

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

ALESSANDRA GUEDES BALERONI

**Taxas de indução do KHI na obtenção de haploides em função de
diferentes texturas de grãos de milho**

MARINGÁ
PARANÁ-BRASIL
OUTUBRO - 2014

ALESSANDRA GUEDES BALERONI

Taxas de indução do KHI na obtenção de haploides em função de diferentes texturas de grãos 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. Carlos Alberto Scapim.

MARINGÁ
PARANÁ-BRASIL
OUTUBRO - 2014

PÁGINA DESTINADA À FOLHA DE APROVAÇÃO. ENCONTRA-SE NA
SECRETARIA DO PGM.

Aos meus pais, Antonio e Conceição, por todo amor e confiança.
À minha irmã, Fernanda, pela amizade que sempre me fortalece.
A toda minha família, com muito amor.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser o guia essencial em minha vida e aumentar a minha fé a cada dia, dando-me coragem para enfrentar as dificuldades.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo apoio financeiro por meio da concessão de bolsas de estudos.

Ao professor doutor Carlos Alberto Scapim, pela orientação, confiança e incentivo na elaboração deste trabalho.

Ao professor doutor Ronald José Barth Pinto, pela coorientação.

À Hingrid Ariane da Silva, pelo acompanhamento e auxílio em tantas difíceis decisões a serem tomadas durante a execução deste trabalho.

Aos amigos do grupo de melhoramento de milho, que mesmo atarefados dedicaram um tempinho para ajudar.

À Mariela Thim, à Camila Castro e ao Rodrigo Ivan Contreras Soto, pela ajuda com as atividades na casa de vegetação.

Ao professor doutor Carlos Moacir Bonato, por disponibilizar a casa de vegetação.

A outros tantos amigos que direta ou indiretamente fizeram parte de mais essa etapa da minha vida.

Muito obrigada.

BIOGRAFIA

ALESSANDRA GUEDES BALERONI, filha de Antonio Baleroni e Conceição Aparecida Guedes Baleroni, nasceu em vinte e cinco de abril de 1987, na cidade de Guaraçaí, estado de São Paulo.

Concluiu o Ensino Fundamental em 2001 e o Ensino Médio em 2004, ambos no Colégio Stella Maris, na cidade de Andradina, estado de São Paulo.

Em 2007, formou-se no Curso Técnico em Açúcar e Álcool, pelo Colégio Stella Maris, em Andradina, São Paulo.

Ingressou no Curso de Agronomia, em 2008, na Universidade Estadual de Maringá (UEM), cidade de Maringá, estado do Paraná, obtendo o título de Engenheira Agrônoma em 2012.

Em março de 2013, iniciou o Curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, na Universidade Estadual de Maringá, estado do Paraná, Brasil.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Breve histórico do milho	3
2.2. Classificação botânica e morfologia do milho	3
2.3. Polinização e fertilização.....	5
2.4. Melhoramento genético do milho	6
2.5. Emprego dos duplo-haploides.....	7
2.5.1. Obtenção de haploides via indução <i>in vivo</i>	9
2.5.2. Linhagens indutoras de haploidia	10
2.6. Identificação dos haploides	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. Local	13
3.2. Material genético.....	13
3.3. Indução de haploides <i>in vivo</i>	13
3.4. Identificação das sementes potencialmente haploides mediante o marcador morfológico <i>R-navajo</i> e características fenotípicas	14
3.5. Teste de qui-quadrado	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4.1. Obtenção de haploides	16
4.2. Identificação dos possíveis haploides pelo marcador <i>R-navajo</i>	17
4.3. Taxa de possíveis haploides	18
4.4. Seleção de haploides pelo fenótipo das plantas	26
4.5. Teste de qui-quadrado	29
5. CONCLUSÕES	31
6. REFERÊNCIAS	32

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Identificação dos híbridos utilizados para indução de haploidia.....	13
Quadro 2 - Taxa de possíveis haploides dos quatro híbridos induzidos à haploidia .	18
Quadro 3 - Características fenotípicas analisadas nas plantas selecionadas como possíveis haploides, por meio do seu vigor.....	27
Quadro 4 - Resultado do teste de qui-quadrado (χ^2) para a taxa de possíveis haploides obtidos <i>in vivo</i> e a taxa de haploides esperados pela indução natural.....	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Expressão de antocianina nas espigas induzidas. (A) P2530; (B) P3989; (C) IAC125 e (D) RB6324.....	16
Figura 2 - Separação dos possíveis haploides.....	17
Figura 3 - Sementes diploides excluídas pelo marcador <i>R-navajo</i>	18
Figura 4 - Espigas de milho doce induzido à haploidia, com destaque para aquelas que não tiveram seus grãos pigmentados por antocianina.	24
Figura 5 - Híbrido IAC125 induzido à haploidia, com pouca formação de grãos em diversas espigas.....	25
Figura 6 - Diferença entre o vigor de uma planta diploide (A) e outra haploide (B), resultantes do cruzamento do híbrido P2530 com o indutor <i>KHI</i>	28
Figura 7 - Sementes com variados níveis de coloração por antocianina, devido à expressão do gene <i>R1-nj</i>	28

RESUMO

BALERONI, Alessandra Guedes, M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, outubro de 2014. **Taxas de indução do KHI na obtenção de haploides em função de diferentes texturas de grãos de milho.** Orientador: Carlos Alberto Scapim. Conselheiro: Ronald José Barth Pinto.

A tecnologia de produção de duplo-haploides (DH) destaca-se nos programas de melhoramento de milho devido à possibilidade de redução no tempo de obtenção de linhagens. Além disso, a mão de obra e os recursos financeiros necessários também são inferiores quando comparados com o método convencional. A obtenção de plantas DH consiste basicamente na indução de haploidia, seguida da duplicação do conteúdo genético dos possíveis haploides. Para isso, a identificação preliminar dos haploides é essencial. Os objetivos deste trabalho foram: obter: sementes haploides de diferentes genótipos, verificar a eficiência da separação de sementes potencialmente haploides, mediante a coloração por antocianina atribuída pelo gene *R1-nj*, e analisar a taxa de possíveis haploides em função da textura do grão. Foi realizado o cruzamento *in vivo* entre a variedade indutora de haploidia *KHI* e quatro híbridos F_1 's. Sementes resultantes desses cruzamentos foram caracterizadas quanto à haploidia por meio do marcador morfológico *R-navajo*. As selecionadas como possíveis haploides, provenientes de quatro espigas escolhidas de cada genótipo, foram semeadas em casa de vegetação para uma confirmação de haploides baseada no fenótipo das plantas. Foram obtidas cerca de 50 espigas de cada genótipo cruzado com o indutor de haploidia *KHI*. As sementes com endosperma dentado apresentaram melhor pigmentação, facilitando a seleção via *R-navajo*. No entanto, essa seleção não foi totalmente eficiente. A taxa de possíveis haploides, baseada nessa seleção, foi reduzida expressivamente após a avaliação do fenótipo das plantas, indicando a presença de falsos-positivos selecionados por meio da expressão de antocianina atribuída ao gene *R1-nj*.

Palavras-chave: indução de haploidia, *R-navajo*, *Zea mays*.

ABSTRACT

BALERONI, Alessandra Guedes, M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, October 2014. **Induction rates of KHI in obtaining haploid for different textures of maize kernels.** Adviser: Carlos Alberto Scapim. Committee member: Ronald José Barth Pinto.

The production technology of doubled haploids (DH) stands out in programs of maize breeding due to the possibility of reducing the time to obtain lines. Furthermore, the manpower and the necessary financial resources are also lower compared to the conventional method. Obtaining DH plants is basically the induction of haploid, followed by duplication of the genetic content of haploid possible. For this, a preliminary identification of haploids is essential. The objectives of this study were to obtain haploid seeds of different genotypes, verify the efficiency of the separation of potentially haploid seed by staining anthocyanin assigned by *R1-nj* gene and analyze the rate of haploid possible in function of grain texture. Plants of inducer *KHI* were crossed *in vivo* with four hibrids F_1 's. Seeds resulting from these crosses were characterized as to haploid through morphological marker *R-navajo*. The seeds selected as possible haploids from four ears, chosen each genotype were sown in a greenhouse for a confirmation based on phenotype of plants. About 50 ears of each genotype were obtained. Seeds with dent endosperm showed better pigmentation, facilitating the selection via *R-Navajo*. However, this selection is not fully efficient given that rate of haploid possible based on this selection, was reduced significantly after the evaluation of the phenotype of the plants, indicating the presence of selected false positives by expression of anthocyanin, assigned the *R1-nj* gene.

Keywords: induction of haploid, *R-navajo*, *Zea mays*.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é responsável por cerca de 75 milhões de toneladas da produção de milho mundial, ocupando a terceira posição dentre os maiores produtores (CONAB, 2014). Essa cultura apresenta um importante papel na economia mundial, sendo utilizada tanto na indústria de rações quanto para o consumo humano, seja *in natura* (milho verde) ou industrializado.

O processo convencional de obtenção de linhagens em programas de melhoramento comercial de milho é dispendioso e leva de seis a oito gerações de autofecundação para atingir a homozigose, enquanto a tecnologia dos duplo-haploides (DH) permite reduzir esse tempo em pelo menos 18 meses (Milach, 2007).

A obtenção de linhagens DH consiste na indução de haploidia por meio do cruzamento entre um genótipo de interesse, do qual se deseja extrair linhagem, com um genótipo indutor de haploidia que usualmente é de origem temperada. Esse cruzamento pode gerar haploides maternos ou paternos, dependendo do indutor empregado. Porém, ambos os casos originam plantas cujos embriões apresentam metade do número de cromossomos. Em seguida, os genomas dessas plantas haploides são duplicados para que voltem ao seu conteúdo cromossômico normal ($2n$) e assim sejam obtidas as linhagens DH.

Além de reduzir o tempo de obtenção de linhagens endogâmicas e necessitar de menor quantidade de mão de obra e recursos financeiros, o uso de DH garante maior pureza genética, uma vez que as plantas geradas são obtidas de uma única semente haploide duplicada e a pureza genética é mantida (Rabel, 2008).

A grande limitação do uso da tecnologia DH na obtenção de linhagens envolve a baixa taxa de indução alcançada e a dificuldade de identificação de plantas efetivamente haploides. As sementes haploides podem ser identificadas por marcadores morfológicos, como o gene *R1-nj* (Nanda e Chase, 1966). A identificação por meio desse gene é baseada na pigmentação por antocianina, ou seja, as sementes diploides possuirão o endosperma e o embrião roxos, enquanto as haploides apresentarão somente o endosperma roxo, ficando com o embrião branco. Entretanto, a eficiência desse marcador morfológico tem sido questionada por diversos pesquisadores, pois a expressão do gene *R1-nj* é bastante influenciada pelo *background* genético do genótipo doador (Geiger e Gordillo, 2009), além da

presença de genes dominantes (*C1-I*, *C2-Idf* e *In1-ID*) que inibem a síntese de antocianina (Coe Junior, 1994).

O presente trabalho foi realizado com os objetivos de obter sementes haploides de diferentes genótipos; verificar a eficiência da separação de sementes potencialmente haploides, mediante a coloração por antocianina atribuída pelo gene *R1-nj*; e analisar a taxa de possíveis haploides em função da textura do grão.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Breve histórico do milho

A cultura do milho foi domesticada primeiramente na região sudoeste do México, a partir da gramínea teosinto. Posteriormente, o milho difundiu-se para outras regiões tropicais da América, como o Panamá e a América do Sul. Há indícios de que há cerca de 40 séculos já se cultivava milho no sul do Peru. No Brasil, antes da chegada dos portugueses, o milho era cultivado pelos índios, sobretudo pelos guaranis, que tinham no milho o principal elemento da sua dieta. A incorporação de produtos à base de milho nos hábitos alimentares brasileiros e o consumo desse cereal aumentaram com a chegada dos portugueses e muito provavelmente a sua expansão para outras partes do mundo ocorreu devido às grandes navegações e o início da colonização do continente americano (Araujo, 2008).

Atualmente o milho é cultivado e consumido em diversos países, sendo o cereal mais produzido mundialmente, com aproximadamente 960 milhões de toneladas (SEAB, 2013; Peixoto, 2014). É um dos alimentos mais nutritivos que existe, pois se trata de uma importante fonte energética para os seres humanos e animais. Além de ser um cereal de altas qualidades nutritivas, apresenta ampla versatilidade na alimentação humana (Duarte et al., 2011).

Com relação aos maiores produtores mundiais de milho destacam-se os Estados Unidos, a China, o Brasil e a Argentina, totalizando 70% da produção (Peixoto, 2014). Em território nacional, os estados que mais produzem são o Paraná, as Minas Gerais e o Rio Grande do Sul, na primeira safra, e o Mato Grosso e Paraná na segunda safra. Na safra 2014/2015, a produção estimada de milho total, no Brasil, foi de 78,9 milhões de toneladas, numa área cultivada de 15,5 milhões de hectares. Nesse mesmo período, a produtividade média estimada da primeira safra foi de 4,6 t ha⁻¹ e na segunda safra de 5,4 t ha⁻¹ (CONAB, 2014).

2.2. Classificação botânica e morfologia do milho

O milho (*Zea mays* L. spp. *mays*) é uma monocotiledônea pertencente à família Poaceae, tribo Maydeae, gênero *Zea* e espécie *Zea mays*. É uma planta

diploide ($2n=20$ cromossomos) e monoica. O monoecismo permite classificar o milho como uma planta alógama com praticamente 100% de reprodução cruzada (Paterniani e Campos, 2005).

A semente do milho é um fruto seco, classificado como cariopse, e consiste basicamente de três partes: pericarpo, endosperma e embrião. O pericarpo é a camada externa que envolve e protege o endosperma, cujo conteúdo é principalmente amido. O embrião é envolvido pelo endosperma que confere sua proteção contra danos externos, visto que sua função é originar uma nova planta da mesma espécie (Kiesselbach, 1949; Tavares, 1988). De acordo com as características do grão, como formato, quantidade de amido, teor de açúcar, capacidade de expansão, vitriosidade etc., existem diferentes classes ou tipos de milho: dentado, duro, farináceo, pipoca e doce (Paes, 2006).

O sistema radicular da planta de milho é do tipo fasciculado. Isso significa que não há uma raiz principal destacada sobre as demais raízes, o que é característico das gramíneas (Tavares, 1988). O caule consiste de nós e entrenós; é ereto e sem ramificações. As folhas são inseridas nos nós do colmo, dispostas alternadamente e apresentam uma nervura central em forma de canaleta e apresentam pilosidade (Kiesselbach, 1949).

A inflorescência masculina, denominada pendão e localizada no ápice da planta, consiste em um eixo central e várias ramificações laterais, ao longo das quais são dispostas espiguetas aos pares alternadamente, sendo uma séssil e uma pedicelada. As espiguetas apresentam um par de brácteas protetoras que envolvem duas pequenas flores. Cada flor, composta por uma lema e por uma palea, contém três estames, duas lodículas e um pistilo abortado. As anteras em que são produzidos os grãos de pólen surgem na antese, a partir do entumescimento da lodícula (Anderson, 1951; Kiesselbach, 1949).

A inflorescência feminina, designada espiga, localiza-se na parte central da planta e é constituída de palhas, sabugo e flores femininas. Nesse caso, a flor é envolvida apenas parcialmente pela lema e pela palea, apresentando um pistilo funcional com ovário basal único e estilos longos. Os pares de espiguetas femininas de cada espiga diferem daquelas do pendão. Nesse caso as espiguetas são arrançadas ao longo do sabugo em espiral, de modo que o número de fileiras de grãos normalmente seja igual ao dobro do número de espiguetas pareadas (Goodman e Smith, 1987).

2.3. Polinização e fertilização

O florescimento do milho acontece, geralmente, 50 a 100 dias após o plantio. A partir desse período inicia-se o processo de polinização, o qual ocorre por meio da transferência de grãos de pólen, que são carregados pelo vento, da antera para o estigma da inflorescência da mesma planta ou de outra planta (Bueno et al., 2006).

Os estilo-estigmas (cabelos) se tornam receptivos logo após sua emergência. Se não for polinizado, o cabelo pode se alongar de 30 a 40 cm além da palha, durante 10 a 14 dias, cessando o crescimento no momento em que ocorre a fertilização. Dessa maneira, há tempo para todos os cabelos serem polinizados antes do pendão parar de liberar pólen. Um único pendão pode conter cerca de 20 a 50 milhões de grãos de pólen e sua liberação pode começar ao amanhecer, estendendo-se até o meio dia, mas esse processo dificilmente excede quatro horas. Vale ressaltar que, nesse período de floração, a planta encontra-se em intensa atividade fisiológica, sendo necessárias condições favoráveis, como alta disponibilidade hídrica e de nutrientes para atender à sua demanda. Quando há tais condições, a viabilidade do grão de pólen pode durar até 24 horas (Embrapa, 1993).

Ao serem lançados no ar pelas anteras, apenas os grãos de pólen ainda túrgidos são capazes de germinar. Normalmente, mais que um atinge o mesmo estilo-estigma, mas a fertilização de um único óvulo por dois grãos de pólen não ocorre comumente (Toledo, 1987). Quando o pólen germina, ocorre a emissão do tubo polínico que cresce em sentido do óvulo até atingir a micrópila e penetrar o saco embrionário, onde são descarregadas as duas células gerativas ou espermáticas, também chamadas de núcleos espermáticos. Um desses núcleos funde-se com a oosfera para formar o zigoto e assim restaurar o número diploide de cromossomos ($2n=20$), próprio das células somáticas da espécie. Tal processo consiste na fertilização, ou seja, fusão dos gametas masculino e feminino. O outro núcleo espermático une-se aos dois núcleos polares, estabelecendo o endosperma com trinta cromossomos. Dessa forma, completa-se a dupla fertilização, da qual se origina a semente e explica como características do parental masculino podem aparecer tanto no endosperma quanto no embrião (Toledo, 1987; Bueno et al., 2006).

2.4. Melhoramento genético do milho

O melhoramento genético de espécies alógamas, como o milho, permite um aumento na frequência de genes favoráveis em relação às populações originais ou não melhoradas, sendo que esse aumento é alcançado por meio de diversos métodos de seleção. Porém, na prática, não é possível atingir as máximas frequências desses genes e sim um aumento gradativo deles, o qual depende de muitos fatores, tais como variabilidade genética da população original, método de seleção empregado, influência do ambiente, entre outros (Paterniani e Miranda Filho, 1987).

Até o início do século XX, a produção do milho estava restrita a variedades de polinização aberta. Em 1906, Shull e East iniciaram estudos de endogamia e hibridação, mas, devido ao baixo vigor e produção de sementes, esse método não apresentou uma viabilidade satisfatória. Jones obteve os primeiros híbridos duplos em 1918. Posteriormente, diversos estudos passaram a ser conduzidos, possibilitando a produção e a utilização comercial de sementes híbridas. A partir de 1960, devido ao aumento na produção das linhagens, a melhoria da tecnologia de produção do milho viabilizou a utilização de híbridos simples (Hallauer, 2010).

No Brasil, pesquisas de melhoramento iniciaram-se em 1932, por meio de autofecundação de variedades locais, no Instituto Agrônomo de Campinas, no qual, em 1939, foi obtido o primeiro híbrido duplo que produzia 50% a mais em relação às variedades locais. A partir de então, diversos programas de melhoramento foram iniciados. Houve a formação da Agroceres, empresa de iniciativa privada de produção de sementes de milho, e várias outras companhias de sementes passaram a pesquisar e produzir sementes híbridas de milho no país. (Miranda Filho e Viégas, 1987).

Uma das metodologias mais utilizadas no melhoramento de milho é o emprego da superioridade dos genótipos heterozigotos, usufruindo-se do vigor híbrido, oriundo do cruzamento de duas ou mais linhagens homozigotas, as quais são obtidas após seis a oito gerações de autofecundação. A heterose pode ter interesse econômico de várias maneiras. A principal delas consiste na disposição de populações homogêneas que apresentem maior produção e melhor resistência, em comparação às populações anteriormente existentes, por meio de fortes efeitos de dominância e interações entre locos.

Em relação à obtenção de linhagens, que é a etapa mais demorada e onerosa, várias tecnologias têm sido empregadas, como seleção recorrente, retrocruzamento, autofecundações sucessivas e utilização da tecnologia de duplo-haploides (Barbosa, 2009).

2.5. Emprego dos duplo-haploides

Uma planta é denominada haploide quando apresenta somente metade do conteúdo genético encontrado em plantas normais. Dessa forma, essas plantas possuem apenas um conjunto cromossômico e tal condição de haplodia direciona a formação de plantas estéreis. A duplicação de seu número cromossômico, de maneira espontânea ou induzida, recupera a condição diploide e restaura a fertilidade. Plantas que têm o conjunto cromossômico duplicado são totalmente homocigotas, uma vez que cada cromossomo terá sua cópia exata. Para dobrar o número de cromossomos e restabelecer a fertilidade da planta é necessário que o tratamento das plantas haploides seja realizado ainda na fase de plântulas. As plantas duplo-haploides (DH) são, por definição, essas plantas haploides que passaram pelo tratamento e tiveram seu conteúdo genético duplicado ou restabelecido para o normal (Milach, 2007).

Belicuas (2007) relatou que a primeira ocorrência natural de haploides aconteceu em 1922 na espécie *Datura stramonium*, seguida por *Nicotiana tabacum* e *Triticum compactum* em 1924 e 1926, respectivamente. Entre os anos de 1964 e 1966, foram elaborados os primeiros protocolos para a produção de plantas haploides em laboratório por meio de cultura de anteras. Ainda segundo Belicuas (2007), na década de 1970, houve a conversão de haploides estéreis em duplo-haploides. Entre 1974 e 1980, ocorreu o lançamento das primeiras cultivares utilizando DH: Maris haplona, de canola; e Mingo, de cevada, ainda que linhagens DH tenham sido previamente produzidas mediante haploides espontâneos (Pierre et al., 2011).

Nos anos seguintes a 1980, foram divulgados diversos protocolos e inovações tecnológicas para a obtenção de linhagens DH em mais de 200 espécies vegetais (Forster et al., 2007). No entanto, a viabilidade na produção de sementes melhoradas mediante essa tecnologia foi alcançada somente nos últimos vinte anos (Pierre et al., 2011).

Na cultura do milho, a primeira planta haploide foi descrita por Stadler e Randolph em 1929 (Röber et al., 2005). Procurando acelerar a obtenção de linhagens, Chase (1952) foi pioneiro em identificar haploides naturais e duplicar seu número cromossômico, para a obtenção de DH. Até a década de 90, as diferentes técnicas de obtenção de DH eram limitadas devido à baixa eficiência dessa ferramenta para uso em grande escala, em programas convencionais de melhoramento. A partir de então, houve a atenção de pesquisadores em todo o mundo no que diz respeito à tecnologia de obtenção de duplo-haploides (Pierre et al., 2011).

As sementes haploides podem ser obtidas por meio de produção *in vitro*, cruzamentos interespecíficos, uso de linhagens indutoras, entre outras metodologias. Nas décadas de 1960 e 1970, foram lançados os primeiros cultivares comerciais de canola e de cevada, a partir de cultura de anteras. Décadas depois diversas cultivares foram desenvolvidas por essa técnica *in vitro*. Os cruzamentos interespecíficos têm apresentado sucesso entre diversas espécies, como trigo, aveia, batata, morango, entre outras. O exemplo mais comum é o do trigo, cujas etapas consistem em plantio normalmente em casa de vegetação, emasculação das plantas de trigo, polinização artificial com pólen de anteras maduras de milho, aplicação de solução contendo 2,4-D e nitrato de prata, resgate dos embriões e transferência para meio de cultivo. No caso do uso de linhagens indutoras, também conhecido como indução *in vivo*, utiliza-se uma linhagem com deficiência em um dos núcleos polínicos, levando à formação de sementes com endosperma triploide e embrião haploide (Fritsche-Neto et al., 2013).

Em relação à cultura do milho, o mecanismo de capacidade de indução de haploides ainda não foi completamente compreendido. Acredita-se que, em linhagens haploides induzidas, os dois espermatozoides são desenvolvidos em velocidades diferentes (Bylich e Chalyk, 1996). Assim, um dos espermatozoides se desenvolve pronto para a fertilização, mas o outro não, ou seja, a existência de apenas um único espermatozoide normal em um grão de pólen pode ser a razão para a quebra da fertilização dupla e pelo desenvolvimento de grãos com um embrião haploide (Enaleeva et al., 1996).

2.5.1. Obtenção de haploides via indução *in vivo*

Os haploides em milho ocorrem naturalmente a uma taxa extremamente baixa. Chase (1969) verificou aproximadamente uma semente haploide para cada mil sementes formadas. No entanto, algumas técnicas podem ser utilizadas para aumentar essa frequência, como o uso de genótipos indutores, citados anteriormente. Nesse método, as plantas ou sementes são posteriormente tratadas com agentes que duplicam o genoma, como a colchicina, obtendo-se, em apenas uma geração, indivíduos totalmente homocigotos (Barbosa, 2009).

Os haploides obtidos *in vivo* podem ter origem paterna (androgenéticos) ou materna (gimnogenéticos), dependendo do tipo de linhagem indutora e do cruzamento empregado. Para obtenção de haploides gimnogenéticos, o indutor é utilizado como genitor masculino, ou seja, doador de pólen. Nesse caso, ocorre a degeneração do núcleo reprodutivo do grão de pólen e a oosfera não é fecundada, desenvolvendo-se em um “pseudo-embrião”, após a fertilização, resultando em um indivíduo haploide de origem materna. Em contrapartida, quando utilizamos um indutor como genitor feminino ocorre a degeneração da oosfera e o núcleo reprodutivo do grão de pólen se desenvolve originando um haploide androgenético. (Pierre et al., 2011).

Eder e Chalyk (2002), acreditando que a utilização da tecnologia de indução de milho haploide *in vivo* era muito promissora, realizaram um estudo com a intenção de verificar a eficiência na obtenção de haploides de genótipos amplamente utilizados no melhoramento de milho na Europa Central. Foram analisadas duas linhagens indutoras (*MHI* e *M741H*), as quais forneceram pólen para polinização de cinco genótipos maternos utilizados na comparação da eficácia dos indutores. Os autores concluíram que todos os elementos da tecnologia de indução *in vivo* de haploides foram eficazes e que a utilização de plantas haploides maternas tem um grande potencial para a genética e o melhoramento de milho.

O indutor sintético *KHI* também é um exemplo dessa tecnologia, porém sua presença foi pouco observada como foco de pesquisa nas literaturas abordadas. Herpich (2012) trabalhou com os indutores *Stock6* e *KHI* e constatou que o sintético *KHI* teve melhor desempenho na obtenção de haploides gimnogenéticos.

2.5.2. Linhagens indutoras de haploidia

O primeiro genótipo com capacidade de indução em milho foi estudado por Coe Junior (1959) que desenvolveu uma linhagem cuja taxa de indução média foi de 3,2%. Essa linhagem, denominada *Stock6*, é classificada como indutor gimnogenético. Na década seguinte, Kermicle (1969) desenvolveu a linhagem indutora *Wisconsin 23 (W23)* que gera haploides androgenéticos a uma taxa entre 1 e 3%. A partir desses materiais adaptados a clima temperado várias outras linhagens ou populações indutoras foram originadas com maiores taxas de indução de haploidia.

Lashermes e Beckert (1988) obtiveram a linhagem *WS14* por meio do cruzamento entre *Stock6* e *W23*, cuja taxa de indução encontrada variou de 3 a 5%. As linhagens indutoras *ZMS* e *KMS*, também derivadas da *Stock6*, quando cruzadas deram origem à linhagem *MHI* que apresenta indução média em torno de 6,5% (Chalyk, 1999). Röber et al. (2005), desenvolveram a linhagem indutora *RWS*, que induz em média 8 a 10% de haploides. A *RWS* foi obtida pelo cruzamento entre a *WS14* e *KEMS*, que é uma linhagem sintética russa. A partir dessa mesma linhagem russa (*KEMS*) também foi desenvolvido o indutor *UH400* pela Universidade de Hohenheim (citado por Chang e Coe, 2009). Barret et al. (2008) obtiveram a linhagem *PK6* e ainda em 2008, Zhang et al. desenvolveram a linhagem *HZ11* que é derivada da *Stock6*. Li et al. (2009) obtiveram o indutor *CAUHOI* pelo cruzamento entre *Stock6* e uma população chinesa que apresenta alto teor de óleo. Em 2010, Rotarencu et al. obtiveram indutores denominados *PHI-1*, *PHI-2*, *PHI-3* e *PHI-4* com boa expressão dos genes marcadores, melhores características agronômicas, boa produção de pólen e taxa de indução média variando entre 12 e 14,5%. Essa variação de indutores *PHI* foi alcançada por meio de cruzamentos entre as linhagens *MHI* e *Stock6*.

Diante de todos esses materiais indutores temperados, diferenças significativas entre indutores e fonte de germoplasma ao analisarem taxas de indução de haploidia em ambientes tropicais já foram encontradas por Prigge et al. (2011). As taxas verificadas nesse respectivo trabalho foram semelhantes àquelas relatadas para induções em condições temperadas. Isso indica que os indutores temperados podem ser utilizados em programas de melhoramento de milho para obtenção de linhagens DH. No entanto, ainda há necessidade de desenvolver

indutores bem adaptados ao clima tropical com melhores performances agronômicas e maiores taxas de indução, como vem sendo realizado pelo CIMMYT (International Maize and Wheat Improvement Center) em parceria com a Universidade de Hohenheim, na Alemanha, desde 2007 (Prasanna et al., 2012).

2.6. Identificação dos haploides

A identificação prévia de sementes haplóides mais comum é realizada por meio do marcador morfológico *R-navajo*, baseado na pigmentação por antocianina, codificado pelo gene *R1-nj*. Quando os genes dominantes de pigmentação *A1* ou *A2* e *C2* estão presentes, o *R1-nj* confere profunda pigmentação do endosperma na região da coroa do grão, sendo que essa pigmentação varia em extensão e intensidade, dependendo do *background* genético do genótipo doador (Geiger e Gordillo, 2009). Nanda e Chase (1966) foram os pioneiros no uso desse marcador em ensaios de indução de haploides. Eles observaram que nas sementes haploides, a pigmentação estava presente somente no endosperma, ficando com o embrião branco (sem coloração), pois o esperado é que não ocorra fusão do material genético do indutor com o do genótipo a ser induzido. Isso acontece exatamente porque o marcador *R-navajo* é dominante, expressando-se somente no endosperma, o qual é formado por um tecido triploide, sendo um conjunto haploide do parental masculino e dois do parental feminino, e o embrião um tecido diploide. Logo, o marcador não se expressará no embrião haploide, uma vez que esse embrião não conterá o genoma da linhagem indutora que contém o alelo marcador (Couto, 2010).

Vale ressaltar que a eficiência do gene *R1-nj* como marcador morfológico apresenta algumas limitações, como a dificuldade de caracterização de alguns genótipos haploides, provocada pela presença de genes dominantes existentes no milho, *C1-l*, *C2-ldf* e *In1-D*, que inibem a síntese de antocianina (Coe Junior, 1994). Para que um marcador de antocianina funcione em milho, a ação de vários alelos precisa ser considerada. A expressão de *C1*, por exemplo, 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 e embrião (Hattori et al., 1992).

Rotarenco et al. (2007) e Melchinger et al. (2013) utilizaram o teor de óleo presente nas sementes para separar haploides e diploides e observaram que sementes com embrião haploide têm uma concentração de óleo significativamente menor do que aquelas com embrião diploide. Os autores explicam que isso ocorre devido ao tamanho reduzido de embriões haploides, quando comparado com embriões diploides e acreditam que indutores com uma concentração de óleo acima da média deve ser mais adequado para essa abordagem.

Outros tipos de marcadores também podem ser utilizados para determinar a frequência de haploides, como os marcadores fenotípicos *lg1*, *lg2* e *gl1* que correspondem aos genes da ausência de lígula e glossy, respectivamente. Lashermes e Beckert (1988) trabalharam com esses marcadores. Eles compararam as plantas haploides identificadas pelo marcador com o fenótipo dos híbridos, avaliando a natureza haploide das plântulas por meio da morfologia e da contagem do número de cromossomos de cada planta, utilizando a ponta da raiz. Nesse trabalho foi obtida uma frequência de 0,4% a 2,4% de haploides maternos quando a linhagem *Stock6* foi utilizada como polinizadora.

Existem ainda diversos marcadores moleculares desenvolvidos para o milho, os quais são amplamente utilizados nessa cultura. Muitos estudos estão sendo realizados com marcadores microssatélites na identificação de indivíduos haploides/duplo-haploides (Aleckevetch, 2010; Battistelli, 2012; Herpich, 2012; Couto, 2013). Na avaliação fenotípica, observam-se algumas falhas na seleção de sementes ou plantas haploides. Novas técnicas ainda têm sido sugeridas com a finalidade de aumentar a eficiência na identificação dos indivíduos haploides, como o comprimento das células-guarda dos estômatos e o conteúdo de DNA nuclear. (Kim et al., 2010; Choe et al., 2012).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local

A parte de campo desta pesquisa foi desenvolvida na Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI), patrimônio da Universidade Estadual de Maringá (UEM), localizado em Iguatemi, distrito de Maringá-PR, com coordenadas geográficas 23° 25' Sul, 51° 57' Oeste e altitude de 550 metros. O solo é classificado como latossolo vermelho distrófico (Embrapa, 2006) e o clima como mesotérmico úmido, com verão quente e chuvas de verão e de outono (Godoy et al., 1976). As demais atividades foram realizadas no Departamento de Agronomia da UEM, em Maringá.

3.2. Material genético

Quatro híbridos F₁'s de diferentes origens foram induzidos à haploidia (Quadro 1), sendo dois híbridos de milho comum (P2530 e P3989), um híbrido de milho pipoca (IAC125) e um híbrido de milho doce (RB6324).

A variedade de polinização aberta (*KHI*), indutora de haploidia, foi utilizada no cruzamento para avaliação da eficiência de indução de embriões haploides em milho. Essa variedade possui o gene *R1-nj*, responsável pela produção de antocianina nos grão de milhos, o qual tem sido utilizado para selecionar sementes haploides.

Quadro 1 - Identificação dos híbridos utilizados para indução de haploidia

Híbridos	Textura de grão	Ciclo	Origem
P2530	Semiduro	Superprecoce	Pioneer
P3989	Semiduro	Precoce	Pioneer
IAC125	Duro	Superprecoce	IAC
RB6324	Superdoce	Precoce	Syngenta

3.3. Indução de haploides *in vivo*

Para a indução de haploidia, cultivou-se um campo de cruzamento de milho, na safra 2013/2014, contendo a variedade indutora (*KHI*) como polinizadora e os

híbridos F_1 's como fêmeas. O lote foi composto por quatro fileiras de 10m de cada híbrido F_1 e 30 fileiras de 10m da variedade indutora. Os híbridos F_1 's foram semeados todos em uma única época e as fileiras do indutor foram semeadas em cinco épocas diferentes, seis fileiras por semana, sendo a primeira semeadura na mesma época da semeadura dos híbridos F_1 's. O indutor não foi semeado em fileiras intercaladas com os híbridos. Sua distribuição foi realizada na sequência, após as 16 fileiras de híbridos F_1 's. Na semeadura, foram distribuídas duas sementes por cova em linhas espaçadas de 80cm e o espaçamento entre as plantas foi de 20cm. Após 15 dias da emergência das plantas, realizou-se o desbaste, deixando cinco plantas por metro linear. No momento da floração, as espigas dos híbridos foram protegidas com sacos plásticos para evitar autopolinização e permitir que a fecundação dessas, pela variedade polinizadora, fosse realizada de forma controlada, manualmente. Para realizar a polinização manual, coletou-se o pólen da variedade indutora em "*bulk*" e o mesmo foi depositado nos estigmas receptivos dos híbridos F_1 's. Os demais tratos culturais foram realizados de acordo com as recomendações para a cultura do milho.

3.4. Identificação das sementes potencialmente haploides mediante o marcador morfológico *R-navajo* e características fenotípicas

Após a colheita das espigas obtidas dos cruzamentos realizados, as sementes dos quatro híbridos foram debulhadas individualmente e secas a 14% de umidade. Posteriormente, contou-se o número de sementes por espiga e as mesmas foram separadas visualmente pela coloração do endosperma e do embrião para determinação da taxa de indução dos possíveis haploides. Assim, sementes contendo embrião haploide foram identificadas pela coloração roxa somente no endosperma, devido à presença de antocianina, e pela coloração branca do embrião (Nanda e Chase, 1966). Sementes com endosperma e embrião roxos foram consideradas diploides e sementes sem a coloração roxa no endosperma foram classificadas como contaminantes.

Algumas características fenotípicas da planta em si também foram utilizadas para identificar plantas provenientes de embriões haploides dos híbridos P2530, IAC125 e P3989, buscando verificar a eficiência do marcador *R-navajo*, uma vez que plantas provenientes de embriões haploides apresentam características fenotípicas que as diferenciam das descendentes de embriões diploides (Lashermes e Beckert,

1988). Foi observada a presença/ausência das inflorescências femininas e masculinas, estilo-estigma e grãos de pólen, 75 a 90 dias após a semeadura. Para essa análise, as sementes separadas anteriormente como possíveis haploides foram semeadas em vasos de 14L em casa de vegetação, utilizando-se apenas sementes provenientes de quatro espigas de cada genótipo, de modo que cada um deles totalizasse 100 sementes possivelmente haploides. Foram colocadas, escalonadamente, duas sementes por vaso e os tratos culturais adotados foram os mesmos recomendados para a cultura do milho.

3.5. Teste de qui-quadrado

O teste de qui-quadrado (χ^2) é um teste estatístico não paramétrico proposto por Karl Pearson, cuja finalidade se baseia na comparação de possíveis divergências entre as frequências observadas e esperadas de um determinado evento. A fórmula para o seu cálculo é dada por:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(o_i - e_i)^2}{e_i}$$

Em que:

o_i : frequência observada

e_i : frequência esperada

n: número de classes

O intuito de realizar esse teste foi analisar se as taxas de possíveis haploides dos materiais induzidos *in vivo* diferiram estatisticamente da taxa de indução natural, ou seja, verificar a existência de diferenças significativas entre o número de haploides observados na indução *in vivo* e o número de haploides esperados naturalmente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Obtenção de haploides

A variedade indutora *KHI* apresentou-se precoce em comparação com os híbridos utilizados. Seu florescimento coincidiu com os dos híbridos quando estes foram semeados de 14 a 21 dias antes do indutor, ou seja, as plantas indutoras semeadas na segunda e terceira época foram as mais utilizadas como doadores de pólen. Resultado semelhante foi observado por Rabel (2008), empregando a linhagem indutora *W23*. Nos trabalhos de Rabel (2008) a maior coincidência de florescimento ocorreu quando a linhagem indutora foi semeada 16 dias após os demais materiais. Essa precocidade pode ser justificada pela origem temperada apresentada pelos materiais indutores de haploidia.

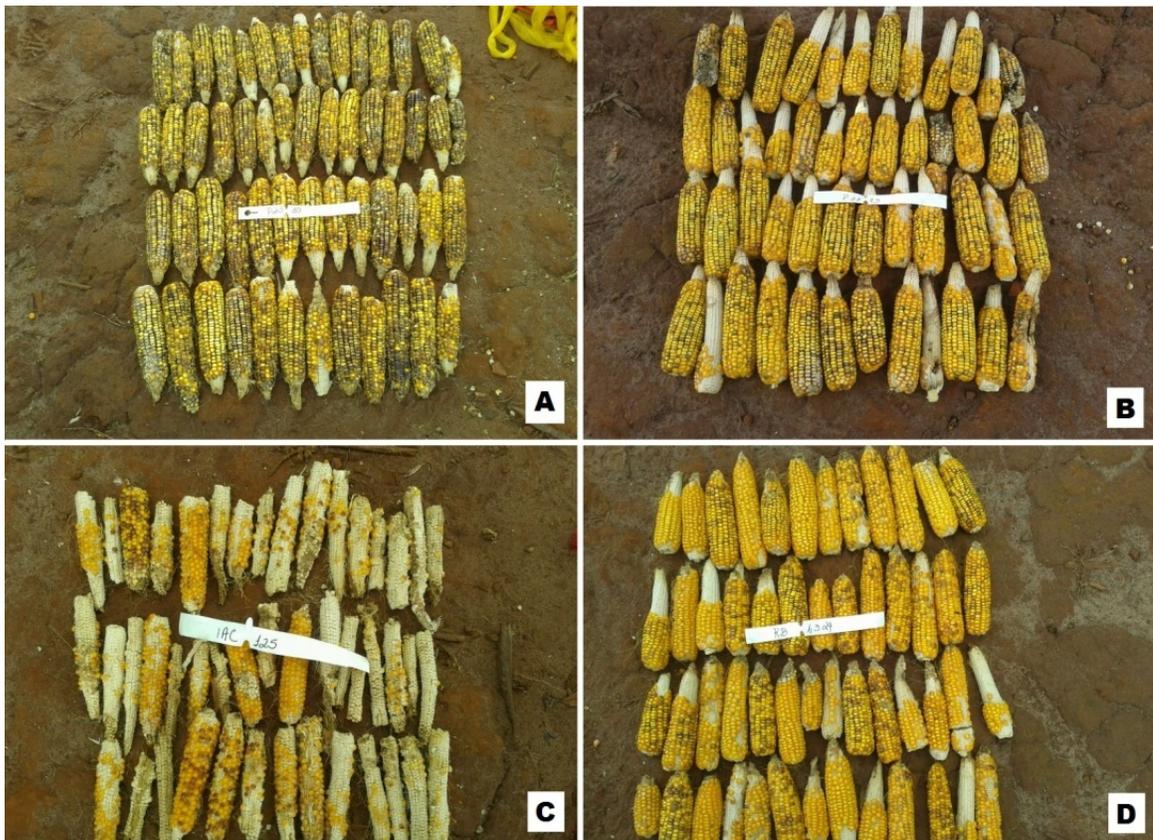


Figura 1 - Expressão de antocianina nas espigas induzidas. (A) P2530; (B) P3989; (C) IAC125 e (D) RB6324.

Utilizando-se diferentes genótipos de híbridos no cruzamento com o indutor de haploidia *KHI* foram obtidas cerca de 50 espigas de cada genótipo com expressão de antocianina em algumas sementes, devido à presença do gene *R1-nj* (Figura 1). As sementes que não foram pigmentadas podem ser provenientes de contaminação com pólen externo ou ser resultante da influência do *background* genético do parental feminino (Rabel, 2008).

4.2. Identificação dos possíveis haploides pelo marcador *R-navajo*

As sementes que apresentaram pigmentação arroxeadada no endosperma e o embrião sem coloração foram selecionadas como possíveis haploides e aquelas com coloração roxa tanto no endosperma quanto no embrião foram identificadas como diploides. As demais foram consideradas como contaminação (Figura 2).



Figura 2 - Separação dos possíveis haploides.

A separação dos possíveis haploides foi feita por meio de uma seleção visual, a qual pode apresentar subjetividade e ocasionar a contagem de falsos-positivos, pela seleção de sementes haploides que, posteriormente, quando cultivadas, podem ser classificadas como diploides. Dessa forma, torna-se necessário a utilização de outros métodos para a identificação de haploides, visando a quantificar os falsos-positivos, determinados pelo marcador *R-navajo*, pois a seleção visual é vulnerável a erros que podem ocorrer devido à inibição da expressão de antocianina em alguns conjuntos genômicos, conforme mencionado por Herpich (2012). Contudo, a utilização deste marcador morfológico é de extrema importância porque auxilia na pré-seleção de indivíduos haploides, excluindo um grande número de sementes diploides (Figura 3).



Figura 3 - Sementes diploides excluídas pelo marcador *R-navajo*.

4.3. Taxa de possíveis haploides

A partir da separação das sementes por meio da expressão do gene *R1-nj*, foi determinada a taxa de possíveis haploides para os quatro híbridos induzidos (Quadro 2).

Quadro - 2 Taxa de possíveis haploides dos quatro híbridos induzidos a haploidia

Híbrido	Espiga	Possíveis Haploides (PH)	Diploides	Total de sementes	Taxa de PH (%)
P2530	1	32	223	255	12,55
	2	45	289	334	13,47
	3	21	110	131	16,03
	4	25	104	129	19,38
	5	67	295	362	18,51
	6	74	176	250	29,60
	7	52	192	244	21,31
	8	77	406	483	15,94
	9	54	250	304	17,76
	10	112	234	346	32,37
	11	80	275	355	22,54
	12	65	185	250	26,00
	13	34	306	340	10,00
	14	66	194	260	25,38
	15	32	110	142	22,54
	16	30	308	338	8,88

Quadro 2, cont.

	17	9	42	51	17,65
	18	65	291	356	18,26
	19	73	246	319	22,88
	20	30	89	119	25,21
	21	37	265	302	12,25
	22	96	278	374	25,67
	23	28	142	170	16,47
	24	81	349	430	18,84
	25	40	191	231	17,32
	26	86	217	303	28,38
	27	33	174	207	15,94
	28	67	174	241	27,80
	29	53	245	298	17,79
	30	20	60	80	25,00
	31	64	301	365	17,53
	32	46	315	361	12,74
	33	69	257	326	21,17
	34	18	274	292	6,16
P2530	35	49	220	269	18,22
	36	67	224	291	23,02
	37	56	319	375	14,93
	38	49	105	154	31,82
	39	52	314	366	14,21
	40	78	281	359	21,73
	41	53	265	318	16,67
	42	98	233	331	29,61
	43	85	249	334	25,45
	44	32	346	378	8,47
	45	71	261	332	21,39
	46	38	302	340	11,18
	47	61	261	322	18,94
	48	102	254	356	28,65
	49	38	364	402	9,45
	50	40	224	264	15,15
	51	38	393	431	8,82
	52	26	206	232	11,21
	53	20	96	116	17,24
	54	92	324	416	22,12
	Total	2926	12808	15734	18,60
	Média	54,19	237,19	291,37	19,03

Quadro 2, cont.

	1	8	68	76	10,53
	2	38	339	377	10,08
	3	84	420	504	16,67
	4	33	392	425	7,76
	5	76	345	421	18,05
	6	65	395	460	14,13
	7	28	223	251	11,16
	8	45	335	380	11,84
	9	47	294	341	13,78
	10	14	150	164	8,54
	11	64	439	503	12,72
	12	31	220	251	12,35
	13	14	176	190	7,37
	14	22	326	348	6,32
	15	43	384	427	10,07
	16	15	149	164	9,15
	17	9	107	116	7,76
	18	57	255	312	18,27
	19	60	333	393	15,27
	20	39	430	469	8,32
	21	26	320	346	7,51
	22	21	314	335	6,27
	23	2	22	24	8,33
P2530	24	52	315	367	14,17
	25	18	197	215	8,37
	26	61	401	462	13,20
	27	27	198	225	12,00
	28	25	202	227	11,01
	29	40	311	351	11,40
	30	27	359	386	6,99
	31	75	376	451	16,63
	32	22	194	216	10,19
	33	7	92	99	7,07
	34	38	401	439	8,66
	35	12	146	158	7,59
	36	48	434	482	9,96
	37	19	251	270	7,04
	38	57	410	467	12,21
	39	14	141	155	9,03
	40	56	249	305	18,36
	41	32	264	296	10,81
	42	13	100	113	11,50
	43	28	233	261	10,73
	44	55	323	378	14,55
	45	14	164	178	7,87
	46	22	135	157	14,01
	47	15	293	308	4,87
	48	32	103	135	23,70
	Total	1650	12728	14378	11,48
	Média	34,38	265,17	299,54	11,13

Quadro 2, cont.

	1	12	42	54	22,22
	2	14	45	59	23,73
	3	7	9	16	43,75
	4	13	60	73	17,81
	5	19	92	111	17,12
	6	24	134	158	15,19
	7	7	21	28	25,00
	8	0	3	3	0,00
	9	10	70	80	12,50
	10	38	199	237	16,03
	11	3	16	19	15,79
	12	26	91	117	22,22
	13	0	24	24	0,00
	14	2	19	21	9,52
	15	8	24	32	25,00
	16	3	21	24	12,50
	17	5	21	26	19,23
	18	0	6	6	0,00
	19	13	231	244	5,33
IAC125	20	19	56	75	25,33
	21	2	12	14	14,29
	22	14	41	55	25,45
	23	3	48	51	5,88
	24	0	9	9	0,00
	25	3	24	27	11,11
	26	5	38	43	11,63
	27	2	1	3	66,67
	28	2	17	19	10,53
	29	1	6	7	14,29
	30	4	25	29	13,79
	31	14	242	256	5,47
	32	7	3	10	70,00
	33	4	63	67	5,97
	34	3	39	42	7,14
	35	19	175	194	9,79
	36	4	50	54	7,41
	37	10	26	36	27,78
	38	23	171	194	11,86
	39	14	204	218	6,42
	40	0	14	14	0,00
	41	0	5	5	0,00
	Total	356	2398	2754	12,96
	Média	8,68	58,49	67,17	15,95

Quadro 2, cont.

	1	16	327	343	4,66
	2	44	318	362	12,15
	3	48	380	428	11,21
	4	0	163	163	0,00
	5	28	467	495	5,66
	6	24	357	381	6,30
	7	0	389	389	0,00
	8	0	376	376	0,00
	9	27	335	362	7,46
	10	15	125	140	10,71
	11	18	227	245	7,35
	12	35	304	339	10,32
	13	0	399	399	0,00
	14	24	237	261	9,20
	15	0	185	185	0,00
	16	0	125	125	0,00
	17	0	297	297	0,00
	18	22	302	324	6,79
	19	16	237	253	6,32
RB6324	20	19	228	247	7,69
	21	0	277	277	0,00
	22	21	206	227	9,25
	23	25	431	456	5,48
	24	17	144	161	10,56
	25	0	91	91	0,00
	26	0	338	338	0,00
	27	49	233	282	17,38
	28	10	57	67	14,93
	29	0	130	130	0,00
	30	62	255	317	19,56
	31	0	234	234	0,00
	32	35	270	305	11,48
	33	26	273	299	8,70
	34	24	177	201	11,94
	35	16	222	238	6,72
	36	0	88	88	0,00
	37	27	379	406	6,65
	38	0	59	59	0,00
	39	0	294	294	0,00
	40	22	336	358	6,15
	41	0	262	262	0,00
	42	21	289	310	6,77

Quadro 2, cont.

	43	0	162	162	0,00
	44	0	216	216	0,00
	45	34	382	416	8,17
	46	10	100	110	9,09
	47	0	171	171	0,00
RB6324	48	0	51	51	0,00
	49	41	322	363	11,29
	50	13	182	195	6,67
	51	40	208	248	16,13
	52	0	331	331	0,00
	Total	829	12948	13777	6,02
	Média	15,94	249	264,94	5,63

A taxa de possíveis haploides em função do *R-navajo* variou de 6,16 a 32,37%, para o híbrido de milho comum P2530; de 4,87 a 23,70%, para o P3989 também de milho comum; de 0 a 70,00%, para o milho pipoca IAC125; e de 0 a 19,56%, para o milho doce RB6324, conforme pode ser visualizado no Quadro 2.

Os genótipos empregados nessa pesquisa apresentam texturas de grãos distintas, o que, provavelmente, seja uma das causas que explicam as diferenças entre as taxas de indução obtidas. Eder e Chalyk (2002), Röber et al. (2005), Barbosa (2009) e Prigge et al. (2012) também encontraram diferenças ao avaliar diversos germoplasmas aliados a diferentes texturas de grãos. Essas diferenças podem estar relacionadas à presença de genes dominantes existentes no milho, *C1-I*, *C2-Idf* e *In1-D*, os quais inibem a síntese de antocianina no endosperma. Coe Júnior (1994) ressaltou em seu trabalho que esses genes dificultam a detecção de haploides em genótipos de grãos duros (*flint*), pois interferem na expressão do marcador *R-navajo* utilizado para seleção de haploides, ou seja, na presença de pelo menos um desses genes no genótipo materno, a identificação de haploides torna-se complicada devido à falta de pigmentação no endosperma.

Os híbridos de milho comum, P2530 e P3989, ambos com textura de grãos semiduros, apresentaram taxa média de possíveis haploides de 19,03% e 11,13%, respectivamente. As sementes obtidas do cruzamento desses materiais com a variedade indutora apresentaram aspecto mais semelhante ao milho dentado e foram as mais fáceis de separar pela coloração do endosperma e embrião devido ao seu formato achatado, o que proporciona maior área de exposição do embrião, fazendo com que este seja visualizado com mais clareza. Por outro lado, os grãos

do milho pipoca que possuem textura *flint* (duro) foram os mais difíceis de separar, pois as sementes obtidas estavam muito pequenas e seu formato arredondado dificultou a visualização da expressão do *R1-nj* no embrião. No entanto, o milho pipoca teve uma taxa média de possíveis haploides de 15,95%, ou seja, maior que o valor obtido para um dos híbridos de milho comum com aspecto dentado após o cruzamento, enquanto o milho com textura superdoce foi o que dispôs da menor taxa média de possíveis haploides (5,63%). Contudo, tais valores são baseados somente na coloração dos grãos e muitas das espigas do milho doce não apresentaram pigmentação roxa em sequer um grão (Figura 4).



Figura 4 - Espigas de milho doce induzido a haploidia com destaque para aquelas que não tiveram seus grãos pigmentados por antocianina.

No trabalho de Rotarencu et al. (2009), também foram observadas sementes sem expressão de coloração arroxeadada no endosperma. Provavelmente, este fato tenha ocorrido ou porque o indutor utilizado não era homocigoto para o gene *R1*, ou porque o outro parental era homocigoto para o alelo dominante *C1-I*, inibidor de antocianina. O mesmo já foi dito por Coe Junior (1994), quando menciona que as

dificuldades para identificar haploides de genótipos *flint* estão relacionadas aos genes dominantes inibidores de antocianina. Belicuas et al. (2007) também afirmam que a identificação de haploides em sementes pode ser muito complicada nos casos em que os doadores são homocigotos para determinados genes. Nesse caso, Geiger e Gordillo (2009) sugerem a identificação dos possíveis haploides em conjunto com a fase inicial de plântula se o indutor for homocigoto para os genes *B1* e *PI1*, os quais condicionam pigmentação do coleóptilo e da raiz de plântulas diploides.

O milho comum P2530 foi o que exibiu a maior taxa média de possíveis haploides (19,03%). Apesar de o milho pipoca ter apresentado a maior variação entre os quatro híbridos e taxa de possíveis haploides maior que um dos híbridos comuns (P3989), suas espigas não ficaram tão cheias quanto às dos demais híbridos (Figura 5). Isso pode ter influenciado algumas espigas a apresentarem elevadas taxas de possíveis haploides. Além disso, a dificuldade de visualização do embrião na etapa de separação das sementes pode ter proporcionado a seleção de muitos falsos-positivos, favorecendo dessa forma o aumento da taxa de possíveis haploides desse material.



Figura 5 - Híbrido IAC125 induzido à haploidia com pouca formação de grãos em diversas espigas.

Röber et al. (2005) citam que, geralmente, a expressão de genes que remetem à pigmentação por antocianina é melhor em genótipos de milho dentado, similar ao que foi encontrado nesse trabalho. A estimativa da maior taxa de indução desses autores foi em média 8,1%, utilizando genótipos testadores com marcadores morfológicos recessivos. Em contrapartida, Eder e Chalyk (2002), avaliando a expressão do gene *R1-nj* no embrião de diferentes genótipos, encontraram melhores resultados em genótipos de grãos *flint*. Eles obtiveram uma média de pontuação de pigmentação em milho *flint* de 4,3 e em milho dentado de 3,7, indicando boa pigmentação e pigmentação ruim, respectivamente. A taxa de indução de haploidia alcançada por esses autores variou entre 2,7% a 8,0%, sendo uma média de indução para as populações dentadas de 5,3%, contra 3,6% das populações *flint* e 4,4% das populações semiduras.

4.4. Seleção de haploides pelo fenótipo das plantas

Para confirmar a ploidia das sementes identificadas como possíveis haploides pelo marcador *R-navajo* e assim eliminar falsos-positivos, foi realizada uma análise fenotípica das plantas cultivadas em casa de vegetação, após dois meses e meio a três meses da data de semeadura. Inicialmente, as plantas foram avaliadas quanto ao seu vigor. De 100 sementes induzidas do híbrido P2530 e selecionadas pelo marcador *R-navajo*, 88 germinaram e 14 plantas foram selecionadas com menor vigor. O híbrido de milho pipoca IAC 125 teve 97 sementes germinadas de um total de 101 induzidas e somente duas plantas apresentaram menor vigor, enquanto o híbrido P3989, de um total de 100 sementes induzidas, teve 91 sementes germinadas e 13 plantas com menor vigor. As plantas do híbrido de milho doce RB6324 não estavam no período ideal de avaliação.

Além de verificar, visualmente, o porte e a espessura das plantas (Figura 6), outras características também foram notadas, como presença/ausência das inflorescências, estilo-estigmas e produção de pólen, resultantes da possível condição haploide destas plantas, conforme descrito no Quadro 3.

Metade das plantas selecionadas como haploides fenotipicamente não desenvolveram a inflorescência feminina e apenas cinco das plantas que tiveram a espiga formada apresentaram estilo-estigmas (cabelo). Em relação à inflorescência

masculina, um pouco mais da metade das plantas a desenvolveu, porém somente duas delas produziram pólen (Quadro 3). observam-se ainda a impossibilidade de extração de linhagem dessas plantas, um vez que não houve presença de estilo-estigma e grãos de pólen na mesma planta. Essas observações indicam que houve um elevado índice de esterilidade dessas plantas, o que é comum em plantas haploides.

Quadro 3 - Características fenotípicas analisadas nas plantas selecionadas como possíveis haploides, por meio do seu vigor

Híbrido	Espiga	Planta	Inflorescência♀	Estilo- Estigma	Inflorescência♂	Pólen	
P2530		2	-	-	+	-	
		4	+	+	+	-	
		10	-	-	+	+	
		11	-	-	+	-	
	52	13	+	-	+	-	
		14	+	-	+	-	
		20	-	-	+	-	
		21	-	-	+	-	
		22	+	+	+	-	
		23	+	+	+	-	
		23	47	+	-	+	+
		4	57	+	-	-	-
			66	-	-	-	-
		68	-	-	-	-	
IAC125	12	167	+	+	+	-	
	19	187	+	-	+	-	
		214	-	-	+	-	
		218	+	-	-	-	
	2	220	-	-	-	-	
		224	+	-	-	-	
	47	235	-	-	-	-	
		246	-	-	-	-	
P3989		249	-	-	-	-	
		254	+	-	+	-	
	28	255	+	-	-	-	
		258	-	-	-	-	
		260	+	+	+	-	
		261	+	-	+	-	
		263	-	-	-	-	

(+): presença (-): ausência.

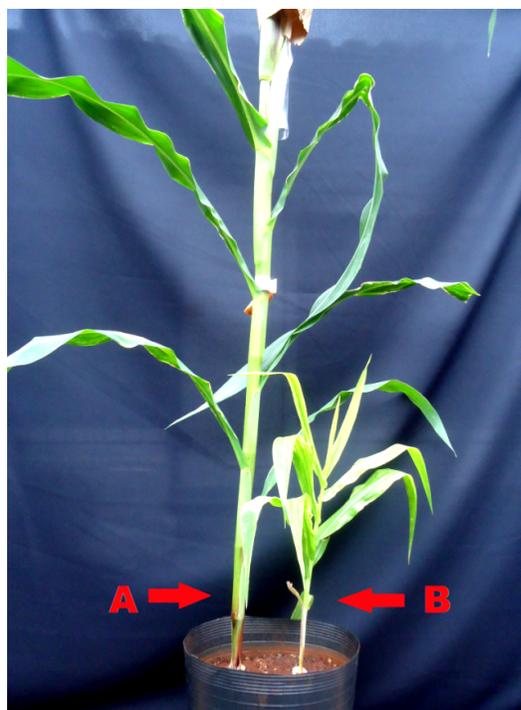


Figura 6 - Diferença entre o vigor de uma planta diploide (A) e outra haploide (B), resultantes do cruzamento do híbrido P2530 com o indutor *KHI*.

Dessa forma, nota-se que a seleção de haploides por meio do fenótipo das plantas reduziu consideravelmente a quantidade de possíveis haploides selecionados, confirmando que o marcador morfológico *R-navajo* é passível de erros, o que, conseqüentemente, resulta em uma superestimação na taxa de possíveis haploides, a qual pode ser explicada, segundo Couto et al. (2010), pelo fato da coloração do pericarpo com antocianina ser um caráter de penetrância incompleta e expressividade variável (Figura 7).



Figura 7 - Sementes com variados níveis de coloração por antocianina, devido à expressão do gene *R1-nj*.

Com isso, verifica-se que há realmente a necessidade de outros métodos para eliminar os falsos-positivos ou até mesmo um aperfeiçoamento na metodologia de seleção pelo gene *R1-nj*, de modo a aprimorar sua eficiência, conforme mencionado por Herpich (2012).

4.5. Teste de qui-quadrado

O teste de qui-quadrado (χ^2) foi aplicado por espiga para obter o valor calculado de cada uma e assim compará-lo com o valor tabelado (Quadro 4). A hipótese de nulidade testada certifica que as taxas de possíveis haploides obtidas pelo cruzamento dos híbridos com a variedade indutora não diferem da taxa de indução de haploidia natural de 0,1%. A hipótese alternativa assegura que as taxas de possíveis haploides obtidas pelo cruzamento dos híbridos com a variedade indutora diferem da taxa de indução natural. O teste foi realizado após a seleção dos possíveis haploides pelo fenótipo das plantas. No entanto, até o momento, foi possível observar as características fenotípicas somente dos híbridos P2530, IAC125 e P3989.

Quadro 4 - Resultado do teste de qui-quadrado (χ^2) para a taxa de possíveis haploides obtidos *in vivo* e a taxa de haploides esperados pela indução natural

Híbrido	Espiga	Total de sementes	Possíveis haploides pelo (<i>R-navajo</i>)	Possíveis haploides germinados	Possíveis haploides pelo fenótipo	T.I. real (%)	Haploides esperados (0,1%)	χ^2 calc
P2530	3	131	21	17	0	0,00	0,13	0,13
	4	129	25	23	3	2,36	0,13	63,90*
	23	170	28	23	1	0,61	0,17	4,05*
	52	232	26	25	10	4,33	0,23	411,27*
IAC125	6	158	24	24	0	0,00	0,16	0,16
	10	237	38	35	0	0,00	0,24	0,24
	12	117	26	25	1	0,86	0,12	6,66*
	19	244	13	13	1	0,41	0,24	2,34
P3989	2	377	38	37	4	1,06	0,38	34,82*
	27	225	27	22	8	3,64	0,23	268,67*
	42	113	13	12	0	0,00	0,11	0,11
	46	157	22	20	1	0,65	0,16	4,53*

T.I.: taxa de indução calc: calculado

*: significativo a 5% de probabilidade.

O valor de χ^2 tabelado utilizado para um nível de significância de 5% foi de 3,841, sendo o grau de liberdade determinado pelo número de classes (haploide e diploide) menos um.

Na maioria dos casos em que houve haploides selecionados por meio do fenótipo das plantas, verificou-se que os valores de χ^2 calculados foram maiores que o tabelado, rejeitando-se a hipótese de nulidade. Portanto, pode-se dizer que houve diferença estatística a 5% de probabilidade, pelo teste de qui-quadrado, entre as taxas de possíveis haploides obtidas *in vivo* e a taxa de indução natural, independente do genótipo utilizado como fêmea. Dessa forma, nota-se que houve efeito da variedade indutora utilizada, pois, apesar de ser de clima temperado, esse material foi responsável por elevar a taxa de possíveis haploides acima da indução natural de 0,1%, indicando ser um bom material indutor, porém mais estudos devem ser realizados, comparando-o com outros indutores, por exemplo.

Sarkar e Coe (1966) obtiveram respostas semelhantes. Utilizando dois indutores, *Stock6* e *Stock6/3* (um híbrido entre os indutores *Stock6* e *Stock 3*). Os autores observaram a existência do efeito dos indutores na obtenção de haploides, sendo descartado o efeito aleatório por meio do teste de qui-quadrado.

Milani (2013), após a contagem cromossômica dos possíveis haploides identificados pelo *R-navajo*, verificou uma redução na taxa de indução de haploidia e, por meio do teste de qui-quadrado, também observou que ainda assim o efeito predominante foi do material indutor.

Com exceção da espiga 19 do híbrido de milho pipoca IAC125, observou-se que a taxa de possíveis haploides, que era acima de 10% quando determinada por meio da coloração do endosperma e do embrião (Quadro 2), diminuiu para 0 a 4,33% após a avaliação do fenótipo dessas plantas (Quadro 4).

Resultados similares foram obtidos por Rabel (2008) e Alekcevetch (2010), após análise molecular para comprovar o caráter haploide das sementes selecionadas pelo *R-navajo*. Rabel (2008) observou que a taxa de indução de possíveis haploides variou de 0 a 82% e diminuiu para 0,4 a 0,6% de haploides androgenéticos verdadeiros. Alekcevetch (2010), ao testar os indutores *Stock6* e *W23*, obteve 0,012% e 0,336% de plantas haploides, respectivamente.

Nenhuma planta DH foi gerada, pois serão testadas novas metodologias de identificação de haploides antes da técnica de duplicação cromossômica.

5. CONCLUSÕES

A utilização da variedade indutora de haploidia *KHI* foi admissível para obtenção de haploides gimnogenéticos em clima tropical, quando comparada com a indução natural.

A identificação de sementes haploides com base somente na coloração dos grãos por antocianina, atribuída pelo gene *R1-nj*, não foi totalmente eficiente para os genótipos utilizados como fêmeas, em relação à confirmação dos possíveis haploides determinada pelo fenótipo das plantas em casa de vegetação.

A taxa de possíveis haploides foi variável em função da textura do grão, sendo as sementes com endosperma dentado as mais fáceis de separar via *R-navajo*, por apresentarem melhor pigmentação do endosperma.

6. REFERÊNCIAS

ALEKCEVETCH, J.C. **Avaliação de indutores e métodos de duplicação cromossômica na obtenção de plantas duplo-haploides de milho (*Zea mays* L).** Cascavel: UNIPAR, 2010. 29p. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas).

ANDERSON, E. **The sacred plume. A description of the maize tassel with some indications of its importance.** Des Moines: Pioneer Hi-Bred Corn Company, 1951. 26p.

ARAUJO, C. **Milho: história e arte.** Jornal eletrônico da Embrapa Milho e Sorgo. Ano 02, edição 07, 2008. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/grao/7_edicao/grao_em_grao_materia_03.htm> Acesso em: 26, maio, 2014.

BARBOSA, M.P.M. **Avaliação do desequilíbrio de ligação e da origem genética em duplo-haploides de milho.** Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, 2009. 55p. Tese (Doutorado em Agronomia).

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

BATTISTELLI, G.M. **Estratégias para obtenção e identificação de duplo-haploides em milho tropical.** Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2012. 62p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).

BELICUAS, P.R. **Uso de haploides no melhoramento de plantas.** Seminário em genética e melhoramento de plantas. São Paulo: USP/ESALQ, 2007. Disponível em: <<http://www.genetica.esalq.usp.br/pub/seminar/PRBelicuas-200702-PPT.pdf>>. Acesso em: 20 julho 2014.

BELICUAS, P.R.; GUIMARÃES, C.T.; PAIVA, L.V.; DUARTE, J.M.; MALUF, W.R.; PAIVA, E. Androgenetic haploids and SSR markers as tools for the development of tropical maize hybrids. **Euphytica**, 156:95-102, 2007.

BUENO, L.C.S.; MENDES, A.N.G.; CARVALHO, S.P. **Melhoramento genético de plantas: princípios e procedimentos**. Lavras: UFLA, 2006. p. 45-48.

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

CHANG, M.T.; COE JÚNIOR E.H. Doubled haploids. In: KRIZ, A.L.; LARKINS, B.A. (eds). **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, Berlin: Springer- Verlag, 2009, p. 127-142.

CHASE, S.S. Monoploids and monoploid derivatives of maize (*Zea mays* L.). **Botanical Review**, 35:117-167, 1969.

CHASE, S.S. Production of homozygous diploids of maize from monoploids. **Agronomy Journal**, 44:263-267, 1952.

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

COE JUNIOR, E.H. A line of maize with high 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 2014/2015 - Primeiro levantamento - outubro de 2014**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_10_09_14_54_26_boletim_graos_outubro_2014.pdf>. Acesso em: 21, outubro, 2014.

COUTO, E.G.O. Identification of haploid maize by flow cytometry, morphological and molecular markers. **Ciência Agrotecnologia**, 1:25-31, 2013.

COUTO, E.G.O.; SILVA, T.N.; DAVIDE, L.M.C.; PIERRE, P.M.O.; VON PINHO, R. G.; RAMALHO, M.A.P. Marcador morfológico em haploides androgenéticos de milho. In: XXVIII CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO. **Resumos...** Goiânia: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2010, p. 2973-2977.

DUARTE, J.O.; GARCIA, J.C.; MIRANDA, R.A. **Cultivo do milho**. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_7_ed/economia.htm>. Acesso em: 26, maio, 2014.

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

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Recomendações técnicas para o cultivo do milho**. Brasília: Embrapa - SPI, 1993. p. 85-92.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Rio de Janeiro: Embrapa - SPI, 2006. 306p.

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

FRITSCHÉ-NETO, R.; GARBUGLIO, D.D.; BORÉM, A. Duplo-haploides. In: BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. (eds.). **Biotecnologia aplicada ao melhoramento de plantas**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2013. cap. 8, p. 267-301.

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

GODOY, H.; CORREA, A.R.; SANTOS, D. Clima no Paraná. In: Iapar: **Manual Agropecuário para o Paraná**. Londrina: Iapar, 1976. p. 17-36.

GOODMAN, M.M.; SMITH, J.S.C. Botânica. In: PATERNIANI, E.; VIÉGAS G.P. **Melhoramento e produção do milho**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 41-56.

HALLAUER, A.R.; CARENA, M.J.; MIRANDA FILHO, J.B. Quantitative genetics in maize breeding. **Handbook of plant breeding**. New York: Springer Science+Business Media, 2010. 663p.

HATTORI, T.; VASIL, V.; ROSENKRANS, L.; HANNAH, L.C.; McCARTY, D.R.; VASIL, I.K. 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.

HERPICH, M.T. **Obtenção de linhagens duplo-haploides em milho**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2012. 61p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).

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

KIESSELBACH, T.A. **The structure and reproduction of corn**. Lincoln: University of Nebraska, Agricultural Experiment Station of Nebraska, 1949. 96p.

KIM, S.; RAYBURN, A.L.; LEE, D.K. Genome size and chromosome analyses in prairie cordgrass. **Crop Science**, 50:2277-2282, 2010.

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

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

MELCHINGER, A.E.; SCHIPPRACK, W.; WURSCHUM, T.; CHEN, S.; TECHNOW, F. Rapid and accurate identification of *in vivo*-induced haploid seeds based on oil content in maize. **Nature-Scientific Reports**, 3:2129, 2013.

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

MILANI, K.F. **Obtenção e avaliação de duas populações tropicais de milho indutoras de haploidia**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2013. 49p. Dissertação (Mestrado em Agronomia).

MIRANDA FILHO, J.B.; VIÉGAS, G.P. Milho híbrido. In: PATERNIANI, E.; VIÉGAS G.P. **Melhoramento e produção do milho**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. v. 1, cap. 7, p. 318-340.

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

PAES, M.C.D. **Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho**. Sete Lagoas-MG: Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária, 2006. 6p. (Circular técnica 75).

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

PATERNIANI, E.; MIRANDA FILHO. Melhoramento de populações. In: PATERNIANI, E.; VIÉGAS G.P. **Melhoramento e produção do milho**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. v. 1, cap. 6, p. 217-220.

PEIXOTO, C.M. **O milho no Brasil, sua importância e evolução**. Artigo da DuPont Pioneer. Disponível em: <<http://www.pioneersementes.com.br/media-center/artigos/165/o-milho-no-brasil-sua-importancia-e-evolucao>>. Acesso em: 26, maio, 2014.

PIERRE, P.M.; DAVIDE, L.M.C.; COUTO, E.G.O.; SILVA, T.N.; RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B. Duplo-haploides: estratégias para obtenção e importância no melhoramento genético do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, 10:1-16, 2011.

PRASANNA, B.M.; CHAIKAM, V.; MAHUKU, G. **Doubled haploid technology in maize breeding: theory and practice**. Mexico: CIMMYT, 2012. 56p.

PRIGGE, V.; SCHIPPRACK, W.; MAHUKU, G.; ATLIN, G.N.; MELCHINGER, A.E. Development of *in vivo* haploid inducers for tropical maize breeding programs. **Euphytica**, 185:481-490, 2012.

RABEL, M. **Haploides androgenéticos em milho tropical**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2008. 69p. Dissertação (Mestrado em Agronomia).

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

ROTARENCO, V.A.; ADICU, G.; SARMANIUC, M. **Induction of maternal haploids in maize.** Maize Genetics Cooperation Newsletter. Disponível em: <<http://www.agron.missouri.edu/mnl/83/46rotarenco.htm>>. Acesso em: 30, setembro, 2014.

ROTARENCO, V.A.; DICU, G.; STATE, D.; FUJA, S. New inducers of maternal haploids in maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter.** Disponível em: <<http://www.agron.missouri.edu/mnl/84/PDF/15rotarenco.pdf>>. Acesso em: 23, julho, 2014.

ROTARENCO, V.A.; KIRTOCA, I.H.; JACOTA, A.G.. Using oil content to identify kernels with haploid embryos. **Maize Genetics Cooperation Newsletter.** Disponível em: <<http://mnl.maizegdb.org/mnl/81/32rotarenco.htm>>. Acesso em: 23, julho, 2014.

SARKAR, K.R.; COE JUNIOR, E.H. A genetic analysis of the origin of maternal haploids in maize. **Genetics**, 54:453-464, 1966.

SEAB – Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. **Conjuntura Agropecuária. Milho safra 2013/2014.** Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/MILHO_ANALISE.pdf>. Acesso em: 21, outubro, 2014.

TAVARES, R.P. **A cultura do milho.** Rio de Janeiro: Ediouro, 1988. 129p.

TOLEDO, F.F. Tecnologia das sementes. In: PATERNIANI, E.; VIÉGAS G.P. **Melhoramento e produção do milho.** Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 722-725.

ZHANG, Z.; QIU, F.; LIU, Y.; MA, K.; LI, Z.; XU, S. Chromosome elimination and in vivo haploid production induced by Stock6-derived inducer line in maize (*Zea mays* L.). **Plant Cell Reports**, 27:1851-1860, 2008.