



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

LETÍCIA DE FREITAS DE SOUZA

**INDUÇÃO DE HAPLOIDIA E TAXA DE DUPLICAÇÃO  
CROMOSSÔMICA EM MILHO COMUM E SUPERDOCE**

---

Londrina  
2023

LETÍCIA DE FREITAS DE SOUZA

**INDUÇÃO DE HAPLOIDIA E TAXA DE DUPLICAÇÃO  
CROMOSSÔMICA EM MILHO COMUM E SUPERDOCE**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Josué Maldonado Ferreira

Londrina  
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

L648i Souza, Leticia de Freitas de.  
Indução de haploides e taxa de duplicação cromossômica em milho comum e superdoce. / Leticia de Freitas de Souza. - Londrina, 2023.  
57 f.

Orientador: Josué Maldonado Ferreira.  
Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2023.  
Inclui bibliografia.

1. Zea mays L - Tese. 2. Haploides - Tese. 3. Duplicação cromossômica - Tese. I. Ferreira, Josué Maldonado. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDU 63

LETÍCIA DE FREITAS DE SOUZA

**INDUÇÃO DE HAPLOIDIA E TAXA DE DUPLICAÇÃO  
CROMOSSÔMICA EM MILHO COMUM E SUPERDOCE**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Agronomia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Orientador Dr. Josué Maldonado Ferreira  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Leandro Simões Azeredo Gonçalves  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Dr. Deoclécio Domingos Garbuglio  
Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná -  
IDR

Londrina, 22 de setembro de 2023.

*Aos meus pais Dorival e Luciana, ao meu esposo  
Rodrigo e ao meu filho Heitor*

**Dedico.**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser meu alicerce, dando-me coragem e fé para enfrentar as dificuldades.

À Universidade Estadual de Londrina (UEL) e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela oportunidade e pelo meu desenvolvimento pessoal.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Ensino Superior Pessoal (CAPES) pelo incentivo a pesquisa e pela bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Dr. Josué Maldonado Ferreira, minha total gratidão por ter acreditado em mim, pelo compromisso em ensinar, pela paciência, dedicação, amizade e principalmente suporte para enfrentar todas as minhas dificuldades.

À empresa Tropical Melhoramento e Genética (TMG) e aos integrantes do laboratório de Melhoramento Genético de Milho, para a condução deste trabalho.

Aos professores dos Programas de Pós-Graduação em Agronomia da UEL, por todo o conhecimento passado em sala de aula.

Aos membros da banca, Dr. Deoclécio Domingos Garbúglio e Dr. Leandro Simões Azeredo Gonçalves, por aceitarem o convite e contribuírem com o trabalho.

Ao meu filho Heitor, que tão pequeno me ensinou tantas lições e me dá forças para lutar e seguir em frente.

Aos meus Pais Dorival e Luciana, pelo amor incondicional, dedicação e apoio para seguir com meus sonhos.

Ao meu marido Rodrigo, pelo apoio, paciência e encorajamento constantes.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”*

**Martin Luther King**

## RESUMO

SOUZA, Leticia de Freitas de. **Indução de haploides e taxa de duplicação cromossômica em milho comum e superdoce**. 2023. 57 páginas. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, 2023.

A tecnologia de duplo-haploide em milho foi desenvolvida em ambientes de clima temperado, empregando germoplasma e indutores adaptados para estes ambientes, com o objetivo de acelerar a obtenção de linhagens homozigotas. Neste sentido, para o avanço desta tecnologia em ambientes tropicais são necessárias pesquisas envolvendo germoplasma e indutores adaptados para este ambiente. Assim, os objetivos foram determinar a taxa de indução de haploidia em populações de milho comum e superdoce tropical, empregando um indutor gimnogenético tropicalizado e identificar a eficiência da metodologia de injeção de colchicina em tecido meristemático para a duplicação cromossômica. O indutor de haploidia PI4003 foi utilizado como parental masculino e cruzada com 23 populações de milho comum e duas populações superdoce tropical. As sementes haploides putativas, classificadas pela marcação do gene *R1-navajo* (*R1-nj*) foram semeadas em bandejas de polipropileno e mantidas em casa de vegetação para germinação. No estádio V2, as plântulas haploides foram submetidas a duplicação cromossômica, via injeção de 100 µL da solução de 0,125% de colchicina e 0,5% de dimetilsulfóxido (DMSO) e realizado transplântio em campo. O indutor apresentou variação na taxa de indução à haploidia nas populações entre 0,9% e 5%. A taxa de germinação média de 94,2% das sementes haploides, indica não ter ocorrido efeito negativo na germinação, porém foram eliminadas mais de 50% de plântulas falsos haploides, selecionadas erroneamente pela falha na marcação promovida pelo gene *R1-nj*. As taxas de sobrevivência, taxas de reprodução e taxas de sucesso geral para obtenção de duplo-haploides, apresentaram diferenças significativas de populações tropicais e de safras, em que, a taxa de sucesso geral, variou de 2,9% a 34%. A baixa capacidade de indução à haploidia observada, evidencia a necessidade do melhoramento do indutor utilizado, buscando alcançar maiores taxas de haploidia. O método de duplicação cromossômica via injeção de colchicina mostrou-se eficaz e fortemente influenciado pelo ambiente, com menor consumo de colchicina por indivíduo tratado e redução na geração de resíduos tóxicos para o descarte.

**Palavras-chave:** *Zea mays* L.; *Zea mays* var. *saccharata*; haploides maternos; duplo-haploides; colchicina.



## ABSTRACT

SOUZA, Letícia de Freitas de. **Haploid induction and chromosome doubling rate in common and super sweet corn.** 2023. 57 pages. Master's Dissertation presented to Post-graduate Program in Agronomy – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

The double haploid technology in maize was developed in temperate environments, using germplasm and inducers adapted for these environments, aiming to accelerate the obtaining of homozygous inbred lines. Therefore, to advance this technology in tropical environments, it is necessary research involving germplasm and inducers adapted for these environments. Thus, the objectives were to determine the haploidy induction rate in common and supersweet tropical maize populations, using a tropicalized gymnogenetic inducer and to identify the efficiency of the colchicine injection methodology in meristematic tissue for chromosomal duplication. The haploidy inducer PI4003 was used as a male parent and crossed with 23 populations of common maize and two tropical supersweet populations. Putative haploid seeds, classified by *R1-navajo* (*R1-nj*) gene marking, were sown in polypropylene trays and kept in a greenhouse for germination. At stage V2, haploid seedlings were subjected to chromosomal duplication, via injection of 100 µL of a solution of 0,125% colchicine and 0,5% dimethyl sulfoxide (DMSO) and transplanted in the field. The inducer varied in the haploidy induction rate between populations from 0,9% to 5%. The average germination rate of 94,2% of haploid seeds indicates that there was no negative effect on germination, but more than 50% of false haploid seedlings were eliminated, wrongly selected due to the failure in marking promoted by the *R1-nj* gene. Survival rates, reproduction rates and general success rates for obtaining double haploids showed significant differences between tropical populations and crops, where the general success rate varied from 2,9% to 34%. The low haploidy induction capacity observed highlights the need to improve the inductor used, seeking to achieve higher haploidy rates. The method of chromosomal duplication via colchicine injection proved to be effective and strongly influenced by the environment, with lower consumption of colchicine per individual treated and a reduction in the generation of toxic waste for disposal.

**Key words:** *Zea mays L.*; *Zea mays var. saccharate*; maternal haploids; double haploid; colchicine.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1** – Precipitação acumulada e média da temperatura mínima e máxima de cinco dias no período do transplante das plântulas duplicadas até a colheita, das safras 2019-2020 e 2020-2021. .... 30
- Figura 4.1** – Porcentagens de espigas duplo-haploides obtidas de diferentes populações de milho superdoce e comum nas safras 2019/20 (D20) e 2020/21 (D21), com base em diferentes intervalos de quantidades de sementes por espiga, obtidas pela duplicação cromossômica por injeção de solução de colchicina em plântulas no estágio V2. .... 51

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 4.1** – Números de sementes haploides putativas (SH); sementes haploides putativas por espiga (SHe); plântulas tratadas com colchicina e transplantadas (PTC); plântulas tratadas com colchicina e mantidas após *roguing* de campo (PTM); taxa de indução de haploides (TI) e porcentagem de germinação das SH (%G) em diferentes populações milho comum e superdoce. Safras 2019/20 e 2020/21..... 49
- Tabela 4.2** – Números de plantas haploides sobreviventes no campo (PHS); taxa de sobrevivência (TS); plantas duplo-haploides autofecundadas (DHA); taxa de autofecundação em relação as plântulas tratadas (TA); plantas D0 que produziram sementes (DHs); eficiência de autofecundação de plântulas D0 (EA); taxa de reprodução (TR) e taxa de sucesso geral (TSG), em diferentes populações milho comum e superdoce. Safras 2019/20 e 2020/21..... 50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CIMMYT	Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo
DH	Duplo-haploide
DHA	Duplo-haploide autofecundadas
EA	Eficiência de autofecundação
G	Germinação
IDR	Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná
PHS	Plantas haploides sobreviventes no campo
PTC	Plântulas tratadas com colchicina e transplantadas
PTM	Plântulas tratadas com colchicina e mantidas após <i>roguing</i> de campo
<i>RI-nj</i>	<i>RI-Navajo</i>
SH	Sementes haploides putativas
She	Sementes haploides por espiga
TA	Taxa de autofecundação
TI	Taxa de indução de haploides
TMG	Tropical Melhoramento e Genética
TR	Taxa de reprodução
TS	Taxa de sobrevivência
TSG	Taxa de sucesso geral
UEL	Universidade Estadual de Londrina

## Sumário

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>15</b>
2.1	IMPORTÂNCIA DA CULTURA DO MILHO .....	15
2.2	HÍBRIDO DE MILHO .....	16
2.3	OBTENÇÃO DE LINHAGENS DUPLO-HAPLOIDES .....	16
2.3.1	Indução de haploides .....	17
2.3.2	Identificação de haploides .....	20
2.3.3	Duplicação cromossômica .....	22
2.3.4	Obtenção da primeira geração de sementes das linhagens duplo-haploides .....	25
<b>3</b>	<b>MATÉRIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>ARTIGO .....</b>	<b>31</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES FINAIS .....</b>	<b>52</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>53</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O milho comum é destinado, principalmente, para a produção de grãos secos e na alimentação animal, mas também utilizado como base na alimentação humana e para produção de biocombustível. Por sua vez, o milho superdoce é considerado uma hortaliça e difere do milho comum por apresentar maior concentração de açúcares, sendo colhido no estágio de milho verde, para consumo humano *in natura* ou em conservas.

Na produção comercial desses tipos de milho, predomina o uso de híbridos, obtidos de linhagem, que possibilitam obter maior produtividade, qualidade e uniformidade. Portanto, o desenvolvimento de linhagens homozigotas é essencial nos programas de melhoramento de milho. O método tradicional de obtenção de linhagens é considerado oneroso e demorado, pois requer de 6 a 8 gerações sucessivas de autofecundações, para obter elevada homozigose. Como alternativa para acelerar o processo de obtenção de linhagens, na cultura do milho, tem sido utilizada a tecnologia de duplo-haploides, que é capaz de alcançar 100% de homozigose, com duas a três gerações, que envolve as etapas de indução à haploidia, classificação de sementes haploides, duplicação cromossômica e autofecundação dos duplo-haploides.

Os haploides em milho são obtidos *in vivo*, predominantemente, por meio da polinização de populações doadoras que recebem pólen de genótipos indutores de haploidia. Os indutores de haploidia são equipados com o gene *R1-navajo*, responsável pela expressão de antocianina nas sementes, possibilitando a diferenciação dos indivíduos haploides e diploides.

Os indivíduos haploides são estéreis, sendo fundamental a duplicação cromossômica para a restauração da fertilidade e obtenção das linhagens duplo-haploides. A frequência de duplicação espontânea é considerada baixa e requer a aplicação de métodos artificiais para produção em larga escala. Na cultura do milho, a colchicina é a substância mais empregada para induzir a duplicação cromossômica, atuando como um agente antimitótico, que inibe a formação das fibras do fuso. Embora a colchicina seja eficiente para promover o aumento das taxas de duplicação cromossômica, ela é altamente tóxica, cancerígena e requer extremos cuidados de manuseio e descarte.

A taxa de sucesso da duplicação cromossômica com colchicina pode variar dependendo de vários fatores, como o método de tratamento, a dose de colchicina e o genótipo do milho. As empresas privadas de melhoramento genético têm protocolos bem estabelecidos para milho comum temperado e tropical, mas que são mantidos em sigilo. Contudo, há reduzidos estudos com duplo-haploides em milho superdoce e disponibilidade de informações

em milho comum tropicais. Desta forma os objetivos deste trabalho foram: a) determinar a taxa de indução de haploidia em populações de milho comum tropical e superdoce, empregando um indutor gimnogenético tropical; b) identificar a eficácia da metodologia de injeção de colchicina em tecido meristemático para a duplicação cromossômica e obtenção de linhagens duplo-haploides em milho comum e superdoce.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 IMPORTÂNCIA DA CULTURA DO MILHO

O milho (*Zea mays* L.) é uma monocotiledônea, pertencente à família das Poaceae, alógama e monoica. Seu processo de domesticação iniciou-se há cerca de nove mil anos no México, por meio do seu antepassado o teosinto, que foi o principal cultivo de civilizações, como a dos Astecas, Maias e Incas (PATERNIANI; CAMPOS, 2005).

O milho é o cereal de maior produção no mundo com 1.150,7 milhões de toneladas produzidas na safra 22/23. Segundo o levantamento do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2023; CONAB, 2023), o Brasil é o terceiro maior produtor, com 133,0 milhões de toneladas, atrás apenas dos Estados Unidos e China, com produção de 348,8 e 277,2 milhões de toneladas, respectivamente. Esta cultura tem grande importância econômica e social, com grande utilização na alimentação humana e animal, matéria prima para a indústria e produção de etanol, associado à um alimento de baixo custo e com viabilidade de cultivo em diferentes escalas (GALVÃO *et al.*, 2014).

A espécie do milho abrange uma diversidade de tipos, sendo o de maior produção o milho comum, geralmente cultivados para obtenção de grãos secos, destinados em sua maioria para alimentação animal. Os milhos tipo especiais, englobam o milho doce, pipoca, branco e farináceo, assim denominados por serem destinados principalmente na alimentação humana e possuírem maior valor agregado (PEREIRA *et al.*, 2009). Dentre os milhos especiais, o milho superdoce é considerado como uma hortaliça, o qual apresenta diferenças na textura das sementes por conterem alelos recessivos em homozigose em um ou mais genes, alterando a concentração de açúcares no endosperma. Os genes mutantes mais conhecidos são o *sugary (su1)*, *shrunk (sh2)* e *brittle (bt1)* (TEIXEIRA *et al.*, 2013).

No Brasil, o milho superdoce é destinado, principalmente, para o uso em conserva no estágio imaturo, exigindo então que o material seja produzido no campo o ano todo, além de requerer características como: uniformidade, produtividade e qualidade. Para atender essa demanda, os híbridos de linhagens são as cultivares mais empregadas para milho comum e superdoce (TEIXEIRA *et al.*, 2013).



## 2.2 HÍBRIDO DE MILHO

O desenvolvimento dos híbridos explora a heterose, que expressa a superioridade da geração F<sub>1</sub> em relação a suas linhagens genitoras (HALLAUER, A.R.; CARENA, M. J.; MIRANDA FILHO, J. B., 2010). A exploração desta heterose foi considerada uma das maiores conquistas da ciência, sendo um dos grandes responsáveis pelo aumento da produtividade, possibilitando a criação e o desenvolvimento da indústria sementeira (PIERRE *et al.*, 2011).

O melhoramento de híbridos de linhagens de milho envolve as seguintes etapas: a) seleção de populações contrastantes e determinação dos grupos heteróticos; b) extração de linhagens homozigóticas; c) determinar as capacidades combinatórias entre as linhagens e a avaliação das combinações híbridas produzidas. Entre todas estas etapas, à obtenção de linhagens homozigotas pelo método convencional são consideradas demoradas e onerosas (PIERRE *et al.*, 2011), pois são necessários de seis a oito ciclos de autofecundação para se atingir a homozigose (PATERNIANI; CAMPOS, 2005). Desta forma, alternativas que agilizem o processo e diminua os custos, como o uso da tecnologia de duplo-haploides (DH), é de grande importância (PIERRE *et al.*, 2011), produzindo linhagens completamente homozigotas, em duas ou três gerações (CHOE *et al.*, 2012).

## 2.3 OBTENÇÃO DE LINHAGENS DUPLO-HAPLOIDES

A tecnologia de DH revolucionou o melhoramento genético de plantas, por meio da indução de haploidia, seguida da duplicação cromossômica de forma espontânea ou artificial, para restaurar a fertilidade e produzir linhagens 100% homozigóticas (CHIDZANGA *et al.*, 2017).

O primeiro pesquisador a descrever uma planta de milho haploide foi Stadler e Randolph, em 1929 (RÖBER *et al.*, 2005), mas o pioneiro a utilizar haploides naturais em milho e duplicar o número cromossômico, para acelerar a obtenção de linhagens foi Chase (1952).

A principal vantagem dos DHs, em relação ao método convencional de sucessivas gerações de autofecundações, é a redução do tempo, espaço e mão de obra requerido para a obtenção das linhagens (CHAIKAM *et al.*, 2019a). Outras vantagens associadas aos DHs são: a obtenção do material 100% em homozigose, porcentagem que não se atinge no método convencional (SMITH *et al.*, 2008); variação apenas de natureza aditiva; neutralizando os

efeitos de dominância, o que leva a uma alta herdabilidade no sentido restrito, aumentando a eficiência de seleção, sendo ainda ideais para o mapeamento genético, que por meio dos marcadores moleculares, auxiliam na identificação de lócus de características quantitativas e auxiliam na introgressão e piramidação de genes (GOSAL *et al.*, 2020).

Apesar das grandes vantagens proporcionadas pela tecnologia de DHs, os programas de melhoramento de milho tropical estão atrasados em relação aos programas de milho temperado, devido à escassez de indutores de haploidia tropicalizados (CHIDZANGA *et al.*, 2017). Porém, o Centro Internacional de melhoramento de Milho e Trigo (CIMMYT), em colaboração com a Universidade de Hohenheim, Alemanha, veem tornando a tecnologia acessível ao setor público e privado de regiões tropicais (CHAIKAM *et al.*, 2019a).

A tecnologia de DHs envolve as etapas de indução à haploidia, identificação dos indivíduos haploides, duplicação cromossômica, autofecundação e multiplicação das sementes obtidas, sendo cada uma dessas, importantes para o sucesso da obtenção de linhagens.

### 2.3.1 Indução de haploides

A indução de haploidia no milho pode ocorrer espontaneamente na natureza, mas ocorre com baixa frequência, chegando a 0,01%, o que tornava o seu uso comercial inviável (CHASE, 1969). No entanto, duas metodologias podem ser utilizadas para aumentar a frequência de obtenção de haploides, a técnica de cultura de anteras (*in vitro*) ou a de indução genética (*in vivo*) (PIERRE *et al.*, 2011)

O Método *in vitro* de cultura de anteras ou também chamado de androgênese, baseia-se na inoculação do pólen em meio de cultura apropriado, favorecendo o desenvolvimento de calos ou embrioides, que em ambientes controlados de baixas temperaturas, podem se regenerar em plântulas haploides ou duplo-haploides. No entanto, há vários fatores que influenciam a eficiência do método, como: fonte do germoplasma, sendo em sua maioria recalcitrante, não respondendo à regeneração em cultura de tecido, variáveis do estágio de maturação da antera e do pré-tratamento do pólen, a necessidade de laboratórios qualificados e pessoal capacitado (CHIDZANGA *et al.*, 2017). Fatores esses que tornaram este método mais difícil e com rendimento inferior em relação aos métodos de obtenção de DHs *in vivo* (CHAIKAM *et al.*, 2019a).

Os métodos *in vivo* utilizam genótipos indutores de haploidia que podem ser especificamente utilizados como genitor feminino ou masculino no cruzamento com a população doadora, visando obter indivíduos haploides, para posterior duplicação

cromossômica (DANG *et al.*, 2012). Os indutores paternos ou androgenéticos são utilizados como genitor feminino nos cruzamentos, podendo ocorrer a degeneração da oosfera e o núcleo reprodutivo do grão de pólen, que se desenvolve para originar o indivíduo haploide (PIERRE *et al.*, 2011). A ocorrência pode ser explicada pelo gene mutante *igl* ou gametófito indeterminado, que causam uma quantidade anormal de núcleos no saco embrionário, exibindo 6% de poliembrião, 7% de heterofertilização, 45% de ploidia no endosperma e produção de 3% de sementes haploides (KERMICLE, 1969). Os indutores maternos ou gimnogenéticos são utilizados como genitores masculinos (doador de pólen) e o germoplasma fonte como os genitores femininos, assim os haploides herdam tanto o citoplasma e o núcleo do germoplasma fonte, tornando-os mais atrativo para programas de melhoramento de milho (CHAIKAM *et al.*, 2019a).

Os mecanismos de indução maternal ainda não foram bem esclarecidos. A primeira hipótese de eliminação cromossômica, propõe que um dos dois núcleos reprodutivos do grão de pólen do indutor sofra alterações, mas ainda é capaz de fundir com a oosfera, ocorrendo degeneração dos cromossomos do indutor para formar o embrião haploide. A segunda hipótese é a de fertilização única, onde um dos núcleos reprodutivos do grão de pólen não seria capaz de se fundir com a oosfera, mas poderia provocar a embriogênese haploide (ZHAO *et al.*, 2013).

Foram identificados que oito QTLs estão envolvidos na indução de haploides, sendo que o *qhir1* e *qhir8* foram capazes de explicar 66% e 20% da variação genotípica para indução de haploides, respectivamente. No caso do *qhir1*, acredita-se que a habilidade de indução está associada a falhas na transmissão do pólen do indutor. Já o *qhir8* é importante para aumentar a capacidade indutora do *qhir1* (LASHERME e BECKERT, 1988; PRIGGE *et al.*, 2012b).

O primeiro indutor de haploidia foi desenvolvido por Coe (1959) com taxa de indução de haploidia (TIH) superior à geração espontânea, conhecido como Stock 6, indutor gimnogenético de clima temperado, com uma média de indução de 3,2%. Outro indutor que veio em seguida foi o Wisconsin 23 (W23), também desenvolvido em clima temperado, porém androgenético, com TIH de 1 a 3% (KERMICLE, 1969). No entanto, a taxa de indução destes primeiros indutores, foram consideradas muito baixas, não suprimindo a demanda dos programas de melhoramento. Então, a partir destes genótipos, foram desenvolvidos vários outros indutores, com o objetivo de aumentar as taxas de indução.

A literatura apresenta exemplos de indutores de haploidia de clima temperado, derivados dos genótipos Stock 6 e W23, com taxas de indução à haploidia de: 3%

a 5% para o WS14 (LASHERMES; BECKERT, 1988); 6,5% para o MHI (CHALYK, 1999); 8% a 10% para o RWS (RÖBER *et al.*, 2005); acima de 10% para UH400, PK6, HZI1, CAUHOI e PHI (BARRET; BRINKMANN; BECKERT, 2008; LI *et al.*, 2009; ROTARENCO *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2008).

Os indutores temperados RWS e UH400 revelaram taxas de indução de 8% a 12% em milho tropical e em condições tropicais (PRIGGE *et al.*, 2011a). Contudo, sob condições tropicais apresentaram algumas dificuldades como: baixo vigor, alta susceptibilidade para patógenos, floração extremamente precoce e baixa produção de pólen e sementes, dificultando a produção em larga escala de linhagens DHs (PRIGGE *et al.*, 2012a).

O CIMMYT em conjunto com a Universidade de Hohenheim, na Alemanha, desenvolveram a primeira geração de indutores tropicais, conhecidos como Tropically Adapted Inducer Lines (TAILs), com desempenho agrônômico superior aos indutores temperados e taxa de haploidia de 6 a 9% (CHAIKAM *et al.*, 2016). Pouco tempo depois, o CIMMYT desenvolveu a segunda geração do TAILs, linhagens com melhor vigor e adaptação às condições tropicais, maior produção de pólen e taxa de indução de 9% a 14%, reduzindo os custos associados à polinização manual (CHAIKAM *et al.*, 2018). No entanto, o acesso destas linhagens indutoras tropicalizadas são de uso restrito e concessão disponibilizada mediante pagamentos de valores para sua utilização (CHAIKAM *et al.*, 2019a). Assim, os programas de melhoramento de milho nas instituições do setor público no Brasil, ainda necessitam de maiores estudos sobre parâmetros genéticos e de estratégias de melhoramento para o desenvolvimento de indutores adaptados, que apresentem características agrônômicas desejáveis, tornando a tecnologia mais acessível e eficaz.

Alguns trabalhos realizados no Brasil utilizaram genótipos indutores temperados, obtendo taxas de indução de haploidia de 7,1% (BATTISTELLI *et al.*, 2013); 8,5% (COUTO *et al.*, 2015); 6,27% no verão e 4,74% no inverno (DA SILVA *et al.*, 2020). Porém, em todos estes trabalhos foram observadas taxas elevadas de falhas na identificação de indivíduos verdadeiramente haploides, por meio da marcação promovida pelo gene *R1-nj*.

No trabalho de Ribeiro *et al.* (2018), foram utilizados como indutores, populações obtidas pelo cruzamento entre linhagens elite tropicais e o indutor temperado KEMS, que apresentaram taxa média de indução igual a 2,48%, mas com taxa de erro de 33,5% na classificação das sementes com base no marcador *R1-nj*. Os trabalhos recentes de Ribeiro *et al.* (2022) e Baleroni *et al.* (2021) já utilizaram os indutores tropicalizados do CIMMYT, mas estes autores não apresentaram as taxas de indução a haploidia obtidas.

### 2.3.2 Identificação de haploides

Os haploides induzidos *in vivo* podem ser distinguidos na fase de sementes, plântula ou planta adulta. Como a taxa de indução de haploides é relativamente baixa, a maioria dos indivíduos serão diploides. Sendo vantajoso a identificação precoce dos haploides, para reduzir o número de plântulas a serem duplicadas e encaminhadas para processos subsequentes, assim obtendo economia de custos, espaço e tempo (CHAIKAM *et al.*, 2019a).

Uma das formas de identificação de haploides é por meio de marcadores genéticos expressos de forma dominante no seu fenótipo, principalmente nos estágios de semente ou plântula. Atualmente, todos os indutores maternos são equipados com o gene *RI-Navajo (RI-nj)* que regula a biossíntese de antocianina nas sementes. Sua expressão requer outros genes estruturais na biossíntese de antocianinas, como: *A1, A2 C2, Bz1, Bz2* e *C1*, no qual condicionam a coloração púrpura na camada da aleurona na região da coroa do endosperma e no escutelo do embrião (NANDA; CHASE, 1966).

Na prática as espigas resultantes do cruzamento entre a população doadora e os indutores podem apresentar três tipos de sementes: a) diploides, sementes com endosperma e embrião púrpura, b) haploides, sementes com endosperma púrpura e embrião não púrpuro e c) possivelmente contaminantes, sementes sem coloração púrpura (NANDA; CHASE, 1966). Contudo, a expressão desse marcador pode apresentar penetrância incompleta e expressividade variável, em relação a fonte de germoplasma e do material indutor, bem como de fatores ambientais (KEBEDE *et al.*, 2011; CHAIKAM *et al.*, 2015), que colaboram para erros de classificação de sementes quanto ao nível de ploidia.

No germoplasma de milho tropical verifica-se a ocorrência de genes inibidores da expressão da antocianina, como o gene *CI-I*. Este alelo dominante é um mutante natural, que impede a identificação dos haploides, diminuindo sua eficiência, onde estudos demonstraram que 28% das populações de origem tropical, apresentaram inibição completa e 70% segregação para inibição de antocianina (CHAIKAM *et al.*, 2015).

Além de problemas com o germoplasma fonte, fatores como alto teor de umidade nos grãos na colheita podem afetar a intensidade da cor expressa (ROTARENCO *et al.*, 2010). O desenvolvimento de bolsas de ar embaixo do pericarpo (PRIGGE *et al.*, 2011) e a coloração natural das sementes com antocianina, podem afetar a eficiência da identificação, levando a seleção de um alto número de falsos haploides (RÖBER *et al.*, 2005), resultando na perda dos indivíduos haploides e desperdício de recursos nos subsequentes processos.

Com isso, há necessidade de adicionar métodos auxiliares para suprir as falhas da identificação de haploides via expressão do gene *R1-nj* e aumentar a eficiência do processo. Marcadores adicionais de antocianina no estágio de muda foram relatados por Chaikam *et al.* (2016), o qual apresentou expressividade independente do gene *R1-nj*. Uma das identificações foi com base na coloração das raízes, onde indivíduos diploides apresentam cor vermelha ou roxa e indivíduos haploides sem coloração nas radículas. Sua grande vantagem apresentada foi o uso por uma grande variedade de germoplasma, por ser um marcador muito raro no milho. O outro marcador avaliado pelo autor foi o de bainha foliar, porém mostrou se pouco eficiente por constatarem que a coloração da bainha foliar ocorre naturalmente em 60% dos genótipos tropicais.

A identificação de acordo com teor de óleo nas sementes também pode ser utilizada, onde se observa um menor teor de óleo em embriões haploides comparados com diploides (ROTARENCO *et al.*, 2010). Este foram facilitados pelo desenvolvimento de indutores específicos com alto teor de óleo (*Oil Content* - OC) (MELCHINGER *et al.*, 2013). Alguns indutores disponíveis são o UH600 (9,9% OC), UH601 (11,6% OC) e CAUHOI (7,8% OC) (LI *et al.*, 2009; MELCHINGER *et al.*, 2014; MELCHINGER *et al.*, 2016a)

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 estudos de ploidia (HAN *et al.*, 2016). Essa técnica é de alta precisão e confiabilidade (COUTO *et al.*, 2013), porém requer treinamento e equipamento especial para interpretação dos resultados (CHOE *et al.*, 2012).

Os trabalhos de Chaikam *et al.* (2012) e Sekiya *et al.* (2020) apresentaram que a diferenciação dos indivíduos haploides e diploides pode ser realizada por meio da comparação do comprimento das células guardas das folhas, sendo possível estabelecer um limite superior e inferior do comprimento para rápida diferenciação dos níveis de ploidia. Além disso, a metodologia mostrou ser mais eficiente do que a citometria de fluxo, por ser fácil, de baixa tecnologia, não destrutivo e rápido, mostrando ser promissor em aumentar a eficiência de produção de duplo-haploides.

Métodos de identificação de haploides por características morfológicas de plântulas foram avaliadas por CHAIKAM *et al.* (2017) e mostraram ser eficientes para eliminar precocemente os indivíduos falsos-haploides selecionados por *R1-nj*. Os autores observaram que plantas haploides apresentam menor comprimento de radícula e coleóptilo e número inferior de raízes seminais laterais.

A análise de vigor das plantas resutante do processo de indução também são utilizadas para a eliminação dos indivíduos diploides, pois os haploides apresentaram menor vigor, folhas eretas, claras e estreitas e machos esterelidade em relação a suas diploides equivalentes (CHASE, 1969; WU *et al.*, 2017). Diferenças em plantas adultas são comumente utilizadas como um padrão ouro, para confirmar o nível de ploidia em fase de campo (CHAIKAM *et al.*, 2016; MELCHINGER *et al.*, 2013).

Como método efetivo para identificação de indivíduos haploides é relatado a utilização de mais de uma técnica em conjunto com o marcador *RI-nj*, para que assim, possa ocorrer o processo em larga escala e em grande variedade de germoplasma.

### 2.3.3 Duplicação cromossômica

As plantas haploides são estéreis por conterem apenas uma cópia de cada cromossomo em suas células, não permitindo a produção normal de células gaméticas masculinas e femininas, então a duplicação é essencial para a recuperação da fertilidade e produção de sementes DHs (CHAIKAM *et al.*, 2020).

A duplicação cromossômica pode ocorrer de forma espontânea, sendo citado na literatura uma frequência menor que 5% (CHAIKAM *et al.*, 2019b; DE LA FUENTE *et al.*, 2020; MOLENAAR *et al.*, 2019), limitando a produção de sementes duplo-haploides em larga escala. Então, para aumentar a eficiência da duplicação cromossômica são utilizados agentes antimitóticos como: colchicina, herbicidas ou gás de óxido nitroso (CHAIKAM *et al.*, 2020; MELCHINGER *et al.*, 2016a; MOLENAAR; SCHIPPRACK; MELCHINGER, 2018).

Os procedimentos artificiais para aumentar a taxa de duplicação cromossômica em milho se concentram especialmente na aplicação de soluções de colchicina, visando interromper a mitose ao se ligar à tubulina, inibindo a polimerização dos microtúbulos que compõem as fibras dos fusos responsáveis pela migração dos cromossomos para os polos das células, o que resulta em uma célula com o dobro de números de cromossomos (CHAIKAM *et al.*, 2019a).

A colchicina é considerada altamente tóxica, potencialmente cancerígena e perigosa para o meio ambiente e por tanto requer uma aplicação, manuseio, armazenamento e descarte adequados (MAQBOOL; BESHIR; KHOKHAR, 2020). Seu maior uso deve-se pela maior facilidade de obtenção em larga escala, possuir protocolos de aplicação mais estabelecidos que os demais produtos antimitóticos e por obter as maiores taxas de duplicação cromossômica (CHAIKAM *et al.*, 2020).

Na literatura existem diferentes protocolos quanto a forma de aplicação do tratamento de duplicação cromossômica, isso deve-se pelo fato de tentar atingir as melhores taxas de duplicação, colocando as células do meristema apical das mudas haploides, que dão origem as inflorescências masculinas e femininas, em contato com o agente duplicador, para que assim se tornem diploides (MELCHIGER *et al.*, 2016a).

Um dos métodos mais utilizados e difundido é o da imersão das plântulas no estágio VE, em solução com concentração de 0,04% a 0,06% de colchicina e com 0,5% de Dimetil Sulfoxido (DMSO), com duração de 12 a 8 horas, respectivamente (DEIMLING *et al.*, 1997). Neste método as sementes são colocadas para germinar em papel germitest até que o coleóptilo alcance cerca de 2 cm de comprimento, quando é realizado o corte de 1mm da ponta do coleóptilo antes da submersão na solução de colchicina. Para este método é citado na literatura uma grande variação entre as taxas de duplicação, Dang *et al.* (2012) observaram taxas de plantas duplicadas variando de 28% a 54% e Battistelli *et al.* (2013) uma porcentagem de 59,1% a 80%. Contudo, estas taxas se referem as plantas que apresentaram sucesso da duplicação cromossômica nas células somáticas da folha, o que não garantem que ela seja fértil e produza sementes. Quando os mesmos autores avaliaram as taxas de plantas que produziram pólen, obtiveram taxas de 12,5% a 26,5% e de 18,3% a 32,1%, respectivamente. Os menores valores encontrados estão relacionados ao menor vigor e atraso no desenvolvimento das plantas haploides duplicadas. Em relação as mudas tratadas os autores Eder e Chalyk (2002) obtiveram uma taxa de 49,4% de plantas com produção de pólen, 39% puderam ser autofecundadas e 27,3% produziram sementes DHs.

Outro método de duplicação cromossômica é via injeção direta no tecido meristemático basal, na porção central da primeira bainha foliar no estágio foliar V2-V3, com solução de 0,125% de colchicina e 0,5% de DMSO (ZABIROVA *et al.*, 1996). Os autores Eder e Chalyk (2002), compararam este método em casa de vegetação e à campo, obtendo em casa de vegetação uma taxa de 42,4% de plantas com produção de pólen, porém somente 30,5% foram autopolinizadas. Já em condições de campo 16,1% das plantas foram férteis e dessas somente 11,3% foram autopolinizadas. Esta grande diferença é associada pelos autores devido à baixa temperatura incomum sofrida na época do experimento, evidenciando a sensibilidade das plantas DHs as condições adversas.

O método de duplicação cromossômica por meio da imersão de raízes no estágio V2, em solução com 0,1% de colchicina e 0,1% de DMSO por um período de seis horas, obteve 69,33% de plantas duplicadas identificadas pelo tecido somático e destas 65,19% das plantas foram autofecundadas, apresentando taxas elevadas quando comparadas com o



tratamento de imersão de mudas recém germinadas, que apresentou uma taxa de duplicação de 51,32% e 30,89% de plantas autofecundadas (COUTO *et al.*, 2015). Este método é considerado trabalhoso e requer cautela para evitar a destruição das raízes, porém apresentou uma alta taxa de duplicação.

Os autores Chaikam *et al.* (2020) obtiveram sucesso de duplicação cromossômica, em um método aprimorado de imersão de raízes até a região da coroa da plântula no estágio V2, em solução de 0,04% de colchicina e 0,1% de DMSO, com duração de imersão por 5 horas. Este método obteve as maiores taxas de sucesso de duplicação cromossômica variando de 10,33% a 11,90%, comparados com os métodos de imersão de mudas (5,94%), imersão de raízes em bandejas (1,32%), imersão de sementes em diferentes concentrações de colchicina (0,5% a 3,34%) e imersão de raízes até a metade de seu comprimento (3,67%).

No estudo do efeito da concentração de colchicina sobre a obtenção de linhagens duplo-haploides, Chaikam *et al.* (2020) observaram um efeito positivo no uso de maiores concentrações de colchicina, onde a taxa de sucesso geral de duplicação cromossômica mais do que dobrou quando a concentração foi aumentada de 0,04% para 0,1%. Contudo, houve uma queda na taxa de sobrevivência das mudas de 94,17% para 88,6% respectivamente, provavelmente devido ao efeito tóxico da colchicina. No mesmo trabalho, os autores evidenciaram a eficácia de seu método de imersão de raízes até a região da coroa em solução de 0,1% de colchicina e 0,5% de DMSO, obtendo altas taxas de sucesso de duplicação cromossômica (23,5 a 58,5%) avaliadas em diferentes populações, além de terem apresentado um aumento da quantidade de sementes DHs por espiga, quando comparado com o método tradicional de imersão de plântulas recém germinadas.

Dentre os diferentes protocolos citados na literatura, não há uma comparação sistemática da eficiência da duplicação cromossômica, por não ocorrer critérios de uniformidade nas avaliações, onde o sucesso da duplicação cromossômica em alguns trabalhos era avaliado pela análise da ploidia do tecido somático e não da formação de inflorescências férteis e produção de sementes DHs (CHAIKAM *et al.*, 2020). Então, Melchinger *et al.* (2016b) por meio do conceito que a eficiência do método de duplicação cromossômica é medida pela capacidade de um tratamento produzir duplo-haploides férteis, propôs as seguintes taxas: a) taxa de sucesso geral (TSG), estimada pela proporção do número de plantas duplicadas que produziram sementes pelo número de plântulas que foram tratadas; b) taxa de sobrevivência (TS), que mede a fitotoxicidade do tratamento; c) taxa de reprodução (TR), que mede a ação da duplicação cromossômica. O objetivo de Melchinger *et al.* (2016b) foi comparar a eficiência da obtenção de duplo-haploides através do tratamento com diferentes tipos e concentrações de

herbicidas com a colchicina. Nos quatro experimentos realizados, o tratamento teste de colchicina aplicado via imersão de mudas em solução de 0,06% de colchicina e 0,05% de DMSO, por um período de 8 horas, obteve TSG variando de 10% a 22,1%, sendo a maior associada a condições ambientais muito favoráveis. Entre os herbicidas testados, a combinação de 20 mg L<sup>-1</sup> Amiprofos-metil e 4,0 mg L<sup>-1</sup> pronamide, aplicados via imersão de mudas por um período de 8 horas, foi que obteve taxas semelhantes de TSG iguais a 16,1%.

Com o objetivo de substituir a colchicina para duplicação cromossômica Molenaar *et al.* (2019), avaliou a aplicação de óxido nitroso (N<sub>2</sub>O), devido ao seu manuseio simples e seguro. Para o método as sementes haploides foram colocadas em papel de germinação e após a duração específica de cada tratamento suas mudas foram colocadas em câmara de pressão com hidróxido de cálcio para absorver o dióxido de carbono das mudas. O gás N<sub>2</sub>O então foi bombeado para a câmara a uma pressão de 0,6 MPa e as mudas tratadas permaneceram a 25°C por 3 dias. O melhor tratamento de mudas com N<sub>2</sub>O apresentaram taxas de sucesso de duplicação cromossômicas de 6,4% a 33,3%, enquanto a TSG da colchicina ficou entre 5,0% e 28,1%, dependendo do ano e do ambiente.

#### 2.3.4 Obtenção da primeira geração de sementes das linhagens duplo-haploides

As plantas haploides tratadas para a duplicação cromossômica são mais suscetíveis a fatores bióticos e abióticos, além da possibilidade de ocorrerem danos físicos e de toxicidade química, aumentando a mortalidade das plântulas em campo (CHAIKAM *et al.*, 2020, MELCHINGER *et al.* (2016b).

No decorrer do desenvolvimento das plantas duplicadas as recomendações para cultura do milho devem ser empregadas, visando minimizando estresses abióticos e bióticos (CHAIKAM *et al.*, 2019a). Também é importante o monitoramento das plantas em relação à altura, vigor e fertilidade antes da floração, eliminando os possíveis falsos haploides do processo (VANOUS *et al.*, 2017)

As plantas duplicadas podem apresentar redução na produção de pólen, sendo necessário realizar a autofecundação da mesma planta de duas a três vezes em dias consecutivos, para garantir uma boa produção de sementes (MAQBOOL; BESHIR; KHOKHAR, 2020).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

No campo experimental da empresa Tropical Melhoramento e Genética (TMG), unidade de Cambé, foram conduzidos campos isolados de polinização para indução de haploidia, utilizando o indutor gimnogenético PI4003. Na safra 2019-2020, foram utilizados como populações doadoras de milho comum: G2203, H3201, M3101, N2201, R2102, S2202 e X2103. Na safra 2020-2021, foram utilizadas as populações de milho comum: A2201, B2201, B2203, B2204, B2205, D2201, D2204, G2201, G2202, I2201, J2206, J4201, K2201, L2201, P2203 e V2202. Em ambas as safras foram utilizadas como populações doadoras os milhos superdoce os sintéticos SD3005 e SD3006, do Programa de Melhoramento Genético de Milho da UEL, que são homozigotos para o gene *shrunken2* (*sh2*).

Os campos isolados para indução de haploidia, de cada safra, empregaram fileiras de 120 m de comprimento, espaçadas de 0,80 m entre fileiras e 0,20 m entre as plantas. As populações doadoras serviram como fêmeas, sendo semeadas em fileiras duplas, ladeadas por fileiras do indutor, que foram semeadas com cinco e dez dias após a semeadura das doadoras, visando garantir a sincronia de florescimento.

As populações doadoras foram despendoadas antes da abertura das anteras para receberem pólen somente do indutor PI4003. A implementação dos lotes isolados e manejo foram realizados de acordo com as recomendações para a cultura do milho.

As espigas obtidas dos cruzamentos foram colhidas após a maturação fisiológica, com umidade dos grãos em média de 17% e colocadas para secar até a umidade de 12%. As espigas induzidas de cada população foram contabilizadas, debulhadas e as sementes armazenadas em pacotes devidamente identificados.

As sementes obtidas foram classificadas pela marcação do gene *R1-navajo* (*R1-nj*), sendo consideradas diploides, as sementes com endosperma e embrião púrpuro, e haploides putativos, as sementes contendo apenas o endosperma púrpuro. O restante das sementes sem a expressão do *R1-nj* foram descartadas, por não serem consideradas como originadas do cruzamento com o indutor.

As sementes haploides putativas de cada população foram contabilizadas para estimativa da taxa de sementes haploides por espiga. Contudo, no caso das populações superdoce, também foram contabilizados o número total de sementes diploides obtidas na indução para estimar a taxa de indução (TI), com base na razão do número de sementes haploides putativas pelo número total destes diploides.

As sementes haploides putativas obtidas nas safras 2019-20 e 2020-21 foram

semeadas em bandejas plásticas de 64 células, preenchidas com Turfa Sphagnum, e colocadas para germinar em casa de vegetação, nos dias 27 de agosto de 2020 e de 2021, respectivamente. Após nove dias de cada semeadura, as plântulas obtidas de cada população, no estágio V2, foram contabilizadas para estimar as porcentagens de germinação, plântulas albinas, débeis e falsos haploides (diploides considerados haploides devido a falha do processo de classificação das sementes), reconhecidos por apresentarem elevado vigor e tamanhos atípicos aos indivíduos haploides. No caso das populações superdoce, as plântulas diploides foram identificadas com base na coloração púrpura da primeira bainha foliar, característica típica do indutor e ausente das populações superdoce, como observado por Sekiya *et al.* (2020).

No Laboratório de Melhoramento Genético do Departamento de Biologia da UEL, onze dias após as semeaduras e tendo sido feita a eliminação das plântulas diploides, foram realizados os procedimentos para duplicação cromossômica das plântulas haploides no estágio V2-V3, via injeção de 100  $\mu$ L da solução de 0,125% de colchicina e 0,5% de dimetilsulfóxido (DMSO) por plântula, na porção central do colmo próximo ao tecido meristemático (EDER; CHALYK, 2002).

As plântulas tratadas e contabilizadas foram transplantadas para campo irrigado por gotejamento, na estação experimental da TMG-Cambé, nos dias 09 de setembro de 2020 e 10 de setembro de 2021, respectivamente. O transplante mecânico em fileiras duplas tiveram comprimento variável dependendo do número de haploides de cada população. A implementação dos campos de autofecundação de duplo-haploides e manejo foram realizados de acordo com as recomendações para a cultura do milho, visando a máxima redução de estresse bióticos e abióticos.

Em outubro de cada ano, cerca de 30 dias após o transplante e antes do florescimento, foi realizada a eliminação das plantas tipicamente diploides (falsos haploides), mais altas e vigorosas; colmo grosso; folhas largas e com verde intenso; e com expressão pronunciada de antocianina em partes das plantas.

A autofecundação dos duplo-haploides ocorreu de 26 de outubro a 24 de novembro de 2020 e 25 de outubro a 23 de novembro de 2021, respectivamente, com as plantas sobreviventes e que apresentaram fertilidade e sincronismo da produção de pólen e emissão do estilo-estigma.

As espigas resultantes das autofecundações foram colhidas separadamente por população doadora, logo que atingiram a maturação fisiológica, evitando a perda das espigas por pragas e doenças no campo.

No Laboratório de Melhoramento Genético do CCB, as espigas colhidas

passaram por processo de secagem, despalha e seleção. As espigas segregantes foram contabilizadas para cada população doadora e eliminadas, pois se originaram de plantas diploides, não eliminadas antes do florescimento. As espigas não segregante, consideradas duplo-haploides, foram contabilizadas para cada população doadora, debulhadas individualmente e acondicionadas em sacos de papel devidamente identificados por população e contabilizado o número de sementes por linhagem DH.

Dados de precipitação pluviométrica (mm) acumulada de cinco dias e média da temperatura mínima e máxima do mesmo período, foram elaborados com dados fornecidos pelo Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná (IDR-Paraná), entre os períodos de transplantio das plântulas duplicadas até colheita, de ambas as safras (Figura 3.1).

Durante a condução dos experimentos foram obtidos dados de contagem separadamente por população doadora induzidas à haploidia:

- a) Número de sementes haploides putativas (SH);
- b) Número de sementes haploides putativas por espiga (She);
- c) Número de sementes diploides de milho superdoce;
- d) Número de sementes germinadas;
- e) Número de plântulas tratadas com colchicina e transplantadas a campo (PTC),
- f) Número de plântulas tratadas com colchicina e mantidas após *roguing* de campo (PTM);
- g) Número de plantas sobreviventes no campo até autofecundação (PS);
- h) Número de plantas duplo-haploides autofecundadas (DHA)
- i) Número de plantas D0 que produziram sementes (DHs);
- j) Número de sementes D1 por espiga.

A partir dos dados de contagem foram estimadas os seguintes índices e taxas:

- a) Taxa de indução de haploides (TI): número de SH/número total de sementes induzidas;
- b) Porcentagem de germinação das sementes haploides (%G): número de sementes haplóides germinadas/número de sementes haploides semeadas;
- d) Taxa de sobrevivência (TS): PS/PTM
- e) Taxa de autofecundação em relação as plântulas tratadas (TA): DHA/PS
- f) Eficiência da autofecundação de plântulas D0 (EA): DHs/DHA
- g) Taxa de reprodução (TR): DHs/PS
- h) Taxa de sucesso geral (TSG): DHs/PTM

Os índices e taxas foram comparados pelo teste de Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ), para comparação das taxas de sucesso e insucesso encontradas, avaliando as populações dentro de cada safra e entre as médias das safras, segundo a expressão:

$$\chi^2 = \frac{1}{\bar{p}(1-\bar{p})} \sum (p_i - \bar{p})^2 N_i$$

Em que:

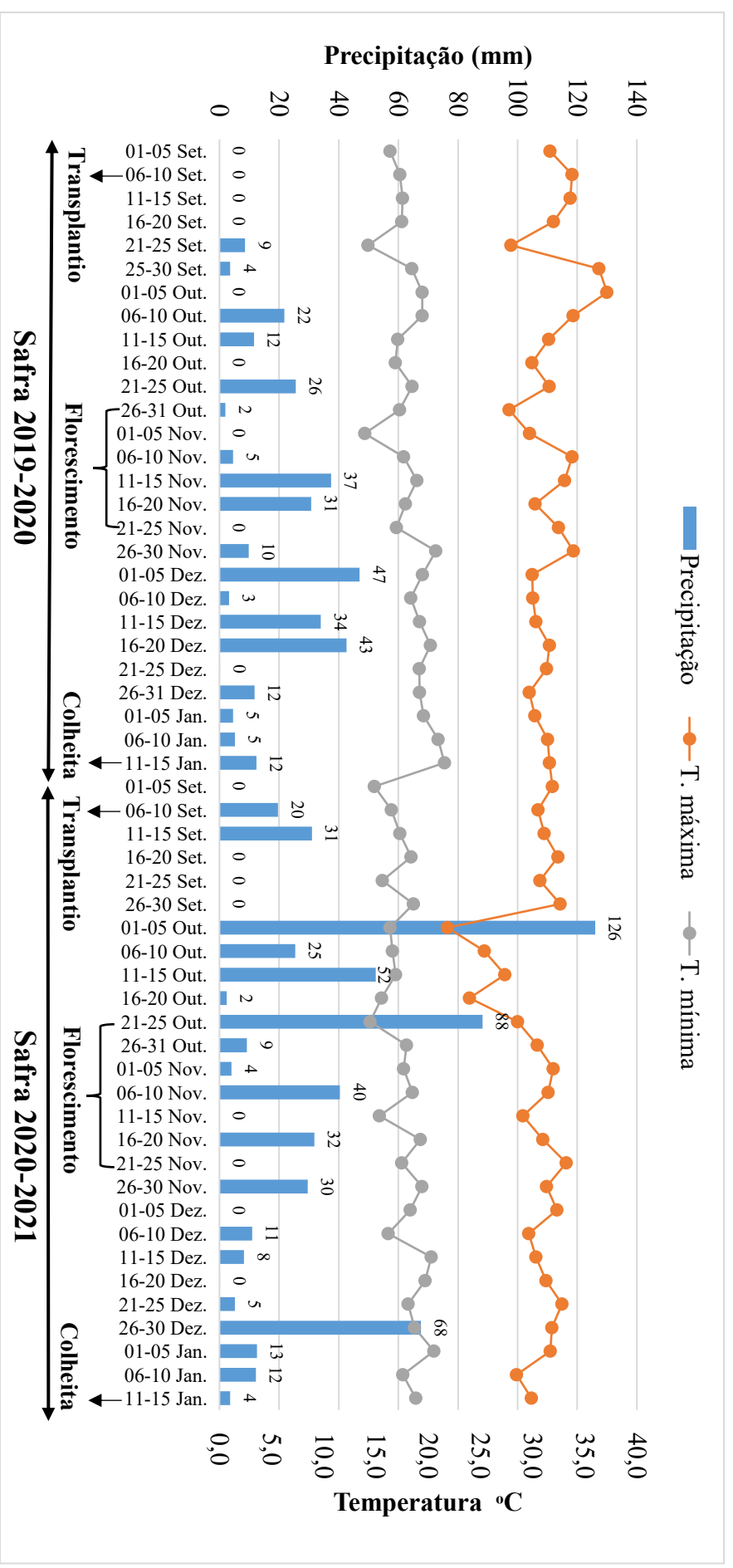
$N_i$  = soma dos indivíduos empregados no i-ésimo tratamento

$n_i$  = número total de indivíduos do i-ésimo tratamento com sucesso;

$p_i$  = proporção de sucesso do i-ésimo tratamento, que é dada pela razão  $n_i/N_i$ ;

$\bar{p}$  = proporção média de sucesso considerando todos os tratamentos conjuntamente, que é dada pela razão  $\sum n_i / \sum N_i$ .

As espigas DH's de cada população foram contabilizadas e separadas nos seguintes intervalos de classes de sementes duplo-haploides por espiga: menor que 5 sementes; de 5 a 25 sementes; de 26 a 50 sementes, 51 a 100 sementes e mais que 100 sementes.



**Figura 3.1** – Precipitação acumulada e média da temperatura mínima e máxima de cinco dias no período do transplante das plântulas duplicadas até a colheita, das safras 2019-2020 e 2020-2021.

Fonte: Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná

#### 4 ARTIGO

### HAPLOIDIA E DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA VIA INJEÇÃO DE COLCHICINA EM MILHO COMUM E SUPERDOCE TROPICAL

#### Resumo

Os objetivos foram determinar a taxa de indução de haploidia em populações de milho comum e superdoce tropical, empregando uma população indutora gimnogenética, e identificar a eficácia da duplicação cromossômica via injeção de colchicina em tecido meristemático. As sementes haploides putativas foram semeadas em bandejas com Turfa Sphagnum, sendo injetado 100 µL de solução de 0,125% de colchicina e 0,5% de dimetilsulfóxido em cada plântula haploide no estágio V2, antes do transplante para campo irrigado. A população indutora utilizada apresentou taxa de indução a haploidia variando de 0,9% a 5%, sendo que mais de 50% das sementes haploides putativas foram falsos haploides. Para taxas de sobrevivência, taxas de reprodução e taxas de sucesso geral para obtenção de duplo-haploides, houve diferenças significativas de populações tropicais e de safras, revelando adequada eficácia deste método de duplicação cromossômica e que o ambiente mais favorável permitiu dobrar o sucesso da obtenção de duplo-haploides.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Zea mays L.*, *Zea mays var. saccharata*, indução a haploidia, duplo-haploides, *in vivo*.



## INTRODUÇÃO

As cultivares comercializadas de milho comum e superdoce são, predominantemente, híbridos obtidos de linhagens, que apresentam a vantagem de conferir elevada produtividade, qualidade e uniformidade. Estas linhagens podem ser obtidas por meio de seis a oito ciclos de autofecundação, ou por meio da tecnologia duplo-haploides (DH), que em duas ou três gerações permite obter linhagens 100% homozigotas (Chaikam *et al.* 2019a).

A obtenção dos duplo-haploides depende do aperfeiçoamento das etapas que envolvem indução de haploidia, identificação de haploides, duplicação cromossômica e a multiplicação de sementes duplo-haploides (Chidzanga *et al.* 2017). A adequação de todas estas etapas tem sido amplamente estudadas em populações de milho comum temperadas (Chase, 1969; Coe, 1959; Dang *et al.* 2012; Eder; Chalyk, 2002; Melchinger *et al.* 2016a; Trentin *et al.*, 2022), mas com número reduzido de publicações envolvendo milho tropicais (Baleroni *et al.* 2021; Battistelli *et al.*, 2013; Couto *et al.* 2015; Ribeiro *et al.* 2020) e, em especial, milho superdoce (Khulbe *et al.* 2020; Sekiya *et al.* 2020; Trentin *et al.* 2022).

Na cultura do milho há o predomínio do uso de indutores gimnogenéticos para obtenção de DH's *in vivo*, que são utilizados na polinização de populações doadoras, estes indutores apresentam vantagens como: elevadas taxas de indução, permanência do citoplasma do genótipo induzido e a facilidade de instalação de campos de indução por meio de campos isolados de polinização.

Os primeiros indutores desenvolvidos foram o Stock 6 (indutor gimnogenético) e Wisconsin 23 (indutor androgenético), ambos de origem temperada e com taxas de indução variando de 1 a 3,2% (Coe, 1959; Kermicle, 1969), que são consideradas baixas e limitantes ao processo de obtenção de DH's. A partir destes primeiros indutores e suas derivações foram desenvolvidos diversos indutores temperados com taxas de indução variando

de: 3% a 5% para o WS14 (Lashermes; Beckert, 1988); 5,5% a 6,7% para MHI (Chalyk, 1999); 8 a 10% para RWS (Röber *et al.* 2005); 10% a 16% para o PHI (Rotarenco *et al.* 2010); 9% a 16% para UH600 (Melchinger *et al.* 2016a); 10,6% a 20,8% para o híbrido CHOI4 (Liu *et al.* 2022). Linhagens indutoras tropicalmente adaptadas (TAILs) foram desenvolvidas pelo Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo (CIMMYT), em conjunto com a Universidade de Hohenheim, na Alemanha, apresentando taxas de indução de 9 a 14% (Chaikam *et al.* 2018).

A etapa de duplicação cromossômica dos indivíduos haploides, que são estéreis por possuírem apenas uma cópia de cada cromossomo em suas células, é fundamental para permitir a autofecundação e a produção de sementes DH's. Desta forma, como normalmente a taxa de duplicação espontânea em milho é baixa, menor que 5% (Chaikam *et al.* 2019b; De La Fuente *et al.* 2020; Molenaar *et al.* 2019), há a necessidade de utilizar métodos de duplicação artificial com emprego de agentes antimitóticos como: a colchicina (Chaikam *et al.* 2020), herbicidas (Melchinger *et al.* 2016b) ou o gás de óxido nitroso (Molenaar *et al.* 2018), que resultam em diferentes taxas de sucesso de duplicação. A colchicina é o produto mais utilizado na cultura do milho, por possuir protocolos mais estabelecidos (Chaikam *et al.* 2020), mas é altamente tóxica, potencialmente cancerígena, perigosa para o meio ambiente e demanda cuidadoso manuseio, aplicação, armazenamento e descarte (Maqbool *et al.* 2020).

Os principais métodos que empregam colchicina na duplicação cromossômica envolvem: a imersão de mudas recém germinadas (Bastilelli *et al.* 2013); imersão de raízes (Chaikam *et al.* 2020); imersão de sementes (Ren *et al.* 2018) ou injeção diretamente no meristema (Eder; Chalyk, 2002). Contudo, há uma carência de pesquisas publicadas para direcionamento e aumento do sucesso da duplicação cromossômica (Chaikam *et al.* 2020), sendo grande parte da informação mantida em sigilo dentro das empresas de melhoramento, sobretudo para ambientes tropicais. Assim, objetivou-se determinar a taxa de indução de haploidia, empregando uma população indutora gimnogenética tropical e,

identificar a eficácia da duplicação cromossômica via injeção de colchicina, em tecido meristemático, em populações de milho comum e superdoce tropical.

### **Material e Métodos**

Durantes os anos de 2020 e 2021, no campo experimental da empresa Tropical Melhoramento e Genética (TMG), unidade de Cambé, Paraná, Brasil, em lotes isolados, foram induzidas à haploidia 23 populações de milho comum tropical do Programa de Melhoramento de Milho da TMG (G2203, H3201, M3101, N2201, R2102, S2202; X2103; A2201, B2201, B2203, B2204, B2205, D2201, D2204, G2201, G2202, I2201, J2206, J4201, K2201, L2201, P2203 e V2202) e dois sintéticos de milho superdoce tropical (SD3005 e SD3006) do Programa de Melhoramento Genético de Milho da Universidade Estadual de Londrina (UEL), homocigotos para o gene *shrunk2* (*sh2*), empregando como macho uma população indutora tropical PI4003. Os genótipos doadores foram semeados em fileiras duplas de 120 m, ladeadas por uma fileira do genótipo indutor aos cinco e dez dias após o início da semeadura, respectivamente.

As sementes obtidas foram classificadas pela marcação do gene *R1-navajo* (*R1-nj*), sendo consideradas diploides, as sementes com endosperma e embrião púrpuro, e haploides putativos, as sementes contendo apenas o endosperma púrpuro. O restante das sementes sem a expressão do *R1-nj* foram descartadas, por não serem consideradas como originadas do cruzamento com o indutor ou devida a ocorrência de inibição do gene marcador.

As sementes haploides putativas de cada população de milho comum foram contabilizadas para estimativa da taxa de sementes haploides por espiga. Contudo, no caso das populações superdoce, também foram contabilizados o número total de sementes diploides obtidas na indução para estimar a taxa de indução (TI), com base na razão do número de

sementes haploides putativas pelo número total destes diploides.

As sementes haploides putativas obtidas foram semeadas em bandejas de polipropileno de 64 células, preenchidas com Turfa Sphagnum, e colocadas para germinar em casa de vegetação, nos dias 27 de agosto de 2020 e de 2021, respectivamente. Após nove dias de cada semeadura, as plântulas obtidas de cada população, no estágio V2, foram contabilizadas para estimar as porcentagens de germinação e foram realizados a eliminação dos falsos haploides (diploides erroneamente considerados haploides devido a falha do processo de classificação das sementes), reconhecidos por apresentarem elevado vigor e padrão morfológicos típicos de diploides. No caso das populações superdoce, as plântulas diploides foram identificadas com base na coloração púrpura da primeira bainha foliar, característica típica do indutor e ausente das populações superdoce empregadas, como o observado por Sekiya *et al.* (2020).

No Laboratório de Melhoramento Genético do Departamento de Biologia da UEL, onze dias após as semeaduras e tendo sido feita a eliminação das plântulas diploides, foram realizados os procedimentos para duplicação cromossômica das plântulas haploides no estágio V2, via injeção de 100 µL da solução de 0,125% de colchicina e 0,5% de dimetilsulfóxido (DMSO) por plântula, na porção central do colmo próximo ao tecido meristemático basal (Eder; Chalyk, 2002).

As plântulas tratadas e contabilizadas foram transplantadas para campo irrigado por gotejamento, na estação experimental da TMG em Cambé, nos dias 09 de setembro de 2020 e 10 de setembro de 2021, respectivamente. O transplante mecânico em fileiras duplas tiveram comprimento variável dependendo do número de indivíduos haploides tratados de cada população (Tabela 4.1). A implementação dos campos de autofecundação de duplo-haploides e manejo foram realizados de acordo com as recomendações para a cultura do milho, visando a máxima redução de estresse bióticos e abióticos.

Em outubro de cada ano, cerca de 30 dias após o transplante e antes do florescimento, foi realizada a eliminação das plantas tipicamente diploides (falsos haploides), mais altas e vigorosas; colmo grosso; folhas largas e com verde intenso; e com expressão pronunciada de antocianina em partes das plantas.

A autofecundação dos duplo-haploides ocorreu de 26 de outubro a 24 de novembro de 2020 e 25 de outubro a 23 de novembro de 2021, respectivamente, com as plantas sobreviventes e que apresentaram fertilidade e sincronismo da produção de pólen e emissão do estilo-estigma. As espigas resultantes das autofecundações foram colhidas separadamente por população doadora, logo que atingiram a maturação fisiológica, evitando a perda das espigas por pragas e doenças no campo.

No Laboratório de Melhoramento Genético, as espigas colhidas passaram por processo de secagem, despalha e seleção. As espigas segregantes foram contabilizadas para cada população doadora e eliminadas, pois se originaram de plantas diploides, não eliminadas antes do florescimento. As espigas não segregante, sem a presença de grãos marcados pelo gene *RI-nj* e consideradas duplo-haploides, foram contabilizadas para cada população doadora, debulhadas individualmente e acondicionadas em sacos de papel devidamente identificados por população e contabilizado o número de sementes por linhagem DH.

Durante a condução dos experimentos foram obtidos dados de contagem separadamente por população doadora induzidas à haploidia: Número de sementes haploides putativas (SH); número de sementes haploides putativas por espiga (SHe); número de sementes diploides de milho superdoce; número de sementes germinadas; número de plântulas tratadas com colchicina e transplantadas a campo (PTC), número de plântulas tratadas com colchicina e mantidas após *roguing* de campo (PTM); número de plantas sobreviventes no campo até autofecundação (PS); número de plantas duplo-haploides autofecundadas (DHA); número de plantas D0 que produziram sementes (DHs); número de sementes por espiga DH.

A partir dos dados de contagem foram estimadas: taxa de indução de haploides (TI): número de SH/número total de sementes induzidas; porcentagem de germinação das sementes haploides (%G): número de sementes haploides germinadas/número de sementes haploides semeadas; taxa de sobrevivência (TS): PS/PTM; taxa de autofecundação (TA): DHA/PS; eficiência da autofecundação de plântulas D0 (EA): DHs/DHA; taxa de reprodução (TR): DHs/PS; Taxa de sucesso geral (TSG): DHs/PTM.

Os dados foram comparados pelo teste de Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ), para comparação das taxas de sucesso, avaliando as populações dentro de cada safra e entre as médias das safras, segundo a expressão:  $X^2 = \frac{1}{\bar{p}(1-\bar{p})} \sum (p_i - \bar{p})^2 N_i$ , onde;  $N_i$  = soma dos indivíduos empregados no  $i$ -ésimo tratamento;  $n_i$  = número total de indivíduos do  $i$ -ésimo tratamento com sucesso;  $p_i$  = proporção de sucesso do  $i$ -ésimo tratamento, que é dada pela razão  $n_i/N_i$ ;  $\bar{p}$  = proporção média de sucesso considerando todos os tratamentos conjuntamente, que é dada pela razão  $\sum n_i / \sum N_i$ .

As espigas DH's de cada população foram contabilizadas e separadas nos seguintes intervalos de classes de sementes duplo-haploides por espiga: menor que 5 sementes; de 5 a 25 sementes; de 26 a 50 sementes, 51 a 100 sementes e mais que 100 sementes.

## Resultados e Discussão

O indutor gimnogenético PI4003 utilizado para polinizar nove populações na safra 2019/20 e 18 populações na safra 2020/21, permitiram a obtenção de 73074 e 27074 sementes consideradas haploides putativas, por meio da expressão do gene *R1-nj*, respectivamente. As taxas de indução de haploidia (TI) com base nas sementes haploides putativas, apresentaram variação média de 0,9% a 5,0% para populações de milho superdoce, com comportamento diferenciado entre as safras (Tabela 4.1).

Para as populações de milho comum, não foram contabilizados o número de sementes diploides, com embrião e endosperma marcados, mas pode se verificar uma variação de 4 a 10 sementes por espiga, nas duas safras. Considerando que as espigas de milho comum tinham em média 250 sementes por espiga, estima-se que em milho comum, a taxa de indução variou de 1,6% a 4,0%, ficando dentro do intervalo observado para populações superdoces avaliadas. Estes resultados evidenciaram uma baixa taxa de indução e a necessidade de melhoramento do indutor PI4003, que apresentou indução semelhantes aos indutores da década de 80 (Lashermes; Beckert, 1988) e resultados inferiores as taxas de indução dos indutores atuais, com estimativas médias entre 8% e 20,8% (Chaikam *et al.* 2018; Liu *et al.* 2022; Melchinger *et al.* 2016a; Prigge *et al.* 2011; Rotarenco *et al.* 2010; Trentin *et al.* 2022). Em uma comparação da taxa de indução em milhos com diferentes endospermas, Trentin *et al.* (2022), evidenciaram maiores estimativas em milhos dentados em comparação aos milhos doce, 9,6% e 4,6%, respectivamente. Contudo, os resultados obtidos neste artigo não indicam esta diferenciação entre milho comum e milho superdoce (Tabela 4.1).

As sementes haploides putativas de cada população semeadas em bandejas e mantidas em casa de vegetação, apresentaram adequadas taxas de germinação, variando de 77,5% a 97,6% na safra 2019-2020 e de 87,8% a 98,5% na safra 2020-2021 (Tabela 4.1), estas taxas foram próximas as apresentadas por Prassana *et al.* (2012) e Zararsiz *et al.* (2019), que variaram de 85% a 90% e 63,6% a 95,2%, respectivamente.

A identificação precoce das plântulas realmente haploides a serem submetidas ao processo de duplicação cromossômica é importante para a redução de gastos com reagentes químicos, mão de obra e espaço em casa de vegetação e campo (Chaikam *et al.* 2016). Para isto, foram semeadas bandejas de indivíduos  $F_1$ 's diploides de cada população para servir de comparação entre indivíduos diploides e haploides e auxiliar na eliminação dos falsos haplóides presentes nas bandejas. No caso das populações superdoce, assim como observado

por Sekiya *et al.* (2020), os haploides apresentaram apenas primeira bainha foliar verde, a semelhança das plantas utilizadas como fêmeas na indução à haploidia. Contudo, como as populações doadoras de milho comum apresentavam primeira bainha foliar roxa, a eliminação dos diploides se deu com base nas características morfológicas típicas dos diploides: maior vigor das plântulas, folhas mais largas e de coloração verde intenso (Chaikam *et al.* 2017).

Os autores como Kebede *et al.* (2011), Yu e Birchler (2016), Sekiya *et al.* (2020) e Trentin *et al.* (2022) também relatam a as limitações da identificação correta dos indivíduos haploides, apenas pela expressão do gene *RI-nj* nas sementes, sendo verificado elevado número de sementes falso haploides, superestimando as taxas de indução dessas populações. Da mesma forma, neste foi observada elevada frequência de falsos haploides dentro das sementes haploides putativas semeadas, sendo necessária realizar a eliminação de mais de 50% das plântulas antes do tratamento com colchicina, nas duas safras (Tabela 4.1). Houve diferentes porcentagens de plântulas tratadas e transplantadas (PTC) dentre as populações em cada safra, em relação as sementes haploides putativas semeadas, com variação de 23,7% a 42,6% na safra 2019/20 e 16,7% a 49,8% na safra 2020/21. Estes resultados indicam prevalência diferentes de falsos haploides em função das populações induzidas. A menor porcentagem de PTC observado para o milho superdoce, deve estar associada à maior segurança da eliminação dos diploides, com o auxílio da coloração da primeira bainha foliar.

Mesmo com a pré-eliminação das plântulas diploides nas bandejas, foi necessário ainda a realização de *roguing* dos diploides à campo, com base em características morfológicas evidentes dos diploides e em características específicas da população doadora. Na estimação das porcentagens de plântulas haploides tratadas e mantidas após o *roguing* dos diploides no campo (PTM), foi também subtraído número de plantas que produziram espigas segregantes para o gene *RI-nj*, o que permitiu observar estimativas de PTM entre 19,3% e 31,9% na safra 2019/20 e entre 11,5% e 50,4% na safra 2020/21, em relação as sementes



haploides putativas semeadas (Tabela 4.1). Estes resultados evidenciam que a seleção dos haploides com base na cor verde da bainha foliar em milho superdoce foi eficiente para eliminação dos diploides, reduzindo drasticamente a manutenção de diploides à campo e sua necessidade de *roguing*, havendo casos de eliminação completa dos diploides na fase de bandejas. Também em relação às populações de milho comum, a pré-seleção em bandejas foi importante para reduzir a necessidade de *roguing* à campo, sendo observado em várias populações diferença pequena entre as estimativas de PTC e PTM, com destaque para M3101, R2102, B2201, B2205, G2202, K2201 e V2202.

Na safra 2019/20, as condições ambientais foram favoráveis promovendo menor estresse para a recuperação das plântulas tratadas e transplantadas, pois na safra 2020/21, quatro semanas após o transplântio, houve uma chuva de granizo, que danificou as folhas das plântulas, contribuindo negativamente para reduções nas taxas de sobrevivência (TS), taxas de autofecundação (TA); eficiência da autofecundação (EA), taxas de reprodução (TR) e taxa de sucesso geral (TSG). Assim, como neste trabalho, Eder e Chalyk (2002) e Melchinger *et al.* (2016b), obtiveram melhor eficácia na obtenção de linhagens duplo-haploides em condições ambientais mais favoráveis, chegando ser quase duas vezes maior do que em anos com condições desfavoráveis.

As taxas de sobrevivência (TS) foram estimadas com base no número de plântulas realmente haploides sobreviventes até a autofecundação (PHS), em relação ao número de plântulas haploides tratadas (PTM), ambas taxas já eliminadas as plântulas diploides nos *roguing*s e plantas que apresentaram espigas segregantes para o gene *RI-nj*. As taxas de sobrevivência ao tratamento com injeção de solução de colchicina, observadas no presente trabalho, diferiram entre as safras e entre as populações dentro da safra (Tabela 4.2), revelando que ambientes favoráveis são fundamentais para aumentar as taxas de sobrevivência das

populações submetidas ao tratamento com o agente antimetabólico e que este tem efeitos diferentes sobre a mortalidade de plântulas nas populações (Chaikam *et al.* 2019a).

As populações apresentaram taxas de sobrevivência (TS) significativamente diferentes, variando de 74,30% a 95,70% na safra 2019-20 e de 42,90% a 91,40% na safra 2020-2021 (Tabela 4.2), sendo que 78% das populações na safra 2019-20 e 61% das populações na safra 2020/21, apresentaram taxas de sobrevivências maior ou igual a 80%. Estas taxas de sobrevivência são comparáveis aos melhores resultados apresentados na literatura, que variaram de acordo com a população doadora, condições ambientais e métodos de duplicação cromossômica, com variação de 47,2% a 92,6% para imersão de mudas após germinadas em solução de colchicina a 0,04% e 0,06% (Chaikam *et al.* 2020; Dang *et al.* 2012; Eder; Chalyk, 2002; Melchinger *et al.* 2016b; Zararsiz *et al.* 2019); de 40,33% a 95,2% para imersão de raízes até a região da coroa em solução de colchicina entre 0,04% a 0,10% (Chaikam *et al.*, 2020); de 88,6% em condições de campo e 90,8% em casa de vegetação para a injeção com solução de colchicina a 0,125% (Eder; Chalyk, 2002).

Dentre as plantas sobreviventes ao processo de duplicação cromossômica foi possível identificar plantas férteis, que permitiram verificar taxas de autofecundação diferentes entre as populações, variando de 17,1% a 46,1% na safra 2019-20 e de 8,3% a 45,5% na safra 2020-21, ambas em condições de campo e sem uso de sombrites. Na melhor safra (2019-20) foi observada taxa média de autofecundação igual a observada por Eder e Chalyk (2002) em casa de vegetação (30,5%), um ambiente mais favorável que à campo. Mesmo na safra 2020-21, a taxa média foi quase o dobro da observada apresentada por Eder e Chalyk (2002) em condições de campo.

O sucesso da autofecundação, estimado pela eficiência de autofecundação foi maior na safra 2019-20 e pode ser explicado, em parte, pelas melhores condições climáticas desta safra, menor intensidade de pragas como a lagarta do cartucho e ataque de pulgões. As

taxas de eficiência da autofecundação na safra 2019-20 variaram de 53% a 80%, mas não houve diferença entre as populações na safra 2020-21, apresentando uma média igual a 46,8%.

Com vistas a criar formas mais padronizadas de se avaliar a eficiência dos métodos de duplicação cromossômica, Melchinger et al. (2016b) sugeriram uso das taxas de reprodução (TR) e taxa de sucesso geral (TSG). As taxas de reprodução, estimadas pela razão entre o número de plantas que produziram sementes duplo-haploides pelo número de plantas sobreviventes, foram diferentes para as populações avaliadas dentro de cada safra, com estimativas entre 11,2% e 36,5% na safra 2019-20 e de 3,1% a 25,5% safra 2020-21 (Tabela 4.2). Para a taxa de sucesso geral (TSG), estimada pela razão do número de plantas que produziram sementes duplo-haploides pelo número de plântulas tratadas com colchicina e mantidas após a eliminação dos indivíduos diploides, também houve diferenças entre as populações, variando entre 9,9% e 27,9% na safra 2019-20 e entre 2,9% e 20,0% na safra 2020-21 (Tabela 4.2).

O sucesso da obtenção de linhagens DH's variou em função da população doadora e para as safras. A comparação das médias gerais das taxas de sucesso em cada safra, revelam uma superioridade de quase o dobro na safra 2019-20, em relação à safra seguinte, ressaltando o quanto estas taxas de sucesso do processo de duplicação depende do ambiente (Tabela 4.2). Isto pode ser evidenciado nas populações de milho superdoce, avaliadas em ambas as safras.

Assim como neste trabalho, artigos que empregam mais de um experimento para avaliar a eficiência da duplicação cromossômica, revelam taxas de reprodução e taxas de sucesso geral bastante diferentes entre experimentos. Melchinger *et al.* (2016b), utilizando o método de imersão de mudas após germinação com concentração de 0,06% de colchicina e 0,5% de DMSO e duração de 8 horas, obtiveram taxas de reprodução iguais a 15,9%, 16,8%, 21,1%, 29,2% e taxas de sucesso geral iguais a 10,0%, 11,1%, 11,9% e 22,1%.

Semelhantemente, Chaikam *et al.* (2020), testaram em diferentes populações o método de imersão de mudas após germinação e com concentração de 0,04% de colchicina e 0,1 DMSO e duração de 5 horas, estimou 12 taxas de reprodução variaram de 3,1% a 11,7% e das taxas de sucesso geral entre 2,7% e 10,5%. Quando utilizaram o método de imersão de raízes até a região da coroa, com concentração de 0,04% de colchicina e 0,1 DMSO e duração de 5 horas, Chaikam *et al.* (2020) observaram taxas de reprodução de 11,42%, 16,9%, 30,3% e taxas de sucesso geral de 10,3%, 10,7% e 11,9%. Contudo, em único experimento com doze populações, onde Chaikam *et al.* (2020) sugerem uma otimização das concentrações de colchicina para o método de imersão de raízes observou taxas de reprodução entre 24,9% e 61,5% e taxas de sucesso geral entre 23,5% e 58,5%.

Os resultados apresentados na literatura para a taxa de reprodução e a taxa de sucesso geral, indicam que há variação de acordo com a população doadora, relação quanto as condições ambientais, ao método de aplicação da colchicina, concentração da colchicina e até mesmo a duração da exposição das plântulas à solução antimitótica. Neste sentido, pode-se considerar que a duplicação cromossômica por meio da injeção com solução de colchicina foi eficiente e se posicionou entre os melhores métodos de duplicação apresentados na literatura.

Em termos de consumo de colchicina, a partir da experiência prática do Laboratório, para o tratamento de grupos de 1000 indivíduos com solução de colchicina em diferentes métodos, com concentrações de 0,125% para injeção direta no tecido meristemático basal, 0,04% para imersão de mudas após a germinação e 0,07% para imersão de raízes até a região da coroa, seriam necessários volumes de soluções iguais a 100 mL (132 mg de colchicina com um mínimo de 95% de pureza), 1750 mL (737 mg de colchicina com um mínimo de 95% de pureza) e 3750 mL (2763 mg de colchicina com um mínimo de 95% de pureza), respectivamente. Assim, em comparação com o consumo de colchicina pelo método de injeção direta no tecido meristemático basal, seria necessário 5,6 vezes mais colchicina para o método

de imersão de mudas e 21 vezes mais colchicina para o método de imersão de raízes. Esses dados indicam menor consumo de colchicina para a metodologia por meio de injeção, reduzindo os custos com esse reagente, com a vantagem de minimizar a necessidade de descarte de resíduos após o tratamento. Por outro lado, a metodologia de injeção apresenta a desvantagem de necessitar um número maior de pessoas treinadas no momento da aplicação da solução de colchicina, o que pode influenciar diretamente na eficiência da duplicação e possíveis riscos de manuseio devido ao maior número de pessoas expostas ao reagente.

Processos de duplicação cromossômica, que produzam espigas duplo haploides com maior número de sementes, permite acelerar o melhoramento genético, pois disponibilizam sementes suficientes para multiplicação e a avaliação *per se* e em combinações híbridas. Neste sentido, os DHs obtidos neste estudo foram classificadas por intervalos de quantidades de sementes por espiga, sendo observadas variação das frequências de 21,6% a 56,3% e 7,1% a 66,7 para espigas com menos de 5 sementes; de 18,8% a 41,4% e 6,7 a 50% no intervalo de 5 a 25 sementes e 19,6% a 37,8% e 12,5 a 58,8% acima de 25 sementes, respectivamente para populações nas safras 2019-20 e 2020-21 (Figura 4.1). As frequências médias destes intervalos de quantidade de sementes DHs por espiga, empregando o tratamento de injeção de solução de colchicina, foram semelhantes nas duas safras e comparáveis aos melhores resultados apresentados por Chaikam *et al.* (2020), empregando solução de colchicina, para imersão de raízes (38,9% de espigas com menos de 5 sementes, 36% de espigas no intervalo de 5 a 25 sementes e 28% de espigas acima de 25 sementes), mas superaram aos observados para imersão de mudas (56,8% de espigas com menos de 5 sementes, 44,3% no intervalo de 5 a 25 sementes e de 12,5% de espigas com mais de 25 sementes).

As populações superdoce SD3005 e SD3006 e as populações de milho comum B2201, D220 e I2201 na safra 2020-2021 mostraram maior desempenho de produção

de sementes duplo-haploides por espiga, possuindo uma frequência maior que 40% acima de 25 sementes por espiga (Figura 4.1).

### **Conclusão**

O indutor PI4003 apresenta baixas taxas de indução de haploidia em populações de milho comum e superdoce tropical, com desempenho diferenciado entre as safras e elevadas taxas de falsos haploides, indicando a necessidade de melhorar o indutor para estas características.

A duplicação cromossômica por meio da injeção de solução de colchicina no tecido meristemático basal tem eficácia comparável aos melhores métodos de duplicação cromossômica apresentados na literatura, com a vantagem de ser um método de baixo consumo de colchicina e não gerar grandes quantidades de resíduos após o tratamento.

### **Agradecimentos**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Ensino Superior Pessoal (CAPES) pela bolsa de estudos, a empresa Tropical Melhoramento e Genética (TMG) e aos integrantes do laboratório de Melhoramento Genético de Milho, para a condução deste trabalho, e ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, pelo incentivo à pesquisa.

## Referências

- Baleroni AG, Ré F, Pelozo A, Kamphorst SH, Carneiro JWP, Rossi RM and Scapim CA. (2021). Identification of haploids and diploids in maize using seedling traits and flow cytometry. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** **21**:1–8.
- Battistelli GM, Von Pinho RG, Justus A, Couto EGO and Balestre M. (2013). Production and identification of doubled haploids in tropical maize. **Genetics and Molecular Research** **12**: 4230–4242.
- Chaikam V, Gowda M, Martinez L, Ochieng J, Omar HA and Prasanna BM. (2020). Improving the efficiency of colchicine-based chromosomal doubling of maize haploids. **Plants** **9**: 1–13.
- Chaikam V, Gowda M, Nair SK, Melchinger AE and Boddupalli PM. (2019a). Genome-wide association study to identify genomic regions influencing spontaneous fertility in maize haploids. **Euphytica** **215**: 1–14.
- Chaikam V, Lopez LA, Martinez L, Burgueño J and Boddupalli PM. (2017). Identification of in vivo induced maternal haploids in maize using seedling traits. **Euphytica** **213**: 177.
- Chaikam V, Martinez L, Melchinger AE, Schipprack W and Boddupalli PM. (2016). Development and validation of red root marker-based haploid inducers in maize. **Crop Science** **56**: 1678–1688.
- Chaikam V, Molenaar W, Melchinger AE and Boddupalli PM. (2019b). Doubled haploid technology for line development in maize: technical advances and prospects. **Theoretical and Applied Genetics** **132**: 3227–3243.
- Chaikam V, Nair SK, Babu R, Martinez L, Tejomurtula J, Boddupalli PM. (2015). 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. **TAG. Theoretical and applied genetics** **128**: 159–171.
- Chaikam V, Nair SK, Martinez L, Lopez LA, Utz HF, Melchinger AE and Boddupalli PM. (2018). Marker-assisted breeding of improved maternal haploid inducers in maize for the tropical/subtropical regions. **Frontiers in Plant Science** **871**: 1–14.
- Chalyk ST. (1999). Creating new haploid-inducing lines of maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter** **73**: 53-54.
- Chase, S. S. (1969). Monoploids and monoploid-derivatives of maize (*Zea mays* L.). **The Botanical Review** **35**: 117–168.
- Chidzanga C, Muzawazi F, Midzi J and Hove T. (2017). Production and use of haploids and doubled haploid in maize breeding: A review. **African Journal of Plant Breeding** **4**: 201–213.
- Coe EH. (1959) A line of maize with high haploid frequency. **America Naturalist** **93**: 381-382.

Kermicle JL. (1969). Androgenesis conditioned by a mutation in maize. **Science** **166**: 1422-1424.

Couto EGO, Von Pinho EVR, Von Pinho RG, Veiga AD, Bustamante FO and Dias KOG (2015) In vivo induction and efficiency of two chromosome duplication protocols in tropical maize. **Ciência e Agrotecnologia** **39**: 435-442.

Dang NC, Munsch M, Aulinger I, Renlai W and Stamp P. (2012). Inducer line generated double haploid seeds for combined waxy and opaque 2 grain quality in subtropical maize (*Zea mays*. L.). **Euphytica** **183**: 153–160.

De La Fuente GN, Frei UK, Trampe B, Ren J, Bohn M, Yana N, Verzeznazzi A, Murray SC and Lübberstedt T. (2020). A diallel analysis of a maize donor population response to in vivo maternal haploid induction: II. Haploid male fertility. **Crop Science** **60**: 873–882.

Eder J and Chalyk S. (2002). In vivo haploid induction in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, 104(4), 703–708. <https://doi.org/10.1007/s00122-001-0773-4>

Kebede AZ, Dhillon BS, Schipprack W, Araus JL, Bänziger M, Semagn K, Alvarado G and Melchinger AE. (2011). Effect of source germplasm and season on the in vivo haploid induction rate in tropical maize. **Euphytica** **180**: 219–226.

Khulbe RK, Pattanayak A, Kant L, Bisht GS, Pant MC, Pandey V, Kapil R and Mishra NC. (2020). Doubled haploid production in maize under sub-montane himalayan conditions using *R1-nj*-based haploid inducer TAILP1. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding** **80**: 261–266.

Lashermes P and Beckert M. (1988). Genetic control of maternal haploidy in maize (*Zea mays* L.) and selection of haploid inducing lines. **Theoretical and Applied Genetics** **76**: 405–410.

Liu C, Li J, Chen M, Li W, Zhong Y, Dong X, Xu X, Chen C, Tian X and Chen S. (2022). Development of high-oil maize haploid inducer with a novel phenotyping strategy. **Crop Journal** **10**: 524–531.

Maqbool MA, Beshir AR and Khokhar ES. (2020). Doubled haploids in maize: Development, deployment, and challenges. **Crop Science** **60**: 2815–2840.

Melchinger AE, Brauner PC, Böhm J and Schipprack W. (2016a). In vivo haploid induction in maize: Comparison of different testing regimes for measuring haploid induction rates. **Crop Science** **56**: 1127–1135.

Melchinger AE, Molenaar WS, Mirdita V and Schipprack W. (2016b). Colchicine alternatives for chromosome doubling in maize haploids for doubled- haploid production. **Crop Science** **56**: 559–569.

Molenaar WS, Schipprack W, Brauner PC and Melchinger AE. (2019). Haploid male fertility and spontaneous chromosome doubling evaluated in a diallel and recurrent selection experiment in maize. **Theoretical and Applied Genetics** **132**: 2273–2284.

Molenaar WS, Schipprack W and Melchinger AE. (2018). Nitrous oxide-induced chromosome doubling of maize haploids. **Crop Science** **58**: 650–659.



- Prigge V, Sánchez C, Dhillon BS, Schipprack W, Araus JL, Bänziger M, Melchinger AE. (2011). Doubled Haploids in Tropical Maize: I. Effects of Inducers and Source Germplasm on *in vivo* Haploid Induction Rates. **Crop Science** **51**: 1498-1506
- Ren X, Ci J, Cui X and Yang W. (2018). Doubling effect of anti-microtubule herbicides on the maize haploid. **Emirates Journal of Food and Agriculture** **30**: 903–908.
- Ribeiro CB, Rezende BA, Bueno Filho JS de S, Silva ÉDB da, Dias KO das G, Nunes JAR, Carvalho PLS, Mota SF, Bustamante F de O, Diniz RP, Castro CEC de, Camargos RB, Nascimento J and de Souza JC. (2020). Breeding strategies for tropical maize targeting *in vivo* haploid inducers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** **20**: 1–8.
- Röber FK, Gordillo GA and Geiger HH. (2005) *In vivo* haploid introduction in maize – performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding. **Maydica** **50**: 275-283.
- Rotarencu V, Dicu G, State D and Fuia S. (2010). New inducers of maternal haploids in maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter** **84**: 1–7.
- Sekiya A, Pestana JK, Silva MGB da, Krause MD, Silva, CRM da and Ferreira, J. M. (2020). Haploid induction in tropical supersweet corn and ploidy determination at the seedling stage. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, **55**: e00968.
- Trentin HU, Batîru G, Frei UK, Dutta S and Lübberstedt T. (2022). Investigating the Effect of the Interaction of Maize Inducer and Donor Backgrounds on Haploid Induction Rates. **Plants**, **11**: 1–10.
- Yu W and Birchler JA. (2016). A green fluorescent protein-engineered haploid inducer line facilitates haploid mutant screens and doubled haploid breeding in maize. **Molecular Breeding** **36**: 1–12.
- Zararsiz D, Öztürk L, Yanikoğlu S, Turgut İ, Kizik S and Bilgin B. (2019). Production of double haploid plants using *in vivo* haploid techniques in Corn. **Tarım Bilimleri Dergisi** **25**: 62–69.

**Tabela 4.1** - Números de sementes haploides putativas (SH); sementes haploides putativas por espiga (SHe); taxa de indução de haploides (TI); porcentagem de germinação das SH (%G); número de plântulas tratadas com colchicina e transplantadas (PTC) e número de plântulas tratadas com colchicina e mantidas após *roguing* de campo (PTM), em diferentes populações de milho comum e superdoce. Safras 2019/20 e 2020/21.

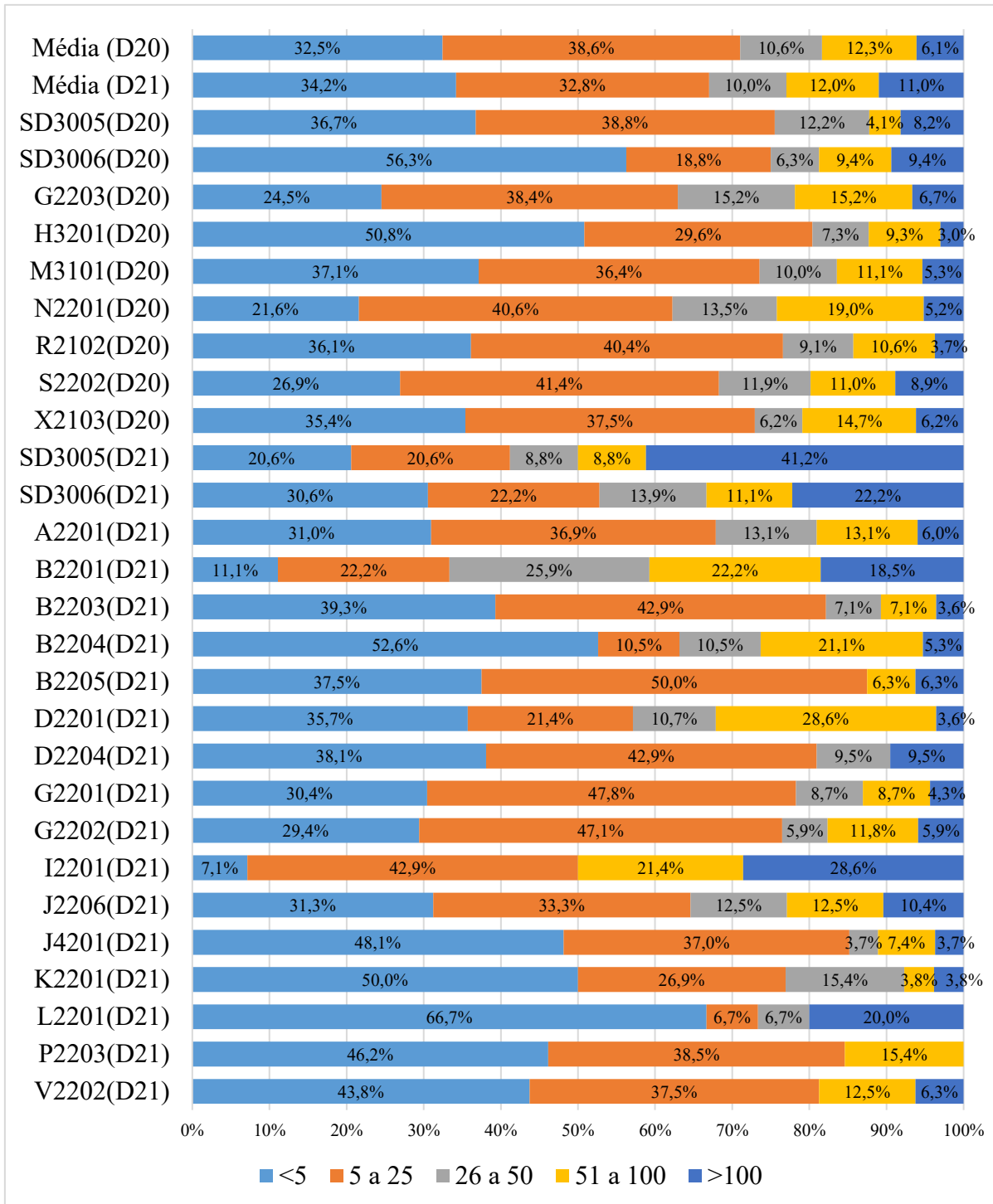
População	SH	SHe	TI	%G	PTC	PTM
Saфра 2019/20						
SD3005	1024	6,4	5,0%	77,5% <sup>b</sup>	276 (27,0%)	268 (26,2%)
SD3006	655	5,0	1,1%	88,9% <sup>b</sup>	155 (23,7%)	129 (19,7%)
G2203	6867	4,7	---	90,9%	2607 (38,0%)	1787 (26,0%)
H3201	8301	9,8	---	97,6%	2335 (28,1%)	1605 (19,3%)
M3101	11260	9,3	---	97,6%	3792 (33,7%)	3563 (31,6%)
N2201	6056	4,4	---	94,6%	1931 (31,9%)	1526 (25,2%)
R2102	15067	8,5	---	96,1%	5341 (35,4%)	4601 (30,5%)
S2202	11776	7,9	---	92,2%	3814 (32,4%)	3014 (25,6%)
X2103	12068	8,1	---	90,5%	5144 (42,6%)	3852 (31,9%)
Saфра 2020/21						
SD3005	959	1,8	0,9%	91,8% <sup>a</sup>	335 (34,9%)	333 (34,7%)
SD3006	1752	4,1	2,2%	97,5% <sup>a</sup>	293 (16,7%)	292 (16,7%)
A2201	1497	7,9	---	90,1%	926 (61,9%)	755 (50,4%)
B2201	800	8,6	---	98,4%	214 (26,8%)	172 (21,5%)
B2203	694	6,3	---	98,1%	231 (33,3%)	140 (20,2%)
B2204	409	8,1	---	96,3%	198 (48,4%)	151 (36,9%)
B2205	509	4,4	---	94,3%	217 (42,6%)	190 (37,3%)
D2201	4362	4,3	---	90,2%	1931 (44,3%)	610 (14,0%)
D2204	1939	8,1	---	87,8%	921 (47,5%)	421 (21,7%)
G2201	1503	9,8	---	98,1%	389 (25,9%)	225 (15,0%)
G2202	2616	9,4	---	93,7%	1235 (47,2%)	1111 (42,5%)
I2201	830	9,3	---	96,5%	254 (30,6%)	180 (21,7%)
J2206	3447	8,1	---	97,9%	1717 (49,8%)	686 (19,9%)
J4201	986	4,4	---	99,5%	277 (28,1%)	219 (22,2%)
K2201	586	7,9	---	98,1%	282 (48,1%)	273 (46,6%)
L2201	1582	9,9	---	98,5%	547 (34,6%)	182 (11,5%)
P2203	1805	6,2	---	95,6%	781 (43,3%)	450 (24,9%)
V2202	795	8,5	---	97,4%	175 (22,0%)	144 (18,1%)
X <sup>2</sup> Saфра 19/20	---	---	---	*	*	*
X <sup>2</sup> Saфра 20/21	---	---	---	*	*	*
Média Saфра 19/20		--	--	94,0% <sup>b</sup>	34,8%	27,8%
Média Saфра 20/21		--	--	94,7% <sup>a</sup>	40,3*	24,1%
Total/média	100145	--	--	94,2%	36318	26879

ns, \*: não significativo e significativo em nível de 0,05 de probabilidade pelo teste de qui-quadrado ( $X^2$ ), respectivamente, sendo que os valores seguidos de mesmas letras não diferiram significativamente pelo  $X^2$ .

**Tabela 4.2** - Números de plantas haploides sobreviventes no campo (PHS); taxa de sobrevivência (TS); plantas duplo-haploides autofecundadas (DHA); taxa de autofecundação em relação as plântulas tratadas (TA); plantas D0 que produziram sementes (DHs); eficiência de autofecundação de plântulas D0 (EA); taxa de reprodução (TR) e taxa de sucesso geral (TSG), em diferentes populações milho comum e superdoce. Safras 2019/20 e 2020/21.

População	PHS	TS	DHA	TA	DHs	EA	TR	TSG
Safra 2019/20								
SD3005	201	75,0%	75	37,3%	50	66,7%	24,9%	18,7%
SD3006	115	89,1%	53	46,1%	36	67,9%	31,3%	27,9%
G2203	1664	93,1%	560	33,7%	385	68,8%	23,1%	21,5%
H3201	1536	95,7%	545	35,5%	310	56,9%	20,2%	19,3%
M3101	2646	74,3%	875	33,1%	462	52,8%	17,5%	13,0%
N2201	1373	90,0%	439	32,0%	351	80,0%	25,6%	23,0%
R2102	4116	89,5%	1025	24,9%	722	70,4%	17,5%	15,7%
S2202	2803	93,0%	1285	45,8%	1024	79,7%	36,5%	34,0%
X2103	3408	88,5%	582	17,1%	383	65,8%	11,2%	9,9%
Safra 2020/21								
SD3005	143	42,9%	56	39,2%	34	60,7%	23,8%	10,2%
SD3006	235	80,5%	90	38,3%	38	42,2%	16,2%	13,0%
A2201	649	86,0%	172	26,5%	86	50,0%	13,3%	11,4%
B2201	144	83,7%	56	38,9%	28	50,0%	19,4%	16,3%
B2203	110	78,6%	50	45,5%	28	56,0%	25,5%	20,0%
B2204	138	91,4%	45	32,6%	21	46,7%	15,2%	13,9%
B2205	164	86,3%	55	33,5%	17	30,9%	10,4%	8,9%
D2201	363	59,5%	57	15,7%	28	49,1%	7,7%	4,6%
D2204	329	78,1%	44	13,4%	21	47,7%	6,4%	5,0%
G2201	187	83,1%	46	24,6%	23	50,0%	12,3%	10,2%
G2202	931	83,8%	77	8,3%	34	44,2%	3,7%	3,1%
I2201	156	86,7%	31	19,9%	15	48,4%	9,6%	8,3%
J2206	438	63,8%	99	22,6%	48	48,5%	11,0%	7,0%
J4201	182	83,1%	71	39,0%	27	38,0%	14,8%	12,3%
K2201	231	84,6%	50	21,6%	28	56,0%	12,1%	10,3%
L2201	104	57,1%	30	28,8%	15	50,0%	14,4%	8,2%
P2203	356	79,1%	37	10,4%	13	35,1%	3,7%	2,9%
V2202	128	88,9%	49	38,3%	18	36,7%	14,1%	12,5%
X <sup>2</sup> Safra 19/20	---	*	---	*	---	*	*	*
X <sup>2</sup> Safra 20/21	---	*	---	*	---	ns	*	*
Média Safra 19/20		87,8% <sup>a</sup>		30,5% <sup>a</sup>		68,5% <sup>a</sup>	20,8% <sup>a</sup>	18,3% <sup>a</sup>
Média Safra 20/21		76,3% <sup>b</sup>		22,4% <sup>b</sup>		46,8% <sup>b</sup>	10,5% <sup>b</sup>	8,0% <sup>b</sup>
Total/média	22850	85,0%	6554	28,7%	4245	64,8%	18,6%	15,8%

ns, \*: não significativo e significativo em nível de 0,05 de probabilidade pelo teste de qui-quadrado (X<sup>2</sup>), respectivamente, sendo que os valores seguidos de mesmas letras não diferiram significativamente pelo X<sup>2</sup>.



**Figura 4.1** - Porcentagens de espigas duplo-haploides obtidas de diferentes populações de milho superdoce e comum nas safras 2019/20 (D20) e 2020/21 (D21), com base em diferentes intervalos de quantidades de sementes por espiga, obtidas pela duplicação cromossômica por injeção de solução de colchicina em plântulas no estágio V2.

## 5 CONCLUSÕES FINAIS

O indutor PI4003 apresenta baixas taxas de indução de haploidia em populações de milho comum e superdoce tropical, com desempenho diferenciadas entre as safras e elevadas taxas de falsos haploides, indicando a necessidade de melhoramento do indutor para estas características.

A duplicação cromossômica por meio da injeção de solução de colchicina no tecido meristemático basal tem eficácia comparável aos melhores métodos de duplicação cromossômica apresentados na literatura, com a vantagem de ser um método de baixo consumo de colchicina e não gerar resíduos após o tratamento.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALERONI, A. G.; RÉ, F.; PELOZO, A.; KAMPHORST, S. H.; CARNEIRO, J. W. P.; ROSSI, R. M.; SCAPIM, C. A. Identification of haploids and diploids in maize using seedling traits and flow cytometry. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 21, n. 4, p. 1–8, 2021.
- BARRET, P.; BRINKMANN, M.; BECKERT, M. A major locus expressed in the male gametophyte with incomplete penetrance is responsible for in situ gynogenesis in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 117, n. 4, p. 581–594, 2008.
- BATTISTELLI, G. M.; VON PINHO, R. G.; JUSTUS, A.; COUTO, E. G. O.; BALESTRE, M. Production and identification of doubled haploids in tropical maize. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 4230–4242, 2013.
- CHAIKAM, V.; NAIR, S. K.; BABU, R.; MARTINEZ, 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. TAG. Theoretical and applied genetics. **Theoretische und angewandte Genetik**, v. 128, n. 1, 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, n. 4, p. 1678–1688, 2016.
- CHAIKAM, V.; LOPEZ, L. A.; MARTINEZ, L.; BURGUEÑO, J.; BODDUPALLI, P. M. Identification of in vivo induced maternal haploids in maize using seedling traits. **Euphytica**, v. 213, n. 8, 2017.
- CHAIKAM, V.; NAIR, S. K.; MARTINEZ, L.; LOPEZ, L. A.; UTZ, H. F.; MELCHINGER, A. E.; BODDUPALLI, P. M. Marker-assisted breeding of improved maternal haploid inducers in maize for the tropical/subtropical regions. **Frontiers in Plant Science**, v. 871, n. 10, p. 1–14, 2018.
- CHAIKAM, V.; MOLENAAR, W.; MELCHINGER, A. E.; BODDUPALLI, P. M. Doubled haploid technology for line development in maize: technical advances and prospects. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 132, n. 12, p. 3227–3243, 2019a.
- CHAIKAM, V.; GOWDA, M.; NAIR, S. K.; MELCHINGER, A. E.; BODDUPALLI, P. M. Manje; et al. Genome-wide association study to identify genomic regions influencing spontaneous fertility in maize haploids. **Euphytica**, v. 215, n. 8, p. 1–14, 2019b.
- CHAIKAM, V.; GOWDA, M.; MARTINEZ, L.; OCHIENG, J.; OMAR, H. A.; PRASANNA, B. M. Improving the efficiency of colchicine-based chromosomal doubling of maize haploids. **Plants**, v. 9, n. 4, p. 1–13, 2020.
- CHALYK, S.T. Creating new haploid-inducing lines of maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v. 73, n. 1, p. 53-54, Apr. 1999.
- CHASE, S. S. Production of Homozygous Diploids of Maize from Monoploids 1. **Agronomy Journal**, v. 44, n. 5, p. 263–267, 1952.

CHASE, S. S. Monoploids and monoploid-derivatives of maize (*Zea mays* L.). **The Botanical Review**, v. 35, n. 2, p. 117–168, 1969.

CHIDZANGA, C.; MUZAWAZI, F.; MIDZI, J.; HOVE, T. Production and use of haploids and doubled haploid in maize breeding: A review. **African Journal of Plant Breeding**, v. 4, n. 4, p. 201–213, 2017.

CHOE, E.; CARBONERO, C. H.; MULVANEY, K.; RAYBURN, A. L.; MUMM, R. H. Improving in vivo maize doubled haploid production efficiency through early detection of false positives. **Plant Breeding**, v. 131, n. 3, p. 399–401, 2012.

COE, E. H. A Line of Maize with High Haploid Frequency. **The American Naturalist**, v. 93, n. 873, p. 381–382, 1959.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos safra 2022/23**, v. 10 n. 12, 2023. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/>>.

COUTO, E. G. DE O.; DAVIDE, L. M. C.; BUSTAMANTE, F. DE O.; VON PINHO, R. G.; SILVA, T. N. Identificação de milho haploide por citometria de fluxo, marcadores morfológicos e moleculares. **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 Agrotecnológica**, 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 waxy and opaque 2 grain quality in subtropical maize (*Zea mays* L.). **Euphytica**, v. 183, n. 2, p. 153–160, 2012.

DA SILVA, H. A.; SCAPIM, C. A.; VIVAS, M.; AMARAL, A. T.; PINTO, R. J. B.; VIVAS, J. M. S.; ROSSI, R. M.; BALERONI, A. G. Corn genotypes and crop seasons on the rate of putative haploids with the expression of gene *R1-navajo*. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 55, p. 1–10, 2020.

DEIMLING, S.; RÖBER, F.; GEIGER, H. H. Methodik und genetic der in-vivo haploideninduktion bei Mais. **Vortr Pflanzenzüchtung**, v.38, p.203-204, 1997.

DE LA FUENTE, G. N.; FREI, U. K.; TRAMPE, B.; REN, J.; BOHN, M.; YANA, N.; VERZEGNAZZI, A., MURRAY, S. C.; LÜBBERSTEDT, T. A diallel analysis of a maize donor population response to in vivo maternal haploid induction: II. Haploid male fertility. **Crop Science**, v. 60, n. 2, p. 873–882, 2020.

EDER, J.; CHALYK, S. In vivo haploid induction in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, n. 4, p. 703–708, 2002.

GALVÃO, J. C. C., MIRANDA, G. V., TROGELLO, E., FRITSCHÉ-NETO, R. Sete décadas de evolução do sistema produtivo da cultura do milho. **Revista Ceres**, v. 61, p. 819–828, 2014.

GOSAL, S.S.; PATHAK, D.; WANI, S.H.; VIJ, S.; PATHAK, M. Accelerated Breeding of

Plants: Methods and Applications. In: GOSAL S., WANI S. Accelerated Plants Breeding. **Springer**, v. 1, p. 1-30, 2020.

HALLAUER, A.R.; CARENA, M. J.; MIRANDA FILHO, J. B. Quantitative genetics in maize breeding. 3. ed. New York: **Springer**, 2010, p. 663.

HALLAUER, A.R.; CARENA, M. J.; MIRANDA FILHO, J. B. Quantitative genetics in maize breeding. 3. **Springer**, ed. New York, p. 663, 2010.

HAN, Y.; GU, Y.; ZHANG, A. C.; LO, Y. H. Review: Imaging technologies for flow cytometry. **Lab on a Chip**, v. 16, n. 24, p. 4639–4647, 2016.

KEBEDE, A. Z.; DHILLON, B. S.; SCHIPPRACK, W.; ARAUS, J. L.; BÄNZIGER, 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. 2, p. 219–226, 2011.

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

LASHERMES, P.; BECKERT, M. Genetic control of maternal haploidy in maize (*Zea mays* L.) and selection of haploid inducing lines. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 76, n. 3, p. 405–410, 1988.

LI, L.; XU, X.; JIN, W.; Chen, S. Morphological and molecular evidences for DNA introgression in haploid induction via a high oil inducer CAUHOI in maize. **Planta**, v. 230, n. 2, p. 367–376, 2009.

MAQBOOL, M. A.; BESHIR, A. R.; KHOKHAR, E. S. Doubled haploids in maize: Development, deployment, and challenges. **Crop Science**, v. 60, n. 6, p. 2815–2840, 2020.

MELCHINGER, A. E.; SCHIPPRACK, W.; WÜRSCHUM, T.; CHEN, S.; TECHNOW, F. Rapid and accurate identification of in vivo-induced haploid seeds based on oil content in maize. **Scientific Reports**, v. 3, p. 1–5, 2013.

MELCHINGER, A. E.; SCHIPPRACK, W.; UTZ, H. F.; MIRDITA, V. In vivo haploid induction in maize: Identification of haploid seeds by their oil content. **Crop Science**, v. 54, n. 4, p. 1497–1504, 2014.

MELCHINGER, A. E.; BRAUNER, P. C.; BÖHM, J.; SCHIPPRACK, W. In vivo haploid induction in maize: Comparison of different testing regimes for measuring haploid induction rates. **Crop Science**, v. 56, n. 3, p. 1127–1135, 2016a.

MELCHINGER, A. E.; MOLENAAR, W. S.; MIRDITA, V.; SCHIPPRACK, W. Colchicine alternatives for chromosome doubling in maize haploids for doubled- haploid production. **Crop Science**, v. 56, n. 2, p. 559–569, 2016b.

MOLENAAR, W. S.; SCHIPPRACK, W.; MELCHINGER, A. E. Nitrous oxide-induced chromosome doubling of maize haploids. **Crop Science**, v. 58, n. 2, p. 650–659, 2018.

MOLENAAR, W. S.; SCHIPPRACK, W.; BRAUNER, P. C.; MELCHINGER, A. E. Haploid male fertility and spontaneous chromosome doubling evaluated in a diallel and recurrent



selection experiment in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 132, n. 8, p. 2273–2284, 2019.

NANDA, D.K.; CHASE, S.S. An embryo marker for detecting monoploids of maize (*Zea mays L.*). **Crop Science**, v. 6, n. 2, p. 213–215, 1966.

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

PEREIRA, A. F.; MELO, P. G. S.; PEREIRA, J. M.; ASSUNÇÃO, A.; NASCIMENTO, A. dos R.; XIMENES, P. A. Caracteres agronômicos e nutricionais de genótipos de milho doce. **Bioscience Journal**, v. 25, n. 1, p. 104–112, 2009.

PIERRE, P. M. O.; DAVIDE, L. M. C.; COUTO, E. G. D. O.; SILVA, T. N.; RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. DOS. Doubled haploids: importance in the genetic breeding of maize. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 10, n. 1, p. 1–16, 2011.

PRIGGE, V.; SÁNCHEZ, C.; DHILLON, B. S.; SCHIPPRACK, W.; ARAUS, J. L.; BÄNZIGER, M.; MELCHINGER, A. E.; PRIGGE, V.; DHILLON, B. S.; SCHIPPRACK, W.; MELCHINGER, A. E. Doubled Haploids in Tropical Maize: I. Effects of Inducers and Source Germplasm on in vivo Haploid Induction Rates. **Crop Science**, v. 51, n. 4, p. 1498–1506, 2011.

PRIGGE, V.; SCHIPPRACK, W.; MAHUKU, G.; ATLIN, G. N.; MELCHINGER, A. E. Development of in vivo haploid inducers for tropical maize breeding programs. **Euphytica**, v. 185, n. 3, p. 481–490, 2012a.

PRIGGE, V.; XU, X.; LI, L.; BABU, R.; CHEN, S.; ATLIN, G. N.; MELCHINGER, A. E. New insights into the genetics of in vivo induction of maternal haploids, the backbone of doubled haploid technology in maize. **Genetics**, v. 190, n. 2, p. 781–793, 2012b.

RIBEIRO, C. B.; PEREIRA, F. DE C.; FILHO, L. DA N.; REZENDE, B. A.; DIAS, K. O. DAS G.; BRAZ, G. T.; RUY, M. C.; SILVA, M. B.; CENZI, G.; TECHIO, V. H.; DE SOUZA, J. C. Haploid identification using tropicalized haploid inducer progenies in maize. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 16–23, 2018.

RIBEIRO, M. R.; DOS SANTOS TRINDADE, R.; DE SOUZA, I. R. P.; CARNEIRO, A. A.; DE AZEVEDO, T. C.; GUIMARÃES, L. J. M.; DA SILVA CHAVES, S. F.; DOS SANTOS DIAS, L. A. Are stomatal area and stomatal density reliable traits for identification of doubled haploids in maize? **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 1–8, 2022.

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

ROTARENCO, V.; DICU, G.; STATE, D.; FUIA, S. New inducers of maternal haploids in maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v. 84, n. 3, p. 1–7, 2010.

SEKIYA, A.; PESTANA, J. K.; DA SILVA, M. G. B.; KRAUSE, M. D.; DA SILVA, C. R. M.; FERREIRA, J. M. Haploid induction in tropical supersweet corn and ploidy determination at the seedling stage. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 55, 2020.

SMITH, J. S. C.; HUSSAIN, T.; JONES, E. S.; GRAHAM, G.; PODLICH, D.; WALL, S.; WILLIAMS, M. Use of doubled haploids in maize breeding: Implications for intellectual property protection and genetic diversity in hybrid crops. **Molecular Breeding**, v. 22, n. 1, p. 51–59, 2008.

TEIXEIRA, F. F.; MIRANDA, R. A.; PAES, M. C. D.; SOUZA, S. M.; GAMA, E. E. G. Melhoramento do milho doce. **EMBRAPA Milho e Sorgo**, p. 34, 2013.

USDA – UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **World Agricultural Supply and Demand Estimates, may, 2023**. Disponível em: <<https://www.usda.gov/oce/commodity-markets/wasde/secretary-briefing>> Acesso em: 05 de junho de 2023.

VANOUS, K.; VANOUS, A.; FREI, U. K.; LÜBBERSTEDT, T. Generation of Maize (*Zea mays*) Doubled Haploids via Traditional Methods. **Current Protocols in Plant Biology**, v. 2, p. 147–157, 2017.

WU, P.; REN, J.; TIAN, X.; LÜBBERSTEDT, T.; LI, W.; LI, G.; LI, X.; CHEN, S. New insights into the genetics of haploid male fertility in maize. **Crop Science**, v. 57, n. 2, p. 637–647, 2017.

ZABIROVA, E. R.; CHUMAK, M. V.; SHATSKAIA O. A.; SCHERBAK, V. S. Technology of the mass accelerated production of homozygous lines. **Kukuruza Sorgo**, n. 4, p. 17–19, 1996.

ZHANG, Z.; QIU, F.; LIU, Y.; MA, K.; LI, Z.; XU, S. Chromosome elimination and in vivo haploid production induced by Stock 6-derived inducer line in maize (*Zea mays* L.). **Plant Cell Reports**, v. 27, n. 12, p. 1851–1860, 2008.

ZHAO, X.; XU, X.; XIE, H.; CHEN, S.; JIN, W. Fertilization and uniparental chromosome elimination during crosses with maize haploid inducers. **Plant Physiology**, v. 163, n. 2, p. 721–731, 2013.