

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DE INDUTORES DE HAPLOIDIA E
IDENTIFICAÇÃO DE LINHAGENS DUPLO-HAPLOIDES EM
MILHO**

**Lucas Tadeu Mazza Revolti
Engenheiro Agrônomo**

2018

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DE INDUTORES DE HAPLOIDIA E
IDENTIFICAÇÃO DE LINHAGENS DUPLO-HAPLOIDES EM
MILHO**

Lucas Tadeu Mazza Revolti

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Vitti Môro

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas)

2018

Revolti, Lucas Tadeu Mazza
R454a Avaliação de indutores de haploidia e identificação de linhagens
duplo-haploides em milho / Lucas Tadeu Mazza Revolti. --
Jaboticabal, 2018
vi, 64 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018
Orientador: Gustavo Vitti Mõro
Banca examinadora: Gustavo Hugo Ferreira de Oliveira, Ivana
Marino Bárbaro, Rinaldo César de Paula, Viviane Formice Vianna
Bibliografia

1. *Zea mays*. 2. Genótipos endogâmicos. 3. Melhoramento de
plantas. 4. Genética. 5. R-navajo. 6. Citometria de fluxo. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.52:633.15

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço
Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

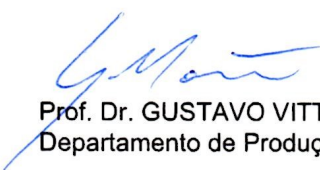
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: AVALIAÇÃO DE INDUTORES DE HAPLOIDIA E IDENTIFICAÇÃO DE LINHAGENS DUPLO-HAPLOIDES EM MILHO

AUTOR: LUCAS TADEU MAZZA REVOLTI

ORIENTADOR: GUSTAVO VITTI MÔRO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. GUSTAVO VITTI MÔRO

Departamento de Produção Vegetal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Pesquisadora Dra. IVANA MARINO BÁRBARO TORNELI
APTA / Colina, SP



Prof. Dr. RINALDO CESAR DE PAULA

Departamento de Produção Vegetal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. GUSTAVO HUGO FERREIRA DE OLIVEIRA

Universidade Federal de Sergipe / Nossa Senhora da Glória/SE



Prof. Dra. VIVIANE FORMICE VIANNA

Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / Unesp - FCAV - Jaboticabal

Jaboticabal, 29 de junho de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LUCAS TADEU MAZZA REVOLTI – filho de Sérgio Sirval Revolti e Elaine Maria Mazza Revolti, nascido em 09 de julho de 1988, em Ribeirão Preto-SP. Ingressou no curso de Agronomia na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, em fevereiro de 2007. No mesmo ano, iniciou estágio no Departamento de Produção Vegetal da FCAV na área de Genética e Melhoramento de Plantas com a cultura da soja, realizando iniciação científica com bolsa FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e defendendo o trabalho de conclusão de curso em 2012. Como aluno de graduação foi Diretor Administrativo, Diretor do Conselho-Administrativo e Diretor Vice-Presidente da CAP Jr, Empresa Júnior da FCAV. Foi integrante do GIEU (Grupo Integração Empresa Universidade), organizando cursos e realizando trabalhos voluntários. Em 2011 estagiou na “University of Kentucky” em Lexington-KY, Estados Unidos, trabalhando na área de Genética e Melhoramento de Plantas com a cultura do trigo. Cumpriu o estágio curricular no segundo semestre de 2012 na Empresa Dow AgroSciences do Brasil, em Indianópolis-MG, trabalhando com a cultura do milho. Obteve o título de Engenheiro Agrônomo em fevereiro de 2013. Em Março do mesmo ano iniciou o curso de Pós-Graduação, nível de Mestrado, em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) com a cultura do milho, pela FCAV/UNESP, sendo bolsista CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), tendo como orientador o Prof. Dr. Gustavo Vitti Mouro. Finalizou a dissertação em Julho de 2014, obtendo o título de Mestre. Em agosto de 2014 iniciou o curso de Pós-Graduação, nível de Doutorado, em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) com a cultura do milho, pela FCAV/UNESP, sendo bolsista CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), tendo como orientador o Prof. Dr. Gustavo Vitti Mouro. Em 2017 realizou Doutorado Sanduíche na “University of Nebraska” em Lincoln-NE, Estados Unidos, onde trabalhou na área de Genética e Melhoramento de Plantas com a cultura do milho e milho pipoca. Finalizou a tese em Junho de 2018, obtendo o título de Doutor.

"Sou um só, mas ainda assim sou um. Não posso fazer tudo, mas posso fazer alguma coisa. E, por não poder fazer tudo, não me recusarei a fazer o pouco que posso "

"O que eu faço, é uma gota no meio de um oceano. Mas sem ela, o oceano será menor."

Madre Teresa de Calcutá

Aos meus avós

João e Yolanda Mazza (in memoriam)

Santina e Domingos Revolti (in memoriam)

DEDICO

Aos meus pais

Elaine e Sérgio

À minha irmã

Paola

À minha namorada

Amanda

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, Santa Izildinha, São Lucas, São José e Nossa Senhora Aparecida por sempre me acompanharem, por me darem força para superar todos os obstáculos e por abençoarem sempre o meu caminho.

Aos meus pais, Elaine e Sérgio, pela vida, educação, amor, apoio, conselhos, paciência e por toda a estrutura que me deram para me tornar a pessoa que sou hoje.

A todos os meus familiares, em especial a minha irmã Paola pelo apoio e amizade.

A minha namorada Amanda Schimidt Célico, por todos esses ótimos anos de companheirismo, amizade, dedicação, ajuda, apoio, carinho, conselhos e paciência.

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mequista Filho” – Câmpus de Jaboticabal, a qual respeito muito, por toda a estrutura oferecida, por todos esses anos vividos dentro da Universidade e pela realização da Graduação em Agronomia e Mestrado e Doutorado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas.

A University of Nebraska, Lincoln-NE, Estados Unidos, a qual me recebeu de braços abertos e possibilitou que eu realizasse o Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida para o Doutorado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida para a realização do Doutorado Sanduíche nos Estados Unidos.

Ao Prof. Dr. Gustavo Vitti Mouro que além da orientação, ensinamentos, confiança, se tornou um amigo e me proporcionou a realização deste trabalho e de mais uma etapa na minha vida.

Aos meus companheiros de trabalho, pós-graduandos, graduandos e todos que trabalharam comigo nesse período do Doutorado, proporcionando novos aprendizados e momentos alegres, principalmente aos grandes amigos do Núcleo de Estudos em Genética e Melhoramento de Milho – NEGEMM, Camila Baptista do

Amaral, Carlos Henrique Braz Giorgenon, Carlos Henrique Cáprio, Élcio Hissagy Samecima Júnior, Flávia Alves da Silva, Gustavo Hugo Ferreira de Oliveira, Kevyn Belonssi, Kauê Charnai, Kian Eghrari Moraes, Leonardo Fernandes Veloso, Luiz Eduardo Tilhaqui Bertasello, Marcela Bonafin Marconato, Naiara Zancanari, Rodolfo Buzinaro, Sophia Mangussi Franchi Dutra.

Aos membros da banca de qualificação e defesa para o título de Doutor: Prof. Dr. Éverlon Cid Rigobelo, Prof. Dr. Gustavo Hugo Ferreira de Oliveira, Dra. Ivana Marino Bárbaro, Prof. Dr. Rinaldo César de Paula, Profa. Dra. Viviane Formice Vianna, pela disponibilidade em participar e por toda a contribuição.

Ao Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana e ao Doutorando Nathan Cruz que permitiram e me ajudaram a realizar a análise de citometria de fluxo.

Aos Professores Doutores Domingos Fornasieri Filho, Rinaldo de Paula, Roberval Daiton Vieira, Éverlon Rigobelo, pelas conversas, conselhos, brincadeiras e por sempre acreditar em meu trabalho e participar na minha formação profissional.

Aos Professores Doutores John E. Foster e Oscar Rodriguez pela orientação, aprendizado e troca de experiência durante a realização do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior, na University of Nebraska, Lincoln-NE, Estados Unidos.

Aos amigos Dr. Santoshi Pitla, Dra. Dipti Dev e Adriana Tonini aos quais sou muito grato.

Aos pesquisadores Dr. Marcelo Marchi Costa e Me. Alexandre Takahashi pelos ensinamentos e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal: Mônica, Rubens (Faro), Sebastião (*in memoriam*), Gabi, Osmar, Mauro e Geraldo pela convivência.

A todos os professores e funcionários da FCAV/UNESP que contribuíram para minha formação e a todas as pessoas que, de alguma forma, foram importantes para execução deste trabalho e por mais uma etapa vencida em minha vida.

Meus sinceros Agradecimentos.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE TABELAS E FIGURAS.....	v
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 A importância da cultura do milho.....	2
2.2 Milho híbrido.....	3
2.2.1 Etapas para obtenção do milho híbrido.....	4
2.2.2 Tipos de híbridos.....	5
2.3 Duplo-haploides.....	6
2.3.1 Obtenção de haploides em milho.....	8
2.3.1.1 Indução in vivo.....	8
2.3.2 Identificação de haploides.....	10
2.3.3 Duplicação cromossômica em haploides putativos de milho.....	12
2.4 Citometria de fluxo.....	13
3. REFERÊNCIAS.....	14
CAPÍTULO 2 – EFFICIENCY OF MAIZE HAPLOID INDUCERS.....	22
ABSTRACT.....	22
1. INTRODUCTION.....	22
2. MATERIAL AND METHODS.....	24
2.1 Experimental field.....	24
2.2 Experimental procedures.....	24
2.3 Selection of putative haploids by R-navajo morphological marker.....	25
2.4 Statistical analysis.....	25
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	25
3.1 2013/2014 Season.....	25
3.2 2014/2015 Season.....	28

3.3 2015/2016 Season.....	31
4. CONCLUSIONS.....	34
5. REFERENCES.....	34
CAPÍTULO 3 – EFICIÊNCIA DE IDENTIFICAÇÃO DE HAPLOIDES PUTATIVOS E LINHAGENS DUPLO-HAPLOIDES EM MILHO UTILIZANDO DIFERENTES TÉCNICAS DE SELEÇÃO.....	
	37
RESUMO.....	37
ABSTRACT.....	37
1. INTRODUÇÃO.....	38
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
2.1 Área experimental e material vegetal.....	39
2.2 Condução do experimento em campo.....	40
2.3 Seleção dos haploides putativos por meio do marcador R-navajo	41
2.4 Germinação e seleção das plântulas.....	41
2.5 Duplicação cromossômica.....	43
2.6 Citometria de fluxo.....	45
2.7 Autofecundação dos genótipos.....	46
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4. CONCLUSÕES.....	54
5. REFERÊNCIAS.....	55
APÊNDICES.....	58

AValiação de Indutores de Haploidia e Identificação de Linhagens Duplo-Haploides em Milho

RESUMO – Programas de genética e melhoramento de milho possuem o foco de lançar híbridos com alta produtividade, sendo uma das principais dificuldades a obtenção de linhagens. Melhoristas de milho buscam novas alternativas para tornar esse processo mais rápido e com menor custo, sendo a tecnologia do duplo-haploide viável para esta finalidade. A pesquisa teve como objetivo avaliar a eficiência de indução de indutores de haploidia e a identificação de linhagens duplo-haploides em milho. Utilizou-se cinco híbridos simples de milho e três grupos de indutores de haploidia, os quais foram semeados e cruzados nas safras 2013/2014, 2014/2015 e 2015/2016. Das sementes provenientes dos cruzamentos selecionou-se os possíveis haploides pelo marcador morfológico visual R-navajo, pela avaliação de comprimento de raiz, vigor e coloração de plântulas. Realizou-se a duplicação cromossômica dos possíveis haploides e após a aclimação em casa de vegetação, as plantas sobreviventes foram transplantadas para campo. As análises de citometria de fluxo foram realizadas com os genótipos sobreviventes em campo para confirmação das ploidias e descarte dos falsos haploides. Como resultados, há diferenças entre os três grupos de indutores de haploidia. Na safra 2015/2016 a taxa de indução de possíveis haploides foi de 1 a 20%, 1 a 35% e 1 a 42% para os grupos 1, 2 e 3, respectivamente. Houve diminuição do número de plantas no decorrer das avaliações, sendo que, do total de 332 plantas transplantadas em campo, foi possível realizar a análise de citometria de fluxo em 228 plantas. Constatou-se plantas diploides e diploides/tetraploides pela realização da citometria de fluxo. Os indutores do grupo 3 apresentaram maiores taxas de indução de haploides putativos sendo mais promissores para a adoção em programas de melhoramento de milho visando obter linhagens duplo-haploides. A técnica de citometria de fluxo permitiu o descarte de falsos haploides e é uma técnica de fácil execução e rapidez.

Palavras-chave: citometria de fluxo, genética, genótipos endogâmicos, melhoramento de plantas, R-navajo, *Zea mays*

EVALUATION OF HAPLOID INDUCERS AND IDENTIFICATION OF DOUBLED-HAPLOID INBRED LINES IN MAIZE

ABSTRACT - Maize breeding programs are focused on releasing novel high productive hybrids and one of the main difficulties in maize breeding programs is obtaining inbred lines. Plant breeders have been looking for new alternatives to make this process faster and with a lower cost and doubled-haploid technology is an alternative. The objective of the research was to evaluate the efficiency of induction of tropical haploid inducers and the identification of doubled-haploid inbred lines in maize. Five maize hybrids and three haploid inducing groups were used, which were sown and crossed in the 2013/2014, 2014/2015 and 2015/2016 seasons. Possible haploids seeds were selected by the visual morphological marker R-Navajo, by the evaluation of root length, vigor and seedling staining. Chromosome doubling of the possible haploids was performed and after acclimatization in the greenhouse, the surviving plants were transplanted to the field. The flow cytometric analyzes were performed with the surviving genotypes in the field to confirm the ploidy and discard the false-haploids. As results, there are differences between the induction rates of the three haploid inducers groups. In the 2015/2016 crop season the induction rate was 1 to 20%, 1 to 35% and 1 to 42% for groups 1, 2, and 3, respectively. The number of plants decreased during the evaluations, and of the total of 332 plants transplanted in the field it was possible to perform flow cytometric analysis in 228 plants. Diploid and diploid/tetraploid plants were observed by flow cytometry. The inducers from group 3 present higher rates of putative haploid induction, being more promising for its adoption in breeding programs to obtain doubled haploid inbred lines. The technique of flow cytometry allowed the discarding of false-haploids and it is a technique of easy and fast execution.

Key words: flow cytometry, endogamic genotypes, genetics, plant breeding, R-Navajo, *Zea mays*

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

CAPÍTULO 1

Página

Figura 1. Tipos de indução *in vivo* de haploidia. a - Cruzamento envolvendo a linhagem indutora Stock6, gerando um indivíduo haploide gimnogenético ($n=10$), resultante do desenvolvimento mitótico da oosfera não fecundada. Nesse caso, ocorre a degeneração do núcleo reprodutivo do grão de pólen. b - Cruzamento normal, gerando um indivíduo diploide ($2n=20$), oriundo da fecundação normal do núcleo reprodutivo e oosfera. c - Cruzamento envolvendo a linhagem indutora de haploidia W23, gerando um indivíduo haploide androgenético ($n=10$), resultante do desenvolvimento mitótico do núcleo reprodutivo do grão de pólen. Nesse caso, ocorre degeneração da oosfera. Elaboração da figura: Patrícia M. O. Pierre. Fonte: Pierre et al. (2011).....

9

Figura 2. Mecanismo de funcionamento do marcador fenotípico R-navajo, em linhagens indutoras androgenéticas. Nesse caso, a linhagem indutora é utilizada como genitor feminino. (A) Embrião diploide (Rr) de coloração roxa, oriundo da fecundação normal da oosfera (R) pelo núcleo reprodutivo (r). (B) Embrião haploide androgenético (r), oriundo de divisões mitóticas. Este apresenta coloração branca, devido à ausência do alelo R (exclusivo do saco embrionário da linhagem indutora), que confere pigmentação com antocianina. Elaboração da figura: Patrícia M. O. Pierre. Fonte: Pierre et al. (2011).....

12

CAPÍTULO 2

Table 1. Description of five maize single-cross hybrids and three groups of haploid inducers used in the experiments at Unesp, Jaboticabal-SP, in the 2013/2014, 2014/2015 and 2015/2016 crop seasons.....

24

Fig 1. a) Observed frequencies with the significance of the chi-square test for the number of putative haploid and non-haploid in maize obtained from the crossings of the group 1 inducers with the hybrid A, identified by the R-Navajo. b) Frequency observed considering the inducer capacity of induction. 2013/2014 season in Jaboticabal-SP. OF - observed frequency. EF - expected frequency.....

27

Fig 2. a, b, c, d) Observed frequencies with the significance of the chi-square test for the number of putative haploids and non-haploids in maize obtained from the crossings of the groups 1, 2 and 3 inducers with the hybrids B, C, D and E, identified by the R-Navajo. e) Inducers capacity of induction. f) Single-cross hybrids induction rate. 2014/2015 season in Jaboticabal- SP. OF - observed frequency. EF - expected frequency.....

30

Fig 3. a, b, c, d) Observed frequencies with the significance of the chi-square test for the number of putative haploids and non-haploids in maize obtained from the crossings of the groups 1, 2 and 3 inducers with the hybrids B, C, D and E, identified by the R-Navajo. e) Inducers capacity of induction. f) Single-cross hybrids induction rate. 2015/2016 season in Jaboticabal-SP. OF – observed frequency. EF – expected frequency.....

33

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Descrição dos cinco híbridos de milho e dos três grupos indutores de haploidia utilizados nos experimentos na Unesp, Jaboticabal-SP, nos anos agrícolas 2013/2014, 2014/2015 e 2015/2016.....	40
Figura 1. Sementes de milho identificadas como possíveis haploides, desinfestadas com hipoclorito 2% e colocadas em papel germitest umidecido.....	41
Figura 2. Rolos de papel germitest com as sementes de milho identificadas como possíveis haploides em germinador a 25°C.....	42
Figura 3. Plântulas classificadas de acordo com a parte aérea e raiz. A – plântula haploide putativo, B – plântula diploide e C – sementes mortas.....	42
Figura 4. Plântulas possíveis haploides de milho sendo lavadas em água corrente.....	43
Figura 5. Plântulas possíveis haploides de milho plantadas em bandejas com substrato.....	44
Figura 6. Transplântio das plântulas possíveis haploides de milho em canteiros.....	45
Figura 7. Total de sementes obtidas dos cruzamentos dos híbridos de milho com os três grupos indutores de haploidia e total de sementes haploides putativos.....	47
Figura 8. Sementes classificadas de acordo com o marcador morfológico R-navajo. A - semente possível haploide, B - semente diploide e C – contaminação.....	48
Figura 9. Total de sementes possíveis haploides e plântulas selecionadas como possíveis haploides.....	49
Figura 10. Total de plântulas de milho duplicadas e transplantadas em bandejas, e sobreviventes na primeira e segunda contagem.....	50
Figura 11. Total de plantas de milho transplantadas em canteiros, primeira e segunda contagem de plantas sobreviventes e total de espigas produzidas.....	52
Figura 12. Ploidias detectadas após a análise de citometria de fluxo nas plantas de milho sobreviventes em campo.....	53
Figura 13. a) Histograma do padrão externo <i>Pisum sativum</i> . b) Histograma de híbrido de milho c) Planta diploide d) planta diploide/tetraploide.....	54

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

1. INTRODUÇÃO

É esperado que até o ano de 2050 a população mundial seja de 10 bilhões de pessoas, exigindo maior produção de alimentos, consequentemente um aumento da demanda agrícola. Assim, o milho, *Zea mays* L., sendo um dos principais cereais utilizados como fonte para a alimentação humana, animal e como matéria prima para a indústria, cultivado em todo o mundo, torna-se essencial diante deste cenário. É o grão mais produzido no mundo, sendo Estados Unidos, China e Brasil os maiores produtores, respectivamente (FAO, 2017).

O potencial dos genótipos de milho estudados é superior aos rendimentos obtidos, o que possibilita dizer que a transferência dos conhecimentos adquiridos com a pesquisa, aliada à experiência, pode contribuir para o aumento da produtividade do milho e garantir condições para novas atualizações dos que se dedicam à agricultura (GURGEL, 2006).

Para obter o milho híbrido é necessário o desenvolvimento de linhagens endogâmicas, o teste de capacidade de combinação dessas linhagens, para identificar as melhores combinações, e a produção e comercialização das sementes dos híbridos formados. Assim, para atingir a homozigose são necessárias de seis a oito gerações de autofecundações, tornando a obtenção das linhagens uma das etapas, dentre as citadas, mais demorada e com maior custo (PATERNIANI; CAMPOS, 1999).

Os melhoristas têm procurado diferentes possibilidades para obter linhagens por um processo mais rápido e com um menor custo e a tecnologia de duplo-haploides (DH) é uma alternativa. Este processo gera plântulas a partir de células haploides, sendo realizada, posteriormente, a duplicação cromossômica das mesmas. Chase (1952) foi o primeiro autor a publicar um trabalho sobre este tema, porém somente após a década de 1990 pesquisadores de todo o mundo começaram a dar maior atenção a este promissor processo de obtenção de linhagens endogâmicas (PIERRE et al, 2011).

Muitas linhagens indutoras, utilizadas para indução de haploidia em milho, são de origem temperada, o que dificulta a sua condução e manejo em clima tropical.

Assim, é essencial a seleção e o desenvolvimento de linhagens indutoras em clima tropical para que melhores resultados sejam alcançados.

Diferentes métodos têm sido utilizados para a avaliação dos haploides putativos e, posteriormente, duplo-haploides. A análise visual, através do marcador fenotípico natural R-navajo, é uma das primeiras a ser realizada, visando a seleção das sementes possíveis haploides com marcação somente no endosperma (CHASE; NANDA, 1965). Várias características têm sido analisadas, além do marcador R-navajo, como vigor, comprimento de parte aérea e raiz e coloração de radícula. A citometria de fluxo é outra análise de relevância. É empregada na contagem e triagem de células e detecção de biomarcadores, apresentando facilidade e rapidez no preparo das amostras e obtenção dos resultados (HAN et al., 2016; LOUREIRO; SANTOS, 2004)

Frente a este cenário, a busca por alternativas para obtenção de linhagens endogâmicas por métodos mais rápidos e com menores custos torna-se primordial nos Programas de Genética e Melhoramento de Plantas de instituições públicas e privadas.

Diante disso, o trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de indução de indutores tropicais de haploidia e a identificação de linhagens duplo-haploides em milho.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A importância da cultura do milho

O milho (*Zea mays* L.), pertencente à família das Poaceae, constitui-se em uma das poucas plantas econômicas nativas das Américas. Trata-se de uma planta completamente domesticada, pois não cresce de forma selvagem e não consegue sobreviver na natureza, portanto, depende dos cuidados do homem (FORNASIERI FILHO, 2007). O mesmo autor define a planta do milho como uma haste cilíndrica, com nós e entrenós, cada nó abaixo do solo tem a tendência a produzir raízes enquanto os nós acima do nível do solo produzem perfilhos e raízes suporte, os chamados esporões.

Este cereal é uma das culturas mais cultivadas no Brasil e no mundo, sendo utilizado, principalmente, para a alimentação humana, animal, como matéria prima para a indústria e para produção de etanol, com maior relevância, nos Estados Unidos.

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e China, respectivamente. De acordo com o United States Department of Agriculture (2018), estima-se uma produção global de 1.054,3 milhões de toneladas para a safra 2018/2019, apresentando um acréscimo de 2% com relação a safra anterior (USDA, 2018).

Dados estatísticos estimam que a safra 2017/2018, no Brasil, pode chegar a 16,6 milhões de ha de área plantada, com uma produção próxima a 83 milhões de toneladas de milho (CONAB, 2018). Do total citado, mais de 90% das sementes semeadas são provenientes de milho híbrido.

2.2 Milho híbrido

Um dos maiores desafios para os Programas de Genética e Melhoramento de Plantas, tanto em instituições públicas como em empresas privadas, é a busca por genótipos com maior produtividade e que possuam caracteres agronômicos de interesse para o avanço da agricultura mundial.

Os altos níveis de produção e produtividade, que podem ser alcançados hoje em dia, são devidos, em grande parte, a descoberta da heterose ou vigor híbrido, o qual pode ser obtido pelo cruzamento entre duas linhagens endogâmicas contrastantes, que após o cruzamento expressarão o seu máximo vigor híbrido (PATERNIANI; CAMPOS, 1999).

O esquema de melhoramento endogamia-hibridação, descoberto no século XX, através dos estudos desenvolvidos por Shull (1908, 1909 e 1910), East (1908, 1909) e Jones (1918), continua sendo o mais importante para a produção de sementes híbridas comerciais de milho. Nos estudos realizados por estes pesquisadores pode-se observar o efeito da heterose, que era possível a seleção dos melhores genótipos e, conseqüentemente, a reprodução dos mesmos através dos cruzamentos entre as linhagens obtidas pelas autofecundações sucessivas (MÔRO, 2011).

A introdução do milho híbrido somente ocorreu por volta da década de 1920, quando Jones (1918) sugeriu a utilização do milho híbrido duplo, obtido pelo cruzamento de dois híbridos simples, para a produção comercial. Apesar do avanço de técnicas e ferramentas para o cultivo da cultura, o milho híbrido duplo, acarretou em amplo aumento na produtividade, gerando grande impacto positivo para a agricultura moderna (MÔRO, 2011; PATERNIANI, 1993).

2.2.1 Etapas para obtenção do milho híbrido

De acordo com Paterniani e Campos (1999), o desenvolvimento de linhagens endogâmicas, o teste de capacidade de combinação das mesmas e a produção, são as etapas necessárias para a obtenção do milho híbrido e, posteriormente, a comercialização das sementes dos híbridos formados.

As linhagens endogâmicas são produzidas a partir da autofecundação de várias plantas da população de milho, onde o pólen de cada planta é coletado da parte masculina (pendão) e levado até a parte feminina (estilo-estigma) da mesma planta. Os decendentes S1 obtidos são semeados, selecionados e autofecundados por vários ciclos. Após cerca de seis a oito ciclos de autofecundação, 3 a 4 anos, as linhagens chegam a, aproximadamente, 99,22% de homozigose, levando a fixação do genótipo (COUTO, 2013; PATERNIANI; CAMPOS, 1999). Para obtenção das linhagens os métodos Padrão, Cova Única e Genealógico são os mais utilizados (BESPALHOK; GUERRA; OLIVEIRA, 2015).

O teste de capacidade de combinação é realizado com o intuito de aferir sobre o grau de dominância que uma linhagem possui para uma certa característica, os quais poderão ser transmitidos para uma progênie híbrida. Sprague e Tatum (1942) propuseram os conceitos de capacidade geral de combinação (CGC) e capacidade específica de combinação (CEC). O primeiro conceito (CGC) foi definido como sendo a performance média da linhagem, avaliado através do valor médio dos híbridos obtidos pelo cruzamento desta linhagem com outras (BESPALHOK; GUERRA; OLIVEIRA, 2015), levando-se em consideração, principalmente, os efeitos aditivos. O segundo conceito (CEC) foi definido como sendo a performance média do cruzamento entre linhagens em relação à média geral dos cruzamentos, levando-se em

consideração a ação de genes dominantes ou de efeitos epistáticos (GIORGENON, 2015).

2.2.2 Tipos de híbridos

Diversos tipos de híbridos podem ser obtidos na cultura do milho (GIORGENON, 2015; MIRANDA FILHO; VIÉGAS, 1987), podendo ser divididos em Híbrido Simples, Simples Modificado, Triplo, Triplo Modificado, Duplo, Intervarietal e Topcross.

a) Híbrido Simples (HS) – Resultado do cruzamento de duas linhagens endogâmicas diferentes. Possui maior produtividade e uniformidade de altura de plantas, altura de espigas e ciclo, porém as sementes são mais caras que os demais tipos de híbridos, pois a quantidade de sementes produzidas por área é reduzida. $HS = (A \times B)$.

b) Híbrido Simples Modificado (HS') – Utiliza como genitor feminino o híbrido de duas linhagens aparentadas ($A \times A'$) e como genitor masculino uma linhagem endogâmica diferente (B). Possui menor custo de produção que o HS, pois utiliza um híbrido como parental feminino, sendo assim, produz maior quantidade de sementes por área. $HS' = [(A \times A') \times B]$.

c) Híbrido Triplo (HT) – Resultado do cruzamento entre um híbrido simples ($A \times B$) e uma linhagem endogâmica diferente (C), sendo que o híbrido simples é utilizado como parental feminino. O HT possui produtividade, uniformidade e estabilidade intermediária entre os HS e HD. $HT = [(A \times B) \times C]$

d) Híbrido Triplo Modificado (HT') – Utiliza o mesmo esquema para obtenção do HT, porém o parental masculino é um híbrido obtido entre o cruzamento de duas linhagens aparentadas. $HT' = [(A \times B) \times (C \times C')]$.

e) Híbrido Duplo (HD) – Resultado dos cruzamentos entre dois híbridos simples. Possui menor produtividade e uniformidade que os HS, HS', HT e HT', porém apresenta maior variabilidade genética e estabilidade. Apesar da obtenção das sementes do HD ser mais trabalhosa, pois necessita de mais campos isolados e anos para a produção, possui menor custo de produção que os demais, pois é utilizado

como parental feminino um híbrido simples, o qual produz grande quantidade de sementes por área. $HD = [(A \times B) \times (C \times D)]$.

f) Híbrido intervarietal – Resultado do cruzamento de duas variedades. Apesar de ser de fácil alcance, por não necessitar da obtenção das linhagens endogâmicas e, por ter maior variabilidade genética, apresentar maior capacidade de adaptação, é pouco utilizado por ter uma menor produtividade e maior desuniformidade.

g) Híbrido Topcross – Resultado de um cruzamento de uma linhagem elite com um testador, podendo ser um híbrido, variedade ou linhagem. Também pode ser obtido pelo cruzamento entre híbrido x variedade e linhagem x variedade.

Na safra 2016/2017, 315 cultivares de milho foram relacionadas para a comercialização, sendo que, deste total, 214 apresentavam tecnologia transgênica, enquanto que 101 cultivares eram convencionais (FILHO; BORGHI, 2016). Do total de materiais disponibilizados pelas empresas, 68% eram Híbridos Simples, 17% Híbridos Triplos, 6% Híbridos Duplos, 5% Variedades, 3% Híbridos Simples modificados e 1% Híbridos Triplos modificados. Esses dados evidenciam a possibilidade do agricultor utilizar a cultivar mais correta para a sua região, adotando um manejo mais adequado, podendo atingir altos valores de produtividade. O incremento da tecnologia na agricultura brasileira permite explorar ao máximo o vigor e potencial genético das sementes de milho, aprimorando cada vez mais os sistemas de produção da cultura do milho.

Assim, ressalta-se a importância do desenvolvimento de novas técnicas que possibilitem a obtenção de linhagens endogâmicas de uma maneira mais rápida e menos onerosa, para que novos cultivares híbridos possam ser produzidos em um menor tempo.

2.3 Duplo-haploides

Programas de melhoramento de instituições públicas e privadas buscam diferentes alternativas para a obtenção de linhagens endogâmicas de uma maneira mais rápida e econômica e uma alternativa, disponível na cultura do milho, consiste na produção de linhagens homozigotas instantâneas pelo uso de haplóides duplicados, também conhecidos como duplo-haploides (CHASE, 1952).

Em espécies diploides, a probabilidade de encontrar um genótipo recessivo aabb, em uma população F₂, a partir da autofecundação de um genótipo com dois pares de locos independentes segregando entre os genitores AAbb x aaBB, é de 1/16. Utilizando-se indutores de haploidia a probabilidade de encontrar o mesmo genótipo recessivo é de 1/4, isso ocorre devido a ausência dos genótipos heterozigotos na população, ocorrendo apenas os genótipos homozigotos. Com a obtenção das linhagens homozigotas, realizada com base na aditividade, não há interferência dos efeitos de dominância e epistasia, assim, a variância aditiva é maximizada, os efeitos de dominância são neutralizados e as vantagens na seleção de características quantitativas podem ser superiores (BORDES et al., 2006; SILVA et al., 2002).

A ocorrência natural de haploides é considerada rara (VASIL, 1996), mesmo assim, aproximadamente 100 espécies de angiospermas foram descritas com haploidia natural. Dentre essas plantas pode-se citar: *Nicotiana tabacum* (tabaco), por Clausen e Mann, em 1924 (FORSTER et al., 2007), *Triticum compactum* (trigo), por Gains e Aase, em 1926 (WEDZONY et al., 2009), *Solanum tuberosum* (batata), por Hougas e Pelouquim, em 1958 (ROKKA, 2009), *Oryza sativa* (arroz), por Niizeki e Oono, em 1968 (PAUK; JANCÓS; SIMON-KISS, 2009), *Hordeum vulgare* (cevada), por Kasha e Kao, em 1970 (DEVAUX; KASHA, 2009), e *Brassica napus* (canola), por Thomas e Wenzel, em 1975 (GIL-HUMANES; BARRO, 2009). A primeira planta haploide de milho foi descrita por Stadler e Randolph, em 1929 (ROBER; GORDILLO; GEIGER, 2005).

Segundo Wedzony et al. (2009), um grande avanço na produção artificial de duplo-haploides ocorreu entre 1964 e 1966, quando Guha e Maheshwari, em *Datura stramonium*, obtiveram o primeiro haploide gerado por meio de cultura de anteras. Em 1974 e 1980 foram lançadas as duas primeiras cultivares DH, em canola e cevada, respectivamente, porém linhagens DH já haviam sido produzidas a partir de haploides espontâneos previamente. Nos anos 80 foram divulgados protocolos com inovações para produção de linhagens DH em diversas espécies vegetais, no entanto, somente nos últimos 20 anos tem-se mostrado viável a produção de sementes melhoradas a partir de linhagens DH (FORSTER et al., 2007).

2.3.1 Obtenção de haploides em milho

2.3.1.1 Indução *in vivo*

A indução *in vivo* baseia-se na utilização de linhagens indutoras e tem sido um dos métodos preferidos pelos pesquisadores de instituições públicas e privadas (Figura 1). Inicialmente destacaram-se duas linhagens indutoras de haploidia em milho. A primeira denominada Stock6 (COE, 1959), possui taxa de indução em torno de 3,2% e é utilizada como genitor masculino, gerando haploides de origem materna ou gimnogenéticos, ou seja, após a fertilização a oosfera se desenvolve em um “pseudo-embrião” (SARKAR; COE, 1966). Como o mecanismo de indução dessa linhagem não é bem conhecido, supõe-se que ocorra uma falha na fertilização devido ao gameta masculino ou feminino, resultando nos haploides (ROTARENCO; DICU; SARMANIUC, 2009).

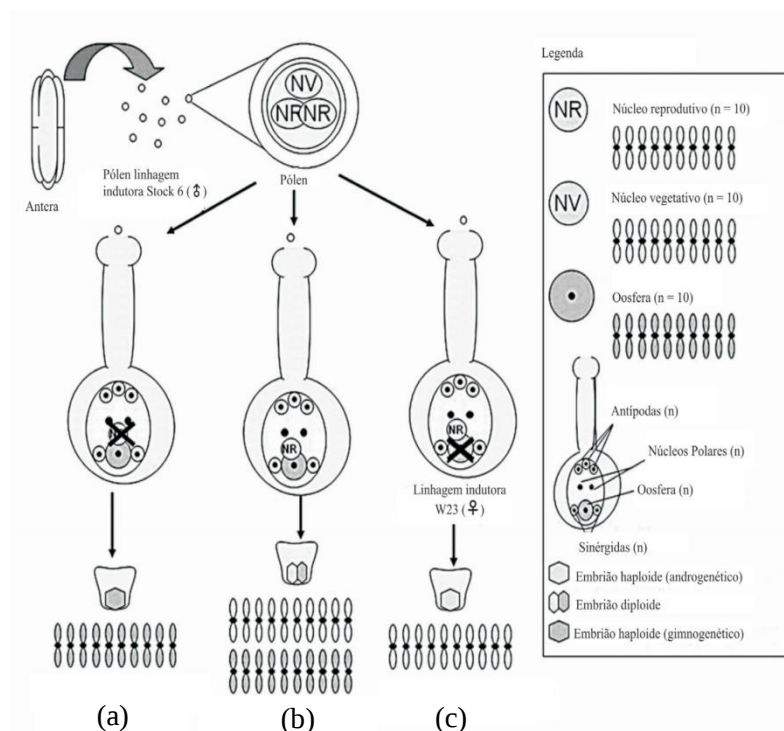


Figura 1. Tipos de indução *in vivo* de haploidia. a - Cruzamento envolvendo a linhagem indutora Stock6, gerando um indivíduo haploide gimnogenético ($n=10$), resultante do desenvolvimento mitótico da oosfera não fecundada. Nesse caso, ocorre a degeneração do núcleo reprodutivo do grão de pólen. b - Cruzamento normal, gerando um indivíduo diploide ($2n=20$), oriundo da fecundação normal do núcleo reprodutivo e oosfera. c - Cruzamento envolvendo a linhagem indutora de haploidia W23, gerando um indivíduo haploide androgenético ($n=10$), resultante do desenvolvimento mitótico do núcleo reprodutivo do grão de pólen. Nesse caso, ocorre degeneração da oosfera. Elaboração da figura: Patrícia M. O. Pierre.

Fonte: Pierre et al. (2011).

A segunda linhagem é a Wisconsin 23 (W23), com taxa de indução variando de 1 a 3% (KERMICLE, 1973), sendo utilizada como genitor feminino, gerando haploides androgenéticos. Após a fertilização um dos núcleos reprodutivos do grão de pólen se desenvolve em um “pseudo-embrião” (PIERRE et al., 2011).

No sistema androgenético, a produção de haploides a partir do gameta masculino é induzida por um alelo recessivo de um gene (*ig*), podendo ser denominado gametófito indeterminado (KERMICLE, 1969). Segundo Kermicle e Demopulos-Rodrigues (1980), esse alelo está localizado no braço longo do cromossomo 3 a 90 cM do loco envolvido na produção de lígula (*lg2*), o mais distal do braço curto. Um saco embrionário com oito núcleos é formado a partir de três mitoses sucessivas em uma megasporogênese normal, ao passo que, algumas

megasporogêneses podem resultar em um saco embrionário com dezesseis núcleos ou mais, sob ação do alelo recessivo *ig*, sofrendo quatro mitoses ou mais (LIN, 1981).

Ainda segundo o mesmo autor, os indivíduos que possuem o alelo *ig* recessivo, depois da fertilização, exibem poliembrião, heterofertilização e variação no nível de ploidia do endosperma, como resultado das divisões mitóticas adicionais. Um embrião androgenético haploide pode ser originado a partir da formação, sem a ocorrência de fertilização, de um núcleo reprodutivo de grão de pólen, o qual é favorecido pelos sacos embrionários com oosferas degeneradas (LIN, 1981).

A partir das linhagens Stock6 e W23, outras linhagens foram geradas com o intuito de aumentar as frequências de indução de haploidia. Dentre elas destacam-se a WS14 com uma taxa de indução de 3 a 5% (LASHERMES; BECKERT, 1988), ZMS e KMS que quando cruzadas deram origem à linhagem MHI, induzindo, em média, 6,5% de haploides (CHALYK, 1999; EDER; CHALYK, 2002) e a RWS oriunda do cruzamento das linhagens WS14 e KMS, obtendo de 8 a 10% de haploides (ROBER; GORDILLO; GEIGER, 2005).

2.3.2 Identificação de haploides

Pela utilização de um sistema de marcador fenotípico baseado na pigmentação por antocianina, determinado pelo gene R-navajo (*R1-η*), torna-se possível a identificação antecipada dos possíveis haploides gerados a partir do uso de linhagens indutoras de haploidia (CHASE; NANDA, 1965). As sementes diploides apresentam pigmentação, causada pelo alelo dominante com antocianina, no endosperma e no embrião, enquanto as sementes haploides apresentam embrião de coloração branca, havendo pigmentação somente no endosperma.

Belicuas et al. (2007) realizaram cruzamentos entre a linhagem indutora de haploidia W23 e o híbrido simples BRS1010, obtendo 87 espigas, das quais as sementes foram separadas visualmente utilizando o marcador fenotípico R-navajo, atingindo porcentagem de possíveis haploides entre 0 e 51%.

No cruzamento da linhagem indutora Stock6 com o híbrido Chuandan13, foram identificadas 303 prováveis haploides, com base no marcador R-navajo. Realizando

análise citológica, verificou-se que, dos 303 prováveis haploides, 253 sementes germinaram e somente 71 apresentavam $n = 10$ cromossomos (TANG et al., 2009).

Segundo (2014), trabalhando com três populações diferentes de milho, Tropical Flint, Tuxpeño e StiffStalk, após o cruzamento com uma linhagem indutora obtida na Universidade de Hohenheim, Alemanha, encontrou taxas de indução variando de 8,6 a 13,21%, com média de 10,32%, levando-se em consideração o marcador *R1-nj*.

De acordo com Rabel (2008) o marcador *R*-navajo não apresenta precisão na indicação das sementes haploides por ter penetrância incompleta. A expressão da antocianina pode variar significativamente em diferentes germoplasmas, indicando a influência de fatores não genéticos ou ambientais e, possivelmente, da expressão gênica dos antecessores (CHAIKAM et al., 2015; CHASE 1952; KEBEDE et al. 2011; PRIGGE et al., 2011; ROBER; GORDILLO; GEIGER, 2005).

Além disso, foram relatados alguns alelos dominantes inibitórios de genes envolvidos na expressão de antocianina, *C1-l*, *C2-lf* e *in-1D*, os quais podem causar inibição da biossíntese de antocianina no endosperma e embrião do milho, dificultando a seleção dos possíveis haploides (COE; NUEFFER; HOISINGTON, 1988; STINARD; SACHS, 2002).

De acordo com Chaikam et al. (2015), em um cruzamento de indução de haploidia, dependendo da homozigosidade e da heterozigosidade dos alelos inibidores na população, o marcador *R1-nj* pode ser completamente inibido ou a expressão da coloração pode segregar nos grãos de milho.

Portanto, para a identificação dos haploides, também estão sendo utilizados alelos para ausência de lígula e glossy (*lg1*, *lg2* e *gl1*) (FRITSCHÉ-NETO; BORÉM, 2013), além de outros marcadores moleculares (LASHERMES; BECKERT, 1988). Todos os métodos citados, com exceção do *R1-nj*, podem ser utilizados após a realização da duplicação cromossômica artificial dos possíveis haploides.

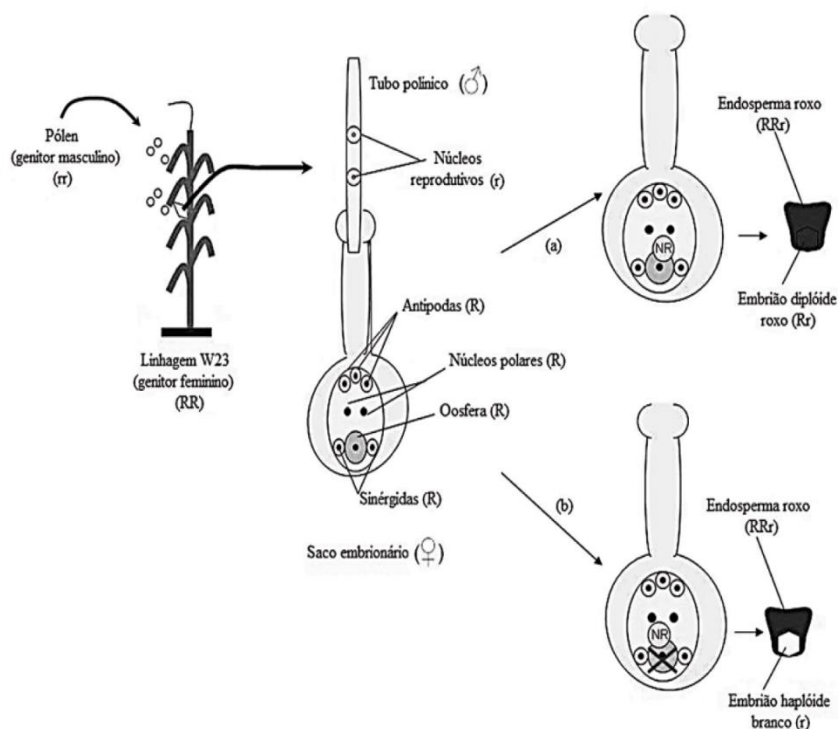


Figura 2. Mecanismo de funcionamento do marcador fenotípico R-navajo, em linhagens indutoras androgenéticas. Nesse caso, a linhagem indutora é utilizada como genitor feminino. (A) Embrião diplóide (Rr) de coloração roxa, oriundo da fecundação normal da oosfera (R) pelo núcleo reprodutivo (r). (B) Embrião haplóide androgenético (r), oriundo de divisões mitóticas. Este apresenta coloração branca, devido à ausência do alelo R (exclusivo do saco embrionário da linhagem indutora), que confere pigmentação com antocianina. Elaboração da figura: Patrícia M. O. Pierre.

Fonte: Pierre et al. (2011).

2.3.3 Duplicação cromossômica em haploides putativos de milho

A taxa de duplicação cromossômica espontânea em milho é de 0 a 10% (CHASE, 1969; KATO, 2002). Assim, como a duplicação espontânea não ocorre com frequência, protocolos de indução de duplicação têm sido desenvolvidos (PIERRE et al., 2011).

Agentes antimitóticos como: colchicina, muito utilizado para milho, e herbicidas, amiprofosfo-metil, orizalina e trifuralina, têm sido utilizados na duplicação cromossômica (PIERRE et al., 2011). De acordo com Castillo et al. (2009), a duplicação ocorre, pois esses compostos se ligam a tubulina, inibindo a formação do fuso mitótico, resultando na não-segregação das cromátides irmãs.

Utilizando-se a indução *in vivo*, esses agentes antimitóticos são aplicados diretamente nas plântulas ou as mesmas são imergidas em soluções contendo esses agentes. Porém, devido a inacessibilidade ao meristema e a necessidade da utilização de altas concentrações e volume de agente antimitótico, torna-se difícil a indução *in vivo* em plântulas de milho (CASTILLO et al., 2009).

A frequência de duplicação cromossômica espontânea em haploides de milho não tem sido satisfatória, assim, torna-se primordial, em programas de genética e melhoramento de plantas, o desenvolvimento de protocolos eficientes que possibilitarão a obtenção de plantas DH (WAN et al., 1991).

Couto (2013) avaliou dois protocolos de duplicação cromossômica, sendo que no primeiro, plântulas foram imersas em solução de colchicina 0,04% e de DMSO 0,5% por 12 horas, e no segundo raízes foram imersas em solução de colchicina 0,1%, DMSO 0,5% e Tween 20 0,1%, por 6 horas. Os protocolos apresentaram diferenças significativas, sendo que o protocolo 2 foi mais eficiente, apresentando as maiores taxas de plantas duplicadas, com valor de 69,33%, enquanto que o protocolo 1 apresentou taxas de 51,32%.

Instituições privadas, produtoras de sementes, possuem grande conhecimento dessa técnica e conseguem obter resultados promissores, porém os métodos utilizados por elas não são totalmente divulgados à sociedade (COUTO, 2013).

2.4 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica empregada na triagem e contagem de células e na detecção de biomarcadores, além de mensurar o conteúdo de DNA celular para estimar a distribuição do ciclo celular e estudos de ploidia (HAN et al., 2016; LAERUM; FARSUND, 1981). Essa técnica apresenta como principal característica a análise de propriedades ópticas de partículas com coloração em suspensão líquida (DOLEZEL, 1997).

Nos eucariontes o crescimento e a divisão celular são processos que ocorrem constantemente, sendo que o tempo entre cada mitose divide-se em três fases: G1, S e G2 (HOWARD; PELC, 1986). Na fase G1 ocorre o período de crescimento celular e nessa fase uma célula diploide apresenta um conteúdo 2C, consequentemente,

possui duas cópias de cada cromossomo. Na fase seguinte (fase S), ocorre a duplicação do genoma nuclear, obtendo um conteúdo 4C. Já na fase G2, a qual ocorre o segundo período de crescimento celular, o conteúdo de DNA nuclear é mantido o mesmo da fase S. Posteriormente ocorre a fase M, onde a célula está pronta para dividir-se em duas células filhas, ocorrendo a mitose e possuindo novamente um conteúdo de 2C de DNA. Em uma análise de ploidia, os histogramas obtidos pela análise de citometria de fluxo, apresentam picos de maior intensidade na fase G1 do ciclo celular quando comparado a fase G2, isso ocorre pois em uma população de células em crescimento o número de núcleos na fase G1 é maior que na fase G2 (BELICUAS, 2004).

A análise por citometria de fluxo do conteúdo de DNA nuclear baseia-se na intensidade de fluorescência relativa de núcleos corados com um fluorocromo específico para o DNA. A amostra a ser analisada por citometria de fluxo necessita se encontrar na forma de uma suspensão de partículas individuais (DOLEZEL, 1997). Ainda de acordo com o mesmo autor, para estimar o nível de ploidia o pico G1 da amostra analisada é comparado com o pico de uma planta padrão com ploidia conhecida.

Por ser um método de fácil preparação da amostra, rápido, não necessita de divisão celular, é não destrutivo e é capaz de detectar mixoploidia (DOLEZEL, 1997; LOUREIRO; SANTOS, 2004). Vários autores têm empregado esta técnica no estudo de duplo-haploides em milho, com o objetivo de confirmar a ploidia e, resultados satisfatórios tem sido obtidos (BATTISTELLI et al., 2013; BELICUAS et al., 2007; COUTO et al., 2013; RABEL, 2008; RIBEIRO, 2016).

3. REFERÊNCIAS

BATTISTELLI, G. M.; VON PINHO, R. G.; JUSTUS, A.; COUTO, E. G. O.; BALESTRE, M. Production and identification of doubled haploids in tropical maize. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, n. 4, p. 4230-4242, 2013.

BELICUAS, P. R. **Obtenção, identificação e caracterização de haplóides androgenéticos em milho**. 2004. 52 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2004.

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

BESPALHOK FILHO, J. C.; GUERRA, E. P.; OLIVEIRA, R.; **Variedades híbridas: obtenção e predição**, 2015. Disponível em: <www.bespa.agrarias.ufpr.br/paginas/livro/capitulo%2015.pdf>. Acesso em 22 de julho de 2017.

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

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

CHAIKAM, V.; NAIR, S. K.; MARTINEZ, R. B. L.; TEJOMURTULA, J.; BODDUPALLI, P. M. Analysis of effectiveness of R1-nj anthocyanin marker for in vivo haploid identification in maize and molecular markers for predicting the inhibition of R1-nj expression. **Theoretical Applied Genetics**, v. 128, p. 159-171, 2015.

CHALYK, S. T. Creating new haploid-inducing lines of maize. **Maize Genetics Cooperation**, Urbana, v. 79, p. 53-54, 1999.

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

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

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

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

COE, E. H. JR.; NUEFFER, M. G.; HOISINGTON, D. A. (1988) The genetics of corn. In: Sprague G. F.; Dudley J. W. (ed) **Corn and corn improvement**, 3rd ed. Madison, Wisconsin, p. 81–258.

CONAB - **Companhia Nacional de Abastecimento** (2018). Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Safra 2017/2018 Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 29 abr 2018.

COUTO, E. G. O. **Indução de haploides e duplicação cromossômica**. 2013. 104 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2013.

COUTO, E. G. O.; DAVUDE, L. M. C.; BUSTAMANTE, F. O.; VON PINHO, R. G.; SILVA, T. N. Identification of haploid maize by flow cytometry, morphological and molecular markers. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 37, n. 1, p. 25-31, 2013.

DEVAUX, P.; KASHA, K. J. Overview of barley doubled haploid production. In: TOURAEV, A.; FORSTER, B. P.; JAIN, S. M. (Ed.). **Advances in haploid production in higher plants**. New York: Springer, 2009. cap. 3, p. 47-63.

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

EAST, E. M. Inbreeding in corn. **Connecticut Agricultural Experiment Station Report for 1907**, New Haven, p. 419-428, 1908.

EAST, E. M. The distinction between development and heredity in inbreeding. **The American Naturalist**, Chicago, v. 43, p. 173-181, 1909.

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

FILHO, I. A. P.; BORGHI, E. **Mercado de sementes de milho no Brasil safra 2016/2017**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. 2016. 28p. (Documentos/Embrapa Milho e Sorgo, 202).

FAO– **Food and Agriculture Organization Statistical Databases (2017)**. Crops. FAO-Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <<http://www.fao.org/home/en/>>. Acesso em: 23 out 2017.

FORNASIERI FILHO, D. **Manual da cultura do milho**. Jaboticabal: Funep, 2007. p. 576.

FORSTER, B. P.; HEBERLE-BORS, E.; KASHA, K.; TOURAEV, A. The resurgence of haploids in higher plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 12, n. 8, p. 368-375, 2007.

FRITSCHÉ-NETO, R.; BORÉM, A. **Melhoramento de plantas para condições de estresses abióticos**. 1.ed. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2012. v. 1. 240p.

GIL-HUMANES, J.; BARRO, F. Production of doubled haploids in Brassica. In: TOURAEV, A.; FORSTER, B. P.; JAIN, S. M. (Ed.). **Advances in haploid production in higher plants**. New York: Springer, 2009. cap. 4, p. 65-73.

GIORGENON, C.H.B. **Capacidade de combinação para seleção de genótipos de milho**. 2015. 54 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) –Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal-SP, 2015.

GURGEL, F. L. **Grandes culturas** - A cultura do milho, 2006. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/31650688/A-Cultura-Do-Milho>>. Acesso em: 29 out 2017.

HAN, Y.; GU, Y.; ZHANG, A. C.; LO, Y. H. Review: imaging technologies for flow cytometry. **Lab on a Chip, The royal society of chemistry**, v. 16, p. 4639-4647, 2016.

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

JONES, D. F. The effects of inbreeding and crossbreeding upon development. **Connecticut Agricultural Experiment Station Bulletin**, New Haven, v. 207, p. 5-100, 1918.

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

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

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

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

KERMICLE, J. L.; DEMOPULOS-RODRIGUEZ, J. Location of indeterminate gametophyte (ig) on chromosome 3. **Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 54, p. 84-85, 1980.

LAERUM, O. D.; FARSUND, T. Clinical application of flow cytometry.: A review. **Cytometry. Pub Med**, v. 2, p. 1-13, 1981.

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

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

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

MIRANDA FILHO, J. B.; VIÉGAS, G. P. Milho híbrido. In: PATERNIANI, E.; VIÉGAS, G. P. **Melhoramento e produção do milho**. 2. ed. Campinas: Fundação Cargil, 1987. v. 1, p. 277-326.

MÔRO, G. V. Uso da seleção genômica e fenotípica em linhagens para a predição de testcrosses em milho. 2011. 116 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, 2011.

PATERNIANI, E. Métodos tradicionais de melhoramento de milho. In: BULL, L. T.; CANTARELLA, H. **Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: POTAFOS, 1993. p. 23-43.

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

PAUK, J.; JANCÓS, M.; SIMON-KISS, I. Rice doubled haploids and breeding. In: TOURAEV, A.; FORSTER, B. P.; JAIN, S. M. (Ed.). **Advances in haploid production in higher plants**. New York: Springer, 2009. cap. 16, p. 189-197.

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

PRIGGE, V.; SÁNCHEZ, C.; DHILLON, B. S.; SCHIPPRACK, W.; ARAUS, J. L.; BANZIGER, M.; MELCHINGER, E. A. Doubled haploids in tropical maize: effects of inducers and source germplasm on in vivo haploid induction rates. **Crop Science**, Madison, v. 51, n. 1, p. 1498-1506, 2011.

RABEL, M. Haploides androgenéticos em milho tropical. 2008. 57 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2008.

RIBEIRO, C. B. Estratégias para obtenção de duplo-haplodes e progênies indutoras de haploidia em milho. 2016. 113 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2016.

ROBER, F. K.; GORDILLO, G. A.; GEIGER, H. H. In vivo haploid induction in maize-performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding. **Maydica**, Bergamo, v. 50, n. ¾, p. 275-283, 2005.

ROKKA, V. M. Potato haploids and breeding. In: TOURAEV, A.; FORSTER, B. P.; JAIN, S. M. (Ed.). **Advances in haploid production in higher plants**. New York: Springer, 2009. cap. 17, p. 199-208.

ROTARENCO, V. A.; DICU, G.; SARMANIUC, M. Induction of maternal haploids in maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 83, 2009. Disponível em: <<http://www.agron.missouri.edu/mnl/83/46rotarenco.htm>>. Acesso em: 18 jul 2017.

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

SEGUNDO, J. P. Avaliação das taxas de indução de haploides utilizando o marcador R1-nj, em diferentes germoplasmas de milho. 2014. 55 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2014.

SHULL, G. H. The composition of a field of maize. **American Breeders Association Reports**, Washington, v. 4, p. 296-301, 1908.

SHULL, G. H. A pure line method of corn breeding. **American Breeders Association Reports**, Washington, v. 5, p. 51-59, 1909.

SHULL, G. H. Hybridization methods in corn breeding. **American Breeders Association Reports**, Washington, v. 6, p. 63-72, 1910.

SILVA, J. A. G.; CARVALHO, F. I. F.; SILVA, S. A.; BARBIERI, R. L.; MARCHIORO, V. S.; LORENCETTI, C. Temperatura e seus efeitos na polinização para a obtenção de embriões haplóides de trigo em cruzamento intergenérico. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 8, n. 2, p. 97-102, 2002.

SPRAGUE, G. F.; TATUM, L. A. General vs. Specific combining ability in single crosses of corn. **Journal of American Society of Agronomy**, Madison, v. 34, n. 10, p. 923-932, 1942.

STINARD, P. S.; SACHS M. M. The identification and characterization of two dominant r1 haplotype-specific inhibitors of aleurone color in *Zea mays*. **Journal of Heredity**, v. 93, p. 421–428, 2002.

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

USDA - **United States Department of Agriculture (2018)**. World corn supply and use. World agricultural supply and demand estimates. Disponível em: <<https://www.usda.gov/>>. Acesso em: 25 jul 2018.

VASIL, I. K. Haploid production in higher plants. A dedication. In: JAIN, S. M.; SOPORY, S. K.; VEILLEUX, R. E. (Ed.). **In vitro haploid production in higher plants**. Dordrecht: Kluwer, 1996. p. ix-x.

WAN, Y.; DUNCAN, D. R.; RAYBURN, A. L.; PETOLINO, J. F.; WIDHOLM, J. M. The use of antimicrotubule herbicides for the production of doubled-haploid plants from anther derived maize callus. **Theoretical Applied and Genetics**, Berlin v. 81, p. 205-211, 1991.

WEDZONY, M.; FORSTER, B. P.; ZUR, I.; GOLEMIEC, M.; SZECHYNSKA-HEBDA, E.; GOTEBIOWSKA, D. G. Progress in doubled haploid technology in higher plants. In: TOURAEV, A.; FORSTER, B. P.; JAIN, S. M. (Ed.). **Advances in haploid production in higher plants**. New York: Springer, 2009. cap. 1, p. 1-18.

CAPÍTULO 2 – Efficiency of maize haploid inducers

ABSTRACT - Maize breeding programs are focused on releasing novel high productive hybrids. Doubled-haploids appear as an alternative strategy to speed and reduce costs of maize hybrid synthesis process. The objective of the study was to evaluate the efficiency of maize haploid inducers by the R-navajo phenotypic marker. The experimental crossing fields were conducted in the 2013/2014, 2014/2015 and 2015/2016 crop seasons in Jaboticabal-SP, Brazil. Crossings were performed between single-cross hybrids and three groups of haploid inducers and, subsequently, putative haploid seeds obtained from the crossings were selected by R-navajo phenotypic marker. As results, there are differences between the induction rates of the three haploid inducers groups. In the 2015/2016 crop season the induction rate was 1 to 20%, 1 to 35% and 1 to 42% for groups 1, 2, and 3, respectively. Although they present variable rates of induction, the three haploid inducers groups are effective, allowing the formation of putative haploid seeds in a tropical climate. The inducers from group 3 present higher rates of haploid induction, being more promising for its adoption in breeding programs to obtain doubled-haploid inbred lines.

Keywords: Inducers, Genetic, Morphological marker, Plant breeding, R-navajo, *Zea mays*

1. INTRODUCTION

The majority of commercial maize seeds are hybrids. In order to obtain maize hybrids, it is necessary the development of inbred lines, which will be combined to form hybrids (SHULL, 1909). However, to achieve the homozygosity of the inbred lines, six to eight generations of successive self-pollination are required, which demands time and increases costs due to the high number of inbred lines that are selected in breeding programs (PATERNIANI; CAMPOS, 1999).

In this scenario, breeders have sought alternative methodologies to obtain inbred lines for a faster and less costly process, being doubled-haploid (DH) technology an important alternative for the development of inbred lines to obtain maize hybrids.

This technology is based on the use of inducers that can generate androgenetic or gynogenetic haploids. In androgenetic haploids, the inducer inbred line is used as a female genitor, recipient of pollen, and one of the sperm cells develops a pseudo-embryo after fertilization. In gynogenetic haploids, the inducer inbred line is used as

a male pollen donor, which the oosphere of the female parent develops a pseudo-embryo (PIERRE et al., 2011).

There are several advantages of using doubled-haploids in relation to the traditional process of obtaining inbred lines, such as: even after six to eight generations of self-pollination, loci in heterozygosis still occur in the traditional method, whereas with the DH the inbred lines are obtained with all loci in homozygosis; the time to obtain homozygous inbred lines is reduced by at least half; with DH the chance of maintaining existing combinations in parental inbred lines increases, since the recombination of linkage genes occurs only in meiosis, so most of the loci will not be recombined and the experiments performed for hybrid evaluation may have better quality, since all the plants generated from a haploid seed will be identical (PIERRE et al., 2011).

Chase and Nanda (1965) described a natural phenotypic marker system by means of anthocyanin, determined by the R-Navajo gene (R1-nj). This gene allows the identification of putative haploids (GREENBLATT; BOCK, 1967), which have a white staining embryo and a purple staining endosperm (CHASE; NANDA, 1965). Inducers usually originate from temperate regions, making it difficult to adapt to tropical regions.

At the outset, two maize haploid inducers were highlighted. The inbred line Stock 6 (COE, 1959), with induction rate around 3.2%, used as male parent (SARKAR; COE, 1966) and Wisconsin 23 (W23), with an induction rate varying from 1 to 3%, used as the female parent (KERMICLE, 1973). From these inbred lines, other genotypes were developed to increase haploid induction rates of these original inducers.

In order to obtain doubled-haploids, it is necessary to perform chromosome doubling after selection of putative haploids. The chromosome doubling can be induced in two ways, *in vitro* with antimetabolic agents added to the nutrient medium, or *in vivo*, by adding agents directly to the seedlings or by immersing them in antimetabolic solutions (PIERRE et al., 2011). The objective of the study was to evaluate the efficiency of maize haploid inducers by the R-navajo phenotypic marker.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Experimental field

The experimental crossing fields were conducted in the 2013/2014, 2014/2015 and 2015/2016 seasons in Jaboticabal-SP (21° 14' 33" S latitude, 48° 17' 10 " W longitude and altitude of 565 m). The climate is defined as Aw according to the International Classification System (KÖPPEN, 1931), with rainfall concentration in the summer. In all crossing fields, the cultural treatments were carried out according to the recommendations for maize cultivation.

2.2. Experimental procedures

Five maize single-cross hybrids (A, B, C, D and E) and three groups of haploid inducers were used (Table 1).

Table 1. Description of five maize single-cross hybrids and three groups of haploid inducers used in the experiments in Unesp, Jaboticabal-SP, in the 2013/2014, 2014/2015 and 2015/2016 crop seasons.

Single-cross hybrids	Type ¹	Cicle	Grains ²	Color
A	SH	Early	F	Orange
B	SH	Normal	F	Orange
C	SH	Early	SD	Orange-yellow
D	SH	Early	SD	Orange-yellow
E	SH	Early	F	Orange-yellow
Inducers	Description			
Group 1	Composed of 34 selected and inbreeding genotypes			
Group 2	Composed of partially inbreeding inducers, containing seeds with purple-colored endosperm and intense purple embryo marker			
Group 3	Composed of partially inbreeding inducers, with seeds presenting purple-colored endosperm and moderate purple embryo marker			

¹SH – Single-cross hybrid. ²F - Flint, SDT - semi-dent.

For the crossings between hybrids and inducers, in 2013/2014 season, hybrid A was sown in rows beside the inducers of group 1 to facilitate manual crossing. For the 2014/2015 and 2015/2016 seasons, single-cross hybrids B, C, D and E were

crossed with the three groups of haploid inducers. The single-cross hybrids and the inducers were also sown in separate rows beside each others. All inducers have a paternal origin, so the inducers were used as male parent at all crossings with the hybrids.

2.3. Selection of putative haploids by R-Navajo morphological marker

After manual harvesting and ear threshing of the crossings obtained in the three crop seasons, seeds with purple-colored endosperm and colorless embryo were selected as presenting the natural morphological marker R-Navajo, and considered as putative haploids (CHASE; NANDA, 1965).

2.4. Statistical analysis

After visual selection and seed counting, a chi-square test was performed considering as expected frequency the mean of several induction rates published in peer-reviewed journals. In this way, the theoretically expected frequency was 9%.

Thus, the hypotheses tested were:

H_0 = The observed data are adjusted to the expected frequency (9%), or

H_a = The observed data are not adjusted to the expected frequency (9%).

The test criteria was to reject the data at the expected frequency at the 5% probability level if the calculated χ^2 value was higher than the χ^2 tabulated.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. 2013/2014 Season

In the 2013/2014 season, it was possible to perform 27 crossings between the inducers of group 1 and hybrid A (Fig 1). The mean induction rate of putative haploids was 5.2% considering all inducers, ranging from 1 to 13%. Battisteli et al. (2013) and Rober, Gordillo and Geiger (2005) obtained mean induction of putative haploids of 7.1% and, 8.12 and 6.05%, respectively.

Between all crossings, 78% were significantly different when selected using the R-Navajo morphological marker. Haploid induction rates can be altered due to pollination period, crossing methodology adopted and environmental conditions (KEBEDE et al., 2011; ROTARENCO; DICU; SARMANIUC, 2009).

Among the significant crossings, 95% presented values below the expected frequency (9%), whereas the crossing between GI-57 and hybrid A was significantly higher than the 9% rate, being a promising crossing for putative haploids.

Regarding the crossings that were not significant (22%), these presented percentage of induction that does not differ from the expected frequency, showing itself within the standard of the inducers used by companies and research institutions.

The frequency observed considering the inducers capacity of induction was significantly, but lower than the frequency of induction found in the literature. It shows that the genotype can influence in the induction rate (Fig 1b).

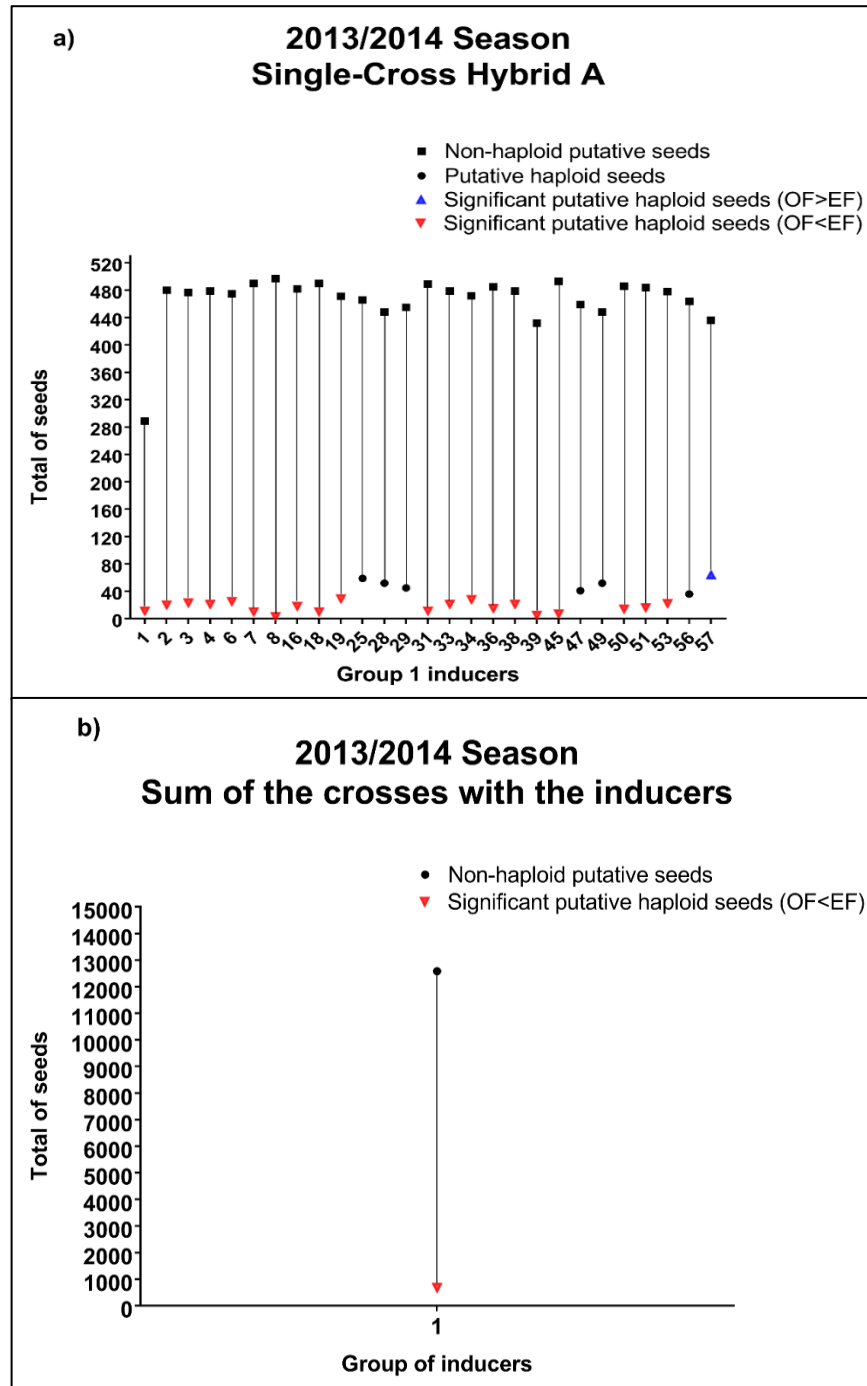


Fig 1. a) Observed frequencies with the significance of the chi-square test for the number of putative haploid and non-haploid in maize obtained from the crossings of the group 1 inducers with the hybrid A, identified by the R-Navajo. b) Frequency observed considering the inducer capacity of induction. 2013/2014 season in Jaboticabal-SP. OF - observed frequency. EF - expected frequency.

3.2. 2014/2015 season

In the 2014/2015 season, it was possible to obtain seeds of 28 crossings that were performed between the hybrids and the haploid inducers of the three groups (Fig 2a, b, c, d). Inducers of group 2 and group 3 were more vigorous than those of group 1 and less susceptible to pests and diseases. In addition, groups 2 and 3 were more adapted to tropical cultivation conditions, because they have a lower percentage of temperate germplasm and a lower degree of inbreeding when compared to those belonging to the group 1. Belicuas (2004), Rabel (2008) and Battistelli (2012), working with the W23 inducer, which was developed in a temperate climate, described susceptibility to end-of-cycle diseases and low adaptation to cultivation in tropical climate, which lead to a lower production of putative haploids. These results evidence that the selection of the three groups of inducers are important for the deployment of doubled-haploid programs for tropical climate.

The induction rate of haploids selected by the R-Navajo marker obtained from inducers of groups 1, 2 and 3, ranged from 1 to 13%, 1 to 26% and 3 to 48%, respectively. The mean haploid induction was 4.0, 5.8 and 8.3% for groups 1, 2, and 3, respectively. Belicuas et al. (2007) found a variation of 0 to 51% in the induction rate in crossings between the W23 inducer and the hybrid BRS1010.

Considering all crossings, 36% presented significant values for putative haploids, while 64% were non-significant when compared to the expected frequency of 9% of the chi-square test. Only the crossings between GIII-12 and hybrid C, and between GII-1 and hybrid E were significantly higher than the expected frequency (9%), while the rest of the significant crossings presented values below the expected frequency. The same inducer, crossed with different hybrids, presents different rates of induction, resulting in an interaction between haploid inducers and the genotypes with which they were crossed (BATTISTELLI et al., 2013; ROBER; GORDILLO; GEIGER, 2005).

It has been reported that the R-Navajo gene expression can vary between progenies derived from crossings of pure varieties or lines, including presence or absence of anthocyanin inhibition, seed segregation expressing the R-Navajo

phenotype, area marked by anthocyanin pigmentation, and intensity of coloration (CHAIKAM et al., 2015).

Regarding the inducers capacity of induction, the crossings with the groups 1 and 2 showed significant differences, with the observed frequency lower than the expected frequency, indicating that the induction rate is below the average of the inducers induction rate found in the literature (Fig 2e). On the other hand, crossings with group 3 did not present significant differences, indicating that these crossings have similar induction rate to the average of the inducers found in the literature.

Considering all crossings with the hybrids, it is observed that the crossings with hybrids B and C did not present significant differences when compared to the expected induction frequency of 9%, showing that these crossings do not differ from the crossings with the currently used inducers. The crossings with hybrids D and E presented significant differences and lower values when compared with the average of 9%, indicating that these crossings are less promising (Fig 2f).

Couto et al. (2015) working with four single-cross maize hybrids and the KEMS inducer found differences in the haploid induction rate between hybrids, corroborating with the results found in this work. Battistelli et al. (2013) also reported differences between the haploid induction rate in crossings between two haploid inducers and six maize hybrids.

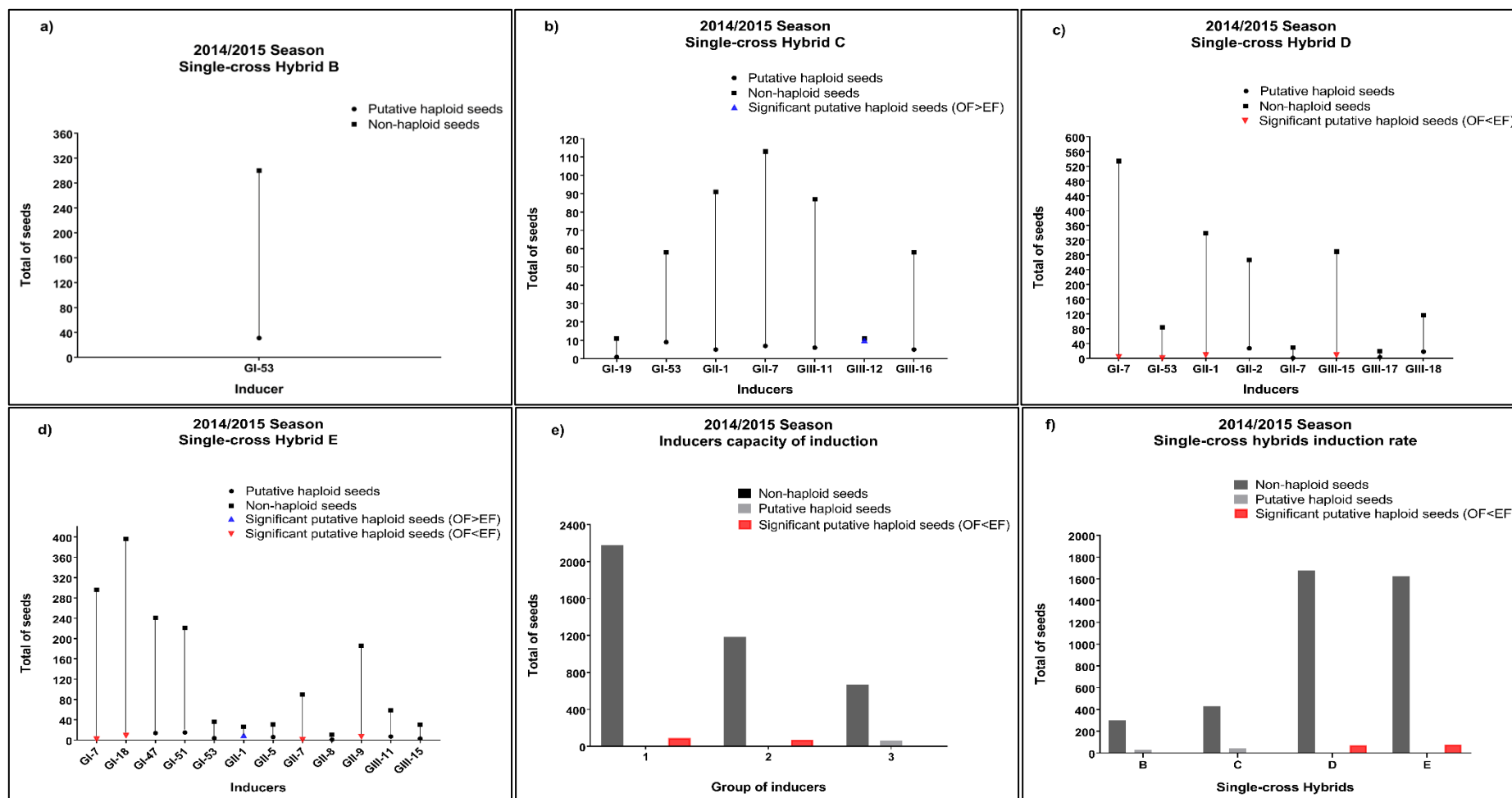


Fig 2. a, b, c, d) Observed frequencies with the significance of the chi-square test for the number of putative haploids and non-haploids in maize obtained from the crossings of the groups 1, 2 and 3 inducers with the hybrids B, C, D and E, identified by the R-Navajo. e) Inducers capacity of induction. f) Single-cross hybrids induction rate. 2014/2015 season in Jaboticabal-SP. OF - observed frequency. EF - expected frequency.

3.3. 2015/2016 season

The number of seeds obtained between the crossings of the inducers and the single-cross hybrids was satisfactory (Fig 3). Couto (2013) also achieved good results working with inducers from temperate climate in tropical regions. Performing crossings between inducers of temperate and tropical origins, both in temperate and tropical conditions, Prigge et al. (2011) did not find differences between the rate of haploid induction. Thus, inducers from temperate regions can be used under tropical conditions, although better results are obtained when temperate inducers are adapted to tropical regions.

It was possible to obtain 103 crossings, considering the four hybrids (B, C, D and E) and the inducers from the three groups. The average of putative haploids from groups 1, 2 and 3 were 6.3, 8.1 and 10.2%, respectively. The rates of some crossings are related to the low number of seeds obtained in these crossings and can overestimate the results (COUTO, 2013).

The variation of the observed induction rate was 1 to 20%, 1 to 35% and 1 to 42% for groups 1, 2, and 3, respectively. Couto et al. (2013) using the KEMS inducer, found induction rates varying from 3.7 to 19.7%, considering the haploid selection by the R-Navajo gene, obtaining an average of 9.16%, a similar value to the averages found in the 2015/2016 season in this work.

The haploid induction rate was significantly higher in 25% of the crossings, producing more putative haploids than the expected frequency. Conversely, 24% of the crossings presented putative haploid frequencies significantly lower than the expected frequency. The others 51% of the crossings did not present significant differences, this indicates that 76% of the crossings presented values better than or equal to the average obtained from the mean haploid induction rate from the literature, evidencing the efficiency of induction of the evaluated genotypes.

The three groups presented significant differences in relation to the expected induction frequency when analyzed the inducers capacity of induction (Fig 3e). However, only crossings with the inducers of group 3 presented frequency higher than the expected frequency, being superior relative to groups 1, 2, and the average of inducers currently used.

According to Couto et al. (2015), different hybrids may influence the haploid induction rate when using the R-Navajo morphological marker. In the present work, when comparing the single-cross hybrids induction rate, it was observed that all of them obtained significant values, but only hybrid B obtained higher value than the expected frequency, showing that the crossings between the inducers and this hybrid were more promising, also confirming the interaction of the inducer with the hybrids induced (Fig 3f).

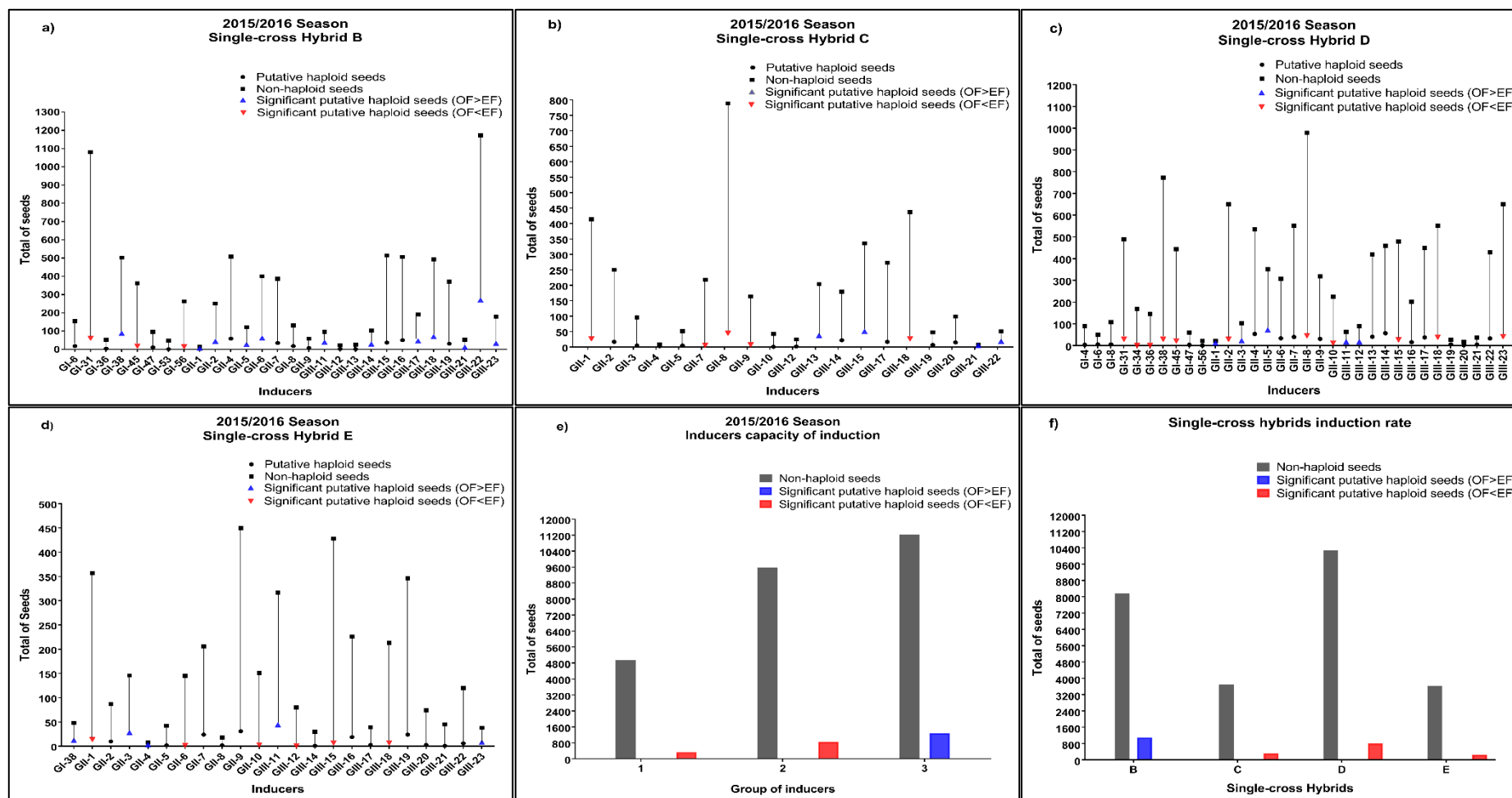


Fig 3. a, b, c, d) Observed frequencies with the significance of the chi-square test for the number of putative haploids and non-haploids in maize obtained from the crossings of the groups 1, 2 and 3 inducers with the hybrids B, C, D and E, identified by the R-Navajo. e) Inducers capacity of induction. f) Single-cross hybrids induction rate. 2015/2016 season in Jaboticabal-SP. OF - observed frequency. EF - expected frequency.

4. CONCLUSIONS

Although they present variable rates of induction, the three groups haploid inducers are effective, making possible the formation of putative haploids in a tropical climate.

The inducers from group 3 present higher rates of putative haploid induction, being more promising for its adoption in breeding programs to obtain doubled-haploid inbred lines.

5. REFERENCES

BATTISTELLI, G. M. **Estratégias para obtenção e identificação de duplo-haploides em milho tropical**. 2012. 61 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras- MG, 2012.

BATTISTELLI, G. M.; VON PINHO, R. G.; JUSTUS, A.; COUTO, E. G. O.; BALESTRE, M. Production and identification of doubled haploids in tropical maize. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, n. 4, p. 4230-4242, 2013.

BELICUAS, P. R. **Obtenção, identificação e caracterização de haplóides androgenéticos em milho**. 2004. 52 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2004.

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**, v. 156, n. 1/2, p. 95-102, 2007.

CHAIKAM, V.; NAIR, S. K.; MARTINEZ, R. B. L.; TEJOMURTULA, J.; BODDUPALLI, P. M. Analysis of effectiveness of R1-nj anthocyanin marker for in vivo haploid identification in maize and molecular markers for predicting the inhibition of R1-nj expression. **Theoretical Applied Genetics**, v. 128, p. 159-171, 2015.

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

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

COUTO, E. G. O. **Indução de haploides e duplicação cromossômica**. 2013. 104 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2013.

COUTO, E. G. O.; DAVIDE, L. M. C.; BUSTAMANTE, F. O.; VON PINHO, R. G.; SILVA, T. N. (2013) Identification of haploid maize by flow cytometry, morphological and molecular markers. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 37, n. 1, p. 25-31, 2013.

COUTO, E. G. O.; VON PINHO, E. V. R.; VON PINHO, R. G.; VEIGA, A. D.; BUSTAMANTE, F. O.; DIAS, K. O. G. In vivo haploid induction and efficiency of two chromosome duplication protocols in tropical maize. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 39, n. 5, p. 435-442, 2015.

GREENBLATT, I. M.; BOCK, M. A commercially desirable procedure for detection of monoploids in maize. **Journal of Heredity**, v. 58, n. 1, p. 9-13, 1967.

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

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

KÖPPEN, W. (1931) *Grundriss der Klimakunde*. Berlin, Walter de Gruyter. 369 pp

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

PIERRE, P. M. O.; DAVIDE, L. M. C.; COUTO, E. G. O.; SILVA, T. N.; 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**, v. 10, n. 1, p. 1-16, 2011.

PRIGGE, V.; SÁNCHEZ, C.; DHILLON, B. S.; SCHIPPRACK, W.; ARAUS, L. A.; BANZIGER, M.; MELCHINGER, A. E. Doubled haploids in tropical maize: effects of inducers and source germplasm on in vivo haploid induction rates. **Crop Science**, v. 51, n. 1, p. 1498-1506, 2011.

RABEL, M. Haploides androgenéticos em milho tropical. 2008. 57 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2008.

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

ROTARENCO, V. A.; DICU, G.; SARMANIUC, M. Induction of maternal haploids in maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 83, 2009. Disponível em: <<http://www.agron.missouri.edu/mnl/83/46rotarenco.htm>>. Acesso em: 18 abr 2017.

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

SHULL, G. H. A. Pure-line method of corn breeding. **American Breeders Association**, v. 5, p. 51-59, 1909.

CAPÍTULO 3 – Eficiência de identificação de haploides putativos e linhagens duplo-haploides em milho utilizando diferentes técnicas de seleção

RESUMO - Uma das principais dificuldades nos programas de melhoramento genético de milho, é a obtenção de linhagens. Melhoristas buscam novas alternativas para tornar esse processo mais rápido e com menor custo e a tecnologia do duplo-haploide é viável. Objetivou-se avaliar a eficiência de identificação de haploides putativos pelo marcador R-navajo, comprimento, vigor e coloração de plântulas e de linhagens duplo-haploides pela citometria de fluxo em genótipos de milho. Para isso foram utilizados cinco híbridos de milho e três grupos de indutores de haplodia, os quais foram semeados e cruzados nas safras 2013/2014, 2014/2015 e 2015/2016. Das sementes provenientes dos cruzamentos selecionou-se os possíveis haploides pelo marcador morfológico visual R-navajo, pela avaliação de comprimento de raiz, vigor e coloração de plântulas e, após a duplicação cromossômica dos possíveis haploides, realizou-se análises de citometria de fluxo com os genótipos sobreviventes em campo para confirmação das ploidias e descartes de falsos haploides. Constatou-se plantas diploides e diploides/tetraploides após a realização da citometria de fluxo. A utilização do marcador morfológico R-navajo e a avaliação do comprimento, vigor e coloração de plântulas são análises primárias de seleção de possíveis haploides, porém outras técnicas de avaliação devem ser realizadas a fim de confirmar a ploidia e descartar falsos haploides selecionados. A técnica de citometria de fluxo permitiu o descarte de falsos haploides e é uma técnica de fácil execução e rapidez.

Palavras-chaves: citometria de fluxo, genética, melhoramento de plantas, R-navajo, *Zea mays*,

ABSTRACT - One of the main difficulties in maize breeding programs is obtaining inbred lines. Plant breeders have been looking for new alternatives to make this process faster and with a lower cost and doubled-haploid technology is an alternative. The objective of this study was to evaluate the efficiency of putative haploid identification by the R-Navajo marker, length, vigor and staining of seedlings and doubled-haploid lines by flow cytometry in maize genotypes. Five maize hybrids and three groups of haploid inducers were used, which were sown and crossed in the 2013/2014, 2014/2015 and 2015/2016 seasons. Possible haploids seeds were selected by the visual morphological marker R-Navajo, by the evaluation of root length, vigor and seedling staining and, after chromosome doubling of the possible haploids, flow cytometry analyzes were performed with the surviving genotypes in the field to confirm the ploidy and false-haploids. Diploid and diploid/tetraploid plants were observed by flow cytometry. The use of the R-Navajo morphological marker and the evaluation of the length, vigor and the staining of seedlings are primary analyzes of possible haploids selection, but other evaluation techniques must be performed in order to confirm the ploidy and to discard selected false-haploids. The technique of flow cytometry allowed the discarding of false-haploids and it is a technique of easy and fast execution.

Keywords: flow cytometry, genetics, plant breeding, R-navajo, *Zea mays*,

1. INTRODUÇÃO

Uma das principais dificuldades nos programas de melhoramento genético de milho, que visam a produção de híbridos, é a obtenção de linhagens. Esta etapa é umas das mais demoradas e com maior custo, pois para atingir a homozigose são necessárias de seis a oito gerações de autofecundações (PATERNIANI; CAMPOS, 1999).

Assim, melhoristas buscam novas alternativas para tornar esse processo mais rápido e menos oneroso e a tecnologia do duplo-haploide é uma alternativa viável. Utilizando este método é possível obter linhagens homozigotas em apenas duas gerações a partir da duplicação cromossômica de plântulas haploides (CHASE, 1952). O método de duplo-haploide pode ser resumido em quatro etapas: produção de sementes haploides pelo cruzamento de um genótipo com uma fonte de indutor de haploidia, separação das semente haploides resultantes do cruzamento, duplicação cromossômica das plântulas ou plantas que se desenvolvem a partir das sementes haploides e autofecundação das plantas resultantes (PRIGGE; MELCHINGER, 2012).

Dois métodos podem ser utilizados para obtenção de haploides na cultura do milho, a indução *in vivo* e *in vitro*. O método *in vivo* é o mais utilizado e constitui-se na utilização de linhagens indutoras de haploides, as quais são cruzadas com genótipos de milho realizando-se, posteriormente, a duplicação cromossômica (GEIGER; GORDILLO, 2009).

A duplicação cromossômica era uma limitação na produção de linhagens duplo-haploides, em consequência da baixa frequência de duplicação espontânea e a pouca eficiência dos protocolos de duplicação artificial (BATTISTELLI, 2012). Atualmente diversos autores têm utilizado a duplicação cromossômica e obtido porcentagens variáveis de sementes duplicadas (COUTO et al., 2013; RIBEIRO, 2016).

Dessa maneira, torna-se importante a identificação e confirmação da duplicação de sementes haploides e a diferenciação das sementes formadas por meio de fertilização convencional. O método mais utilizado, até os dias atuais, é a seleção a partir do marcador morfológico R-navajo, o qual está presente nos indutores de haploidia e expressa a marcação roxa no endosperma e no embrião, possibilitando a diferenciação das sementes haploides, as quais terão endosperma com coloração

roxa e embrião branco. O marcador R-navajo não apresenta precisão na indicação das sementes haploides por ter penetrância incompleta (RABEL, 2008). A expressão da antocianina pode variar significativamente em diferentes germoplasmas, indicando a influência de fatores não genéticos ou ambientais e, possivelmente, da expressão gênica dos antecessores (CHAIKAM et al., 2015; CHASE 1952; KEBEDE et al. 2011; PRIGGE et al., 2011; ROBER; GORDILLO; GEIGER, 2005).

Várias características têm sido analisadas, além do marcador R-navajo, como vigor, comprimento de parte aérea e raiz e coloração de radícula e/ou coleóptilo. A citometria de fluxo é outra análise de relevância, tendo por objetivo avaliar o conteúdo de DNA das amostras, possibilitando a verificação da ploidia e permitindo analisar a duplicação cromossômica como também a indução de haploides (COUTO et al., 2013; DANG et al., 2012). É uma técnica de fácil e rápida preparação das amostras onde os resultados são obtidos com rapidez (COUTO, 2013; LOUREIRO; SANTOS, 2004).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de identificação de haploides putativos pelo marcador R-navajo, comprimento, vigor e coloração de plântulas e de linhagens duplo-haploides pela citometria de fluxo em genótipos de milho.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Área experimental e material vegetal

Os experimentos foram conduzidos em campo na Fazenda de Ensino Pesquisa e Extensão da Unesp em Jaboticabal-SP, (Latitude 21°14'33" S, longitude 48°17'10" W e altitude de 565 m), nos anos agrícolas 2013/2014, 2014/2015 e 2015/2016. O clima é definido como Aw de acordo com o Sistema Internacional de Classificação (KÖPPEN, 1931), com concentração de chuvas no verão. Foram utilizados cinco híbridos simples (A, B, C, D e E) e três grupos de indutores de haplodia (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição dos cinco híbridos de milho e dos três grupos indutores de haploidia utilizados nos experimentos na Unesp, Jaboticabal-SP, nos anos agrícolas 2013/2014, 2014/2015 e 2015/2016.

Híbrido	Tipo ¹	Ciclo	Grãos ²	Coloração
A	HS	Precoce	D	Alaranjado
B	HS	Normal	SD	Alaranjado
C	HS	Precoce	SDT	Amarelo-alaranjada
D	HS	Precoce	SDT	Amarelo-alaranjada
E	HS	Precoce	SD	Amarelo-alaranjada
Indutores		Descrição		
Grupo 1	Composto por 34 genótipos já selecionados e endogâmicos			
Grupo 2	Indutores parcialmente endogâmicos, possuindo sementes com endosperma marcado e marcação (coloração) forte no embrião.			
Grupo 3	Indutores parcialmente endogâmicos, possuindo sementes com endosperma marcado e marcação (coloração) fraca no embrião.			

¹HS - Híbrido Simples. ²D - Duro, SD - semi-duro, SDT - semi-dentado.

2.2. Condução do experimento em campo

Nas três safras, 2013/2014, 2014/2015 e 2015/2016, foram semeadas linhas com os híbridos intercaladas com os indutores, separadamente, para cruzamentos manuais.

Na safra 2013/2014 foram realizados cruzamentos entre o híbrido simples A e os indutores pertencentes ao Grupo 1. Com relação as safras 2014/2015 e 2015/2016 foram utilizados os híbridos simples B, C, D e E, os quais foram cruzados com os indutores dos Grupos 1, 2 e 3.

Todos os indutores são de origem paterna, assim foram utilizados como parental masculino nos cruzamentos com os híbridos. Nas safras foram realizadas adubação de base e duas adubações de cobertura de acordo com as seguintes dosagens: 400 kg/ha do formulado 08-28-16 e 200 kg/ha do formulado 30-0-10 e 200 kg/ha de uréia, respectivamente. Os demais tratos culturais necessários foram realizados de acordo com as recomendações para a cultura do milho (EMBRAPA, 2010).

2.3. Seleção dos haploides putativos por meio do marcador R-navajo

Após a colheita e debulha manual das espigas dos cruzamentos obtidos nas três safras, as sementes foram identificadas e separadas visualmente pela marcação (coloração) roxa do endosperma e do embrião, considerando o marcador morfológico natural R-navajo. Sementes com endosperma roxo e embrião branco foram consideradas possíveis haploides, sendo selecionadas, conforme descrito por Chase e Nanda (1965). As sementes que apresentaram endosperma e embrião roxos foram classificadas como diploides e as sementes que não apresentaram coloração no endosperma e embrião foram consideradas como contaminação, não sendo selecionadas.

2.4. Germinação e seleção das plântulas

No Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Produção Vegetal da Unesp, Jaboticabal-SP, as sementes identificadas como haploides putativos, a partir da seleção do marcador morfológico R-navajo, foram desinfestadas com hipoclorito 2% e colocadas para germinar em papel germitest umedecido na proporção de 2,5 vezes a massa seca (g) do substrato, sendo alocadas até 15 sementes por rolo de papel, os quais foram mantidos em germinador a 25° C (BRASIL, 2009) (Figuras 1 e 2).



Figura 1. Sementes de milho identificadas como possíveis haploides, desinfestadas com hipoclorito 2% e colocadas em papel germitest umedecido.



Figura 2. Rolos de papel germitest com as sementes de milho identificadas como possíveis haploides em germinador a 25 °C.

Após 72 horas os rolos de papel foram retirados do germinador e avaliou-se as plântulas levando-se em consideração o vigor e a coloração do coleóptilo, plantas com parte aérea superior a 3 cm e raiz a 4 cm e/ou radícula com coloração roxa, não foram consideradas haploide e foram descartadas (Figura 3). Os resultados foram expressos em porcentagem.

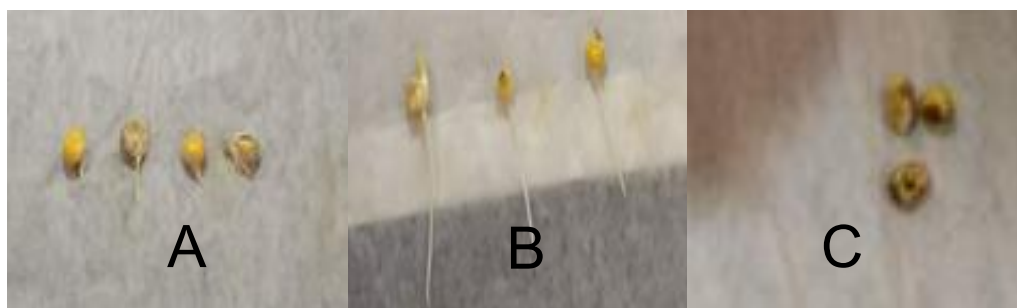


Figura 3. Plântulas classificadas de acordo com a parte aérea e raiz. A – plântula haploide putativo, B – plântula diploide e C – sementes mortas.

2.5. Duplicação cromossômica

No Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Melhoramento de Plantas do Departamento de Produção Vegetal da Unesp, Jaboticabal-SP, preparou-se a solução de 0,06% de colchicina e 0,5% de dimetilsufóxido (DMSO). Posteriormente, no Laboratório de Análise Química do Departamento de Produção Vegetal da Unesp, Jaboticabal-SP, realizou-se um pequeno corte no coleóptilo das plântulas selecionadas como haploides putativos, a fim de facilitar a absorção da solução de duplicação cromossômica. Posteriormente, as plântulas foram identificadas e imergidas em uma bandeja de plástico contendo a solução de duplicação cromossômica, sendo mantidas no escuro por 12 horas (COUTO, 2013; PRASANNA; CHAIKAM; MAHUKU, 2012).

Após as 12 horas, as plântulas foram lavadas por 20 minutos em água corrente no Laboratório de Plantas Daninhas do Departamento de Biologia da Unesp, Jaboticabal-SP, o qual possui local correto para descarte de resíduos (Figura 4).



Figura 4. Plântulas possíveis haploides de milho sendo lavadas em água corrente.

A seguir, as plântulas foram transplantadas em bandejas de isopor contendo substrato e foram aclimatadas em casa de vegetação por 15 dias (Figura 5). Após sete e 15 dias, do transplântio, foram realizadas contagens de plantas sobreviventes.

Todos os tratos culturais para o desenvolvimento das plantas foram realizados e quando necessário, utilizou-se irrigação artificial.



Figura 5. Plântulas possíveis haploides de milho plantadas em bandejas com substrato.

Após 15 dias do transplante em bandejas, as mudas sobreviventes foram levadas a campo, plantadas em canteiros e identificadas (Figura 6). Aos 15 e 30 dias após o plantio foram realizadas contagens das plantas sobreviventes e adubações de acordo com as seguintes dosagens: 200 kg/ha do formulado 20-0-20 e 200 kg/ha de uréia, respectivamente. Utilizou-se irrigação por aspersão quando necessário e os demais tratos culturais para a condução do experimento em campo foram realizados, seguindo as recomendações para a cultura.



Figura 6. Plantio das plântulas possíveis haploides de milho em canteiros.

2.6. Citometria de Fluxo

A análise de citometria de fluxo foi realizada no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Setor de Citometria do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel da Unesp, Jaboticabal-SP. Para isso foram coletadas 20-30 mg de folhas, na época do florescimento (65 dias após o plantio das mudas) dos híbridos e das progênies plantados em canteiros. Utilizou-se como padrão externo de referência 20-30 mg de folhas jovens da espécie *Pisum sativum* (9,09 pg/2C). As amostras foram maceradas em cadinho contendo 1 mL de tampão LB01 gelado para obtenção da suspensão nuclear (DOLEZEL, 1997), adicionou-se 2,5 µL de RNase e corou-se com 25 µL de iodeto de propídeo (1 mg mL⁻¹). Cada suspensão foi analisada no citômetro de fluxo Facs Canto (BD Biosciences – Becton, Dickinson and Company) utilizando o software BD FACSDiva.

Comparando-se a posição do pico G1 das amostras com o pico G1 do padrão externo de referência, que possui índice de DNA conhecido, foi possível estimar o conteúdo de DNA nuclear (pg) de cada amostra. Para essa comparação foi utilizada a seguinte expressão:

$$DI = (E/S) \times R, \text{ em que:}$$

DI é o índice de DNA da amostra avaliada (pg/2C).

E é a posição do pico G1 da amostra.

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

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

Obtendo a quantidade de DNA foi possível inferir sobre o nível de ploidia dos genótipos avaliados.

2.7. Autofecundação dos Genótipos

Para realização da autofecundação em campo, as espigas foram protegidas com sacos de plástico transparentes antes da emissão do estilo-estigma das plantas. Foram autofecundadas todas as plantas que apresentaram sincronismo com relação a produção de pólen e emissão do estilo-estigma. Realizou-se cortes nas espigas de plantas que possuíam pólen fértil e ainda não haviam emitido o estilo-estigma, buscando-se acelerar o desenvolvimento do estilo-estigma para que a autofecundação pudesse ser realizada.

Realizou-se a colheita, contagem e debulha de todas as espigas das plantas autofecundadas que produziram sementes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos indutores foram capazes de induzir possíveis haploides, corroborando com Silva (2016), que avaliou cruzamentos de indutores com seis populações de milho e também observou indução de haplodia por todos os indutores (Figura 7). Levando-se em consideração as três safras, 2013/2014, 2014/2015 e 2015/2016, os cruzamentos realizados entre o grupo 1 de indutores de haploidia com os híbridos foram os que apresentaram a maior quantidade de sementes produzidas, totalizando 20.818 sementes, seguido pelos grupos 3 e 2, que produziram 13.230 e 11.664 sementes, respectivamente.

Devido a não coincidência de florescimento e a quantidade limitada de pólen de alguns genótipos, não foi possível realizar todos os cruzamentos entre os híbridos

e os indutores de haplodia, principalmente na safra 2014/2015, fato esse que pode explicar a quantidade menor de sementes obtidas nessa safra.

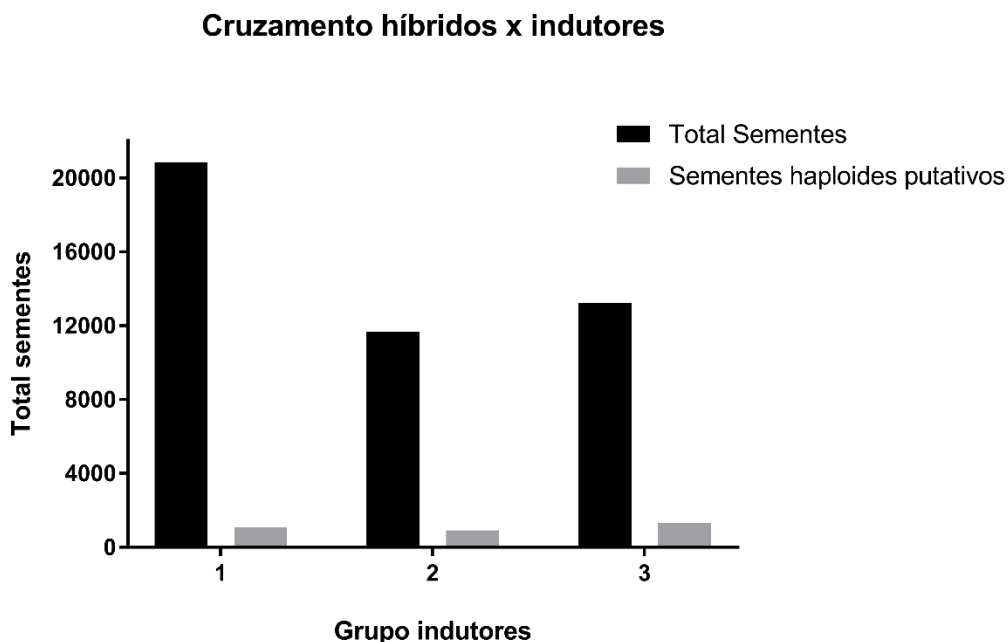


Figura 7. Total de sementes obtidas dos cruzamentos dos híbridos de milho com os três grupos indutores de haploidia e total de sementes haploides putativos.

A partir das sementes obtidas nas três safras foram selecionados os haploides putativos levando-se em consideração o marcador morfológico R-navajo ($R1-\eta$), sementes com endosperma roxo e embrião branco foram selecionadas (Figura 8).

Os grupos indutores de haploidia apresentaram diferentes taxas de indução, 5,29, 7,85 e 10,11%, para os grupos 1, 2 e 3, respectivamente, com média de 7,75%. Valores estes semelhantes aos encontrados por Battistelli (2012) e Couto et al (2015), sendo 3,7 e 11,6% e 3,8 e 15,4%, respectivamente. No entanto, esses valores são maiores aos encontrados por Ribeiro (2016) que também comparou a indução de haploidia em milho em diferentes safras e obteve valores variando de 1,82 a 3,14%, com média de 2,48%.

O alelo marcador $R1-\eta$ possui penetrância incompleta e a expressão do fenótipo R-navajo pode variar entre progênies derivadas de cruzamentos de raças ou linhas endogâmicas, incluindo presença/ausência de inibição da cor da antocianina, segregação de grãos que expressam o fenótipo R-navajo, área marcada por antocianina, pigmentação e intensidade da cor (CHAIKAM et al., 2015; PRIGGE et al.,

2011; RABEL, 2008). Dessa maneira, a avaliação de outras características para seleção de haploides torna-se importante, objetivando o descarte de falsos haploides.

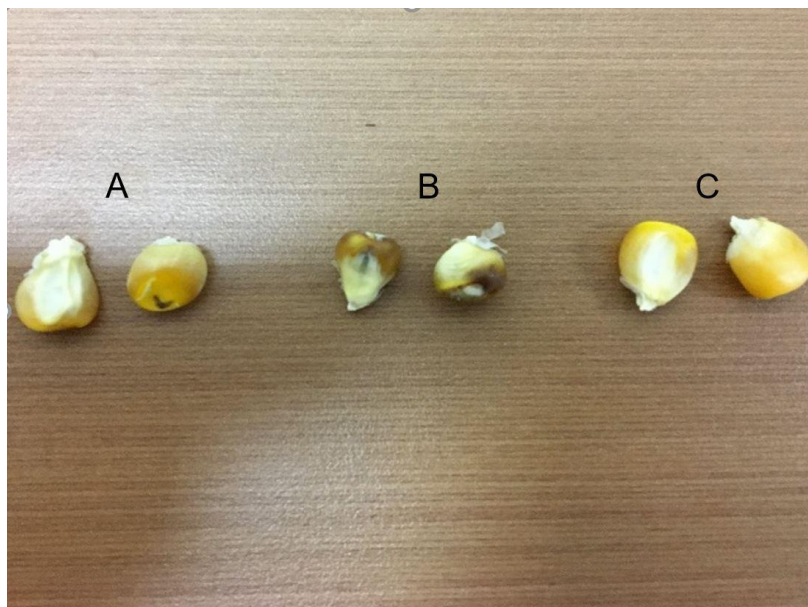


Figura 8. Sementes classificadas de acordo com o marcador morfológico R-navajo. A - semente possível haploide, B - semente diploide e C - contaminação.

A avaliação da coloração da radícula e coleóptilo tem sido utilizada por diversos autores e tem-se mostrado eficiente para a discriminação de haploides e falsos haploides (CHAIKAM et al., 2016; ROTARENCO et al., 2010).

Nas análises de germinação e avaliação de plântulas verificou-se alta taxa de falsos haploides selecionados anteriormente pelo marcador morfológico R-navajo, corroborando com Battistelli (2012) (Figura 9). Os cruzamentos realizados com os grupos de indutores de haploidia 1, 2 e 3 apresentaram porcentagem de falsos haploides de 77,62, 79,46 e 76,38%, respectivamente.

Após essa avaliação, apenas as plântulas selecionadas como possíveis haploides foram submetidas ao protocolo de duplicação cromossômica. Assim, a identificação eficiente dos haploides antes da realização da duplicação cromossômica permite uma economia de reagentes químicos, espaço em casa de vegetação e campo, produtos agroquímicos, mão de obra e manejo de diploides em campo (CHAIKAM et al., 2016).

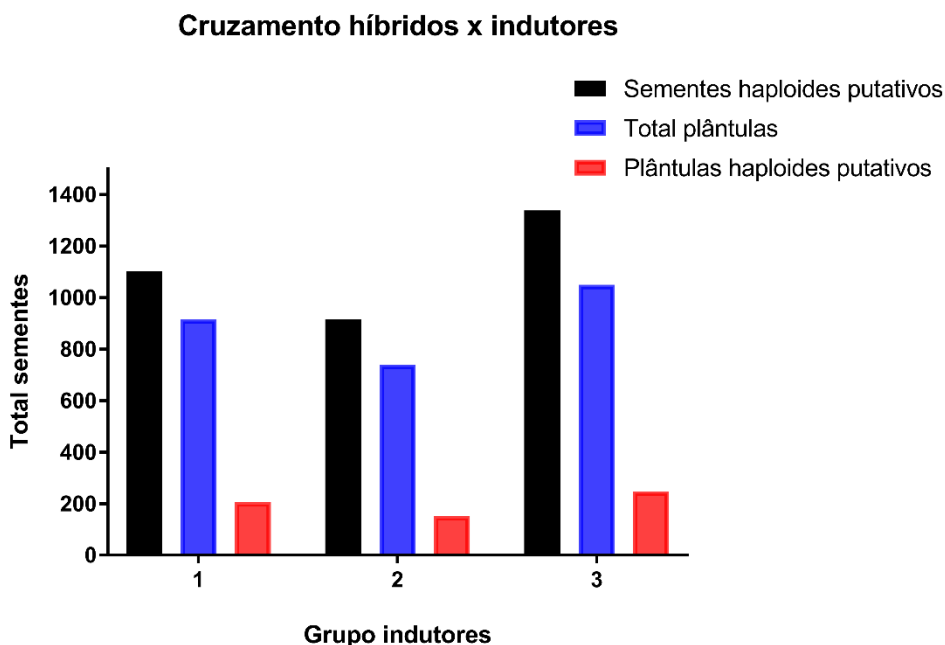


Figura 9. Total de sementes possíveis haploides e plântulas selecionadas como possíveis haploides.

Os três grupos indutores de haploidia apresentaram diminuição no número de plântulas vivas após a duplicação cromossômica, o que pode ser atribuído ao efeito tóxico da colchicina, concordando com Battistelli (2012). Os genótipos provenientes dos cruzamentos com os três grupos indutores de haplodia, apresentaram taxa de sobrevivência de 52,20, 56,58 e 56,05%, respectivamente, com uma média de 54,94%, após a etapa de duplicação cromossômica (Figura 10).

Battistelli (2012), Dang et al. (2012) e Couto (2013) obtiveram valores superiores de sobrevivência de plantas, 62, 67,7 e 85,5%, respectivamente, quando utilizaram haploides duplicados em milho. Eder e Chalyk (2002) conseguiram 90,8% de sobrevivência de plântulas de milho cultivadas em casa de vegetação após o tratamento com colchicina.

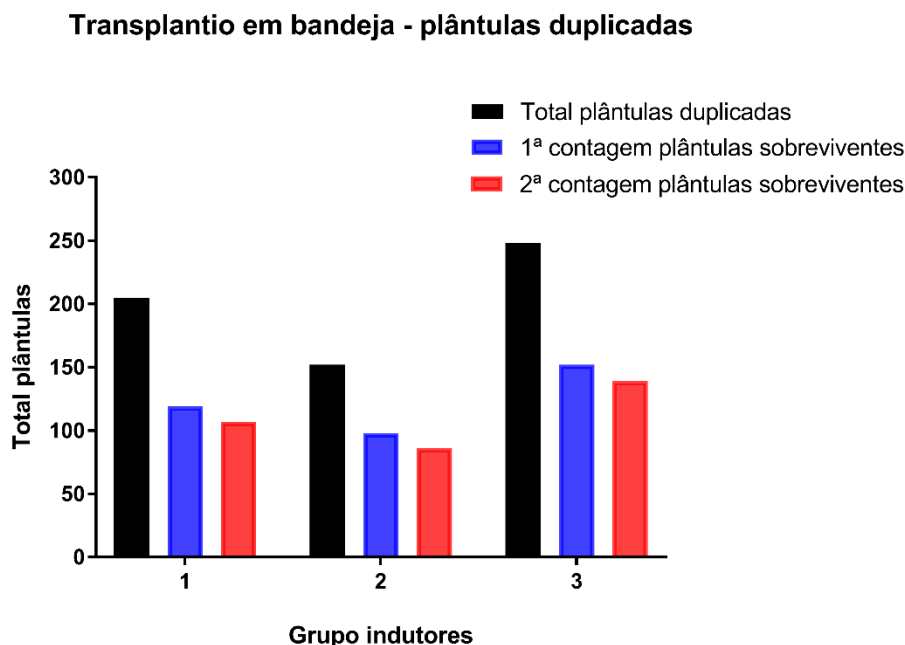


Figura 10. Total de plântulas de milho duplicadas e transplantadas em bandejas, e sobreviventes na primeira e segunda contagem.

Após as contagens das plantas sobreviventes em campo, pode-se observar que muitas plantas não resistiram e morreram (Figura 11). Couto (2013) também averiguou a redução do número de plantas sobreviventes em campo. Isso pode ser explicado pela mudança de ambiente, em casa de vegetação as plantas estavam em condições controladas e não estavam em exposição ao sol como em campo. Outro motivo pela diminuição da quantidade de plantas sobreviventes pode ter sido a não adaptação com a colchicina, que é um reagente tóxico.

As progênies obtidas dos cruzamentos entre os híbridos e os indutores do grupo 3, foram as que apresentaram a maior porcentagem de sobrevivência em campo com um valor de 74,82%. A média geral de plantas sobreviventes em campo foi de 69,45% sendo maior que a média das plantas sobreviventes após a duplicação cromossômica (54,94%), indicando que com o passar dos dias as plantas sobreviventes foram se adaptando ao ambiente. Couto (2013) apresentou média geral de porcentagem de sobrevivência em campo de 72,1%, menor que a observada após a duplicação cromossômica.

Plantas anormais, por exemplo, com desenvolvimento de estilo-estigma no pendão, evidenciando a ação da colchicina, foram descartadas do experimento,

facilitando a visualização de quais plantas puderam ser autofecundadas para a obtenção de sementes.

Diversos pesquisadores encontraram plantas anormais em campo após o processo de duplicação cromossômica. Couto (2013) também encontrou plantas com o desenvolvimento de estilo-estigma no pendão, além de plantas com manchas amarelas em todas as folhas, podendo ser uma mutação. Battistelli (2012) e Rotarenco (2000) relataram plantas menos vigorosas em campo e Couto et al. (2013) observaram plantas com folhas frágeis, quebradiças e com disposição diferente.

É importante a avaliação da porcentagem de plantas que produziram espigas, a fim de confirmar a efetividade da duplicação cromossômica (Figura 11). Nem todas as plantas sobreviventes em campo produziram espigas, somente 58,21, 47,54 e 65,38%, grupos 1, 2 e 3, respectivamente. Levou-se em consideração todas as espigas produzidas independentemente da ploidia das plantas. Couto (2013) colheu 82 espigas de ploidias variadas de 537 plantas sobreviventes em campo.

Além disso, muitas plantas que produziram quantidades elevadas de pólen não possuíam estilo-estigma receptivo, não sendo possível a sua autofecundação, corroborando com Battistelli (2012), Couto (2013) e Dang et al. (2012) que também encontraram plantas que produziram pólen e não possuíam estilo-estigma ou apresentavam desenvolvimento tardio das espigas. Geiger e Schonleben (2011) observaram várias plantas haploides produzindo pólen viável em fontes de germoplasma de milho elite dentado.

Plantas de milho transplantadas em campo

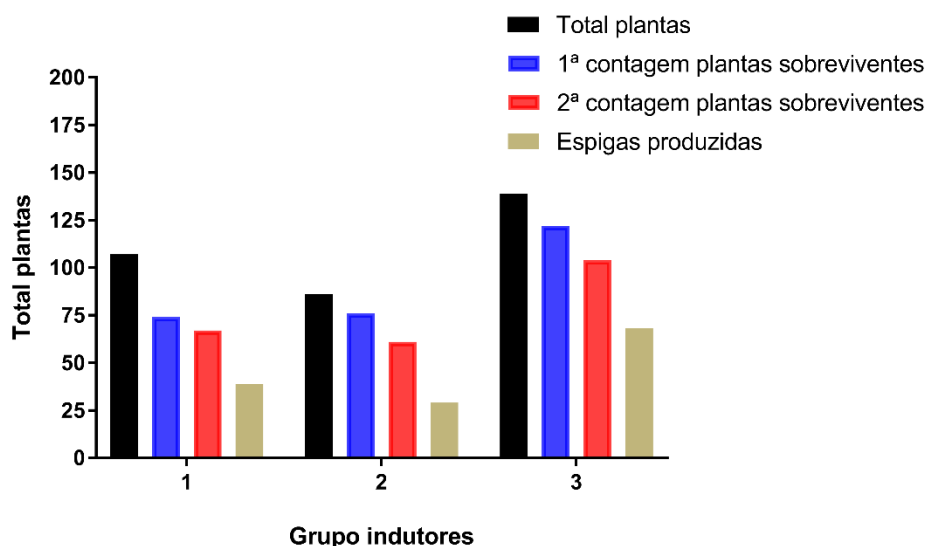


Figura 11. Total de plantas de milho plantadas em canteiros, primeira e segunda contagem de plantas sobreviventes e total de espigas produzidas.

As análises de citometria de fluxo foram realizadas com todas as plantas sobreviventes à duplicação cromossômica e ao plantio em campo. Dessa forma, realizou-se a análise em 228 plantas, sendo 65 oriundas dos cruzamentos com o grupo 1, 61 obtidas pelos cruzamentos com o grupo 2 e 102 geradas a partir dos cruzamentos com o grupo 3 de indutores de haploidia (Figura 12). Assim, levando-se em consideração todas as plantas que foram tratadas com colchicina (Figura 10), somente 37,69% puderam ser submetidas a análise de citometria de fluxo (Figura 12). Battistelli (2012) e Dang et al. (2012) alcançaram valores maiores de plantas sobreviventes até a realização da citometria, 62 e 65,7%, respectivamente. Isto pode ser explicado pelo fato de que os autores citados realizaram essa análise poucos dias após a duplicação cromossômica e nesse trabalho a análise foi realizada no período de florescimento dos genótipos.

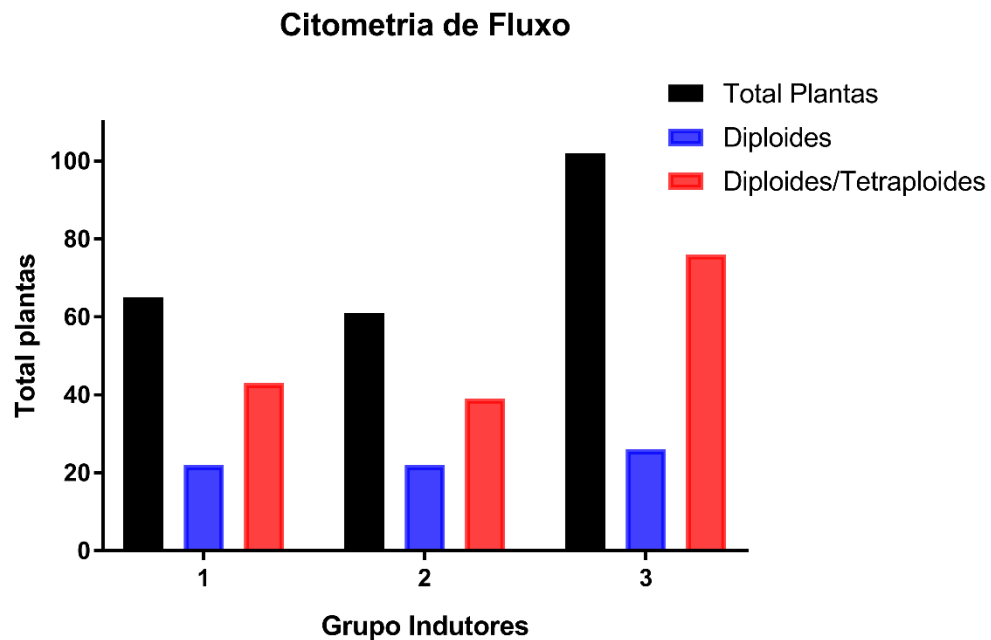


Figura 12. Ploidias detectadas após a análise de citometria de fluxo nas plantas sobreviventes de milho em campo.

Foi possível verificar pela técnica de citometria de fluxo plantas diploide e diploide/tetraploide (Figura 12 e 13). Nas Figuras 13 (a e b) são apresentados os histogramas da planta padrão *Pisum sativum* e de um parental híbrido de milho, respectivamente. Na Figura 13 (c) observa-se o histograma de uma amostra diploide. Nota-se que a Figura 13 (d) apresenta 2 picos altos G1 de células diploide e tetraploide, indicando que a planta apresenta variação no número cromossômico em um mesmo tecido (BATTISTELLI, 2012). Todas as ploidias detectadas foram obtidas pela comparação do pico dos histogramas das plantas duplicadas com o pico dos histogramas dos parentais híbridos (B, C, D e E) e do padrão externo utilizado, *Pisum sativum*.

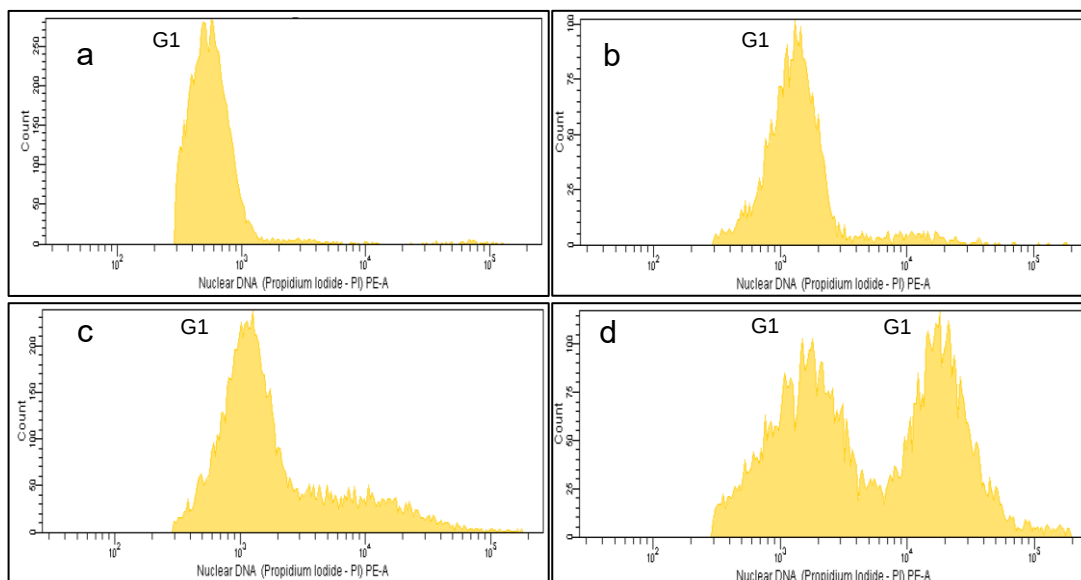


Figura 13. a) Histograma do padrão externo *Pisum sativum*. b) Histograma de híbrido de milho c) Planta diploide d) planta diploide/tetraploide.

Do total das plantas analisadas, 30,70% foram dadas como diploide e 69,30% como diploide/tetraploide. O grupo 2 obteve a maior quantidade de plantas diploide com um total de 36,07%. Com relação as plantas oriundas dos cruzamentos com os grupos 1 e 2, 33,85% e 25,49%, respectivamente, foram verificadas como sendo diploide. As plantas diploide/tetraploides não foram consideradas como duplo-haploides, sendo consideradas como falso haploides, os quais haviam sido selecionados de acordo com as análises anteriores. Acredita-se que seja muito difícil de se obter uma planta completamente diploide após a indução de duplicação cromossômica, então sementes obtidas da autofecundação das plantas que foram consideradas diploides, pela citometria de fluxo, devem ser semeadas em campo e avaliadas quanto ao seu desenvolvimento e a segregação entre plantas. Havendo segregação das características das plantas, certifica-se que não eram plantas duplo-haploides (BATTISTELLI et al., 2013).

4. CONCLUSÕES

A utilização do marcador morfológico R-navajo e a avaliação do comprimento, vigor e coloração de plântulas são análises primárias de seleção de possíveis

haploides, porém outras técnicas de avaliação devem ser realizadas a fim de confirmar a ploidia e descartar falsos haploides selecionados.

A técnica de citometria de fluxo permitiu o descarte de falsos haploides e é uma técnica de fácil execução e rapidez.

5. REFERÊNCIAS

BATTISTELLI, G. M. **Estratégias para obtenção e identificação de duplo-haploides em milho tropical**. 2012. 61 f. *Dissertação* (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2012.

BATTISTELLI, G. M.; VON PINHO, R. G.; JUSTUS, A.; COUTO, E. G. O.; BALESTRE, M. Production and identification of doubled haploids in tropical maize. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, n. 4, p. 4230-4242, 2013.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 399p. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/arquivos/publicacoes-insumos/2946_regras_analise_sementes.pdf>. Acesso em: 23 fev 2018.

CHAIKAM, V.; NAIR, S. K.; BABU, R.; MARTINEZ, L. REJOMURTULA, J.; BODDUPALLI, P. M. Analysis of effectiveness of R1-nj anthocyanin marker for in vivo haploid identification in maize and molecular markers for predicting the inhibition of R1-nj expression. **Theoretical Applied Genetics**, v. 128, p. 159-171, 2015.

CHAIKAM, V.; MARTINEZ, L.; MELCHINGER, A. E.; SCHIPPRACK, W.; BODDUPALLI, P. M. Development and validation of red root marker-based haploid inducers in maize. **Crop Science**, v. 56, p. 1678-1688, 2016.

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

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

COUTO, E. G. O. **Indução de haploides e duplicação cromossômica**. 2013. 104 f. *Dissertação* (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2013.

COUTO, E. G. O.; DAVIDE, L. M. C.; BUSTAMANTE, F. O.; VON PINHO, R. G.; SILVA, T. N. Identification of haploid maize by flow cytometry, morphological and molecular markers. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 37, n. 1, p. 25-31, 2013.

COUTO, E. G. O.; VON PINHO, E. V. R.; VON PINHO, R. G.; VEIGA, A. D.; BUSTAMANTE, F. O.; DIAS, K. O. G. In vivo haploid induction and efficiency of two chromosome duplication protocols in tropical maize. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 39, n. 5, p. 435-442, 2015.

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

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

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

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo. **Cultivo do milho**. 6. Ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. (Sistema de produção, 2).

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

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

KEBED, A. Z. et al. Effect of source germplasm and season on the in vivo haploid induction rate in tropical maize. **Euphytica**, Wageningen, v. 180, n. 1, p. 219-226, 2011.

KÖPPEN, W. (1931) *Grundriss der Klimakunde*. Berlin, Walter de Gruyter. 369 pp

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

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

PRASANNA, B. M.; CHAIKAM, V.; MAHUKU, G. **Doubled haploid technology in maize breeding: theory and practice**. Mexico: CIMMYT, 2012. p. 50.

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

PRIGGE, V.; SÁNCHEZ, C.; DHILLON, B. S.; SCHIPPRACK, W.; ARAUS, J. L.; BANZIGER, M.; MELCHINGER, A. E. Doubled haploids in tropical maize: I. effects of inducers and source germplasm on in vivo haploid induction rates. **Crop Science**, Madison, v. 51, n. 1, p. 1498-1506, 2011.

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

RIBEIRO, C. B. **Estratégias para obtenção de duplo-haplodes e progênes indutoras de haploidia em milho**. 2016. 113 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2016.

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

ROTARENCO, V. A.; DICU, G.; STATE, D.; FUJA, S. New inducers of maternal haploids in maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 84, 2010.

ROTARENCO, V. A. The comparative characteristic of the correlation between the traits of maize diploids and haploids. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 74, n. 1, p. 14-15, 2000.

SILVA, M. V. **Avaliação de indutores na obtenção de duplo-haplóides em germoplasma tropical de milho**. 2016. 37 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2016.

APÊNDICE

CAPÍTULO 2 – Efficiency of tropical haploid inducers in maize

Table 1. Observed and expected frequencies with the significance of the chi-square test for the number of putative haploids and non-haploid in maize, identified by the R-Navajo morphological marker obtained of the crossings of the group 1 inducers with the single-cross hybrid A in the 2013/2014 season in Jaboticabal-SP.

Single-Cross Hybrid A			
Inducer	Ploidy	OF (%)	EF (%)
GI-1	Put. Hap.	11 (4)*	27 (9)
	Non-Hap.	289 (96)	273 (91)
GI-2	Put. Hap.	20 (4)*	45 (9)
	Non-Hap.	480 (96)	455(91)
GI-3	Put. Hap.	23 (5)*	45 (9)
	Non-Hap.	477 (95)	455 (91)
GI-4	Put. Hap.	21 (4)*	45 (9)
	Non-Hap.	479 (96)	455 (100)
GI-6	Put. Hap.	25 (5)*	45 (9)
	Non-Hap.	475 (95)	455 (91)
GI-7	Put. Hap.	10 (2)*	45 (9)
	Non-Hap.	490 (98)	455 (91)
GI-8	Put. Hap.	3 (1)*	45 (9)
	Non-Hap.	497 (99)	455 (91)
GI-16	Put. Hap.	18 (4)*	45 (9)
	Non-Hap.	482 (96)	455 (91)
GI-18	Put. Hap.	10 (2)*	45 (9)
	Non-Hap.	490 (98)	455 (91)
GI-19	Put. Hap.	29 (6)*	45 (9)
	Non-Hap.	471 (94)	455 (91)
GI-25	Put. Hap.	59 (11)	47 (9)
	Non-Hap.	466 (89)	478 (91)
GI-28	Put. Hap.	52 (10)	45 (9)
	Non-Hap.	448 (90)	455 (91)
GI-29	Put. Hap.	45 (9)	45 (9)
	Non-Hap.	455 (91)	455 (91)
GI-31	Put. Hap.	11 (2)*	45 (9)
	Non-Hap.	489 (98)	455 (91)
Inducer capacity of induction			
Inducer	Ploidy	OF (%)	EF (%)
GI	Put. Hap.	679 (5)*	1.193 (9)
	Non-Hap.	12.583 (95)	12.069 (91)

Putative haploid (Put. Hap.), Non-haploids (Non-Hap.), Observed frequency (OF), Expected frequency (EF). * - Significant value at the 5% probability level according to the chi-square test. Values that do not have * are considered insignificant at the 5% probability level.

Table 2. Observed and expected frequencies with the significance of the chi-square test for the number of putative haploids and non-haploid in maize, identified by the R-Navajo morphological marker obtained of the crossings of the groups 1, 2 and 3 inducers with the single-cross hybrids B, C, D and E in the 2014/2015 season in Jaboticabal-SP.

Single-cross Hybrid B							
Inducer		Ploidy		OF (%)		EF (%)	
GI-53		Put. Hap.		31 (9)		30 (9)	
		Non-Hap.		300 (91)		301 (91)	
Single-cross Hybrid C							
Inducer	Ploidy	OF (%)	EF (%)	Inducer	Ploidy	OF (%)	EF (%)
GI-19	Put. Hap.	1 (9)	1 (9)	GIII-11	Put. Hap.	6 (6)	8 (9)
	Non-Hap.	11 (91)	11 (91)		non-Hap.	87 (94)	85 (91)
GI-53	Put. Hap.	9 (13)	6 (9)	GIII-12	Put. Hap.	10 (48)*	2 (9)
	Non-Hap.	58 (87)	61 (91)		Non-Hap.	11 (52)	19 (91)
GII-1	Put. Hap.	5 (5)	9 (9)	GIII-16	Put. Hap.	5 (8)	6 (9)
	Non-Hap.	91 (95)	87 (91)		Non-Hap.	58 (92)	57 (91)
GII-7	Put. Hap.	7 (6)	11 (9)	-	-	-	-
	Non-Hap.	113 (94)	109 (91)				
Single-cross Hybrid D							
Inducer	Ploidy	OF (%)	EF (%)	Inducer	Ploidy	OF (%)	EF (%)
GI-7	Put. Hap.	4 (1)*	48 (9)	GII-7	Put. Hap.	1 (3)	3 (9)
	Non-Hap.	534 (99)	490 (91)		Non-Hap.	29 (97)	27 (91)
GI-53	Put. Hap.	1 (1)*	8 (9)	GIII-15	Put. Hap.	9 (3)*	27 (9)
	Non-Hap.	84 (99)	77 (91)		Non-Hap.	289 (97)	271 (91)
GII-1	Put. Hap.	9 (3)*	31 (9)	GIII-17	Put. Hap.	3 (14)	2 (9)
	Non-Hap.	339 (97)	317 (91)		Non-Hap.	19 (86)	20 (91)
GII-2	Put. Hap.	27 (9)	26 (9)	GIII-18	Put. Hap.	18 (13)	12 (9)
	Non-Hap.	266 (91)	267 (91)		Non-Hap.	117 (87)	123 (91)
Single-cross Hybrid E							
Inducer	Ploidy	OF (%)	EF (%)	Inducer	Ploidy	OF (%)	EF (%)
GI-7	Put. Hap.	2 (1)*	27 (9)	GII-5	Put. Hap.	6 (16)	3 (9)
	Non-Hap.	296 (99)	271 (91)		Non-Hap.	31 (84)	34 (91)
GI-18	Put. Hap.	9 (2)*	36 (9)	GII-7	Put. Hap.	1 (1)*	8 (9)
	Non-Hap.	396 (98)	369 (91)		Non-Hap.	90 (99)	83 (91)
GI-47	Put. Hap.	14 (5)	23 (9)	GII-8	Put. Hap.	1 (9)	1 (9)
	Non-Hap.	241 (95)	232 (91)		Non-Hap.	11 (91)	11 (91)
GI-51	Put. Hap.	15 (6)	21 (9)	GII-9	Put. Hap.	7 (4)*	17 (9)
	Non-Hap.	221 (94)	215 (91)		Non-Hap.	186 (96)	176 (91)
GI-53	Put. Hap.	4 (9)	4 (9)	GIII-11	Put. Hap.	7 (11)	6 (9)
	Non-Hap.	36 (91)	36 (91)		Non-Hap.	59 (89)	60 (91)
GII-1	Put. Hap.	9 (26)*	3 (9)	GIII-15	Put. Hap.	3 (9)	3 (9)
	Non-Hap.	26 (74)	32 (91)		Non-Hap.	30 (91)	30 (91)
Inducer capacity of induction							
Inducer	Ploidy	OF (%)	EF (%)	Inducer	Ploidy	OF (%)	EF (%)
GI	Put. Hap.	90 (4)*	204 (9)	GIII	Put. Hap.	61 (8)	66 (9)
	Non-Hap.	2.177 (96)	2.063 (91)		Non-Hap.	670 (92)	665 (91)
GII	Put. Hap.	73 (6)*	112 (9)	-	-	-	-
	Non-Hap.	1.182 (94)	1.143 (91)				
Single-cross hybrids induction rate							
Hybrid	Ploidy	OF (%)	EF (%)	Hybrid	Ploidy	OF (%)	EF (%)
B	Put. Hap.	31 (9)	30 (9)	D	Put. Hap.	72 (4)*	157 (9)
	Non-Hap.	300 (91)	301 (91)		Non-Hap.	1.677 (96)	1.592 (91)
C	Put. Hap.	43 (9)	43 (9)	E	Put. Hap.	78 (5)*	152 (9)
	Non-Hap.	429 (91)	429 (91)		Non-Hap.	1.623 (95)	1.549 (91)

Putative haploid (Put. Hap.), Non-haploids (Non-Hap.), Observed frequency (OF), Expected frequency (EF). * - Significant value at the 5% probability level according to the chi-square test. Values that do not have * are considered insignificant at the 5% probability level.

Table 3. Observed and expected frequencies with the significance of the chi-square test for the number of putative haploids and non-haploid in maize, identified by the R-Navajo morphological marker obtained of the crossings of the groups 1, 2 and 3 inducers with the single-cross hybrid B, C, D and E in the 2015/2016 season in Jaboticabal-SP.

Single-cross Hybrid B							
Inducer	Ploidy	OF (%)	EF (%)	Inducer	Ploidy	OF (%)	EF (%)
GI-6	Put. Hap.	18 (10)	16 (9)	GII-8	Put. Hap.	18 (12)	13 (9)
	Non-Hap.	155 (90)	157 (91)		Non-Hap.	131 (88)	136 (91)
GI-31	Put. Hap.	61 (5)*	103 (9)	GII-9	Put. Hap.	8 (12)	6 (9)
	Non-Hap.	1.081 (95)	1.039 (91)		Non-Hap.	58 (88)	60 (91)
GI-36	Put. Hap.	4 (7)	5 (9)	GIII-11	Put. Hap.	38 (28)*	12 (9)
	Non-Hap.	52 (93)	51 (91)		Non-Hap.	96 (72)	122 (91)
GI-38	Put. Hap.	87 (15)*	53 (9)	GIII-12	Put. Hap.	2 (8)	2 (9)
	Non-Hap.	502 (85)	536 (91)		Non-Hap.	22 (92)	22 (91)
GI-45	Put. Hap.	18 (5)*	34 (9)	GIII-13	Put. Hap.	1 (4)	2 (9)
	Non-Hap.	362 (95)	346 (91)		Non-Hap.	26 (96)	25 (91)
GI-47	Put. Hap.	11 (10)	10 (9)	GIII-14	Pos. Hap.	28 (21)*	12 (9)
	Non-Hap.	96 (90)	97 (91)		Não Hap.	103 (79)	119 (91)
GI-53	Put. Hap.	1 (2)	4 (9)	GIII-15	Put. Hap.	37 (7)	50 (9)
	Non-Hap.	48 (98)	45 (91)		Non-Hap.	515 (93)	502 (91)
GI-56	Put. Hap.	15 (5)*	25 (9)	GIII-16	Put. Hap.	50 (9)	50 (9)
	Non-Hap.	262 (95)	252 (91)		Non-Hap.	507 (91)	507 (91)
GII-1	Put. Hap.	5 (24)*	2 (9)	GIII-17	Put. Hap.	45 (19)*	21 (9)
	Non-Hap.	16 (76)	19 (91)		Non-Hap.	191 (81)	215 (91)
GII-2	Put. Hap.	43 (15)*	26 (9)	GIII-18	Put. Hap.	69 (12)*	51 (9)
	Non-Hap.	251 (85)	268 (91)		Non-Hap.	493 (88)	511 (91)
GII-4	Put. Hap.	59 (10)	51 (9)	GIII-19	Put. Hap.	31 (8)	36 (9)
	Non-Hap.	508 (90)	516 (91)		Non-Hap.	371 (92)	366 (91)
GII-5	Put. Hap.	26 (18)*	13 (9)	GIII-21	Put. Hap.	11 (17)*	6 (9)
	Non-Hap.	122 (82)	135 (91)		Non-Hap.	53 (83)	58 (91)
GII-6	Put. Hap.	61 (13)*	41 (9)	GIII-22	Put. Hap.	269 (19)*	130 (9)
	Non-Hap.	400 (87)	420 (91)		Non-Hap.	1.172 (81)	1.311 (91)
GII-7	Put. Hap.	35 (8)	38 (9)	GIII-23	Put. Hap.	32 (15)*	19 (9)
	Non-Hap.	387 (92)	384 (91)		Non-Hap.	179 (85)	192 (91)
Single-cross Hybrid C							
Inducer	Ploidy	OF (%)	EF (%)	Inducer	Ploidy	OF (%)	EF (%)
GII-1	Put. Hap.	27 (6)*	40 (9)	GIII-13	Put. Hap.	37 (15)*	22 (9)
	Non-Hap.	414 (94)	401 (91)		Non-Hap.	204 (85)	219 (91)
GII-2	Put. Hap.	17 (6)	24 (9)	GIII-14	Put. Hap.	22 (11)	18 (9)
	Non-Hap.	250 (94)	243 (91)		Non-Hap.	179 (89)	183 (91)
GII-3	Put. Hap.	5 (5)	9 (9)	GIII-15	Put. Hap.	50 (13)*	35 (9)
	Non-Hap.	96 (95)	92 (91)		Non-Hap.	336 (87)	351 (91)
GII-4	Put. Hap.	3 (25)	1 (9)	GIII-17	Put. Hap.	17 (6)	26 (9)
	Non-Hap.	9 (75)	11 (91)		Non-Hap.	273 (94)	264 (91)
GII-5	Put. Hap.	5 (9)	5 (9)	GIII-18	Put. Hap.	27 (6)*	42 (9)
	Non-Hap.	52 (91)	52 (91)		Non-Hap.	437 (94)	422 (91)
GII-7	Put. Hap.	6 (3)*	20 (9)	GIII-19	Put. Hap.	7 (13)	5 (9)
	Non-Hap.	218 (97)	204 (91)		Non-Hap.	48 (87)	50 (91)
GII-8	Put. Hap.	45 (5)*	75 (9)	GIII-20	Put. Hap.	15 (13)	10 (9)
	Non-Hap.	789 (95)	759 (91)		Non-Hap.	99 (87)	104 (91)
GII-9	Put. Hap.	8 (5)*	15 (9)	GIII-21	Put. Hap.	5 (42)*	1 (9)
	Non-Hap.	164 (95)	157 (91)		Non-Hap.	7 (58)	11 (91)
GII-10	Put. Hap.	1 (2)	4 (9)	GIII-22	Put. Hap.	18 (26)*	6 (9)
	Non-Hap.	43 (98)	40 (91)		Non-Hap.	51 (74)	63 (91)
GIII-12	Put. Hap.	2 (7)	2 (9)	-	-	-	-
	Non-Hap.	25 (93)	25 (91)				
Single-cross Hybrid D							
Inducer	Ploidy	OF (%)	EF (%)	Inducer	Ploidy	OF (%)	EF (%)
GI-4	Put. Hap.	4 (4)	9 (9)	GII-8	Put. Hap.	46 (4)*	92 (9)
	Non-Hap.	91 (96)	86 (91)		Non-Hap.	979 (96)	933 (91)

GI-6	Put. Hap.	6 (11)	5 (9)	GII-9	Put. Hap.	31 (9)	32 (9)
	Non-Hap.	49 (89)	50 (91)		Non-Hap.	319 (91)	318 (91)
GI-8	Put. Hap.	6 (5)	10 (9)	GII-10	Put. Hap.	12 (5)*	21 (9)
	Non-Hap.	108 (95)	104 (91)		Non-Hap.	226 (95)	217 (91)
GI-31	Put. Hap.	30 (6)*	46 (9)	GIII-11	Put. Hap.	17 (21)*	7 (9)
	Non-Hap.	490 (94)	474 (91)		Non-Hap.	64 (79)	74 (91)
GI-34	Put. Hap.	1 (1)*	16 (9)	GIII-12	Put. Hap.	17 (16)*	10 (9)
	Non-Hap.	169 (99)	154 (91)		Non-Hap.	89 (84)	96 (91)
GI-36	Put. Hap.	2 (1)*	13 (9)	GIII-13	Put. Hap.	41 (9)	41 (9)
	Non-Hap.	145 (99)	134 (91)		Non-Hap.	420 (91)	420 (91)
GI-38	Put. Hap.	30 (4)*	72 (9)	GIII-14	Put. Hap.	57 (11)	46 (9)
	Non-Hap.	772 (96)	730 (91)		Non-Hap.	459 (89)	470 (91)
GI-45	Put. Hap.	22 (5)*	42 (9)	GIII-15	Put. Hap.	27 (5)*	46 (9)
	Non-Hap.	444 (95)	424 (91)		Non-Hap.	479 (95)	460 (91)
GI-47	Put. Hap.	4 (6)	6 (9)	GIII-16	Put. Hap.	16 (7)	20 (9)
	Non-Hap.	60 (94)	58 (91)		Non-Hap.	203 (93)	199 (91)
GI-56	Put. Hap.	1 (4)	2 (9)	GIII-17	Put. Hap.	38 (8)	44 (9)
	Non-Hap.	22 (96)	21 (91)		Non-Hap.	450 (92)	444 (91)
GII-1	Put. Hap.	12 (35)*	3 (9)	GIII-18	Put. Hap.	39 (7)*	53 (9)
	Non-Hap.	22 (65)	31 (91)		Non-Hap.	552 (93)	538 (91)
GII-2	Put. Hap.	30 (4)*	61 (9)	GIII-19	Put. Hap.	6 (18)	3 (9)
	Non-Hap.	651 (96)	620 (91)		Non-Hap.	27 (82)	30 (91)
GII-3	Put. Hap.	22 (17)*	11 (9)	GIII-20	Put. Hap.	2 (9)	2 (9)
	Non-Hap.	104 (83)	115 (91)		Non-Hap.	18 (91)	18 (91)
GII-4	Put. Hap.	54 (9)	53 (9)	GIII-21	Put. Hap.	5 (9)	4 (9)
	Non-Hap.	536 (91)	537 (91)		Non-Hap.	38 (91)	39 (91)
GII-5	Put. Hap.	71 (17)*	38 (9)	GIII-22	Put. Hap.	33 (7)	42 (9)
	Non-Hap.	352 (83)	385 (91)		Non-Hap.	429 (93)	420 (91)
GII-6	Put. Hap.	34 (10)	31 (9)	GIII-23	Put. Hap.	42 (6)*	62 (9)
	Non-Hap.	308 (90)	311 (91)		Non-Hap.	651 (94)	631 (91)
GII-7	Put. Hap.	40 (7)	53 (9)	-	-	-	-
	Non-Hap.	551 (93)	538 (91)				
Single-cross Hybrid E							
Inducer	Ploidy	OF (%)	EF (%)	Inducer	Ploidy	OF (%)	EF (%)
GI-38	Put. Hap.	12 (20)*	5 (9)	GIII-12	Put. Hap.	1 (1)*	7 (9)
	Non-Hap.	48 (80)	55 (91)		Non-Hap.	80 (99)	74 (91)
GII-1	Put. Hap.	14 (4)*	33 (9)	GIII-14	Put. Hap.	1 (3)	3 (9)
	Non-Hap.	357 (96)	338 (91)		Non-Hap.	30 (97)	28 (91)
GII-2	Put. Hap.	10 (10)	9 (9)	GIII-15	Put. Hap.	7 (2)*	39 (9)
	Non-Hap.	87 (90)	88 (91)		Non-Hap.	428 (98)	396 (91)
GII-3	Put. Hap.	28 (16)*	16 (9)	GIII-16	Put. Hap.	19 (8)	22 (9)
	Non-Hap.	146 (84)	158 (91)		Non-Hap.	226 (92)	223 (91)
GII-4	Put. Hap.	3 (27)*	1 (9)	GIII-17	Put. Hap.	3 (7)	4 (9)
	Non-Hap.	8 (73)	10 (91)		Non-Hap.	39 (93)	38 (91)
GII-5	Put. Hap.	2 (5)	4 (9)	GIII-18	Put. Hap.	7 (3)*	20 (9)
	Non-Hap.	42 (95)	40 (91)		Non-Hap.	213 (97)	200 (91)
GII-6	Put. Hap.	2 (1)*	13 (9)	GIII-19	Put. Hap.	24 (6)	33 (9)
	Non-Hap.	145 (99)	134 (91)		Non-Hap.	346 (94)	337 (91)
GII-7	Put. Hap.	24 (10)	21 (9)	GIII-20	Put. Hap.	3 (4)	7 (9)
	Non-Hap.	206 (90)	209 (91)		Non-Hap.	74 (96)	70 (91)
GII-8	Put. Hap.	2 (9)	2 (9)	GIII-21	Put. Hap.	1 (2)	4 (9)
	Non-Hap.	18 (91)	18 (91)		Non-Hap.	45 (98)	42 (91)
GII-9	Put. Hap.	31 (6)	43 (9)	GIII-22	Put. Hap.	6 (5)	11 (9)
	Non-Hap.	450 (94)	438 (91)		Non-Hap.	120 (95)	115 (91)
GII-10	Put. Hap.	3 (2)*	14 (9)	GIII-23	Put. Hap.	8 (17)*	4 (9)
	Non-Hap.	151 (98)	140 (91)		Non-Hap.	38 (83)	42 (91)
GIII-11	Put. Hap.	44 (12)*	32 (9)	-	-	-	-
	Non-Hap.	317 (88)	329 (91)				
Inducers capacity of induction							
Inducer	Ploidy	OF (%)	EF (%)	Inducer	Ploidy	OF (%)	EF (%)
GI	Put. Hap.	333 (6)*	476 (9)	GIII	Put. Hap.	1.277 (10)*	1.124 (9)
	Non-Hap.	4.956 (94)	4813 (91)		Non-Hap.	11.222 (90)	11.375 (91)

GII	Put. Hap.	843 (8)*	934 (9)	-	-	-	-
	Non-Hap.	9.566 (92)	9.475 (91)				
Single-cross hybrids induction rate							
Hybrid	Ploidy	OF (%)	EF (%)	Hybrid	Ploidy	OF (%)	EF (%)
B	Put. Hap.	1.083 (12)*	831 (9)	D	Put. Hap.	798 (7)*	996 (9)
	Non-Hap.	8.159 (88)	8.411 (91)		Non-Hap.	10.277 (93)	10.079 (91)
C	Put. Hap.	317 (8)*	360 (9)	E	Put. Hap.	255 (7)*	347 (9)
	Non-Hap.	3.694 (92)	3.651 (91)		Non-Hap.	3.614 (93)	3.522 (91)

Putative haploid (Put. Hap.), Non-haploids (Non-Hap.), Observed frequency (OF), Expected frequency (EF). * - Significant value at the 5% probability level according to the chi-square test. Values that do not have * are considered insignificant at the 5% probability level.

CAPÍTULO 3 – Eficiência de identificação de haploides putativos e linhagens duplo-haploides em milho utilizando diferentes técnicas de seleção

Tabela 2. Total de sementes obtidas dos cruzamentos dos híbridos de milho com os três grupos indutores de haploidia e total de sementes haploides putativos em experimentos na Unesp, Jaboticabal-SP, nos anos agrícolas 2013/2014, 2014/2015 e 2015/2016.

Indutores	Total Sementes	Sementes Possíveis Haploides	Indução Possíveis Haploides (%)
Grupo 1	20.818	1.102	5,29
Grupo 2	11.664	916	7,85
Grupo 3	13.230	1.338	10,11

Tabela 3. Total de sementes possíveis haploides e plântulas selecionadas como possíveis haploides em experimento na Unesp, Jaboticabal-SP, 2018.

Indutores	Total sementes	Total plântulas	Plântulas possíveis haploides	Plântulas possíveis haploides (%)
Grupo 1	1.102	916	205	22,38
Grupo 2	916	740	152	20,54
Grupo 3	1.338	1.050	248	23,62

Tabela 4. Total de plântulas de milho duplicadas e transplantadas em bandejas, e sobreviventes na primeira e segunda contagem em casa de vegetação em experimento na Unesp, Jaboticabal-SP, na segunda safra do ano agrícola 2018.

Indutores	Total plântulas duplicadas	1ª contagem	2ª contagem	Sobreviventes (%)
Grupo 1	205	119	107	52,20
Grupo 2	152	98	86	56,58
Grupo 3	248	152	139	56,05

Tabela 5. Total de plântulas de milho transplantadas em canteiros, primeira e segunda contagem de plantas sobreviventes, número e porcentagem de espigas produzidas no experimento na Unesp, Jaboticabal-SP, na segunda safra do ano agrícola 2018.

Indutores	Total plantas	1ª contagem	2ª contagem	(%) Plantas sobreviventes	Espigas produzidas	(%) Plantas produziram espigas
Grupo 1	107	74	67	62,62	39	36,45
Grupo 2	86	76	61	70,93	29	33,72
Grupo 3	139	122	104	74,82	68	48,92

Tabela 6. Número de plantas em que foi realizada a citometria de fluxo e haploides confirmados pela mesma técnica, no experimento na Unesp, Jaboticabal-SP, na segunda safra do ano agrícola 2018.

Indutores	Total de plantas	Diploide	Diploide/tetraploide
Grupo 1	65	22	43
Grupo 2	61	22	39
Grupo 3	102	26	76