

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO**

**MONISE THAÍS HERPICH**

**Obtenção de linhagens duplo-haplóides de milho**

MARINGÁ  
PARANÁ - BRASIL  
MAIO – 2012

**MONISE THAÍS HERPICH**

**Obtenção de linhagens duplo-haplóides de milho**

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

Orientador: Prof. Dr. Ronald José Barth Pinto.

MARINGÁ  
PARANÁ - BRASIL  
MAIO - 2012

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Aos meus pais maravilhosos, Eliani Marilei Freitag e Guido Herpich, pelo exemplo de seres humanos amorosos, éticos, humildes, serenos e honestos.

Aos meus avós, Mário Abílio Freitag e Augusto Herpich, pela influência, desde criança, em admirar tudo que reflete no nome “Agronomia” e por hoje me dedicar e amar a minha profissão.

A toda a minha família, pelo total apoio, por sempre acreditar na minha capacidade e principalmente pelo amor e respeito.

Com amor dedico.

## AGRADECIMENTOS

Sempre a Deus, da forma como eu o reconheço e acredito.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudo.

À Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola (Coodetec), pelo apoio em disponibilizar ferramentas e materiais necessários a esta pesquisa.

Ao professor doutor Ronald José Barth Pinto, pela orientação, grande amizade e ajuda e por ser um exemplo de profissional para mim.

Ao Dr. Ivan Schuster, pela paciência, dedicação como meu Coorientador e também por ser, para mim, um grande exemplo como profissional e ser humano.

À Dra. Elisa Serra Negra Vieira, por acreditar na minha capacidade, pela amizade e carinho.

À Dra. Polyana Kelly Martins, por se tornar uma grande amiga, pelos importantes ensinamentos teóricos e práticos, pela paciência e carinho.

À Dra. Leandra Regina Texeira e futura Dra. Fabiane Lazzari, pela ajuda prestada e disponibilidade.

À minhas amadas famílias, Freitag e Herpich, principalmente pelo apoio e orgulho em ter uma mestranda na família.

Aos meus amigos Simone, Bruna, Clériston, Cris, Karinie, Pricila, Fairuz, Carol, Marlon, Renato, Fran, Patrícia, Polaka, Suzana entre outros, que fazem da minha vida um verdadeiro mar de alegrias.

A todos meus amigos do Núcleo de Biotecnologia da Coodetec, em especial à Crisleine, Fabiane, Joselaine, Laura, Mariana, Patrícia Vinholes e Vanessa e ao Leonardo, Marcelo, Carlinhos e Henderson, pela amizade, alegrias, colaboração e companheirismo durante essa jornada.

Aos amigos de Maringá, em especial à Carla, Cláudia, Greicy, Katlin e Juliana e ao Leonardo, Marcelo, André, Henrique, Bernardo, Dino, Bombeiro e Fernando Fernande, pela amizade e companhia.

Ao professor doutor Ednaldo Michellon, pela oportunidade em participar do projeto “Programa Paranaense de Certificação de Produtos Orgânicos” (Universidade sem Fronteiras), cujas atividades oportunizaram a obtenção de uma

bolsa de estudos, no período anterior ao recebimento de bolsa da Capes, permitindo que eu me mantivesse em Maringá e adquirisse conhecimentos valiosos para minha vida profissional.

Finalmente, a todos os que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e que estarão sempre em meu coração.

## **BIOGRAFIA**

MONISE THAÍS HERPICH, filha de Eliani Marilei Freitag e de Guido Herpich, nasceu em Marechal Cândido Rondon, estado do Paraná, no dia 13 de fevereiro de 1988.

Concluiu o Ensino Fundamental, em 2001, e o Ensino Médio, em 2004, ambos no Colégio Evangélico Martin Luther.

Recebeu o título de Engenheira Agrônoma, em dezembro de 2008, pela Faculdade Assis Gurgacz (FAG), em Cascavel, Paraná.

Também em 2008, iniciou sua atividade profissional na Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola (Coodetec), trabalhando com tecnologias relacionadas a duplo-haplóides em trigo e milho.

Em março de 2010, ingressou no Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, da Universidade Estadual de Maringá, em Maringá, estado do Paraná.

## SUMÁRIO

<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>vii</b>
<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	<b>ix</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>x</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>xi</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xii</b>
<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>2</b>
2.1. Biologia floral do milho.....	2
2.2. Polinização e fertilização .....	4
2.3. Maturação e constituintes da semente .....	5
2.4. Melhoramento do milho .....	6
2.5. Haplóides e duplo-haplóides.....	7
2.5.1. Sementes haplóides: formação e identificação.....	8
2.5.2. Histórico do emprego dos duplo-haplóides.....	9
2.5.3. Obtenção de haplóides gimnogenéticos através da indução <i>in vivo</i> .....	10
2.5.4. Duplicação cromossômica .....	13
2.5.5. Importância dos duplo-haplóides .....	13
2.6. Utilização de marcadores SSR na seleção de haplóides e DH .....	14
<b>3. MATERIAL E METODOS</b> .....	<b>16</b>
3.1. Local .....	16
3.2. Indução de haploidia.....	16
3.3. Identificação das sementes potencialmente haplóides .....	16
3.4. Métodos de duplicação cromossômica .....	17
3.4.1. Tratamento 1: testemunha.....	17
3.4.2. Tratamento 2: imersão das sementes em solução de colchicina.....	17
3.4.3. Tratamento 3: germinação em papel germitest .....	18
3.4.4. Tratamento 4: imersão das plântulas em colchicina .....	19
3.4.5. Tratamento 5: injeção de colchicina nas plantas .....	19

3.5. Caracterização fenotípica das plantas haplóides e DH.....	19
3.6. Identificação de plantas haplóides ou DH através de marcadores SSR.....	20
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>22</b>
4.1. Eficiência na indução de haploidia.....	22
4.2. Duplicação cromossômica .....	28
4.3. Seleção de plantas haplóides por meio de marcadores SSR.....	31
4.4. Comparação dos três métodos de seleção e obtenção de sementes DH .....	34
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>37</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>38</b>

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1– Sementes potencialmente haplóides selecionadas em cada indutor cruzado com as diferentes populações .....	24
Quadro 2 - Avaliação fenotípica das plantas potencialmente haplóides. ....	25
Quadro 3 - Duplicação cromossômica de sementes potencialmente haplóides induzidas pelo Stockc 6.....	28
Quadro 4 - Duplicação cromossômica de sementes potencialmente haplóides induzidas pelo KHI .....	29
Quadro 5 - Número de marcadores SSR utilizados na identificação de plantas DH em cada população. ....	31
Quadro 6 - Marcadores microssatélites utilizados na identificação de plantas haploides ou DH .....	31
Quadro 7 - Número de haplóides ou DH selecionados na análise fenotípica e molecular e coincidência entre as duas análises .....	33

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Corte realizado acima do embrião para melhor absorção da solução de colchicina .....	18
Figura 2 - A) Expressão de antocianina nas sementes; B) Sementes sem expressão de antocianina.....	22
Figura 3 - A) semente híbrida, B) potencialmente haplóide e C) semente sem expressão de antocianina.....	23
Figura 4 - Diferença fenotípica entre planta híbrida e planta haplóide, oriundas do cruzamento com o genitor Stock 6 .....	26
Figura 5 - Plantas haplóides oriundas do cruzamento com o genitor KHI ....	27
Figura 6 - Amostras de sementes submetidas ao tratamento 2 em que se observa a injúria causada pelo corte profundo.....	29
Figura 7 - Padrão obtido com o marcador umc 1797 para plantas oriundas do cruzamento entre Stock 6 e P3. 1, 2, 3, 4, 5 e 7: híbridos; 6: haplóide ou .....	32
Figura 8 - Padrão obtido com o marcador bnlg 1031 para plantas oriundas do cruzamento entre KHI e P21. 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 12, 15 e 18: híbridos; 5, 6, 10, 11, 13, 14, 16 e 17: haplóides ou DH .....	32
Figura 9 - Avaliação de três métodos de seleção de haplóides para o indutor Stock 6 .....	34
Figura 10 - Avaliação dos três métodos de seleção de haplóides para o indutor KHI .....	35
Figura 11 - Espigas colhidas nas plantas autofecundadas. Somente a espiga nº 2 foi oriunda de uma planta caracterizada fenotipicamente e molecularmente como DH.....	36

## RESUMO

HERPICH, Monise Thaís, M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, maio de 2012. **Obtenção de linhagens duplo-haplóides de milho.** Orientador: Ronald José Barth Pinto. Conselheiros: Ivan Schuster e Carlos Alberto Scapim.

A tecnologia de produção de Duplo-Haplóides (DH) tem sido utilizada por empresas de melhoramento de milho em função da possibilidade de reduzir o tempo e o custo despendidos na obtenção de linhagens. A implantação de uma rotina de produção de linhagens duplo-haplóides em programas de melhoramento de milho no Brasil depende do estabelecimento de protocolos eficientes. Este trabalho foi realizado com dois objetivos: 1) avaliar a eficiência da obtenção de linhagens duplo-haplóides de milho, utilizando dois indutores e cinco métodos de duplicação cromossômica; 2) identificar marcadores moleculares microssatélites (SSR) para auxiliar a seleção fenotípica de plantas haploides ou DH. Para tanto, foi avaliada a eficiência na indução de haplóides utilizando híbridos do programa de melhoramento de milho da Coodetec e os indutores de haploidia Stock 6 e KHI, obtendo assim sementes/plantas haplóides gimnogenéticas. Para a duplicação cromossômica, foram utilizados cinco métodos, sendo a colchicina empregada como agente antimitótico. A identificação de haplóides ou DH foi realizada por meio da análise fenotípica e do uso de marcadores SSR. O indutor de haploidia KHI apresentou melhor desempenho na indução de haplóides gimnogenéticos de milho. Os métodos de duplicação cromossômica apresentaram baixa eficiência, necessitando, assim, da otimização de protocolos. Os marcadores moleculares microssatélites utilizados foram eficazes na identificação das plantas haplóides ou DH, auxiliando na seleção fenotípica.

**Palavras-chave:** *Zea mays* (L.), duplo-haplóides, melhoramento genético.

## ABSTRACT

HERPICH, Monise Thaís, M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, may, 2012. **Obtaining double haploid lineages of maize.** Advisor: Ronald José Barth Pinto. Committee members: Ivan Schuster and Carlos Alberto Scapim.

The production of double-haploids (DH) being used by maize companies due to the possibility of reducing time and cost spent in obtaining inbred lines. The implementation of routine production of double haploids lines in maize breeding programs in Brazil depends on the establishment of efficient protocols. This work was conducted with two objectives: 1) evaluate the efficiency of obtaining double-haploid lines in maize using two inductors and five methods of chromosome doubling; 2) identify SSR markers to assist phenotypic selection of haploid plants or DH. To this end, was evaluated the efficiency in induction of haploids using hybrid of maize breeding program of Coodetec and the inductors of haploidy Stock 6 and KHI, thereby obtaining seeds/plants genotyping haploids. To the chromosome duplication was used five methods, and colchicine used as antimitotic agent. The identification of haploids or DH was performed by phenotypic analysis and the use of microsatellite molecular markers (SSR). The inductor of haploidy KHI presented the best performance in the induction of genotyping haploids of maize. The methods of chromosome duplication had low efficiency, requiring thus of optimizing protocols. The used of microsatellite molecular markers shown to be efficient to identify the haploids plants or DH, supporting phenotypic selection.

**Key words:** *Zea mays* (L.), double haploids, genetic improvement.

## 1. INTRODUÇÃO

A indução de haplóides seguida da diploidização cromossômica tem sido uma importante estratégia para a obtenção de linhagens em programas de melhoramento comercial de milho. Esta técnica consiste na obtenção de haplóides de milho por meio do cruzamento de um híbrido de interesse com um indutor de haploidia realizando-se em seguida a duplicação destes haplóides, para a obtenção dos duplo-haplóides. O resultado esperado permite reduzir o tempo e custo de obtenção de linhagens, melhorando, assim, a eficiência na produção de híbridos. Quando se utiliza o processo tradicional, mesmo após seis a oito gerações de autofecundação, ainda persistem locos em heterozigose.

Analogamente aos procedimentos adotados no sistema tradicional de autofecundações manuais, o processo de obtenção de linhagens DH também envolve uma etapa de seleção dos melhores genótipos. No entanto, essa seleção é realizada em uma etapa posterior, após a obtenção e duplicação do indivíduo haplóide. Por prescindir da necessidade de realização de autofecundações sucessivas, no sistema DH, é possível avaliar um número bem maior de plantas.

Os marcadores moleculares representam uma ferramenta utilizada para auxiliar a seleção fenotípica de plantas haplóides/DH. Eles contribuem para identificação de plantas haploides/DH, minimizando, assim, a seleção de falso-positivos.

A implantação de uma rotina de produção de linhagens duplo-haplóides em programas de melhoramento de milho depende do estabelecimento de protocolos eficientes.

Este trabalho foi realizado com os objetivos de avaliar a eficiência da obtenção de linhagens duplo-haplóides de milho, utilizando dois indutores e cinco métodos de duplicação cromossômica, assim como identificar marcadores SSR para auxiliar a seleção fenotípica de plantas haplóides ou DH.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

O milho é uma das principais culturas agrícolas do Brasil. Na safra 2011/12, a área cultivada com milho no Brasil (primeira e segunda safra) deve chegar a 14,7 milhões de hectares e a produção deve chegar a 60,3 milhões de toneladas.

### 2.1. Biologia floral do milho

O milho (*Zea mays* L. spp *mays*) pertence à família Poaceae, também conhecida como gramineae, com a subfamília Panicoideae, tribo Maydeae, gênero *Zea* e espécie *Zea mays*. É uma espécie diplóide, com  $2n = 20$  cromossomos. Classificada como espécie alógama, possui taxa de autofecundação inferior a 5%. O vento é o principal agente de polinização (Marcos Filho, 2005).

O milho é uma planta monóica, isto é, apresenta os órgãos masculinos e femininos separados, porém na mesma planta. Pendão ou flecha é o nome dado à inflorescência masculina. O pendão se desenvolve no interior do colmo, até o momento em que surge na extremidade da planta, momento considerado como o início do florescimento e a sua formação ocorre por diferenciação do meristema apical, que se inicia poucos dias após a emergência (Marcos Filho, 2005).

A inflorescência masculina consiste numa panícula. De um eixo central, denominado ráquis, surgem várias ramificações laterais. Ao longo das ramificações, estão localizadas as espiguetas, dispostas aos pares, sendo uma séssil e a outra pedicelada. Os pares de espiguetas estão arranjados alternadamente. As espiguetas possuem um par de brácteas protetoras chamadas glumas, em forma de bainha, envolvendo duas pequenas flores. Cada flor é composta de lema e pálea, as quais envolvem três estames, duas lodículas e um pistilo abortado (Viana et al., 1999; McSteen et al., 2000).

A partir da diferenciação do estame, a sua extremidade superior dá origem à antera. Nas anteras, estão presentes as células especializadas, denominadas microsporócitos, e os grãos de pólen são produzidos por diferenciação a partir destas células. Esses microsporócitos surgem a partir de inúmeras divisões mitóticas da célula-mãe do grão de pólen e sofrem divisões meióticas, para dar origem aos micrósporos (Viana et al, 1999).

Após a abertura das espiguetas, na antese, as anteras sofrem ruptura de uma de suas extremidades, a fim de permitir a saída dos grãos de pólen. A duração total da floração de um pendão em um campo de milho pode variar de 10 a 20 dias. Temperaturas elevadas podem encurtar estes períodos, enquanto temperaturas mais amenas podem prolongá-los (Goodman e Smith, 1987). Em um pendão, existem milhares de anteras. Cada antera produz, em média, 400 grãos de pólen e cada planta produz milhões de grãos de pólen, o que possibilita uma enorme eficiência do processo de polinização. Os grãos de pólen são transportados, predominantemente, pelo vento, possibilitando a polinização cruzada (Luna et al., 2001; Ramalho e Silva, 2004).

A inflorescência feminina, denominada espiga, ocorre por diferenciação das gemas existentes nas axilas foliares do colmo. É constituída de palhas, sabugo e flores femininas. A palha envolve firmemente a inflorescência, de modo que cada bainha foliar é originada de um único nó. À medida que as bainhas surgem, uma se sobrepõe à outra (Viana et al., 1999). O sabugo é um eixo ao longo do qual se encontram reentrâncias ou alvéolos, nos quais se desenvolvem as espiguetas. Estas estão dispostas aos pares, formando um espiral em torno do sabugo, o que faz com que o número de fileiras de grãos presentes na espiga normalmente seja um número par. A flor é parcialmente envolvida pela lema e pela pálea, apresentando um pistilo funcional com ovário basal único e estilo longo.

O estilete se caracteriza por ser um filamento de conexão entre o estigma e o ovário. O ovário situa-se na parte basal da flor, aderido ao sabugo, e é constituído pela parede do ovário e do óvulo. O óvulo, por sua vez, tem na sua constituição, o funículo, integumentos, micrópila, nucela e saco embrionário (Dumas e Mongensen, 1993).

O conjunto formado pelo estilo e estigma é denominado de cabelo ou barba da espiga e fornece umidade aos grãos de pólen capturados, os quais germinam e emitem o tubo polínico por meio de um poro germinativo. O estilo-estigma tem tamanho variável, podendo atingir até 45 cm de comprimento (Mercer, 2001).

Os estilos e estigmas permanecem receptivos logo após a sua emergência até por volta de 14 dias, dependendo das condições climáticas. Apenas a flor superior de cada espiguetas é funcional, pois a inferior geralmente encontra-se atrofiada. A fecundação de todas as flores da espiga só será verificada se a polinização for efetuada entre o sétimo e nono dia, aproximadamente. Quando não

fecundados, os estilos-estigmas começam a secar a partir da extremidade após o período de alongamento (Cárcova et al., 2003).

## **2.2. Polinização e fertilização**

Com o surgimento das inflorescências, inicia-se o processo de polinização e fertilização, ocorrendo a liberação do pólen pelas inflorescências masculinas. O pólen é carregado pelo vento até atingir o estilo-estigma de outra planta. A polinização cruzada no milho é favorecida, pois a deiscência e dispersão do pólen ocorrem aproximadamente de 2 a 3 dias, depende do genótipo, antes da emergência do estilo-estigma, ocorrendo, portanto, o fenômeno da protandria. Pode ocorrer autopolinização, desde que coincida o período de emergência do pólen com a receptividade do estilo-estigmas. Embora a dispersão do pólen possa ocorrer por até 14 dias em situação favoráveis, usualmente, ocorre por 5 a 8 dias (Viana et al., 1999). O tempo necessário desde a polinização até a fertilização depende de fatores como umidade, temperatura e constituição genética da planta (Goodman e Smith, 1987).

A liberação do pólen pode começar desde o nascer do sol até o meio-dia e é usual que se complete com 4 a 5 horas. Quando as condições são muito favoráveis, o pólen é viável no máximo por vinte e quatro horas, sendo que o clima seco e quente causa uma redução na sua viabilidade (Bignotto, 2002).

A germinação do grão de pólen consiste na emissão do tubo polínico. O grão de pólen adere aos estigmas por uma substância viscosa, ou citoplasma, com três núcleos posicionados na sua extremidade. Um desses, chamado vegetativo, é responsável pelo funcionamento da ponta apical, os outros dois núcleos, denominados generativos, somente entram em ação no processo de fertilização (Chang e Neuffer, 1992).

Ao aderir aos estigmas, o pólen penetra no interior do mesmo e atinge o estilete, percorrendo toda a sua extensão até atingir a micrópila, no óvulo. No decorrer desse processo, o tubo polínico, formado pela germinação do grão de pólen, continua seu crescimento até penetrar no saco embrionário, onde sua extremidade é rompida, liberando os dois núcleos generativos ou espermáticos. Um dos núcleos espermáticos funde-se à oosfera para formar o zigoto, restaurando, desse modo, o número diplóide de cromossomos próprio das células somáticas da

espécie ( $2n=20$ ). O outro núcleo espermático funde-se aos dois núcleos polares de tal modo que, posteriormente, essa estrutura triploide forma o endosperma (Veit et al., 1993).

A dupla fertilização resulta na formação do zigoto e do endosperma. O zigoto origina o embrião híbrido, que contém 50% da informação dos cromossomos de origem paterna e 50% de origem materna. Já no endosperma, 66,66% dos cromossomos são de origem materna e apenas 33,33%, paterna (Veit et al., 1993).

### **2.3. Maturação e constituintes da semente**

A semente de milho é um fruto tipo cariopse que apresenta como característica a presença de uma única semente presa ao pericarpo em toda a sua extensão (Smith et al., 2004). Logo após a fertilização, inicia-se a fase de enchimento de grãos, desenvolvendo-se assim os componentes dos grãos, como pericarpo, embrião e endosperma (Mercer, 2001). O desenvolvimento da semente se completa cerca de 50 dias após a fertilização (Paterniani e Miranda Filho, 1987), que ocorre entre 12 e 36 horas após a polinização (Chang e Neuffer, 1992).

Antes de se transformar em embrião, o zigoto sofre divisões celulares em um processo de diferenciação, formando-se primeiro o pré-embrião, com forma e características próprias da espécie, continuando seu crescimento e desenvolvimento até a maturação completa da semente. A formação do endosperma ocorre anteriormente e com maior rapidez, em relação à do embrião (Mercer, 2001).

Assim que ocorre a dupla fertilização, a estrutura celular formada na fusão dos três núcleos primários do endosperma sofre inúmeros ciclos de divisão, fazendo com que se amplie o número de núcleos livres, sem citocinese. Este processo ocorre na região periférica da célula original (óvulo). Posteriormente, ocorre a citocinese, quando os núcleos livres migram para diferentes regiões por meio de um grande vacúolo central, até que o endosperma passe a ser constituído de inúmeras células mononucleares (Guimarães, 1997; Lopes e Larkins, 1993).

As condições ambientais interferem nas fases de desenvolvimento da semente, cuja duração total alcança aproximadamente 50 dias. Durante esse período, o ovário aumenta o seu peso em mais de 1.400 vezes, provavelmente por estar ocorrendo uma intensa atividade metabólica e divisão celular. A maximização de acúmulo de matéria seca é visualmente perceptível quando surge a “camada de

abscisão” ou “camada preta”, indicando que o grão se encontra completamente formado, atingindo a maturidade fisiológica (Vieira et al., 1995).

A camada externa da semente é o pericarpo, que deriva da parede do ovário e pode ser incolor, vermelho, marrom, laranja ou variegado (Paterniani e Miranda Filho, 1987).

A ponta da semente é a parte remanescente do tecido que conecta a semente ao sabugo e permite uma rápida absorção de umidade. Dentro da semente, está o endosperma e o embrião, sendo o endosperma responsável por aproximadamente 85% do peso total do grão, o embrião 10% e o pericarpo 5% (Kiesselbach, 1949).

O embrião é proveniente do crescimento e diferenciação do zigoto. Está posicionado em uma depressão da face superior do endosperma perto da base da semente. Nele se encontram as estruturas que originarão uma nova planta e que serão ativadas quando esta for colocada em condições favoráveis à germinação (Paterniani e Filho 1987). O embrião é constituído por um eixo embrionário e pelo cotilédone. O eixo embrionário é constituído por várias estruturas: a plúmula ou epicótilo, que se situa na extremidade superior, e origina as primeiras folhas. A plúmula é envolta por uma bainha protetora chamada coleóptilo. Na extremidade inferior, encontra-se a radícula, da qual serão originadas as raízes, inicialmente envoltas por uma bainha chamada de coleorriza (Mercer, 2001).

O endosperma é triplóide, originado da fusão de dois núcleos femininos e um núcleo masculino. Com exceção da(s) sua(s) camada(s) mais externa(s) constituída(s) por uma ou algumas camadas de células de aleurona, o endosperma é constituído principalmente de amido e pode apresentar cor branca, amarela ou laranja (Brieger e Blumenschein, 1966).

As sementes de milho mantêm um alto nível de viabilidade (95-100%) por até 6 anos em condições secas e frias. A redução do teor de umidade para menos de 12% permite que a semente mantenha a viabilidade enquanto congelada (Purseglove, 1972).

## **2.4. Melhoramento do milho**

Várias metodologias são empregadas no melhoramento genético da cultura do milho, tais como, seleção recorrente, retrocruzamento, produção de linhagens por

autofecundação e a utilização de duplo-haplóides para futura produção de híbridos (Barbosa, 2009).

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 Filho, 1987).

No Brasil, as pesquisas de melhoramento genético de milho iniciaram em 1932. O lançamento do primeiro híbrido duplo ocorreu em 1946 e o surgimento do primeiro híbrido simples, em 1952. A tecnologia do milho híbrido explora a heterose ou o vigor híbrido, oriunda do cruzamento de duas ou mais linhagens homocigotas. Estas linhagens são obtidas após 6-7 gerações de autofecundação (Fancelli, 1994).

Nos últimos anos, o Brasil lidera os investimentos no desenvolvimento de híbridos de milho tropical. É um mercado altamente competitivo. O milho híbrido ocupa lugar de destaque entre as contribuições da ciência para a sociedade e tem sido responsável por expressivos aumentos na produtividade dessa importante cultura em todo o mundo (Barbosa, 2009).

A superioridade dos genótipos heterocigotos em relação aos demais foi descoberta na cultura do milho no início do século XX. A partir de então, vários estudos foram conduzidos, viabilizando a produção e a utilização comercial de sementes híbridas. O sucesso dos programas de melhoramento de milho depende do desenvolvimento de linhagens. Essas 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 (Hallauer, 1990).

As considerações acima permitem concluir que a obtenção de linhagens a serem utilizadas na obtenção de híbridos com alto desempenho produtivo, representa uma das principais metas do melhoramento de milho (Miranda Filho e Viégas, 1987).

## **2.5. Haplóides e duplo-haplóides**

Uma planta haplóide tem somente metade do patrimônio genético, sendo, portanto, estéril. A duplicação de seu número cromossômico de maneira espontânea, ou induzida pela aplicação de colchicina, recupera a condição diplóide

e restaura a fertilidade. Esta planta, chamada duplo-haplóide, será totalmente homozigota, uma vez que cada cromossomo terá sua cópia exata. Uma planta ou semente obtida a partir de uma planta DH autopolinizada pode ser denominada como planta duplo-haplóide. Uma planta é considerada DH se ela for fértil, mesmo que toda a parte vegetativa da planta não consista das células com o grupo duplicado de cromossomos. Por exemplo, uma planta será considerada uma planta DH se contiver gametas viáveis, mesmo se for quimérica (Moraes-Fernandes, 1990).

A técnica de obtenção de linhagens DH de milho tem sido estudada principalmente para reduzir o tempo na síntese de linhagens, nos programas de melhoramento de milho. Além disso, a técnica requer menor área experimental nos campos de melhoramento, resultando em economia de recursos da empresa (Milach, 2007).

Segundo Strahwald e Geiger, 1988, a tecnologia permite que o melhorista realize o *testcross* com linhagens homozigotas em vez de fazê-lo utilizando material que ainda apresenta segregação.

### **2.5.1. Sementes haplóides: formação e identificação**

Sementes haplóides maternas de milho são obtidas por meio de indução *in vivo*, utilizando-se como polinizador uma linhagem com deficiência em um dos núcleos polínicos. Obtêm-se, assim, uma semente com endosperma triplóide e embrião haplóide.

O mecanismo molecular de indução de haplóides não foi totalmente compreendido. No entanto, há indícios de que, em linhas haplóides, dois conjuntos espermáticos sejam desenvolvidos com diferentes velocidades (Bylich e Chalyk, 1996). Como resultado, um dos espermatozoides se desenvolve em um estágio pronto para a fertilização, mas o outro não. A existência de somente um espermatozoide normal em um grão de pólen pode ser a razão para a quebra de fertilização dupla e o desenvolvimento de grãos haplóides (Enaleeva e Tyrnov, 1996).

Os haplóides em milho ocorrem naturalmente a uma taxa aproximada de um para cada mil sementes formadas (Chase, 1965). Contudo, algumas técnicas podem ser utilizadas para aumentar essa frequência. Um desses métodos baseia-se no uso de linhagens indutoras, que podem gerar haplóides maternos ou paternos, dependendo do tipo de linhagem indutora empregada e do cruzamento empregado.

As plantas/sementes são posteriormente tratadas com agentes que duplicam o genoma, como a colchicina, obtendo-se, em apenas uma geração, indivíduos totalmente homocigotos (Barbosa, 2009).

### **2.5.2. Histórico do emprego dos duplo-haplóides**

Segundo Belicuas (2007), a primeira ocorrência natural de haplóides foi verificada em 1922, na espécie *Datura stramonium*, seguida por *Nicotiana tabacum* (1924) e *Triticum compactum* (1926).

Conforme Belicuas (2007), os primeiros protocolos para a produção de plantas haplóides em laboratório através de cultura de anteras foram desenvolvidos entre 1964 e 1966. Na década de 1970 houve a conversão de haplóides estéreis (H) em duplo-haplóides (DH). O lançamento da primeira cultivar utilizando DH foi em *Maris haplona* de canola (1974).

Outra ocorrência de produção de haplóides foi desenvolvida por Kasha e Kao, também na década de 1970, em cevada via hibridação com o método bulbosum. No referido trabalho, o progenitor masculino foi *Hordeum bulbosum*, uma espécie de cevada geralmente estéril e relativamente próxima à cevada cultivada. Neste caso os haplóides são obtidos pela eliminação dos cromossomos de *H. bulbosum*. Merecem ainda destaque os cruzamentos intergenéricos de trigo com milho, utilizados para a produção de haplóides de trigo, seguindo o mesmo mecanismo.

Nos anos que seguem a década de 1980, diversos protocolos e inovações tecnológicas para a obtenção de linhagens DH em mais de 200 espécies vegetais foram divulgados (Forster et al., 2007). Contudo, somente nos últimos vinte anos sua utilização se mostrou viável na produção de sementes melhoradas (Pierre, 2011).

DH também são utilizados na recuperação da fertilidade do híbrido entre milho e capim-elefante (Abreu, 2006).

A primeira planta haplóide de milho foi descrita por Stadler e Randolph, em 1929 (Röber et al., 2005). Chase (1952) foi pioneiro em propor o emprego de haplóides de milho com o intuito de acelerar a obtenção de linhagens. O autor identificou haplóides naturais e duplicou seu número cromossômico, para a obtenção de DH.

Atualmente, a produção de linhagens DH *in vivo* por meio de indutores gimnogenéticos é apontada como uma técnica de sucesso na cultura do milho,

independentemente do genótipo (Lashermes e Beckert, 1988; Chalyk, 1994; Deimling, 1997; Bordes, 1997).

### **2.5.3. Obtenção de haplóides gimnogenéticos através da indução *in vivo***

Em um processo de autofecundação normal em espécies diplóides, considerando apenas dois pares de locos independentes e segregando entre os genitores (AAbb) e (aaBB), o genótipo recessivo aabb tem a probabilidade de ser encontrado na proporção de  $\frac{1}{16}$  em uma população F<sub>2</sub>. Porém, na indução de haploidia, será de  $\frac{1}{4}$  a probabilidade de ocorrência desse mesmo genótipo dentro da população. Isso acontece devido à ausência dos heterozigotos, observando apenas quatro genótipos homozigotos (AABB, AAbb, aaBB e aabb). Assim, com a obtenção de linhagens, a variância aditiva é maximizada, os efeitos de dominância são neutralizados e as vantagens na seleção de características quantitativas podem ser superiores, uma vez que é realizada somente com base na aditividade, não havendo a interferência dos efeitos de dominância e epistasia (Pinto, 2009).

A indução *in vivo* baseia-se na utilização de linhagens ou sintéticos indutores, podendo gerar haplóides de origem materna (gimnogenéticas), como também de origem paterna (androgenéticas). O desenvolvimento de uma variedade nomeada como Stock 6 por Coe (1959), que autofecundada produzia frequência de haplóides de 3,2%, abriu possibilidades do uso de polinizadores seletivos para aumentar a frequência de haplóides. Assim, variedades indutoras de haploidia foram desenvolvidas a partir desta variedade. Entretanto, o uso de duplo haplóides continuou restrito pela dificuldade de geração de linhagens a partir destes haplóides (Chase, 1969). A maioria das linhagens e dos sintéticos indutores de haploidia são derivadas da linhagem temperada Stock 6, que gera haplóides de origem materna, gimnogenéticos (Coe, 1959). A exemplo disso, tem-se o sintético indutor KHI. O mecanismo de indução de haploidia dessa linhagem, Stock 6, não é bem conhecido (Rotarenco et al., 2009). Acredita-se que os haplóides resultem de uma falha na fertilização, devida ao gameta masculino ou feminino. Não ocorrendo a fertilização, por um mecanismo também não elucidado, a oosfera cresce e se diferencia em um “embrião” haplóide (Sarkar e Coe, 1966).

Outra linhagem indutora, também de clima temperado, denominada Wisconsin-23 (W23), gera haplóides tanto de origem paterna, ou seja,

androgenéticos (Kermicle, 1969) como também haplóides de origem materna, gimnogenéticos (Alekcevetch, 2011).

Incluem-se ainda como linhagens indutoras de haploidia para milho a MHI e M741H, que produzem haplóides de origem materna (Eder et al, 2002), e os indutores RWS (Roeber e Geiger, 2005), KEMS (Deimling e Geiger, 1997), KMS e ZMS (Chalyk, 1994).

Na literatura estudada, não foi observado a presença do sintético indutor de haploidia KHI como foco de pesquisa.

Para facilitar a identificação de sementes ou plantas haplóides/DH, fazendo com que ocorra assim um melhor êxito na seleção fenotípica das plantas de interesse, pode-se utilizar o marcador morfológico dominante do sistema R-navajo (*R1-nj*), presente no loco R do cromossomo 10. Com este tipo de seleção ocorre, portanto, a diminuição do número de indivíduos diplóides, os quais não são de interesse.

O sistema desenvolvido por Nanda e Chase (1966) utiliza um parental masculino denominado “Purple embryo Marker” ou “PEM, com a presença do gene *R1-nj*, caracterizado por promover a pigmentação com antocianina no endosperma e no embrião nas sementes diplóides (Figura 1). Nas sementes haplóides, a pigmentação está presente somente no endosperma, ficando com o embrião branco, natural de sementes de milho (Nanda e Chase, 1966).

É importante ressaltar que o gene *R1-nj* apresenta algumas limitações, como a dificuldade de isolamento de alguns genótipos haplóides, causada pela presença de genes dominantes existentes no milho, *C1-I*, *C2-I<sup>df</sup>* e *I<sup>n1</sup>-ID*, que inibem a síntese de antocianina (Figura 2) (Coe Junior, 1994).

Para que um marcador de antocianina funcione em milho, a ação de vários alelos precisa ser considerada. A produção de pigmentos de antocianina em tecidos de milho inclui os produtos de genes estruturais e reguladores. Genes estruturais, tais como *A1*, *A2*, *Bz1*, *Bz2* e *C1*, codificam as enzimas biossintéticas da via metabólica. Os genes reguladores de antocianina encaixam-se em duas classes de fatores de transcrição, *C1/PI1* e *R1/B1*, os quais interagem para ativar a transcrição dos genes estruturais. Mais especificamente, a expressão de antocianina no grão requer um alelo determinador de coloração no loco *C1*, tal como *C1* ou *C1-S* (Cone et al., 1986).

O *C1-S* é dominante ao alelo *C1* de tipo selvagem e apresenta pigmentação intensificada (Cone et al., 1986). A expressão de *C1*, ao contrário, é dependente do gene *Vp1*, que codifica um fator de transcrição que está envolvido na expressão de genes durante a germinação de sementes. A especificidade da expressão de *C1* em grãos ocorre porque a expressão de *Vp1* é limitada ao endosperma (aleurona) e embrião (Hattori et al., 1992).

Um alelo, para ser útil no rastreamento haplóide/diplóide, deve conferir coloração em ambos, endosperma (aleurona) e embrião. Coe et al. (1988) listaram três tipos de alelos que conferem coloração em ambos, o *R1-nj*, *R-scm* e *B-peru*. O *R1-nj* é o mais comumente usado para rastreamento haplóide/diplóide de sementes maduras (Nanda e Chase, 1966).

Estudos demonstraram a possibilidade de aumentar a taxa de indução de haploidia, utilizando linhagens indutoras de clima temperado que chegam a produzir até 10% a 12% de haplóides, porém, com grande variação de acordo com o genótipo empregado (Shatskaya et al., 1994). Após a obtenção e identificação das mesmas, faz-se então a diploidização cromossômica (Milack, 2007).

O indutor de haploidia de origem de clima temperado, linhagem W23, produz de 1% a 3% de grãos haplóides, o que teoricamente resulta em 2 a 6 haplóides numa espiga contendo 200 grãos (Kermicle, 1969).

Lashermes e Beckert (1988) utilizaram marcadores fenotípicos para identificar haplóides, mais especificamente os genes da ausência de lígula e glossy (*lg1*, *lg2* e *gl1*). Dependendo do genótipo, verificaram uma variação de 0,4 a 2,4% na frequência de indução. Além disto, desenvolveram novas linhagens indutoras. Produziram e avaliaram 29 linhagens e híbridos de linhagens indutoras com Stock 6. Os autores observaram uma alta correlação entre as capacidades de indução das gerações F2 e F3.

Chalyk (1994) avaliou plantas haplóides obtidas por meio do cruzamento com um indutor ZMS durante dois anos (604 plantas no primeiro ano e em 1030 plantas no segundo). Estimou a fertilidade de plantas haplóides, ou seja, a frequência de duplo-haplóides espontâneos, e concluiu que a maioria das plantas haplóides é macho estéril. Por outro lado, encontrou uma taxa de diploidização espontânea variando entre 3,3 e 3,6%.

#### **2.5.4. Duplicação cromossômica**

Após a identificação de plantas haplóides, é necessário duplicar o número de cromossomos, para a obtenção de plantas DH. Para isso, alguns métodos foram desenvolvidos e consistem basicamente em emergir a plântula, ou semente ou até mesmo injetar uma quantidade ideal de inibidores mitóticos como colchicina, agentes antimicrotúbulos ou herbicidas antimicrotúbulos, pronamida, óxido nitroso, carbanatos, benzamidas, ácidos benzóicos, entre outros nas plantas de interesse (Deimling et al., 1997).

Outros agentes podem ser usados juntamente com os inibidores mitóticos para melhorar a eficiência de duplicação. Estes agentes podem ser: dimetilsulfóxido (DMSO), adjuvantes, surfactantes e similares.

O agente antimitótico colchicina ( $C_{22}H_{25}N$ ) é um alcalóide extraído de semente e bulbos de uma liliácea (*Colchicum autumnale*). Atua no final da prófase mitótica, inibindo a formação do fuso mitótico ou levando à formação de um fuso abortivo pela precipitação das proteínas constituintes nas fibras do mesmo. Conseqüentemente, a colchicina evita a migração dos cromossomos para os pólos da célula, formando assim células com o número cromossômico duplicado (Jackson, 1976).

Segundo Deimling et al. (1997), a colchicina é um agente antimitótico, que atua na organização das fibras do fuso durante a metáfase celular, impedindo a sua formação e a conseqüente disjunção dos cromossomos filhos, resultando na duplicação dos cromossomos. Estes autores conseguiram uma taxa de 67% de plântulas com a fertilidade restaurada após o processo de duplicação de cromossomos com colchicina.

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

#### **2.5.5. Importância dos duplo-haplóides**

A tecnologia de duplicação cromossômica de haplóides pode ser utilizada para aumentar a eficiência de seleção, pois aumenta a variabilidade genética entre famílias e diminui a discrepância residual, isto devido a fatores ambientais (Bordes et al., 2007). E, ainda, segundo Chase et al. (1965), as linhagens provenientes de culturas duplo-haplóides tendem a ter uma menor variância (causada por mutações)

do que linhagens desenvolvidas por métodos convencionais. É importante ressaltar que os efeitos de dominância são neutralizados, trazendo vantagens na manipulação de caracteres quantitativos, uma vez que a seleção é realizada somente com base na aditividade, não havendo interferência dos efeitos de dominância e epistasia.

Alguns pesquisadores argumentam que o processo drástico de endogamia, aliado à ausência de seleção durante o processo provocado pelo uso da técnica de D.H, reduz as chances de recombinações maiores em populações D.H quando comparadas com populações convencionais (Barbosa, 2009). Os maiores “blocos de ligação” seriam caracterizados por maiores valores de desequilíbrio de ligação entre os locos.

Barbosa (2009) analisou dados de desequilíbrio de ligação nos cromossomos de linhagens DH e linhagens convencionais (obtidas por autofecundação) e constatou que os valores de DL nas linhagens D.H foram em geral mais altos que nas convencionais. Estes resultados indicam que, para a obtenção de linhagens D.H, a segregação/recombinação ocorre em blocos maiores, quando comparado com as linhagens convencionais, e isso resulta em maior número de genes em desequilíbrio de ligação.

Linhagens D.H podem herdar blocos gênicos inteiros sem ter ocorrido recombinação, sugerindo que, no processo de obtenção de linhagens D.H, é mais viável utilizar populações  $F_2$  do que  $F_1$ , pois há maior probabilidade de ocorrência de recombinações (Bernardo, 2003).

## **2.6. Utilização de marcadores SSR na seleção de haplóides e DH**

A análise molecular da variabilidade do DNA permite determinar pontos de referência nos cromossomos das espécies em estudo. Esses pontos são chamados de marcadores moleculares (Pinto, 2009).

A partir década de 1990, foi obtido enorme e rápido progresso nas técnicas de marcadores moleculares. Estas ferramentas são importantes por apresentarem grande quantidade de polimorfismo, não sendo afetadas por variações ambientais nem pelo estágio fenológico de desenvolvimento da planta.

Os marcadores podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los. Grupo 1 são aqueles obtidos por hibridação,

exemplos: marcadores RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) e os marcadores minissatélites, também conhecidos como VNTR (Variable Number of Tandem Repeats). Os marcadores pertencentes ao grupo 2 são obtidos por amplificação de DNA, incluem-se, neste grupo, marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions), STS (Sequence Tagged Sites), SSR (Simple Sequence Repeats, também denominados microssatélites) e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Pinto, 2009).

Entre os marcadores moleculares incluídos no grupo 2, destacam-se os SSR ou microssatélites. Os marcadores baseados em microssatélites estão sendo desenvolvidos para aplicações de mapeamento genético em culturas de grande expressão, tais como soja, arroz, milho e trigo. Tendo em vista a sua expressão co-dominante e o seu multialelismo, possuem um grande conteúdo de informação de polimorfismo (Pinto, 2009).

De acordo com Wrigley e Batey (1995), a eficiência de um marcador decorre de pelo menos seis atributos: (a) não ser afetado pelo ambiente e pelo estágio de desenvolvimento das plantas; (b) permitir alto grau de discriminação entre genótipos e baixo dentro do genótipo; (c) compreender métodos rápidos e fáceis de execução; (d) não estar sujeito à variação entre laboratórios; (e) apresentar ligação com informações sobre caracteres qualitativos; e (f) possibilitar a utilização de testes estatísticos objetivos para detectar misturas e o coeficiente de similaridade entre genótipos.

Em virtude de atenderem a todos esses requisitos, numerosos microssatélites foram desenvolvidos para milho e são hoje amplamente utilizados nessa cultura (Sibov et al., 2003).

As vantagens oferecidas pelos marcadores moleculares, em relação aos marcadores morfológicos, justificam o seu uso cada vez mais intensivo como ferramenta cotidiana em programas de melhoramento de milho (Pinto, 2009).

A utilização dos marcadores moleculares como apoio na identificação de indivíduos haplóides/duplo-haplóides tem sido demonstrada em estudos sobre o assunto (Silva, 2009; Alekcevetch, 2010, Barbosa, 2009), uma vez que, na avaliação fenotípica, observam-se algumas falhas na seleção de sementes ou plantas haplóides e duplo-haplóides.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Local**

A pesquisa foi desenvolvida na Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola – Coodetec, em Cascavel/PR e Palotina/PR.

#### **3.2. Indução de haploidia**

Foram utilizados dois indutores de haploidia: Stock 6 e KHI. O indutor Stock 6 foi utilizado para polinizar 18 populações  $F_1$  e o indutor KHI foi utilizado para polinizar outras 18 populações  $F_1$ . Essas populações foram identificadas de P1 a P36.

Para a indução de haploidia foram cultivados lotes isolados de milho, contendo as linhagens indutoras como polinizadores e as populações  $F_1$  como fêmeas. Os lotes foram isolados de outros cultivos de milho por pelo menos 100 m para evitar contaminação com pólen externo. Cada lote isolado foi composto por oito fileiras de cinco metros de comprimento, sendo duas fileiras referentes às populações intercaladas com duas linhas do indutor. As populações  $F_1$  foram semeadas todas em uma única época e as fileiras dos indutores semeadas em quatro épocas diferentes, uma fileira por semana, sendo a primeira semeadura na mesma época da semeadura das populações  $F_1$ . Foi conduzido um lote isolado para cada indutor.

No momento da floração, as plantas das populações foram despendoadas, para que fossem polinizadas pelos indutores. Uma vez que os indutores produzem pouco pólen, a polinização foi auxiliada, transferido-se manualmente o pólen para os estigmas das plantas  $F_1$ .

Os lotes isolados foram conduzidos de acordo com as práticas recomendadas para a cultura do milho.

#### **3.3. Identificação das sementes potencialmente haplóides**

Após a colheita das espigas obtidas dos cruzamentos, foi realizada a contagem do número de sementes por espiga. As sementes selecionadas visualmente foram classificadas em: a) sementes potencialmente haplóides

(presença de antocianina no endosperma e ausência no embrião); b) sementes híbridas (presença de antocianina no endosperma e no embrião); c) contaminantes (sementes que não apresentaram antocianina).

Após a identificação das sementes potencialmente haplóides, foram selecionadas nove populações (seis cruzadas com o indutor Stock 6 e três cruzadas com o indutor KHI). Aquelas populações que apresentaram maiores porcentagens de sementes potencialmente haplóides induzidas e que apresentaram sementes com boa qualidade (sem ataque de pragas, doenças e vigorosas), foram selecionadas e suas sementes cultivadas, após dois meses do plantio as plantas geradas foram avaliadas fenotipicamente e molecularmente como haplóides ou DH (critérios de avaliação fenotípica item 3.5).

### **3.4. Métodos de duplicação cromossômica**

As sementes potencialmente haplóides de nove populações foram submetidas a cinco tratamentos para duplicação cromossômica.

As sementes potencialmente haplóides de cada população foram divididas por cinco, para que cada tratamento tivesse o mesmo número de sementes de cada população. Assim, 104 sementes potencialmente haplóides foram selecionadas das populações P1 a P6 e 154 sementes potencialmente haplóides foram selecionadas das populações P19, P20 e P21. As metodologias empregadas em cada tratamento serão descritas a seguir:

#### **3.4.1. Tratamento 1: testemunha**

O método consistiu no plantio direto das sementes, sem aplicação de agente químico para induzir a duplicação cromossômica. A semeadura foi realizada em vasos, em casa de vegetação. O substrato em cada vaso foi constituído por uma mistura de solo, areia e matéria orgânica, na proporção de 6:1:1.

#### **3.4.2. Tratamento 2: imersão das sementes em solução de colchicina**

Foi utilizado o método descrito por Gayen et al. (2010), com algumas modificações. Inicialmente, 104 sementes potencialmente haplóides das seis populações obtidas do indutor Stock 6 foram submetidas à desinfestação em álcool

70% durante 20 minutos, seguindo do mesmo tempo em hipoclorito de sódio comercial 50%, acrescentando-se três gotas de tween 20. As sementes foram lavadas três vezes com água destilada e autoclavada, ficando imersas por 48 horas. Este procedimento também foi aplicado em 154 sementes de três populações obtidas do indutor KHI. Após esse período, as sementes apresentavam-se intumescidas, permitindo a realização de um corte no pericarpo e endocarpo, logo acima do embrião (Figura 1), com a finalidade de aumentar a absorção da solução de colchicina pelo embrião. As sementes foram imersas em solução de colchicina 0,06%, contendo 0,5% de dimetil sulfóxido (DMSO) por 15 horas. Completado este período, as sementes foram lavadas três vezes em água corrente e semeadas em vasos, em casa de vegetação, contendo, cada vaso, um substrato formado por uma mistura de solo, areia e matéria orgânica, na proporção de 6:1:1.



Figura 1 - Corte realizado acima do embrião para melhor absorção da solução de colchicina.

### **3.4.3. Tratamento 3: germinação em papel germitest**

As sementes foram colocadas em papel germitest umedecido com colchicina (concentração de 0,1%) e dimetil sulfóxido (0,5%). Foram utilizados 240 mL dessa solução a cada quatro papéis germitest.

O conjunto foi acondicionado em um germinador com temperatura de 26° C. Após quatro dias, as plântulas estabelecidas foram transplantadas para vasos contendo uma mistura de solo, areia e matéria orgânica, na proporção de 6:1:1. A seguir, os vasos foram colocados em casa de vegetação.

#### **3.4.4. Tratamento 4: imersão das plântulas em colchicina**

As sementes foram colocadas em papel germitest e acondicionadas em um germinador a 26° C durante 3 dias. Quando o coleóptilo apresentava pelo menos 1 cm de comprimento, sua ponta foi excisada e as plântulas imersas por 12 horas em solução de colchicina 0,06%, contendo 0,5% de DMSO (Deimling et al., 1997; Eder e Chalyk, 2002). Essa etapa foi realizada à temperatura ambiente. Posteriormente, as plântulas foram lavadas em água corrente por 20 minutos e em seguida plantadas em vasos contendo uma mistura de solo, areia e matéria orgânica, na proporção de 6:1:1. A seguir, os vasos foram colocados em casa de vegetação.

#### **3.4.5. Tratamento 5: injeção de colchicina nas plantas**

As sementes possivelmente haplóides foram semeadas em vasos, em casa de vegetação, contendo uma mistura de solo, areia e matéria orgânica, na proporção de 6:1:1. Quando as plantas encontravam-se no estágio V3, foi aplicado no ápice das plantas uma solução de colchicina a 0,125% e 0,5% de DMSO (Zabirova, 1996).

Foram aplicados 2 ml da solução em cada planta, por meio da perfuração da extremidade do colmo, utilizando-se um conjunto de seringa e agulha.

### **3.5. Caracterização fenotípica das plantas haplóides e DH**

Todas as plantas estabelecidas após os tratamentos de duplicação cromossômica foram identificadas individualmente após 2 meses do plantio. As plantas foram caracterizadas como:

- híbridas: identificadas pelo alto vigor e produção de pólen (férteis). As plantas híbridas provenientes do cruzamento com o indutor Stock 6 apresentam coloração roxa no colmo e folhas.

- haplóides: identificadas pelo baixo vigor, ausência de pólen (estéris) e coloração verde.

- duplo-haplóides: identificadas pelo vigor intermediário, férteis e coloração verde.

Plantas caracterizadas fenotipicamente como haplóides ou duplo-haplóides e que atingiram maturação fisiológica foram autofecundadas.

### **3.6. Identificação de plantas haplóides ou DH através de marcadores SSR**

O processo de identificação de plantas haplóides ou DH através de marcadores SSR iniciou com a extração de DNA das sementes dos parentais (nove populações híbridas + linhagens indutoras Stock 6 e KHI), que deram origem às plantas potencialmente haplóides.

Amostras de sementes das populações e dos indutores foram moídas e o DNA extraído, utilizando o kit de extração Wizard Magnetic 96 DNA (Promega). Para isso, 40mg das sementes de cada genitor foram acondicionados em microtubos. Uma solução contendo 450 µl de Lysis Buffer A e uma esfera de vidro foi adicionada em cada tubo, identificando-se cada tubo com o nome dos respectivos parentais. As amostras foram agitadas no grinder por 2 minutos e em seguida centrifugadas a 5.000 rpm por 10 minutos. Foram transferidos 125 µl de cada amostra para uma placa de 96 poços que vem junto com o kit, evitando-se contato com o pellet. Em cada amostra, foram acrescentados 85 µl de uma solução contendo 12 µl de Magnesil ressuspensa em 76,5 µl de Lysis Buffer B. A placa foi deixada em temperatura ambiente por 5 minutos. Após este período, a placa foi colocada sobre a estante magnética por 1 minuto. Em seguida, o líquido foi pipetado e descartado. A placa foi retirada da estante magnética e, a seguir, foram adicionados 150 µl de solução de lavagem em cada amostra (Wash Buffer), misturando por pipetagem por 10-15 segundos. Novamente foi colocada a placa sobre a estante magnética por 30 segundos, removendo posteriormente o líquido. Foram realizadas mais duas lavagens, utilizando 100 µl de Wash Buffer. Após a última lavagem, colocou-se a placa sobre a estante magnética e removeu-se a maior quantidade de líquido possível. Após, a placa foi deixada para secar por 10 minutos em temperatura ambiente.

Finalizando o processo de extração de DNA, a placa contendo as amostras dos parentais foi removida da estante magnética, sendo adicionados 50 µl de TE. As beads magnéticas foram ressuspensas e as placas deixadas em temperatura ambiente por 5 minutos. A placa foi então colocada novamente sobre a estante magnética por 2 minutos e, por fim, o DNA purificado foi transferido para novos microtubos identificados.

O DNA de amostras de folhas de plantas potencialmente haplóides ou duplo-haplóides foi extraído também de acordo com o protocolo descrito acima. A quantificação do DNA foi realizada em gel de agarose 0,8%.

Para as reações de PCR, utilizaram-se 30 ng de DNA, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2 mM de Tris, 5 mM de KCl, 250 μM de DNTP, 0,4 μM de cada primer (senso e antisenso) e uma unidade de Taq DNA Polimerase, em um volume final de 20 μl.

As reações de PCR foram realizadas em um programa *touchdown* com 40 ciclos de amplificação. Este consistiu de quatro minutos iniciais para desnaturação a 94°C, seguido de 10 ciclos de 94°C por 20 segundos; 65°C por 20 segundos (diminuindo-se 1°C a cada ciclo) e 72°C por 20 segundos e 30 ciclos a 94°C por 20 segundos; 55°C por 20 segundos e 75°C por 20 segundos. Por fim, foi realizada uma etapa final de 72°C por 10 minutos. As amplificações foram realizadas em termociclador Veriti 96 (Applied Biosystems).

Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose 3%, corados com brometo de etídio (0,5μg mL<sup>-1</sup>), utilizando-se tampão de corrida SB 0,5X. A visualização dos fragmentos foi feita em aparelho de fotodocumentação Vilber Loumat (Marne-la-Vallee, França), sob luz ultravioleta.

Para identificar polimorfismos entre os genitores, 120 marcadores SSR foram testados. Para a identificação de plantas haplóides ou duplo-haplóides, foram utilizados primers com alelos em homozigose e polimórficos entre os parentais de cada população.

No processo de caracterização dos indivíduos, as plantas potencialmente haplóides ou duplo-haplóides, com genótipo heterozigoto para estes marcadores, foram consideradas como híbridos entre a população F<sub>1</sub> e o indutor de haploidia. As plantas com genótipo homozigoto para estes marcadores foram consideradas como haplóides ou duplo-haplóides.

As informações obtidas da análise molecular foram utilizadas para comparar com a caracterização fenotípica.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Eficiência na indução de haploidia

Espigas geradas dos cruzamentos utilizando os indutores de haploidia e as populações híbridas (fêmeas) apresentaram a expressão de antocianina em algumas sementes, conferida pela presença do gene *R1-nj* (Figura 2-A). A inibição da síntese da antocianina nas sementes pode ser devida à contaminação com pólen externo ou influenciada pelo background genético do genitor feminino (Rabel, 2008) (Figura 2-B).

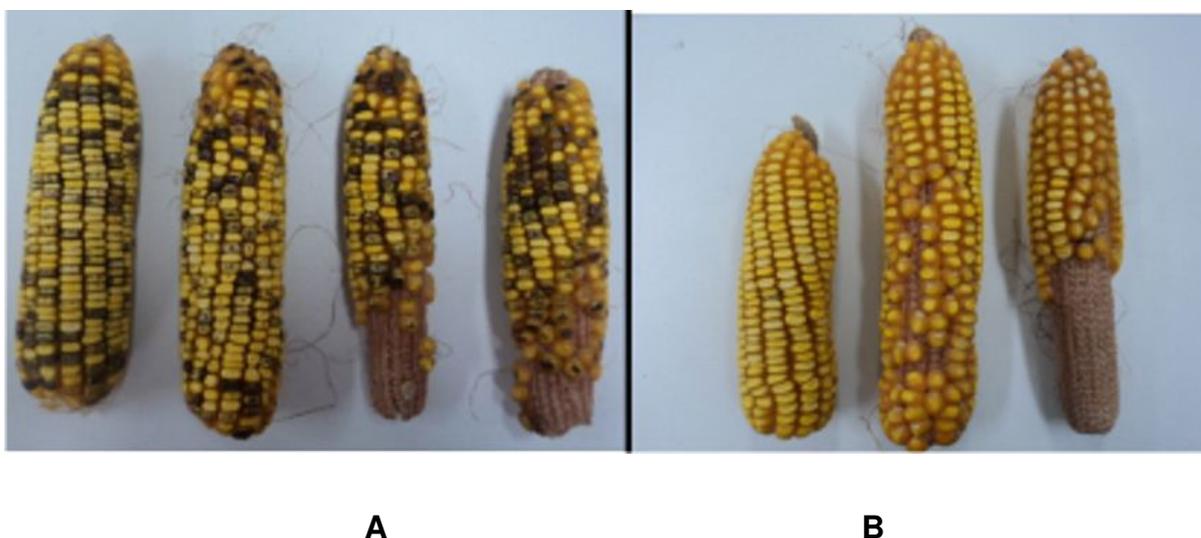


Figura 2 – **A**: Expressão de antocianina nas sementes. **B**: Sementes sem expressão de antocianina.

A seleção fenotípica das sementes potencialmente haplóides pode apresentar subjetividade, acarretando a contabilização de falso-positivos, pela seleção de sementes haplóides que, quando cultivadas, foram caracterizadas como híbridas. Assim, a visualização eficiente das sementes potencialmente haplóides aumenta a eficiência da seleção e reduz com isso os custos de produção de DH. Esta visualização eficiente decorre de processos que façam com que a pessoa que está fazendo a seleção das sementes tenha um maior número de reais haplóides como resultado, isto pode ser, por exemplo, através de uma boa iluminação focada na semente a ser visualizada.

A diferença da expressão de antocianina nas sementes pode ser visualizada na Figura 3. Sementes que apresentaram algumas manchas roxas em seu

endosperma e embrião sem coloração foram classificadas como potencialmente haplóides.



**A**

**B**

**C**

Figura 3 - A) semente híbrida, B) potencialmente haplóide e C) semente sem expressão de antocianina - indutor Stock 6.

Com a seleção das sementes foi obtida a eficiência de cada indutor de haploidia (Stock 6 e KHI) nas diferentes populações (Quadro 1).

A linhagem temperada, Stock 6 e o sintético também de clima temperado, KHI, não apresentam uma alta produção de grãos, pois não são adaptadas ao clima brasileiro. Por isso, ao invés do seu uso direto como indutoras de haploidia nos programas de melhoramento de milho, pode ser em alguns casos, mais interessante a realização de cruzamentos entre essas linhagens temperadas e híbridos comerciais bem adaptados, para o desenvolvimento de linhagens tropicalizadas com capacidade de indução de haploidia. Por outro lado, constatando a utilização de materiais de indução de origem temperada, como o sintético KHI, verificou-se que não houve necessidade em algumas situações de se fazer a tropicalização de materiais indutores, já que este sintético desempenha um bom resultado de indução de haplóides pois produz boa quantidade de pólen e não sofre com condições do clima tropical.

As populações cruzadas com o indutor Stock 6 apresentaram 0,99% de sementes potencialmente haploides. A população que alcançou elevado percentual foi a P3 com 2,91% de sementes induzidas a haploidia. Para o indutor KHI, foram obtidos 1,91% de sementes potencialmente haplóides, sendo a P19 com maior número de sementes induzidas. O fato de as populações utilizadas na indução de

haploidia serem diferentes para os dois indutores pode ter influenciado no número de sementes potencialmente haplóides obtidas.

Quadro 1 - Sementes potencialmente haplóides selecionadas em cada indutor cruzado com as diferentes populações

Indutor	Populações	Total de sementes	Sementes potencialmente haplóides	Potencialmente haplóides (%)
Stock 6	P1	8908	144	1,61
	P2	7108	99	1,39
	P3	5074	148	2,91
	P4	7848	69	0,87
	P5	5661	33	0,58
	P6	5407	53	0,98
	P7	7590	38	0,50
	P8	5351	6	0,11
	P9	6165	42	0,68
	P10	6113	12	0,20
	P11	5275	19	0,36
	P12	1344	7	0,52
	P13	6875	16	0,23
	P14	4364	10	0,23
	P15	6185	11	0,18
	P16	4231	21	0,50
	P17	5267	6	0,11
	P18	5264	4	0,08
	Total	104030	1033	0,99
KHI	P19	4833	543	11,23
	P20	5404	189	3,49
	P21	4956	100	2,01
	P22	5540	96	1,73
	P23	3357	63	1,87
	P24	4482	43	0,95
	P25	2575	67	2,60
	P26	5646	7	0,12
	P27	3189	3	0,09
	P28	6740	7	0,10
	P29	7743	110	1,42
	P30	6223	311	5,00
	P31	7585	16	0,02
	P32	2232	30	1,34
	P33	5886	17	0,29
	P34	4071	7	0,17
	P35	1885	0	0,00
	P36	1768	0	0,00
	Total	84115	1609	1,91

Para haver a confirmação do estado de haploidia por meio da análise fenotípica, as sementes potencialmente haplóides selecionadas foram então cultivadas e, como já mencionado, foi realizada após dois meses a avaliação fenotípica das plantas potencialmente haplóides geradas, estas referentes às nove populações selecionadas. Observou-se que as populações cruzadas com o indutor KHI apresentaram maior número de plantas com características haplóides (Quadro 2), evidenciando a diferença na eficiência dos dois indutores utilizados.

Quadro 2 - Avaliação fenotípica das plantas potencialmente haplóides

Indutor	Populações	Plantas potencialmente haplóides germinadas	Plantas haplóides selecionadas	Plantas haplóides selecionadas (%)
Stock 6	P1	78	3	3,84
	P2	58	5	8,62
	P3	80	5	6,25
	P4	35	3	8,57
	P5	10	3	30,0
	P6	35	2	5,71
KHI	P19	220	102	46,36
	P20	85	70	82,35
	P21	18	10	55,55

O número de plantas selecionadas fenotipicamente como haplóides (Figura 4 e 5) foi menor que o número de sementes, devido à presença de falso-positivos. A seleção baseada na expressão da antocianina no endosperma e sua ausência no embrião é passível de erros, que podem ter ocorrido devido à inibição da expressão da antocianina em alguns conjuntos genômicos. No entanto, é importante destacar que o uso da antocianina é importante porque este marcador ajuda na pré seleção de indivíduos haplóides, excluindo um grande número de sementes diplóides.

O marcador morfológico r-navajo, que confere a expressão da antocianina, pode sofrer influência quando utilizados certos genomas, provocando variações na coloração do endosperma e embrião ou, ainda, a inexistência da coloração (Silva, 2009).

A intensidade da expressão de antocionina contida nas sementes em cada espiga (roxo mais forte e num grande número de sementes) também foi fator de observação, já que primeiramente foram selecionadas as espigas com esta característica de intensidade de coloração nas sementes. Estas espigas apresentaram maior número de sementes potencialmente haplóides. Esta

observação pode ser levada em consideração ao se realizar a seleção dos melhores genótipos maternos a serem empregados neste sistema de produção de DH, pois o melhorista, ao utilizar espigas com intensidade de antocianina forte em suas sementes, a exemplo deste caso, pode estar tendo vantagens quanto ao número de sementes potencialmente haplóides obtidas.

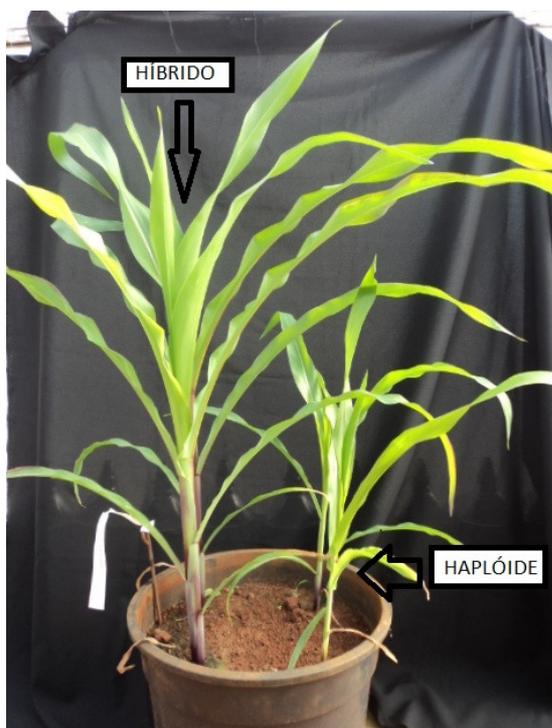


Figura 4 - Diferença fenotípica entre planta híbrida e planta haplóide, oriundas do cruzamento com o genitor Stock 6.

A presença de falso-positivos demonstra que o aperfeiçoamento do método de seleção ou até mesmo a viabilização de outro método de seleção destas sementes deve ser avaliado.

Comparando o número de sementes potencialmente haplóides selecionadas com aquelas que germinaram, observou-se que a maior porcentagem de plantas haplóides entre as populações induzidas pelo Stock 6 foi 30%, referente à P5. Quando induzidas pelo KHI, a P20 destacou-se com 82,35% de plantas potencialmente haplóides (Quadro 2).

A superioridade de KHI parece consistente porque o alto número de populações usadas tende a minimizar o efeito das populações, que são distintas das empregadas com Stock 6.

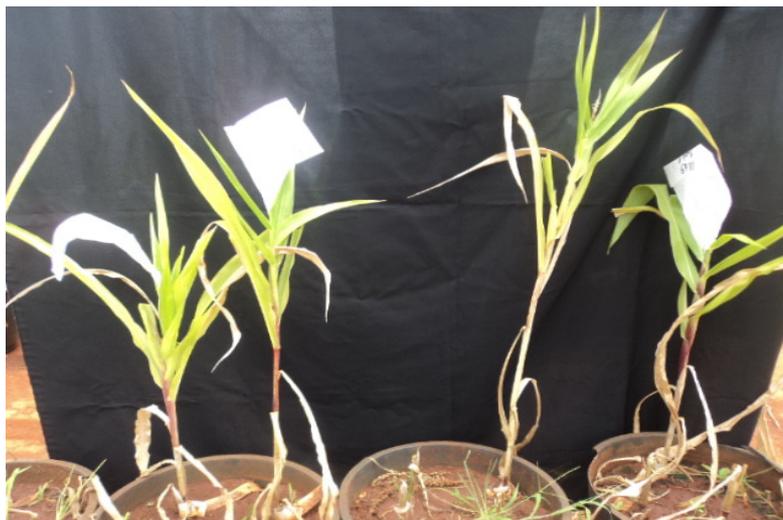


Figura 5 - Plantas haplóides oriundas do cruzamento com o genitor KHI.

Em pesquisas similares, (Bordes et al. 1997; Belicuas, 2007; Silva, 2009; Alekcevetch, 2010), a indução de haplóides de milho foi obtida por meio de diferentes indutores cruzados com diferentes híbridos. Primeiramente, foi realizado o processo de indução de sementes haplóides e, posteriormente, houve a confirmação da haploidia pela análise fenotípica das plantas estabelecidas.

Chase (1952) propôs uma metodologia de identificação de haplóides no estágio de plântula, utilizando um sistema de marcadores fenotípicos, obtendo uma taxa de ocorrência de haplóides de 0,1%.

A detecção confiável de haplóides no estágio de plântula é pré-requisito para o uso de DH no melhoramento de milho. Bordes et al. (1997) utilizaram dois híbridos com uma ampla base genética, identificados como CGT e DGT. Esses híbridos foram polinizados com um indutor e produziram plântulas haplóides sob taxas de 0,64 e 0,93%, respectivamente.

Belicuas et al. (2007), utilizando o indutor W23 como fêmea e o híbrido BRS1010 como macho, obtiveram um percentual de 0 a 51% de plantas haplóides androgenéticas.

O cruzamento de duas linhagens indutoras, ZMS e KMS, ambas derivadas da Stock 6, originou a linhagem MHI. Verificou-se que MHI apresenta, em média, uma indução de haploidia de 6,5% (Chalyk 1999; Eder e Chalyk, 2002). A linhagem indutora RWS, oriunda do cruzamento entre WS14 e KMS, apresentou de 8 a 10% de haplóides gimnogenéticos (Röber et al., 2005).

Alekcevetch (2010), ao testar dois indutores de haploidia, Stock 6 e W23, obteve 0,0117% e 0,3359% de plantas haplóides gimnogenéticas, respectivamente.

Os resultados obtidos foram satisfatórios quando comparados com trabalhos relacionados à indução de haploidia em milho.

## 4.2. Duplicação cromossômica

Utilizando o indutor Stock 6, foram observadas plantas DH, selecionadas fenotipicamente em três tratamentos. Os tratamentos 1, 4 e 5 apresentaram 25%, 33,3% e 22,2% de plantas DH, respectivamente. Os tratamentos 2 e 3 não apresentaram plantas DH (Quadro 3). A eficiência na obtenção de DH depende do número de plantas realmente haplóides obtidas. Neste caso, esse número foi reduzido, gerando poucas plantas DH.

Quadro 3 - Duplicação cromossômica de sementes potencialmente haplóides induzidas pelo Stock 6

Classificação	Trat.1		Trat. 2		Trat. 3		Trat. 4		Trat. 5	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Plantas possíveis haplóides germinadas	101	96,2	1	0,95	68	65,3	37	35,5	89	84,7
Plantas híbridas	95	94	1	100	65	95,5	32	86,4	84	94,3
Plantas haplóides	6	4	0	0	4	4,5	4	2,8	7	5,7
Plantas DH	2	25	0	0	0	0	2	33,3	2	22,2

Trat. 1: semeadura; Trat. 2: imersão das sementes em solução de colchicina; Trat. 3: germinação em papel germitest; Trat 4: imersão das plântulas em colchicina e Trat. 5: injeção de colchicina nas plantas.

O tratamento 2 apresentou somente uma planta germinada, possivelmente devido à injúria causada nas sementes que foram excisadas acima do embrião para melhor embebição em solução de colchicina (Figura 6).

Apesar de o solo utilizado nos vasos ser apropriado para a cultura, houve uma reduzida taxa de germinação de sementes possíveis haplóides/DH. A reduzida taxa de germinação pode ser atribuída à toxicidade decorrente dos tratamentos de duplicação cromossômica com o uso de colchicina, associada aos danos mecânicos causados nas sementes ou plântulas submetidas aos tratamentos 2 e 4. Portanto, é recomendável a introdução de algumas mudanças nos protocolos dos tratamentos 2 e 4, objetivando maior número de plantas estabelecidas. Entre as modificações

sugeridas, deve-se mencionar a redução da concentração de colchicina, o uso preventivo de defensivos e a redução na profundidade dos cortes feitos em sementes e coleóptilos.



Figura 6 - Amostras de sementes submetidas ao tratamento 2, sendo observada a injúria causada pelo corte profundo.

Mesmo com um número maior de plantas haploides selecionadas, os tratamentos de duplicação aplicados nas sementes potencialmente haplóides provenientes do indutor KHI resultaram em um número reduzido de plantas DH (Quadro 4).

Quadro 4 - Duplicação cromossômica de sementes potencialmente haplóides induzidas pelo KHI

Classificação	Trat.1		Trat. 2		Trat. 3		Trat. 4		Trat. 5	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Plantas possíveis haplóides germinadas	64	41,5	44	28,5	80	51,9	2	1,3	133	86,3
Plantas híbridas	13	20,3	6	13,6	27	33,7	0	0	75	56,4
Plantas haplóides	47	73,4	34	77,2	48	60	1	50	52	39
Plantas DH	4	7,8	4	10,5	5	9,4	1	50	6	10,3

Trat. 1: sementeira; Trat. 2: imersão das sementes em solução de colchicina; Trat. 3: germinação em papel germitest; Trat 4: imersão das plântulas em colchicina e Trat. 5: injeção de colchicina nas plantas.

Todos os tratamentos apresentaram DH formados quando observados pela análise fenotípica, sendo que os tratamentos 2, 4 e 5 apresentaram maiores números destes DH (Quadro 4).

Os resultados apresentados no Quadro 4 permitem novamente observar que a germinação foi maior nos tratamentos em que as sementes e plântulas não foram submetidas a qualquer tipo de corte antes da aplicação de colchicina (tratamentos 1, 3, e 5).

Quando utilizada nos demais tratamentos, a colchicina pode ter apresentado efeito de toxicidade nas sementes e plântulas.

Considerando os dois indutores e o total de plantas que receberam os tratamentos de duplicação, 26 plantas foram selecionadas como DH por meio da análise fenotípica das plantas estabelecidas (Quadro 3 e 4).

Utilizando a colchicina na duplicação cromossômica, Bordes et al. (1997) verificaram que a recuperação da fertilidade masculina variou de 30 a 60%, de acordo com o número de haploides detectados. Segundo os autores, a taxa de recuperação de progênie foi influenciada pela base genética. O híbrido identificado como DGT apresentou resultados melhores do que o híbrido CGT. O período de crescimento também teve uma influência sobre a recuperação de espigas férteis. Os autores observaram letalidade em plantas a uma taxa de 4,4 a 13,9% após a utilização da colchicina no tratamento de duplicação. Nesse tratamento, as plântulas foram imersas até a base em solução de 1,5 g de colchicina por litro, durante três horas, em temperatura ambiente. Após este período, as plântulas foram transferidas para vasos contendo substrato e aquelas que apresentaram pólen foram autofecundadas. Estes resultados comparados com os obtidos neste trabalho foram superiores quanto ao número de DH produzidos.

O tratamento 1 apresentou números próximos aos demais tratamentos, sendo em alguns casos melhores, como quando comparados aos tratamentos 2 e 3 (Stock 6) e tratamento 4 (KHI).

Chase et al. (1952) relataram a obtenção de DH espontâneos a uma taxa de 10. Essa diferença pode decorrer da capacidade específica de resposta do genótipo utilizado.

Considerando a variação nos resultados descritos até o momento pela literatura e a escassa disponibilidade de informações metodológicas, é possível concluir que outros protocolos alternativos devem ser testados para otimizar a duplicação cromossômica das plantas, tendo em vista um maior sucesso na obtenção de DH.

### 4.3. Seleção de plantas haplóides por meio de marcadores SSR

Foram testados 120 marcadores microssatélites entre os parentais Stock 6, P1, P2, P3, P4, P5 e P6 e 48 marcadores entre os parentais KHI, P19, P20 e P21. Foram selecionados os que apresentaram polimorfismo entre os genitores (Quadro 5).

Quadro 5 - Número de marcadores SSR utilizados na identificação de plantas DH em cada população

Indutores	Populações	Marcadores testados	Marcadores polimórficos
Stock 6	P1	120	15
	P2	120	11
	P3	120	16
	P4	120	15
	P5	120	14
	P6	120	14
KHI	P19	48	5
	P20	48	5
	P21	48	5

Para todas as populações foi possível encontrar marcadores informativos. O marcador *bnlg 1031* apresentou polimorfismo em oito populações, não sendo polimórfico somente entre os genitores Stock 6 e P6.

Entre os marcadores polimórficos, selecionou-se um ou dois marcadores que foram utilizados para amplificação na população (Quadro 6).

Quadro 6 - Marcadores SSR utilizados na identificação de plantas haploides ou DH

Populações	Marcadores Utilizados
P1	bnlg 1671
P2	umc 1133
P3	umc 1797
P4	umc 1657
P5	bnlg 1671
P6	umc 1016
P19	bnlg 1031 e PHI 028
P20	bnlg 1031
P21	bnlg 1031

As plantas haplóides ou DH foram identificadas visualmente através da produção de pólen e confirmadas por meio dos marcadores SSR (Quadro 7).

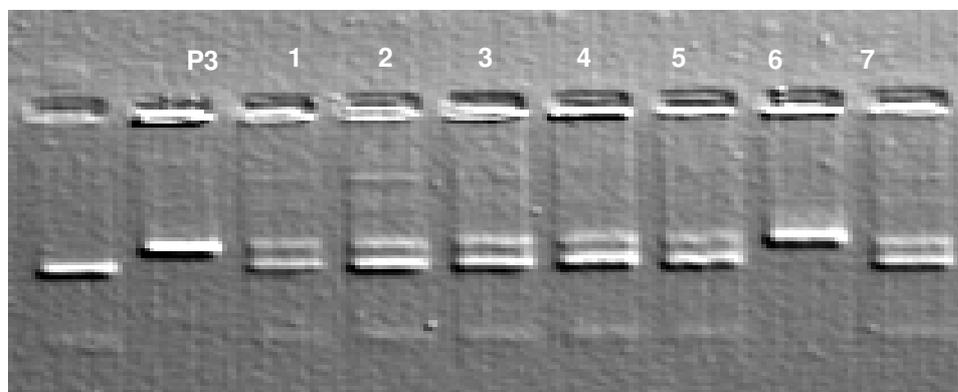


Figura 7 - Padrão obtido com o marcador umc 1797 para plantas oriundas do cruzamento entre Stock 6 e P3 - 1, 2, 3, 4, 5 e 7: híbridos; 6: haplóide ou DH.

As plantas foram avaliadas como híbridos, haplóides ou duplo haplóides (Figura 6 e 7).

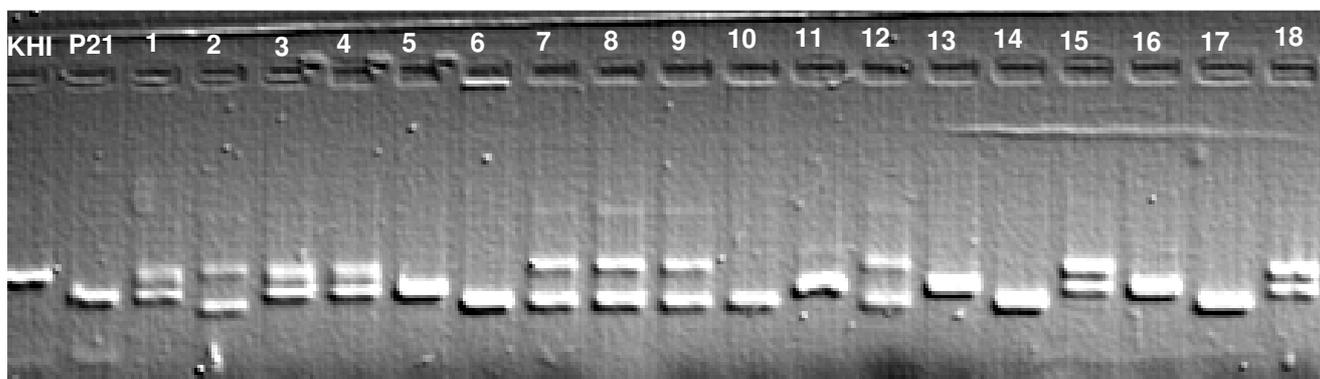


Figura 8 - Padrão obtido com o marcador bnlg 1031 para plantas oriundas do cruzamento entre KHI e P21. 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 12, 15 e 18: híbridos; 5, 6, 10, 11, 13, 14, 16 e 17: haploides ou DH.

Na P20 o número de plantas haplóides ou DH selecionadas nos dois métodos de seleção (fenotípica e molecular) foi igual, o que não significa que as plantas classificadas como haplóides na análise fenotípica são as mesmas da análise molecular. Neste caso, 58 plantas foram identificadas como haplóides tanto fenotipicamente como molecularmente. Nas demais populações, as plantas haplóides/DH identificadas na análise fenotípica foram as mesmas da análise

molecular. Verificou-se excesso de haplóides na análise fenotípica das plantas que, quando submetidas à análise molecular, foram consideradas híbridas (Quadro 7).

No processo de avaliação da coincidência entre as duas análises, resumido no Quadro 7, é interessante ressaltar que uma planta caracterizada como haplóide na análise fenotípica pode não ter sido caracterizada como haplóide na análise molecular, e vice-versa.

Quadro 7 - Número de haplóides ou DH selecionados na análise fenotípica e molecular e coincidência entre as duas análises

Populações	Plantas potencialmente haplóides germinadas	Análise fenotípica	Análise molecular	Coincidência entre as duas análises
P1	78	6	4	4
P2	58	6	3	3
P3	80	2	2	2
P4	35	7	2	2
P5	10	3	3	3
P6	35	3	2	2
P19	220	122	61	61
P20	85	70	70	58
P21	18	10	8	8

Observou-se que o número de plantas haplóide/DH detectadas pela avaliação fenotípica aproximou-se da molecular, sendo economicamente viável esse tipo de avaliação. Contudo, os marcadores microssatélites auxiliaram na seleção de plantas haplóides/DH, aumentando a eficiência da seleção e reduzindo o número de falso-positivos da análise fenotípica.

Resultado semelhante foi obtido por Silva (2009), que avaliou a indução de haploidia de sementes androgenéticas de milho. O autor observou que os marcadores moleculares específicos codominantes foram eficientes na identificação de plantas haplóides. Da mesma forma, trabalhando com plantas haplóides gimnogenéticas, Alekcevetch (2010) verificou que os marcadores SSR foram eficientes na confirmação de genótipos haplóides ou DH de milho.

#### 4.4. Comparação dos três métodos de seleção e obtenção de sementes DH

Para comparar os três métodos de seleção de haplóides/DH (seleção de sementes potencialmente haplóides, seleção fenotípica das plantas potencialmente haplóides e seleção molecular), foram consideradas apenas as sementes potencialmente haplóides que germinaram, pois somente foi possível analisar a sua haploidia quando as plantas foram estabelecidas.

Observou-se que o número de sementes potencialmente haplóides é elevado quando comparado ao número de plantas haplóides detectadas pela avaliação fenotípica e molecular (Figura 9 e 10).

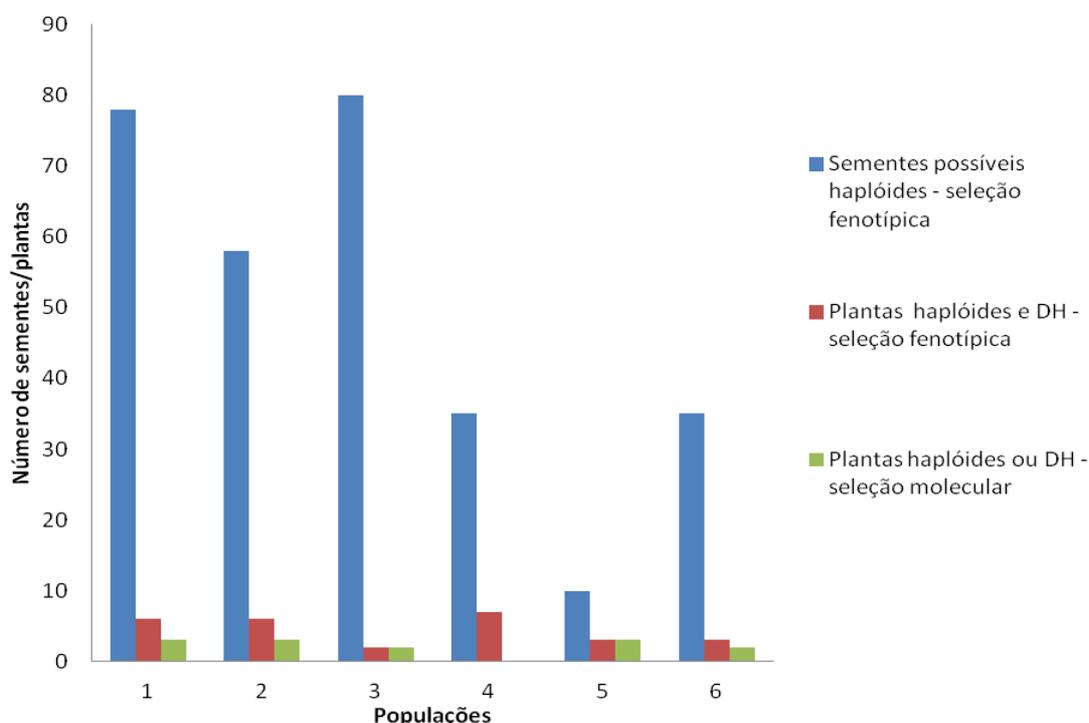


Figura 9 - Avaliação de três métodos de seleção de haplóides para o indutor Stock 6.

Nas populações induzidas pelo Stock 6, geralmente, foi observada uma maior presença de falso-positivos, em comparação às populações oriundas do indutor KHI.

Nas populações induzidas pelo KHI, a P19 apresentou maior número de falso-positivos, sendo 220 sementes potencialmente haplóides germinadas, 102 plantas caracterizadas fenotipicamente como haplóides/DH e 61 plantas com essas características identificadas na análise molecular. A seleção de haplóides/DH nas

populações induzidas pelo KHI apresentou menor número de falso-positivos. Logo, de acordo com este critério, o uso do indutor KHI foi mais vantajoso que o emprego dos outros indutores.

O número de plantas selecionadas fenotipicamente como haplóides/DH foi semelhante ao da análise molecular, evidenciando a importância da avaliação fenotípica e do uso dos marcadores, que contribuíram para aumentar a eficiência da seleção.

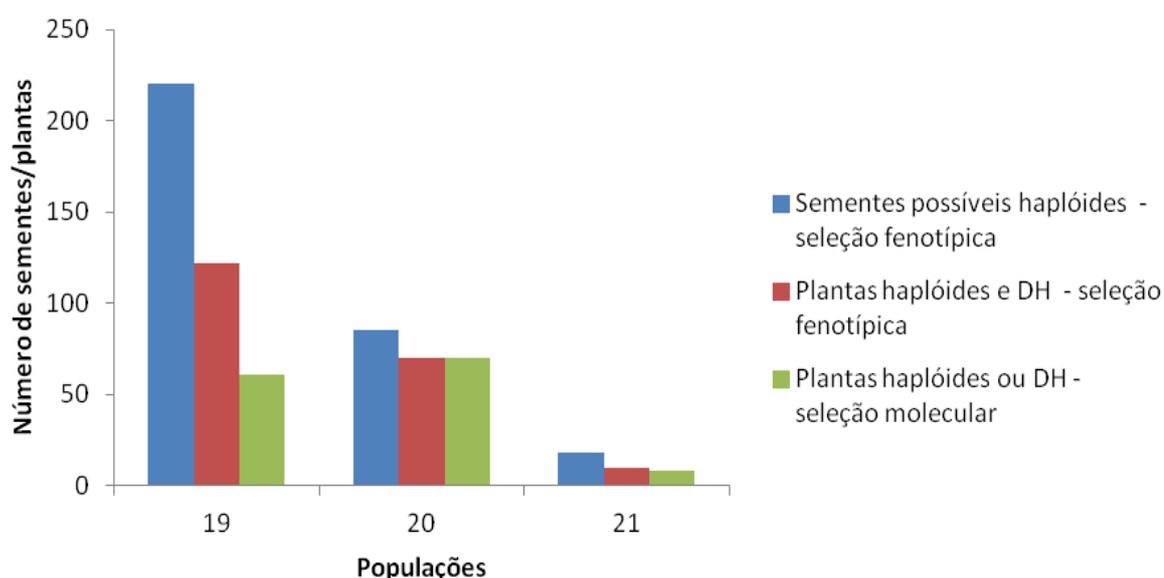


Figura 10 - Avaliação dos três métodos de seleção de haplóides para o indutor KHI.

Todas as plantas caracterizadas fenotipicamente como DH foram autopolinizadas. No entanto, considerando que, em razão da metodologia empregada no presente trabalho, as análises moleculares das plantas foram efetuadas paralelamente, algumas plantas autopolinizadas foram consideradas híbridas na análise molecular

Pode-se, de acordo com os resultados obtidos, observar que, das 26 plantas DH selecionadas fenotipicamente, somente sete foram identificadas como homocigotas na análise molecular, produzindo pólen e qualificando-se, portanto, como DH. No entanto, destas, constatou-se somente uma planta autofecundada. Uma das causas possíveis para este resultado foi a protandria, ou seja, a ausência de pólen viável quando os estigmas finalmente estivessem receptivos. Os efeitos da protandria podem ter sido agravados pela temperatura elevada dentro da casa de

vegetação, colaborando para a rápida inviabilidade do pólen. Observou-se também que muitos pendões tornaram-se secos antes que as polinizações fossem finalizadas.

As 19 plantas restantes identificadas fenotipicamente como DH, foram híbridas na análise molecular (Quadro 3 e 4).

A única planta autofecundada caracterizada fenotipicamente e molecularmente como DH pertenceu à P19 (Figura 2), que produziu uma espiga contendo 51 sementes, das quais 30 apresentaram antocianina e 21 apresentaram tegumento amarelo, característica das sementes do genitor feminino (Figura 12). O motivo da presença de algumas sementes contendo expressão de antocianina possivelmente se deve à contaminação de alguns estilos-estigmas com pólen externo. Por outro lado, aquelas que apresentaram coloração normal, a exemplo do genitor fêmea, foram devido à autofecundação da planta da população P19 constatada fenotipicamente e molecularmente como DH.



Figura 11 - Espigas colhidas nas plantas autofecundadas. Somente a espiga nº 2 foi oriunda de uma planta caracterizada fenotipicamente e molecularmente como DH.

Em estudos posteriores, estas sementes serão semeadas e avaliadas, dando continuidade às demais etapas de obtenção de linhagens DH.

Na figura a seguir verifica-se as características das espigas provindas das autofecundações realizadas, com destaque para a número 2, provinda de DH.

## 5. CONCLUSÕES

O indutor de haploidia KHI apresentou melhor desempenho na indução de haplóides gimnogenéticos de milho.

Os métodos de duplicação cromossômica apresentaram baixa eficiência, sendo oportuno, portanto, o desenvolvimento de uma otimização dos protocolos.

Os marcadores moleculares microssatélites utilizados demonstraram ser eficazes na identificação das plantas haplóides ou duplo-haplóides auxiliando a seleção fenotípica.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, J.C.; DAVIDE, L.C.; PEREIRA, A.V.; BARBOSA, S. Mixoploidia em híbridos de capim-elefante x milho tratados com agentes antimutagênicos. Brasília: **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 41:1629-1635, 2006.

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 de Graduação (Graduação em Ciências biológicas).

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”, 2009. 55p. Tese (Doutorado em Agronomia).

BELICUAS, P.R. **Obtenção, identificação e caracterização de haplóides androgenéticos em milho**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2004. 52p. Dissertação (Mestrado em Aroquímica/Agroquímica).

BELICUAS, P.R. **Uso de haplóides no melhoramento de plantas**. Seminário em genética e melhoramento de plantas. Disponível em <http://www.genetica.esalq.usp.br/pub/seminar/PRBelicuas-200702-PPT.pdf>. Acesso em: 17, dezembro, 2011.

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**, 1:1-8, 2007.

BERNARDO, R. Parental selection, number of breeding populations, and size of each population in inbred development. **Theoretical and Applied Genetics**, 107:1252–1256, 2003.

BESPALHOK, A. Uso e conservação do germoplasma. **Maringá: Universidade Estadual de Maringá Eduem**, 1: 21-28, 2010.

BIGNOTTO, E.A. **Seleção gamética por meio da posição de semente na espiga de milho**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2002. 58p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).

BORDES, J.; CHARMET, G.; DUMAS DE VAULX, R.; LAPIERRE, A.; POLLACSEK, M.; BECKERT, M.; GALLAIS, A. Doubled-haploid versus single-seed descent and S<sub>1</sub>-family variation for testcross performance in a maize population. **Euphytica**, 154:41-51, 2007.

BORDES, J.; CHARMET, G.; DUMAS DE VAULX, R.; POLLACSEK, M.; BECKERT, M.; GALLAIS, A. Doubled haploid versus S<sub>1</sub> family recurrent selection for testcross performance in a maize population. **Theoretical and Applied Genetics**, 112:1063-1072, 2006.

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** 17, 10.1051:291-297, 1997.

BRIEGER, F.G.; BLUMENSCHNEIN, B. Botânica e origem do milho. In: WATSON, S.A.; RAMSTAD, P.E. (eds.). **Cultura e adubação do milho**. São Paulo, 1966. p. 81-107.

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**, 70: 33, 1996.

CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. Tipos de marcadores moleculares. IN: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (eds.) **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, 2006. p. 9-78.

CÁRCOVA, J.; ADRIEU, B.; OTEGUI, M.E. Silk growth in maize: Relationship with flower development and pollination. **Crop Science**, 43:914-920, 2003.

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

- CHANG, M.T.; NEUFFER, M.G. Position of the vegetative and sperm cells of germinating pollen grain in maize (*Zea mays* L.). **Maydica**, 37:223-243,1992.
- CHASE, S.S. Production of homozygous diploids of maize from monoploids. **Agronomic Journal**, 5:263-267, 1952.
- CHASE, S.S. Monoploids and monoploid-derivatives in maize (*Zea mays* L.). **The Botanical Reviews**, 35:117-167, 1969.
- CHASE, S.S.; NANDA, D.K. Comparison of Variability in Inbred Lines and Monoploid-Derived Lines of Maize (*Zea mays* L.) **Crop Science**, 5:275 – 276, 1965.
- COE JUNIOR, E.H. Aline of maize with higt haploid frequency. **The American Naturalist**, 93:381-382, 1959.
- COE JUNIOR, E.H. Anthocyanin genetics. In: FREELING, M.; WALBOT, V. (eds.). **The maize handbook**. New York: Springer-Verlag, 1994. p. 279-281.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2010/2011– décimo primeiro levantamento - Agosto/2011**. Disponível em: [http://www.conab.gov.br/OlalaCM/uploads/arquivos/11\\_08\\_09\\_11\\_44\\_03\\_boletim\\_agosto-2011.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCM/uploads/arquivos/11_08_09_11_44_03_boletim_agosto-2011.pdf). Acesso em: 22, agosto, 2011.
- CONE, K.C. Molecular analysis of maize anthocyanin regulatory *locus C1*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 83:9631-9635, 1986.
- CRUZ, C.D. **Programa Genes**: Estatística experimental e matrizes. UFV. Viçosa. 2006. 285p.
- DEIMLING, S.; ROBER, F.; GEIGER, H.H. Methodik und getetic der in-vivo haploideninduktion bei mais. **Votr Pflanzenzuchtung**, 38:203-204, 1997.
- DUMAS, C.; MOGENSEN, H. L. Gametes and fertilization: maize as a model system for experimental embryogenesis in flowering plants. **Plant Cell**, 5:1337-1348, 1993.
- EDER, J.; CHALYK, S. In vivo haploid induction in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, 104:703-708, 2002.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária: **Milho e sorgo**. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho/importancia.htm>. Acesso em: 23, julho, 2011.

ENALLEVA, N.K.H.; TYRNOV, V.S. Single fertilization and the problem of haploidy induction in maize **Doklady Biological Sciences**, 353:225-226, 1996.

FANCELLI, A.L. **Tecnologia da produção do milho para alta produtividade**. Among Maize inbred lines as inferred from DNA Microsatellites. **Genetics**, 165:2117-2128, 2003.

FORSTER, B.P.; HEBERLE-BORS, E.; KASHA, K.; TOURAEV, A. The resurgence of haploids in higher plants. **Trends in Plant Science**, 12:368-375, 2007.

GARCIA, J.D.; MATTOSO, M.J.; DUARTE, J.O.; CRUZ, J.C. Aspectos econômicos da produção e utilização do milho. Disponível em: [Erro! A referência de hiperlink não é válida. http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/publica/2006/circular/Circ\\_74.pdf](http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/publica/2006/circular/Circ_74.pdf). Acesso em: 01, fevereiro, 2009.

GOODMAN, M.M.; SMITH, J.S.C. Botânica. In: PATERNIANI, E.; VIÉGAS, G.P. (eds.). **Melhoramento e produção do milho**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 39-78.

GUIMARÃES, C.T. Marcadores moleculares no melhoramento. In: BORÉM e CAIXETA. (eds.). **Marcadores moleculares**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2009. p. 129-175.

GUIMARÃES, V.D. **Fatores que controlam a dureza do endosperma do grão de milho**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1997. 67p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).

HALLAUER, A.R. Methods used in developing maize inbred lines. **Maydica**, 35:1-16, 1990.

HATTORI, T. The viviparous-1 gene and abscisic acid activate the *C1* regulatory gene for anthocyanin biosynthesis during seed maturation in maize. **Genes and Development**, 6:609-618, 1992.

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**, 45:1120-1131, 2005.

JACKSON, R.C. Evolution and systematic significance of polyploidy. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 7:209-324, 1976.

KATO, A. Chromosome doubling of haploid maize seedlings using nitrous oxide gas at the flower primordial stage. **Plant Breeding**, 121:370-377, 2002.

KERMICLE, J.L. Androgenesis conditioned by a mutation in maize. **Crop Science**, 166: 1422-1424, 1969.

KIESSELBACH, T.A. The structure and reproduction of corn. **Research Bulletin of the Agricultural Experiment Station of Nebraska**, 161:91-93, 1949.

KROTH, C.F. **Milho: Conab estima safra 2011/12 de 60,319 milhões de toneladas**. Disponível em: <http://www2.formatto.com.br/aguia/new/index.php/component/content/article/35-last-news/396-milho-conab-estima-safra-201112-de-60319-milhoes-de-toneladas>. Acesso em: 06, janeiro, 2012.

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**, 76:405–410, 1988.

LIU, K.; GOODMAN, M.M.S.; SMITH, J.S.; BUCKLER, E.; D.J. **Genetic structure** Piracicaba: ESALQ/USP, 1994. 222p.

LOPES, M.A.; LARKINS, B.A. Endosperm origin, development, and function. **The Plant Cell**, 5:1383-1399, 1993.

LUNA, S.S.; FIGUEROA, J.; BALTASAR, B.; GOMES, R.; TOWNSEND, R.; SCHOPER, J.B. Maize pollen longevity and distance isolation requirements for 84 effective pollen control. **Crop Science**, 41:1551-1557, 2001.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495p.

MCSTEEN, P.; LAUDENCIA-CHINGCUANCO, D.; COLOSANTI, J. A floret by any other name: control of meristem identity in maize. **Trends in Plant Science**, 5:61-66, 2000.

MERCER, J.R. **Implicações do fenômeno Xênia nos programas de melhoramento de milho**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2001. 53p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).

MILACH, S.C.K. O melhoramento de milho. **Informativo Pioneer**, 25:16-17, 2007.

MIRANDA FILHO, J.B.; VIÉGAS, G.P. Milho híbrido. In: PATERNIANI, E.; VIÉGAS, G.P. (eds.). **Melhoramento e produção de milho**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 277-340.

MOHAN, M.; NAIR, S.; BHAGWAT A.; KRISHNA, T.G.; YANO, M.; BHATIA, C.R.; SASAKI, T. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. **Molecular Breeding**, 3:87–103, 1997.

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 monoploids of maize (*Zea mays L.*) **Crop Science**, 6:213-215, 1966.

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

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

PEIXOTO, C.M. O milho: o rei dos cereais – Da sua descoberta há 8.000 anos até as plantas transgênicas. **Seed News**, 1:1-20, 2002.

PIERRE, P.M.O.; DAVIDE, L.M.C.; COUTO, E.G.O.; SILVA, T.N.; RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B. Duplo-haplóides: estratégias para obtenção e importância no

melhoramento genético do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, 10:1-16, 2011.

PINAZZA, L.A.; ALIMANDRO, R. Cenário atípico. **Agroanalysis**, 1:12–17, 1998.

PINTO, R.J.B. **Introdução ao melhoramento genético de plantas**. Maringá: UEM, 2009. 351p.

PURSEGLOVE, J.W. **Tropical crops. Monocotyledons I**. New York: John Wiley and Sons, 1972. 334p.

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

RAMALHO, M.A.P.; SILVA, N.O. Fluxo gênico em plantas. In: MIR, L. (eds.) **Genômica**. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 863-885.

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**, 50:275–283, 2005.

SHATSKAYA, O.A.; ZABIROVA, E.R.; SHCHERBAK, V.S.; CHUMAK, M.V. Mass induction of maternal haploids in corn. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, 68:1-51, 1994.

SIBOV, S.T.; SOUZA JR, C.L.; GARCIA, A.A.F.; SILVA, A.R.; GARCIA, A.F.; MANGOLIN, C.A.; BENCHIMOL, L.L.; SOUZA, A.P. Molecular mapping in tropical maize (*Zea mays L.*) using microsatellite markers. 2. Quantitative trait loci (QTL) for grain yield, plant height, ear height and grain moisture. **Hereditas**, 139:107-115, 2003.

SILVA, G.J. **Produção de haplóides androgenéticos em milho**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. ISSN 1518-4277, 2009.

SMITH, C.W.; BETRÁN, J.; RUNGE, E.C.A. **Corn: origin, history, technology and production**. Hoboken: J. Wiley, 2004. 968p.

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

TANKSLEY, S.D.; MCCOUCH, S.R. Unlocking genetic potential from the wild. **Science**, 277:1063–1066, 1997.

VEIT, B.; SCHMIDT, R.J.; HAKE, S.; YANOFSKY, M.F. Maize floral development: new genes and old mutants. **The Plant Cell**, 5:1205-1215, 1993.

VIANA, F.M.S. Hibridação em milho. In: BORÉM, A. (eds.). **Hibridação artificial de plantas**. Viçosa: UFV, 1999. p. 401-426.

VIEIRA, R.D.; MINOHARA, L.; CARVALHO, N.M.; BERGAMASCHI, M.C.M. Relationship of black layer and milk line development on maize seed maturity. **Scientia Agricola**, 52:142-147, 1995.

WRIGLEY, C.W.; BATEY, I.L. Efficient strategies for variety identification. In: WRIGLEY, C.W. (eds.). **Identification of foodgrain varieties**. St Paul: American Association Cereal Chemists, 1995. p. 19-33.