscópio óptico. Imagem de uma lâmina contendo radícula de um indivíduo haplóide, com $n=10$ cromossomos (A). Imagem de uma lâmina contendo radícula de um indivíduo diplóide, com $2n=20$ cromossomos (B).

Após a análise citogenética, a maioria das sementes possíveis haploides foi considerada falso-positiva. A taxa de indução baseada na análise fenotípica da coloração das sementes que foi de 1,8% e 14,44% para a população indutora de milho comum e a população indutora de milho pipoca, respectivamente, diminuiu para 0,2% e 1,01%.

Resultados similares foram obtidos em outros trabalhos na área. Rabel (2008) após análise molecular para comprovar o caráter haplóide dos possíveis haplóides, observou que a taxa de indução de possíveis haplóides variaram entre 0 e 82%, e diminuíram para 0,4 a 0,6% de haplóides androgenéticos verdadeiros. Alekcevetch (2010) ao testar dois indutores de haploidia, Stock 6 e W23, obteve 0,012% e 0,336% de plantas haplóides, respectivamente, comprovados após análise molecular.

Bordes et al. (1997) cruzaram dois híbridos de base genética ampla com um indutor de haploidia androgenético e produziram plântulas haplóides sob taxas de 0,64 e 0,93%, confirmadas como haplóides verdadeiros. Em contraste com esses resultados, Rotarenco et al. (2010), a partir do cruzamento de duas linhagens indutoras de haploidia, Stock 6 e MHI, desenvolveram quatro novas linhagens indutoras, com taxa de indução entre 12,01 e 14,5%. Em 2012, o International Maize and Wheat Improvement Center – CIMMYT, anunciou o desenvolvimento de uma linhagem adaptada ao clima tropical indutora de haploidia, denominada TAIL, que induz sementes a haploidia com uma taxa de 8 a 10% (CIMMYT, 2013).

Os resultados obtidos indicam que a seleção de sementes haplóides, unicamente baseadas no marcador morfológico, não é um método eficaz na seleção de plantas haplóides em programas de melhoramento. Das 91 sementes selecionadas como possíveis haplóides, induzidas pela nova população indutora de milho comum, 67 foram submetidas à contagem de cromossomos, e apenas 10 foram confirmadas como haplóides verdadeiros, e das 641 sementes selecionadas como possíveis haplóides, induzidas pela população indutora de milho pipoca, 520 foram submetidas à contagem de cromossomos, e apenas 45 foram confirmadas como haplóides verdadeiros (Tabela 2). A Figura 5 evidencia a variação de coloração, em diferentes sementes da mesma espiga quando sob o efeito do gene *RI-nj*. Nota-se que a coloração das sementes obtidas variou desde sementes com pericarpo, endosperma e embrião totalmente pigmentados, até sementes com pontuações minúsculas de coloração por antocianina.



Figura 5. Sementes com diferentes níveis de coloração por antocianina, causado pela variação na expressão do gene *RI-nj*.

Couto et al. (2010) afirmam que, a partir de resultados como os apresentados acima, verifica-se que a coloração do pericarpo com antocianina é um caráter de penetrância incompleta e expressividade variável, provavelmente por isso, não fornece uma indicação precisa das sementes haplóides. Herpich (2012) cita que a seleção baseada na expressão de antocianina no endosperma é passível de erro, que pode ter ocorrido devido à inibição da expressão em alguns conjuntos genômicos.

Como resultado dos cruzamentos das duas populações com o híbrido 2B707, obteve-se taxas de indução semelhantes entre as duas populações indutoras, sendo 0,82% para a

população indutora de milho comum e 1,06% para a população indutora de milho pipoca (Tabela 3).

Tabela 3. Número total de sementes possíveis haplóides, selecionadas com base na coloração com antocianina no endosperma, para as novas populações indutoras de haploidia de milho comum e milho pipoca cruzadas o híbrido comercial 2B707.

População Indutora	Espigas	Número Total de Sementes	Número de Sementes Possíveis haplóides	Sementes Possíveis haplóides (%)
População de Milho Comum Indutora de Haploidia	1	602	3	0,50
	2	413	3	0,73
	3	442	4	0,90
	4	468	5	1,07
	5	503	7	1,39
	6	551	1	0,18
	7	518	6	1,16
	8	462	6	1,30
	9	563	1	0,18
	10	371	4	1,08
Total		4893	40	0,82
População de Milho Pipoca Indutora de Haploidia	1	570	7	1,23
	2	589	9	1,53
	3	603	6	1,00
	4	695	2	0,29
	5	514	3	0,58
	6	544	3	0,55
	7	514	2	0,39
	8	709	6	0,85
	9	456	4	0,88
	10	522	5	0,96
Total		4439	47	1,06

Na seleção das sementes possíveis haplóides foram encontradas dificuldades quanto à coloração das sementes, pois as mesmas não possuíam pigmentação bem definida, apresentando coloração com intensidade fraca na região do endosperma.

Em comparação com as taxas de indução usando como fêmeas as linhagens específicas para cada população indutora (1,80% para a linhagem L-47 e 14,44% para linhagem P9), a taxa de indução utilizando o híbrido 2B707, como fêmea foi bem menor (0,25 para a linhagem L-47 e 0,23 para a linhagem P9 (Tabela 3). Uma possível explicação para

isso talvez seja a diferença do background genético dos genótipos utilizados nos cruzamentos. Haja vista que a linhagem L-47 utilizada como fêmea pertence ao grupo semi-flint, e a linhagem de milho pipoca, pertence ao grupo Flint (QUEIROZ, 2011; GAMA et al., 1990). Eder e Chalik, (2002) afirmam que a expressão do gene *R1-nj* no endosperma pode ser alterada pela presença de genes localizados no endosperma, que inibem a ação da expressão da coloração em genótipos do grupo flint e semi-flint. Trabalhando com indutores maternos de haploidia e linhagens flint, semi-flint e dent, usadas como fêmeas, os autores observaram que a expressão do gene *R1-nj* em embriões de sementes flint foi mais forte que em embriões de sementes dent ou semi-flint. Sementes de milho com endosperma flint carregam genes dominantes como *C1-I*, *C2-Idf* e *In1-D*, que inibem a síntese de antocianina (COE, 1994). Belicuas (2007) também se deparou com o mesmo problema ao utilizar o híbrido simples BRS1010 da empresa EMBRAPA, que possui em seu background genético linhagens do grupo semi-flint.

Além disso, a baixa pigmentação das sementes do híbrido comercial pode ter sido afetada pelo background genético do híbrido que, por se tratar de um material melhorado geneticamente, possui uma base genética mais estreita.

Assim como as sementes possíveis haplóides das linhagens induzidas pelas novas populações indutoras, as sementes haplóides putativo do híbrido também foram submetidas à contagem de cromossomos, a fim de confirmar a condição haplóide das mesmas. Os resultados obtidos também seguem o padrão dos anteriores, em que também ocorreu a presença de vários falso-haplóides, conforme se verifica na Tabela 4.

Tabela 4. Números de sementes que apresentaram n=10 cromossomos na contagem de cromossomos das sementes possíveis haplóides selecionadas do cruzamento entre as novas populações indutoras de haploidia com o híbrido comercial 2B707.

População Indutora	Espigas	Total de Sementes Possíveis haplóides	Total de Sementes Submetidas à Contagem de Cromossomos	Total de Sementes Haplóides (n=10)	Sementes Haplóides Verdadeiros (%)
População de Milho Comum Indutora de Haploidia	1	3	3	1	0,17
	2	3	3	1	0,24
	3	4	4	3	0,68
	4	5	4	3	0,64
	5	8	8	2	0,40
	6	1	1	0	0,00
	7	6	6	0	0,00
	8	6	4	2	0,43
	9	2	2	0	0,00
	10	4	4	0	0,00
Total		40	39	12	0,25
População de Milho Pipoca Indutora de Haploidia	1	7	7	0	0,00
	2	9	9	4	0,68
	3	6	6	0	0,00
	4	2	2	1	0,14
	5	3	3	1	0,19
	6	3	3	2	0,37
	7	2	2	0	0,00
	8	6	6	1	0,14
	9	4	4	1	0,22
	10	5	5	0	0,00
Total		47	47	10	0,23

Das 40 sementes separadas como possíveis haplóides do cruzamento com a linhagem de milho comum, apenas 12 sementes foram confirmadas como haplóides verdadeiros, considerando que uma semente foi perdida por não germinar, a taxa geral de indução foi de 0,25%.

Para a população indutora de milho pipoca, das 47 sementes selecionadas como possíveis haplóides, 10 foram confirmadas como haplóides verdadeiros, correspondendo a uma taxa geral de indução de 0,23%. Tais resultados, embora se equiparem aos da literatura, não são satisfatórios a ponto de considerar as novas populações indutoras como bons genótipos indutores, uma vez que a taxa de indução natural é de 0,1%.

O teste Qui-Quadrado (χ^2) foi aplicado individualmente por grupo de cruzamentos, sendo para as populações indutoras cruzadas com suas respectivas linhagens, e as mesmas cruzadas com o híbrido comercial (Tabela 5).

Tabela 5. Resultado do teste qui-quadrado (χ^2) para o número de haplóides obtidos e o número de haplóides esperados pela taxa de indução natural.

Cruzamentos	Espigas	Haplóides Observados	Haplóides Esperados	χ^2
Linhagem L-47 X População de Milho Comum Indutora de Haploidia	1	2	0,6	0,401
	2	0	0,5	0,533
	3	0	0,6	0,563
	4	0	0,5	0,489
	5	0	0,6	0,600
	6	2	0,4	5,531
	7	6	0,5	54,123
	8	0	0,4	0,403
	9	0	0,4	0,395
	10	0	0,5	0,503
Total		10	5,1	66,541**
Linhagem P-9 X População de Milho Pipoca Indutora de Haploidia	1	6	0,5	65,228
	2	7	0,4	99,858
	3	2	0,5	5,102
	4	4	0,5	27,928
	5	0	0,5	0,493
	6	4	0,4	31,911
	7	5	0,5	38,324
	8	6	0,4	84,888
	9	5	0,3	70,440
	10	6	0,5	58,016
Total		45	4,4	482,188**
Híbrido 2B707 X População de Milho Comum Indutora de Haploidia	1	1	0,6	0,263
	2	1	0,4	0,834
	3	3	0,4	4,804
	4	3	0,5	13,699
	5	2	0,5	4,455
	6	0	0,6	0,551
	7	0	0,5	0,518
	8	2	0,5	5,120
	9	0	0,6	0,563
	10	0	0,4	0,371
Total		12	4,9	41,178**
Híbrido 2B707 X População de Milho Pipoca Indutora de Haploidia	1	0	0,6	0,570
	2	4	0,6	19,754
	3	0	0,6	0,603
	4	1	0,7	0,134
	5	1	0,5	0,460
	6	2	0,5	3,897
	7	0	0,5	0,514
	8	1	0,7	0,119
	9	1	0,5	0,649
	10	0	0,5	0,522
Total		10	5,7	27,221**

**significativo a 1% de probabilidade

A hipótese de nulidade testada postulou que as taxas de indução obtidas pelas novas populações indutoras não diferiram da taxa de indução natural, sendo a diferença entre as mesmas atribuídas ao acaso. A hipótese alternativa foi a de que as taxas de indução obtidas pelas novas populações diferiram da taxa de indução natural, neste caso, a uma taxa maior que a natural, a 1% de probabilidade. O valor tabelado de χ^2 para nove graus de liberdade e $\alpha=5\%$ é de $\chi^2= 16,919$.

A população indutora de milho comum, quando cruzada com a linhagem de milho comum, apresentou um valor de χ^2 calculado de 66,541. A população indutora de milho pipoca, quando cruzada com a linhagem de milho pipoca P-9, apresentou um valor de χ^2 calculado de 157,921 (Tabela 5). Quando as novas populações foram cruzadas com o híbrido comercial, mesmo que as taxas de indução tenham sido menores, ainda foram maiores que a taxa de indução natural, sendo indicado pelo valor de χ^2 calculado. Para a população indutora de milho comum o χ^2 calculado foi de 41,178, e para a população indutora de milho pipoca foi de 27,221. Todos os valores de χ^2 calculados foram maiores que o tabelado, rejeitando-se a hipótese de nulidade, logo houve diferença estatística a 1% de probabilidade, entre as taxas de indução das novas populações e a taxa de indução natural, independente de qual genótipo foi utilizado como fêmea (Tabela 5).

Sarkar e Coe (1966) utilizaram dois indutores, Stock 6 e Stock 6/3 (um híbrido entre os indutores Stock 6 e Stock 3) na obtenção de haplóides, e, por meio do teste qui-quadrado os autores obtiveram resultados que indicaram o efeito dos indutores na obtenção de haplóides, sendo descartado o efeito aleatório.

Não foi gerada nenhuma planta DH provinda da indução pelas novas populações indutoras, pois todas as sementes germinadas foram usadas apenas para contagem de cromossomos da radícula. Em estudos posteriores, a intenção é obter linhagens DH geradas por esses novos indutores.

5. CONCLUSÕES

O caráter de indução à haploidia, e o gene *RI- η j*, foram transferidos para as linhagens tropicais, formando duas novas populações com potencial de indução, porém com baixa taxa de indução de haplóides gimnogenéticos.

A identificação de sementes haplóides unicamente com base na coloração por antocianina conferida pelo gene *RI- η j* não é eficiente diante dos genótipos utilizados como fêmeas nos cruzamentos, independentemente do background genético.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLARD, R.W. **Principles of Plant Breeding**. New York: Jhon Wiley, 485p, 1960.
- ALEKCEVETCH, J.C. **Avaliação de indutores e métodos de duplicação cromossômica na obtenção de plantas duplo-haplóides de milho (*Zea mays*)**. Cascavel: UNIPAR, 2010. 29p. Trabalho de conclusão de curso (Ciências Biológicas).
- ANDRADE, F.H.; OTEGUI, M.E.; VEGA, C.R.C. **Intercepted radiation at flowering and kernel number in maize**. Agronomy Journal, Madison, v. 92, n. 1, p. 92-97, 2000.
- ANDRADE, M.F.B.; MORAIS, A.R.; TEIXEIRA, I.R.; SILVA, M.V. **Avaliação de sistemas de consórcio de feijão com milho pipoca**. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v. 25, n. 2, p. 242-250, 2001.
- ANDRADE, R.A.; CRUZ, C.D.; SCAPIM, C.A.; SILVERIO, L.; PINTO, R.J.B.; TONET, A. **Análise dialélica da capacidade combinatória de variedades de milho pipoca**. Acta Scientiarum - Agronomy, Maringá, v. 24, n. 5, p. 1197-1204, 2002.
- BARBOSA, M.P.M. **Avaliação do desequilíbrio de ligação e da origem genética em duplo-haplóides de milho**. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, 55p. Tese (Doutorado em Agronomia), 2009.
- BATTISTELLI, G.M.; VON PINHO, R.G.; JUSTUS, A.; COUTO, E. G. O.; BALESTRE M.. **Production and identification of doubled haploids in tropical maize**. Genetics and Molecular Research, v. 12, n. 4, p. 4230-4242, 2013.
- BELICUAS, P.R.; GUIMARÃES, C.T.; PAIVA, L.V.; DUARTE, J.M.; MALUF, W.R.; PAIVA, E. **Androgenetic haploids and SSR markers as tools for the development of tropical maize hybrids**. Springer Science Business Media, v. 1, p. 1-8, 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Registro Nacional de Cultivares**. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/php/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php>. Acesso em: 20 fev.2014.
- BRUCE, A.B. **The Mendelian theory of heredity and the augmentation of vigor**. Science, v.32, p.627-628, 1910.
- BORDES, J.; VAULX, D.; LAPIERRE, A.; POLLACSEK, M. **Haplodiploidization of maize (*Zea mays* L.) through induced gynogenesis assisted by glossy markers and its use in breeding**. Agronomie, v.17, n. 10, p.291-297, 1997.
- BYLICH, V.G.; CHALYK, C.T. **Existence of pollen grains with a pair of morphologically different sperm nuclei in the ZMS line**. Maize Genetics Cooperation Newsletter, Urbana, v. 70, p. 33, 1996.
- BUENO, L.C. S.; MENDES, A. N. G.; CARVALHO, S.P.; **Melhoramento genético de plantas**. Lavras:Ufla, 262p, 2001.

CAMARA, F.G. **Estatística Não Paramétrica – Testes de Hipóteses e Medidas de Associação**. Ponta Delgada, 2001. Universidade dos Açores. 59 p.

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

CHARLES, L. A.; DAVID, R.; DUNCAN, V. S. Method for agrobacterium transformation for dohaploid corn plants. Disponível em: <<http://www.patentgenius.com/patent/7572635.html>>2009. Acesso em 29 mar 2013.

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

CHASE, S. S **Production of Homozygous Diploids of Maize from Monoploids**. *Agronomy Journal*, v. 44, n. 5, p. 263-267, 1952.

CIMMYT - Tropicalized maize haploid inducers for doubled haploid-based breeding. Disponível em: <http://www.cimmyt.org/en/what-we-do/maize-research/item/now-available-tropicalized-maize-haploid-inducer-lines>. Acesso em 02 de abril de 2013.

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

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

COUTO, E.G.O.; SOLVA, T.N.; DAVIDEL, M.C.; PIERRE, P.M.O.; VON PINHO, R.G.; RAMALHO, M.A.P. **Marcador Morfológico em Haplóides Androgenéticos em Milho**. Goiânia, ANAIS em CD-ROM, p.2973-2977, 2010.

DANG, N.C.; MUNSCH, M.; AULINGER, I.; RENLAI, W. et al. **Inducer line generated double haploid seeds for combined waxy and opaque 2 grain quality in subtropical maize (*Zea mays* L.)**. *Euphytica* 183: 153-160, 2012.

DAVENPORT, C.G. **Degeneration, albinism and inbreeding**. *Science*, v.28, p.454-455, 1908.

DEIMLING, S.; ROBER, F.; GEIGER, H.H. **Methodik und genetic der in-vivo haplódeninduktionbeimais**. *VortrPflanzenzuchtung*, Berlin, v. 38, p. 203-204, Doc_81.p6., 1997.

EAST, E. M. **Inbreeding in corn**. *Rep. Conn. Agric. Exp. Stn.* pp. 419–428, 1908.

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

EMBRAPA. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. **Milho pipoca**. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/milho/arvore/CONT000fy9zxynl02wx5ok0pvo4k359f3bo9.html> Acesso em: 15/07/2013.

EMBRAPA Solos. Centro Nacional de Pesquisa de Solos (Rio de Janeiro, RJ). **Sistema brasileiro de classificação de solos. 2. ed.** – Rio de Janeiro: EMBRAPA-SPI, 2006.

FAO-Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The state of food and agriculture.** Rome, 2013.

GALVAO, J.C.C.; SAWAZAKI, E.; MIRANDA, G.V. Comportamento de híbridos de milho pipoca em Coimbra, Minas Gerais. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 47, p. 201-218, 2000.

GAMA, E.E.G.; MAGNAVACA, R.; SILVA, J.B.; SANS, L.M.A.; VIANA, P.A.; PARENTONI, S.N.; PACHECO, C.A.P.; CORREA, L.A.; FERNANDES, F.T. **Milho pipoca.** Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 14, p. 12-16, 1990.

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

GODOY, H. et al. Clima no Paraná. In: **Manual Agropecuário para o Paraná.** Londrina: Iapar, p. 1736, 1976.

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

HERPICH, M.T. **Obtenção de Linhagens Duplo-Haplóides de Milho.** Dissertação de Mestrado em Genética e Melhoramento, UEM, Maringá, 61p. 2012.

HOSENEY, R.C.; ZELEZNAK, K.; ABDELRAHMAN, A. **Mecanism of Pop Corn Popping,** v. 25, p. 16-17, 1983.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - **Indicadores Agropecuários 2013.** Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/indicadoresagro_1962003/default.shtm> Acesso em 15 jan de 2013.

KEBEDE, A. Z.; DHILLON, B. S.; SCHIPPRACK, W.; ARAUS, J. L.; BÄNZIGER M.; et al. **Effect of source germplasm and season on the in vivo haploid induction rate in tropical maize.** *Euphytica* 180: 219–226, 2011.

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

KRUG, C. A., VIEGAS, G. P.; PAOLIERI, L. **Híbridos comerciais de milho.** *Bragantia*: Campinas, vol.3, n.11, p. 367-552, 1943.

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

LIN, B. Megametogenetic alterations associated with the indeterminate gametophyte (ig) mutation in maize. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 3, p. 557-563, 1981.

LINARES, E. **Seleção recorrente recíproca em famílias de meio-irmãos em milho pipoca (*Zea mays* L.)**. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 78 f. 1987.

MOTERLE, L. M.; BRACCINI, A. L.; SCAPIM, C. A.; PINTO, R. J. B.; GONÇALVES, L. S. A.; RODRIGUES, R.; AMARAL JÚNIOR, A. T. **Combining ability of popcorn lines for seed quality and agronomic traits**. *Euphytica*, v. 185, n. 3, p. 337-347, 2012.

MIRANDA, G. V.; SOUZA, L. V.; GALVÃO, J. C. C.; GUIMARÃES, L. J. M.; MELO, A. V.; SANTOS, I. C. **Genetic variability and heterotic groups of Brazilian popcorn populations**. *Euphytica*, v. 162, n. 3, p. 123-132, 2008.

MORAES-FERNANDES, M.I.B. Obtenção de plantas haplóides através de cultura de anteras. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA/ABCTP, 1990. p. 311-332.

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

PACHECO, C.A.P.; GAMA, E.E.G.; PARENTONI, S. N.; SANTOS, M.X.; LOPES, M.A.; FERREIRA, A.S.; FERNANDES, F.T.; GUIMARÃES, P.E.O.; CORREA, L.A.; MEIRELLES, W.F.; FELDMAN, R. O. E MAGNAVACA, R. **BRS Ângela: variedade de milho pipoca**. Sete Lagoas: CNPMS, (Comunicado técnico, 27), 2001.

PATERNIANI, E.; CAMPOS, M. S. Melhoramento do milho. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, p. 491-552, 2005.

PATERNIANI, E.; MIRANDA FILHO, J.B. Melhoramento de populações. In: PATERNIANI, E.; VIÉGAS, G.P. (eds.). **Melhoramento e produção do milho**. Campinas: Fundação Cargil, p. 217-274, 1987.

PIERRE, P., M., O.; DAVIDE, L.M.C.; COUTO, E.G.O. Duplo-haplóides: Estratégias para obtenção e importância no melhoramento genético do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 10, n. 1, p. 1-16, 2011.

PINTO, R. J. B.; KVITSCHAL, M. V.; SCAPIM, C.A.; FRACARO, M.; BIGNOTTO, L.S.; SOUZA NETO, I.L. Análise dialéctica parcial de linhagens de milho-pipoca. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 6, n. 3, p. 325-337, 2007.

PRIGGE, V.; SÁNCHEZ, C.; DHILLON, B. S.; SCHIPPRACK, W.; ARAUS, J. L.; et al., et al. **Doubled haploids in tropical maize. I. Effects of inducers and source germplasm on in vivo haploid induction rates**. *Crop Science*. 51: 1498–1506, 2011.

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

RANDOLPH, L. F. **Some effects of high temperature on polyploidy and other variations in maize**. *Prac. Natl. Acad. Sci. U.S.* **18**: 222-229. - 1936. United States Department of Agricultura and Cornell University - Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1076195/?page=1>. 1932 .

- 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*, v. 50, p. 275–283, 2005.
- ROTARENCO, V.; DICU, G.; STATE, D.; FUIA, S., **News Inducers of Maternal Haploids in Maize.** Romania, 7p. , 2010.
- SARKAR, K. R.; COE, E. H. **A genetic analysis of the origin of maternal haploids in maize,** *Genetics*, Austin, v. 54, p. 453-464, 1966.
- SARKAR, K. R.; PANDEY, A.; GAYEN, P.; MADAN, J. K.; KUMAR, R.; SACHAM, J. K. S. **Stabilization of high haploid inducer lines.** *Maize Genetics Cooperation Newsletter*, Columbia, v. 68, p. 64-65, 1994.
- SARKAR, K. R.; COE, E. H. **A genetic analysis of the origin of maternal haploids in maize.** *Genetics*, v. 54, p. 453-464, 1966.
- SAWAZAKI, E.; CASTRO, J.L.; GALLO, P.B.; PATERNIANI, M.E.A.G.Z.; SILVA, R.M.; LUDERS, R.R. Potencial de híbridos temperados de milho pipoca em cruzamentos com o testador tropical IAC 12. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 12, n. 2, p. 14-23, 2003.
- SILVA, G.J. **Produção de haplóides em milho.** Informativo Técnico da Embrapa, doc 81, p. 65, Sete Lags, 2009.
- SHULL, G. H. **The composition of a field of maize.** *Am. Breeders Assoc. Rep.* 4: 296–301, 1908.
- SHULL, G. H. **A pure line method of corn breeding.** *Am. Breeders Assoc. Rep.* 5: 51–59, 1909.
- USDA-United States Department Of Agriculture. **World Agricultural Supplyand Demand Estimates.** February 10, 2014.
- VENCOVSKY, R.; RAMALHO, M. A. P. **Contribuição do melhoramento genético de plantas no Brasil.** In: PATERNIANI, E. (ed.). *Agricultura brasileira e pesquisa agropecuária.* Brasília: Embrapa comunicação para transferência de tecnologia, p.57-89, 2000.
- VIÉGAS, G. P.; MIRANDA FILHO, J. B. Milho híbrido. In: PATERNIANI, E. (Ed.). **Melhoramento e produção do milho no Brasil.** Campinas: Fundação Cargill, p.257-298, 1978.
- VILLARINHO, A.A.; VIANA, J.M.S.; SANTOS, J.F.; CAMARA, T.M.M. **Eficiência da seleção de progênies S1 e S2 de milho pipoca, visando a produção de linhagens.** *Bragantia*, v. 62, n. 11, p. 9-17, 2003.
- ZIEGLER, K.E.; ASHMAN, B. **Popcorn.** In: HALLAUER, A.R. (ed.). *Specialtycorns.* Ames, CRC Press, p. 189-223, 1994.