



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

BRUNO FIGUEIRÓ FREGONEZI

**ALTERNATIVAS À COLCHICINA NA PRODUÇÃO DE  
LINHAGENS DUPLO HAPLOIDES EM MILHO BRANCO  
TROPICAL**

---

Londrina  
2024

BRUNO FIGUEIRÓ FREGONEZI

**ALTERNATIVAS À COLCHICINA NA PRODUÇÃO DE  
LINHAGENS DUPLO HAPLOIDES EM MILHO BRANCO  
TROPICAL**

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

Orientador: Prof. Dr. Josué Maldonado Ferreira

Londrina  
2024

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

Fregonezi, Bruno Figueiró Fregonezi.  
ALTERNATIVAS À COLCHICINA NA PRODUÇÃO DE LINHAGENS DUPLO HAPLOIDES EM MILHO BRANCO TROPICAL / Bruno Figueiró Fregonezi Fregonezi. - Londrina, 2024. 71 f.

Orientador: Josué Maldonado Ferreira.  
Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, , 2024. Inclui bibliografia.

1. Zea mays - Tese. 2. duplo haploide - Tese. 3. indução a haploidia - Tese. 4. duplicação cromossômica - Tese. I. Maldonado Ferreira, Josué. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. . III. Título.

CDU 63

BRUNO FIGUEIRÓ FREGONEZI

**ALTERNATIVAS À COLCHICINA NA PRODUÇÃO DE  
LINHAGENS DUPLO HAPLOIDES EM MILHO BRANCO  
TROPICAL**

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

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

---

Prof. Dr. André Sampaio Ferreira  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina 28 de fevereiro de 2024.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por guiar meus passos e iluminar meu caminho ao longo desta jornada acadêmica. A graça e orientação Dele foram fundamentais em cada etapa deste trabalho de mestrado.

Aos meus pais Gustavo Fregonezi e Carolina Figueiró e minha irmã Isadora Fregonezi, que sempre foram meus alicerces, com amor incondicional, apoio constante e por serem fontes inesgotáveis de incentivo. Cada conquista é um reflexo do amor e apoio recebido.

À minha amada namorada, Talita Manduca, por estar ao meu lado durante cada desafio, celebrando as vitórias e sendo meu porto seguro nos momentos difíceis. Sua compreensão, paciência e amor foram fundamentais para minha jornada acadêmica.

Ao meu estimado orientador, Josué Maldonado Ferreira, expresso minha profunda gratidão pela orientação sábia, paciência infinita e inspiração constante. Seu comprometimento com a excelência acadêmica e seu apoio inabalável foram pilares essenciais para o sucesso deste estudo.

Aos meus amigos do Laboratório de Melhoramento Genético, pela colaboração, troca de conhecimentos e pelo ambiente enriquecedor, que contribuiu para o desenvolvimento desta pesquisa. A experiência compartilhada com cada um foi inestimável.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Deoclécio Domingos Garbuglio e Prof. Dr. André Sampaio Ferreira, por dedicarem seu tempo e conhecimento na avaliação deste trabalho, enriquecendo-o com suas valiosas contribuições.

Ao Centro Internacional de Melhoramento de Milho e trigo e ao Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná pelos materiais genéticos concedidos que possibilitaram a execução do trabalho.

Ao programa de pós graduação da UEL e seus professores pelo apoio e ensinamentos que ajudaram a consolidar meus conhecimentos.

A Fundação de Apoio ao Desenvolvimento da UEL e A Tropical

melhoramento & Genética, pelos recursos que possibilitaram a realização do projeto

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio e pela bolsa de mestrado que facilitaram a condução desse projeto .

A equipe da Fazenda Escola da Uel pelo Auxílio na condução dos experimentos a campo.

FREGONEZI, Bruno Figueiró. **ALTERNATIVAS À COLCHICINA NA PRODUÇÃO DE LINHAGENS DUPLO HAPLOIDES EM MILHO BRANCO TROPICAL**. 2024. 70 páginas. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2024.

## RESUMO

A colchicina é uma substância amplamente utilizada e eficaz para a duplicação cromossômica de haploides e obtenção de linhagens de milho, porém é altamente tóxica ao ser humano e meio ambiente, exigindo cuidados extremos no manuseio e descarte. Assim, é importante identificar substâncias alternativas em substituição ao uso da colchicina, que ofereçam menores riscos e que apresentem eficácia semelhante. Outra alternativa seria a identificação de populações doadoras com elevadas taxas de duplicação espontânea. Um dos fatores mais importantes para o sucesso da produção de linhagens duplo haploides é o uso de indutores de haploidia adaptados e com altas taxas de indução. Dessa forma, os objetivos foram: determinar a eficácia do uso de soluções de pronamida e Amiprofos methyl (APM), em substituição à colchicina, na duplicação cromossômica via imersão de raízes de plântulas; identificar o potencial de duplicação cromossômica espontânea de populações de milho branco tropical; comparar as taxas de indução a haploidia de três linhagens indutoras tropicalizadas desenvolvidas pelo Centro internacional de Melhoramento de Milho e Trigo (CIM2GTAIL-P1, CIM2GTAIL-P2 e CIM2GTAIL-P3) e suas três combinações híbridas em cruzamento com milho branco tropical. Oito populações de milho branco foram polinizadas por estes seis genótipos indutores gimnogenéticos. As sementes F1's foram classificadas em haploides e diploides, pela expressão do gene *R1-nj*, e estimadas as taxas de indução à haploidia. As sementes haploides putativas (SHP), de cada população, foram semeadas em bandejas contendo substrato turfa *sphagnum*. As plântulas haploides foram conduzidas ao estágio V2, quando tiveram suas raízes lavadas em água corrente e imersas em diferentes soluções, constituindo quatro tratamentos de duplicação cromossômica: apenas água filtrada, como controle negativo; colchicina; pronamida; APM+pronamida. Durante o experimento foram contabilizados os números de SHP's utilizados; sementes germinadas; plântulas submetidas aos tratamentos; plântulas tratadas e transplantadas para vasos; plantas D<sub>0</sub> sobreviventes até a fase de polinização; plantas D<sub>0</sub> polinizadas; plantas D<sub>0</sub> que produziram sementes D<sub>1</sub>; plantas macho-estéreis. Estas contagens foram utilizadas para estimar as taxas de autofecundação, eficiência da autofecundação, sobrevivência, reprodução e sucesso geral. Para análise da quantidade de sementes oriundas de plantas férteis D<sub>0</sub>, as espigas com sementes D<sub>1</sub> foram categorizadas em cinco classes de acordo com o número de sementes por espiga. A combinação híbrida CIM2GTAIL-P1 x CIM2GTAIL-P2 apresentou maior taxa de indução média para as populações de milho branco tropical utilizadas, superando o desempenho das linhagens *per-se*. As populações estudadas apresentaram taxas de duplicação cromossômica espontânea entre 7,9% a 38,3%. Em média o sucesso do tratamento APM+pronamida não diferiu da colchicina e é apresentada como alternativa eficaz na produção de linhagens duplo haploides em milho branco tropical.

**Palavras-chave:** *Zea mays*; amiprofos metil, indutores de haploidia; pronamida; duplicação espontânea

FREGONEZI, Bruno Figueiró. **ALTERNATIVES TO COLCHICINE IN THE PRODUCTION OF DOUBLE HAPLOID LINES IN TROPICAL WHITE CORN.** 2024. Dissertation (Master in Agronomy) – State University of Londrina, Londrina. 2024.

### ABSTRACT

Colchicine is a widely used and effective substance for haploid chromosome doubling and obtaining corn lines, however it is highly toxic to humans and the environment, requiring extreme care and disposal. Therefore, it is important to identify sources of replacement for the use of colchicine, which offer lower risks and have similar efficacy. Another alternative would be to identify donor populations with high rates of spontaneous chromosome doubling. One of the most important factors for the successful production of double haploid lines is the use of adapted haploidy inducers with high induction rates. Thus, the objectives were: to determine the effectiveness of using pronamide and Amiprofos methyl (APM) solutions, replacing colchicine, in chromosomal doubling via immersion of plant roots; identify the potential for spontaneous chromosomal duplication of tropical white maize populations; compare the induction rates of three tropicalized inducing lines developed by the International Maize and Wheat Improvement Center (CIM2GTAIL-P1, CIM2GTAIL-P2 and CIM2GTAIL-P3) and their tree hybrids in tropical white corn. Eight populations of white corn were pollinated by these six gyninogenic inducing genotypes. The seeds of F1 ears were complex into haploids and diploids, based on the expression of the *R1-nj* gene, and estimated as haploidy induction rates. The putative haploid seeds (SHP) from each population were sown in trays containing sphagnum peat substrate. The haploid seedlings were grown to the V2 stage, when their roots were washed in running water and immersed in different solutions, constituting four chromosome duplication treatments: only tap water, as a negative control; colchicine; pronamide; APM+pronamide. During the experiment were counted the number of SHP's used; germinated seeds; plants submitted to treatments; plants treated and transplanted into pots; D<sub>0</sub> plants surviving until the pollination phase; pollinated D<sub>0</sub> plants; D<sub>0</sub> plants that produced D<sub>1</sub> seeds; male-sterile plants. These counts were used to estimate rates of self-pollination, self-pollination efficiency, survival, reproduction, and overall success. To analyze the quantity of seeds from fertile D<sub>0</sub> plants, ears with D<sub>1</sub> seeds were categorized into classes according to the ear number of seeds. The hybrid combination CIM2GTAIL-P1 x CIM2GTAIL-P2 presented a higher average induction rate for the tropical white corn population, surpassing the performance of the per-se lines. The sciences studied presented chromosomal doubling rates found between 7.9% and 38.3%. On average, the success of APM+pronamide treatment does not differ from colchicine and is an effective alternative in the production of double haploid lines in tropical white corn.

**Keywords:** *Zea mays*; amiprofos metyl, haploid inducers; pronamide; spontaneous doubling



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APM	Amiprofos methyl
CIM2GTAIL	segunda geração de linhagens indutoras adaptadas ao clima tropical
CIMMYT	Centro Internacional de Melhoramento Milho e Trigo
DH	duplo haploide
EA	eficiência de autofecundação
FAZESC	Fazenda Escola da Uel
ME	porcentagem de macho estéreis
P1	CIM2GTAIL-P1
P2	CIM2GTAIL-P2
P3	CIM2GTAIL-P3
QTL	Quantitative Trait Loci
SHP	Sementes haploide putativas
TA	Taxa de Autofecundação
TI	taxa de indução
TIR	taxa de indução real
TR	Taxa de reprodução
TS	Taxa de sobrevivencia
TSG	Taxa de sucesso geral

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>9</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>11</b>
2.1 MILHO BRANCO .....	11
2.2 Melhoramento de Milho .....	12
2.3 INDUÇÃO À HAPLOIDIA .....	13
2.4 IDENTIFICAÇÃO DE SEMENTES HAPLOIDES .....	16
2.5 DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA .....	17
2.6 MULTIPLICAÇÃO DE SEMENTES DUPLO HAPLOIDES .....	22
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
3.1 MATERIAL GENÉTICO.....	23
3.2 INDUÇÃO DAS POPULAÇÕES.....	23
3.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE INDUÇÃO DOS INDUTORES .....	24
3.4 MÉTODOS DE DUPLICAÇÃO CROMOSSOMICA .....	24
3.5 AVALIAÇÕES DO POTENCIAL DE DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA.....	26
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICAS.....	27
<b>4. ARTIGO.....</b>	<b>29</b>
4.1 INTRODUÇÃO .....	31
4.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	34
4.3 RESULTADOS .....	39
4.4 DISCUSSÃO .....	47
REFERÊNCIAS .....	54
<b>5. CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>59</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>60</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O milho branco é um tipo especial de milho utilizado na alimentação humana, principalmente na forma de canjica e na substituição total ou parcial do trigo na composição de farinhas. O cultivo do milho branco pode ser uma opção para aumentar a renda de agricultores familiares, pois apresenta um maior valor agregado que o milho comum, mas seu cultivo é específico em algumas regiões produtoras, próximas a indústrias de beneficiamento. Poucos programas de melhoramento possuem foco no milho branco, resultando em um baixo número de cultivares disponíveis no mercado, que são em sua maioria híbridos de linhagens.

No método tradicional de obtenção de linhagens para síntese de híbridos são necessários de seis a oito ciclos de autofecundação para gerar indivíduos com alto grau de homozigose. Com o surgimento da tecnologia duplo haploide (DH), linhagens completamente homozigóticas são obtidas com dois a três ciclos, aumentando a velocidade de produção de linhagens em programas de melhoramento de milho. Contudo, ainda existe uma escassez de publicações envolvendo a utilização dessa tecnologia em milho branco tropical.

O crescente uso da tecnologia DH resultou pesquisas que visam aumentar o sucesso das diferentes etapas da produção de linhagens DH, sendo estas a indução à haploidia, identificação de sementes haploides putativas (SHP's), duplicação cromossômica e a multiplicação de sementes duplo haploides (DH's).

A indução a haploidia em milho é realizada empregando principalmente indutores gimnogenéticos, com taxas de indução acima de 8%. O aumento na taxa de indução é fundamental para elevar a eficácia na produção de linhagens DH's. A maior parte dos indutores com altas taxas de indução são adaptados a regiões de clima temperado. Porém, o Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo (CIMMYT) desenvolveu linhagens indutoras adaptadas ao clima tropical e com altas taxas de indução à haploidia. Contudo, ainda há a necessidade de estudos sobre o desempenho destes indutores em cruzamento com germoplasma tropical de milho e nas diferentes condições climáticas do Brasil.

O processo de duplicação cromossômica é necessário para restaurar a fertilidade dos indivíduos haploides, permitindo a obtenção de sementes DH's. Para isto, a colchicina tem sido o principal agente antimitótico utilizado, inibindo a formação

de microtúbulos durante o processo de divisão mitótica, impedindo a separação das cromátides irmãs, resultando na duplicação do número de cromossomos das células haploides. Contudo, devido a sua alta toxidez e periculosidade, requer muitos cuidados em sua manipulação e descarte. Dessa forma, é necessário o desenvolvimento de protocolos que utilizem substâncias antimitóticas que ofereçam mais segurança, mantendo a eficácia, em relação a colchicina.

Outras substâncias antimitóticas vem se mostrando promissoras na duplicação cromossômica de haploides em milho, dentre estas se destacam o pronamide e o Amiprofos Metil (APM), com menor toxidez, periculosidade e custo. Porém, existem poucos estudos sobre a utilização desses herbicidas no processo de produção de linhagens DH's, e ainda não há relatos de uma metodologia bem estabelecida para sua utilização, sobretudo em milhos tropicais e de endosperma branco.

Mesmo sem o uso de substâncias antimitóticas, algumas populações podem apresentar taxas de duplicação espontânea elevadas, não diferindo das taxas de duplicação cromossômica artificial. A identificação de populações que apresentem esta característica e o conhecimento de sua herança são importantes para eliminar a necessidade do uso das substâncias antimitóticas na produção de linhagens DH's em milho.

Assim os objetivos foram determinar a eficácia do uso de soluções de pronamide e Amiprofos methyl (APM), em substituição à colchicina, na duplicação cromossômica via imersão de raízes de plântulas; identificar o potencial de duplicação cromossômica espontânea das populações de milho branco tropical; comparar as taxas de indução de três linhagens indutoras tropicalizadas desenvolvidas pelo Centro internacional de Milho e Trigo (CIM2GTAIL-P1, CIM2GTAIL-P2 e CIM2GTAIL-P3) e suas combinações híbridas em milho branco tropical

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 MILHO BRANCO

O milho branco é da mesma espécie do milho comum (*Zea mays* L.), sendo classificado como um tipo milho especial utilizado em diversos nichos de mercado, tais como milho para canjica e na produção de alimentos para o consumo humano (TEIXEIRA et al., 2019).

A coloração do endosperma em milho, um tecido triploide (3n), é expressa pela ação do gene Y (Yellow) que apresenta dominância completa para a cor amarela em relação a cor branca. Assim, os fenótipos variam de alaranjado (YYY), amarelo (YYy), amarelo claro (Yyy) a branco (yyy) (Oliveira et al., 2007). A característica de coloração dos grãos apresenta uma manifestação fenotípica na geração da planta mãe, sendo conhecido como efeito de xênia, implicando na necessidade de um isolamento temporal ou espacial das áreas produtoras de milho branco, em relação as que produzem milho comum.

A canjica é uma sobremesa consumida em diversas regiões do Brasil e teve sua origem em São Paulo em 1710, devido a uma restrição no uso do sal, que era monopolizado pela monarquia naquele período. A restrição culminou na criação da sobremesa que foi adaptada da cultura indígena (FERREIRA, 2002).

Dentre os produtos derivados de milho branco estão o fubá e farinha, utilizados na substituição parcial ou total da farinha de trigo (MAZZARI et al., 1983). Por não possuir glúten, o milho branco é uma excelente alternativa para as pessoas acometidas pela doença celíaca.

O cultivo do milho branco é uma importante alternativa de renda para pequenos produtores, já que um saco de 60 kg pode chegar até ao dobro do valor de venda de um saco de 60 kg milho comum (ROVARIS et al., 2017), sendo a cotação variável de acordo com a região e com a demanda.

A produção do milho branco no Brasil ocorre principalmente nos estados de São Paulo e Paraná, sendo os principais municípios produtores: Quadra, Tatuí e Itapetininga em São Paulo e Londrina, Irati e Pato Branco, no estado do Paraná; (Sawazaki et al., 2008).

### 2.2 MELHORAMENTO DE MILHO

A hibridação tem um papel fundamental nos programas de melhoramento de milho. Decorreram 50 anos desde as primeiras hibridações bem-sucedidas utilizando linhagens, até se tornar viável para a exploração econômica (BEAL et al., 1876; EAST et al., 1908; JONES et al., 1918).

Os primeiros relatos de hibridação no Brasil foram produzidos pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), tendo seu primeiro híbrido lançado em 1939. Os programas de melhoramento de híbridos de linhagens promoveram grandes avanços para a cultura do milho, permitindo associar características de genitores distintos, utilizar interações gênicas favoráveis, aumentar a uniformidade dos genótipos, reduzindo a interação genótipo ambiente e produzindo sementes de milho em escala comercial (Paterniani, 1974).

A produção de linhagens totalmente homozigotas é uma etapa fundamental para a obtenção de híbridos altamente produtivos, que demanda de seis a oito gerações de autofecundação para atingir a homozigose desejada.

Nas últimas décadas, a tecnologia DH surgiu como uma alternativa eficiente para a produção de linhagens em milho. Esta tecnologia essencialmente produz linhagens completamente homozigotas em duas a três gerações, por meio da indução a haploidia, seleção de haploides, duplicação cromossômica e multiplicação de sementes duplo haploides (CHAIKAM et al., 2019).

Os DH's podem ser obtidos por meio de técnicas *in vitro* e *in vivo*. A obtenção destes *in vitro* envolve a cultura de tecidos a partir de anteras, grãos de pólen e resgate de embrião (BORÉM e MIRANDA, 2013). Porém, taxas reduzidas de produção de embriões e a especificidade do meio de cultura são gargalos, que limitam o sucesso para a produção de DH's *in vitro* (MAQBOOL et al., 2020). A utilização da tecnologia duplo haploide *in vivo* teve início no cruzamento intraespecífico para a obtenção dos haploides, como no caso do milho (HU et al., 2016; KELLIHER et al., 2017).

As pesquisas de Coe e Sarkar (1964) foram fundamentais para o estabelecimento da produção de haploides *in vivo*, que em conjunto com a incorporação de marcadores de antocianina facilitaram a identificação de haploides ainda em estágio de sementes (NANDA e CHASE, 1966; CHASE et al., 1969). Estudos relacionados a indução à haploidia avançaram no mundo todo, em diversos programas de melhoramento de milho na Europa, América do Norte, China, e

recentemente em ambientes tropicais (PRASANNA et al., 2012).

### 2.3 INDUÇÃO À HAPLOIDIA

A pesquisa de Chase (1952) revelou a possibilidade da utilização de plantas haploides como aceleradores para a obtenção de linhagens endogâmicas em milho, mas com reduzida ocorrência de indução a haploidia espontânea, o que inviabilizava a exploração em escala comercial. A partir dos trabalhos de Coe (1959) foi construída a estratégia de indução à haploidia *in vivo*, por meio do genótipo indutor conhecido como *Stock 6*, que possuía uma taxa de indução de 2,3%. Esse genótipo foi o precursor de diversas linhagens indutoras com maiores taxas de indução (PRASANNA et al., 2012).

Os indutores à haploidia *in vivo* são classificados como androgenéticos e gimnogenéticos, sendo utilizados nos cruzamentos como fêmea e macho, respectivamente. Os indutores androgenéticos são resultantes de uma mutação no gene *ig1 (indeterminate gametophyte)* (KERMICLE et al., 1971; EVANS et al., 2007). Os genótipos com a indução baseada na mutação *ig1* não são amplamente utilizados nos programas de melhoramento, devido a sua baixa taxa de indução (1 a 2%) (KERMICLE et al., 1994). Além disso, os indivíduos haploides resultantes do cruzamento com indutores androgenéticos possuem características citoplasmáticas diferentes da população doadora, pois mantem o citoplasma do genótipo indutor (KERMICLE et al., 1973). Outro fator limitante é que, indutores androgenéticos, limitam a indução à haploidia via lotes isolados, pois atuam como receptores do pólen das diferentes populações doadoras.

Os genótipos indutores gimnogenéticos são mais utilizados, pois atuam como doadores de pólen para as populações doadoras, que produzirão indivíduos haploides com os seus respectivos citoplasmas. Além disto, permitem a indução em lotes isolados e apresentam maior taxa de indução.

Existem duas hipóteses para explicar o fenômeno da indução utilizando indutores gimnogenéticos. A primeira propõe uma fertilização única (do endosperma) ao invés de uma fertilização dupla (endosperma e embrião), já a segunda aponta uma eliminação dos cromossomos paternos após a fertilização (ZHAO et al., 2013; CHAIKAM et al., 2019).

Um total de oito Locus de características quantitativas (QTL's) foram identificados com efeitos maiores e menores relacionados a indução a haploidia utilizando indutores gimnogenéticos. Dentre estes, os QTL's qhir1 e qhir8 são os principais e estão localizados nos cromossomos 1 e 9, respectivamente, e que explicam até 66% e 20% da variância genética respectivamente (PRIGGE et al., 2012).

Estudos sugerem que a mutação de um gene denominado *MTL* (*Matrilineal*) (Kelliher et al., 2017)/ *Zea mays Phospholipase A1* (*ZmPLA1*) (Liu et al., 2017)/ *NOT LIKE DAD* (*NLD*) (Gilles et al., 2017) é crítica para a indução a haploidia. Além disto, essa mutação é influenciada positivamente pela presença do gene *ZmDMP* (*Zea mays domain of unknown function membrane protein*). O mecanismo pelo qual o gene *MTL/ZmPLA1/NLD* condiciona a haploidia é através de códon de parada precoce e resulta em uma proteína truncada, que perde a função na membrana plasmática do pólen (GILLES et al., 2021). Além disso recentemente outros genes com efeito importante para a indução a haploidia foram descobertos, sendo estes: *DUF679* (ZHONG et al., 2019); *ZmPLD3* (LI, et al., 2021); *ZmPOD65* (JIANG et al., 2022).

Ainda que a indução seja uma característica governada por muitos genes, a fixação dos genes de efeito maior pode auxiliar na seleção de indivíduos com maiores taxas de indução, auxiliando a seleção das melhores combinações dos QTL's de menor efeito (TRENTIN et al., 2023)

As plantas que sofrem o processo de indução a haploidia apresentam diversas anomalias reprodutivas, como o abortamento de grãos, heterofertilização, plantas com embriões duplos, características que podem ser associadas com o processo de indução gimnogenético, sendo a taxa de abortamento do endosperma e do embrião maior em plantas que foram polinizadas com pólen de genótipos indutores, em relação às polinizadas por pólen comum (CHAIKAM et al., 2018; TIAN et al., 2018).

Os primeiros indutores gimnogenético e androgenético foram o Stock 6 (Coe, 1959) e Wisconsin 23 (KERMICLE, 1969), com taxas de indução variando de 1% a 3,2%, respectivamente, sendo utilizados como base genética para o desenvolvimento dos indutores modernos, que viabilizaram a exploração da tecnologia DH em escala comercial. Dentre estes, pode-se destacar as taxas de 3% a 5% para o WS14 (LASHERMES; BECKERT, 1988); 6,5% para o MHI (CHALYK, 1999); 8% a 12% para o RWS (PRIGGE et al., 2011); acima de 10 % para UH400 e de 12% a 15% para os



indutores PK6, HZI1, CAUHOI e PHI (BARRET; BRINKMANN; BECKERT, 2008; LI et al., 2009; ROTARENCO et al., 2010; ZHANG et al., 2008), todos indutores produzidos com germoplasma temperado e avaliados para condições de climas temperados. Contudo, a utilização destes indutores em ambientes tropicais é limitada pela sua baixa capacidade de adaptação e desempenho agrônômico, com elevada susceptibilidade a doenças tropicais, dificultando o processo de multiplicação e a sua utilização em lotes isolados de indução.

Em 2012, o CIMMYT, em conjunto com a Universidade de Hohenheim, desenvolveu a primeira geração de linhagens indutoras adaptadas a ambientes tropicais (TAILs), que apresentavam melhor performance agrônômica e uma taxa de indução entre 6 e 9%. Posteriormente o CIMMYT desenvolveu a segunda geração das linhagens tropicalizadas (CIM2GTAIL's) com maior taxa de indução (9% a 14%) e melhor adaptação (CHAIKAM et al., 2018).

Estudos utilizando as linhagens indutoras CIM2GTAIL-P1 e CIM2GTAIL-P2 revelaram uma taxa de indução média de 7,46% e 10% respectivamente, mostrando que realmente houve uma evolução em relação à primeira geração das linhagens indutoras tropicalizadas (CIMTAIL-P1), com 5,48% de taxa de indução (KHULBE et al., 2021; KAUR et al., 2023).

Ainda que muito utilizadas, as linhagens indutoras possuem desvantagens práticas nos campos de cruzamento com as populações doadoras, possuindo menor altura de planta, maior susceptibilidade a doenças e menor vigor. Uma estratégia que se mostrou interessante é a utilização de híbridos indutores, que apresentam melhor desempenho agrônômico explorando a heterose nas características chave, como altura de planta, florescimento e vigor, sem reduzir a taxa de indução em comparação com as linhagens. Isto potencializa a utilização de indutores em larga escala, pois facilita a utilização de estratégias como lotes isolados de indução (TRENTIN et al., 2023).

## 2.4 IDENTIFICAÇÃO DE HAPLOIDES

Na identificação de haploides são utilizados genes marcadores e características fenotípicas distintivas entre haploides e diploides.

O gene *R1 navajo* (*R1-nj*) é dominante, sendo empregado na identificação de haploides na fase de semente. Os indivíduos diploides apresentam coloração púrpura no endosperma e no embrião, mas as sementes haploides manifestam coloração púrpura apenas no endosperma, pois o embrião haploide possui apenas uma cópia dos cromossomos da planta mãe doadora. Porém, existem germoplasmas com genes inibidores da expressão do gene *R1-nj*, como por exemplo o gene *C1-I* que está presente em parte do germoplasma tropical, dificultando a identificação de haploides nessas populações (Kebede et al. 2011, Chaikam et al. 2015). Além disso, o gene *R1-nj* apresenta expressividade variável, gerando sementes com falhas na marcação púrpura, resultando na seleção de falsos haploides. Para isto, tem sido recomendada a sua associação com outros genes marcadores envolvidos na síntese de antocianina como: *A1*, *A2*, *C2*, *Bz1*, *Bz2* e marcadores que apresentem coloração em partes distintas da planta como na raiz, caule e pendão (MELCHINGER et al., 2014; CHAIKAM et al., 2019).

Como alternativa ao gene *R1-nj*, trabalhos de melhoramento desenvolveram indutores de haploidia com alto teor de óleo na semente, aproximadamente 10%, sendo que em milhos comuns o teor de óleo é de 3% a 4%. Neste caso, as sementes haploides possuem um menor teor de óleo que as diploides resultantes do cruzamento com esse indutor, com a vantagem de permitir a classificação automatizada das sementes e maior velocidade de seleção (PRECIADO-ORTIZ et al., 2013). Diversos genótipos indutores foram desenvolvidos utilizando esse marcador como: CAUHOI (7,8% de óleo) (CHEN e SONG 2003); CHOIL (8,5% de óleo) (DONG et al., 2014); UH600 (10,8% de óleo) e UH601 (11,7% de óleo) (MELCHINGER et al., 2014). Recentemente, plataformas automatizadas foram criadas para selecionar sementes haploides pelo teor de óleo, possuindo alta assertividade e repetibilidade (MELCHINGER et al., 2017; MELCHINGER et al 2018). Porém, a utilização desse marcador é limitada pelo difícil acesso aos genótipos indutores e pelo alto custo das plataformas de seleção automatizadas (CHAIKAM et al., 2019).

Também existem marcadores obtidos por meio de transgenia. Como exemplo

temos os marcadores, *EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein)* (YU et al., 2016), e *double fluorescent proteins (eGFP and dsRED)* (DONG et al. 2018) que utilizam de proteínas que expressam fluorescência em indutores temperados. Esses marcadores são expressos no embrião, endosperma e na raiz. Os indivíduos que não apresentam fluorescência são haploides.

Recentemente, estudos relacionados ao uso de análise de imagens baseada em modelos de aprendizado de máquina para classificação de milho haplóide e diplóide tem sido intensificados e encontrado resultados positivos (KAHRIMAN et al., 2023)

As plantas haploides apresentam características fenotípicas distintas em relação as diploides. Com isso, algumas estratégias de seleção também são utilizadas devido ao número reduzido de cromossomos dos haploides, como a citometria de fluxo (COUTO et al. 2013, BALERONI et al., 2021), contagem cromossômica (SEKIYA et al. 2020), marcadores moleculares (RIBEIRO et al. 2018), tamanho de célula guarda do estômato (SOUZA et al., 2024). Além disto, também é possível realizar a seleção dos haploides com base no peso de sementes, vigor da planta, diâmetro das folhas, menor quantidade de pólen e sementes produzidas (MELCHINGER et al., 2014). Essas características são muito importantes para auxiliar na seleção de haploides com base no gene *R1-nj*, pois permitem a seleção de plantas falso haploides.

## 2.5 DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA

Os indivíduos haploides são estéreis, sendo necessária a duplicação cromossômica para a restauração da fertilidade. Este processo pode ocorrer de forma espontânea e com uma baixa taxa de duplicação natural, ou pode ser realizado de forma artificial utilizando métodos que induzem a duplicação cromossômica (CHAIKAM et al., 2012; CHAIKAM et al., 2019).

Existem genótipos com a capacidade de duplicar os cromossomos dos indivíduos haploides espontaneamente, porém essa duplicação espontânea não ocorre na maioria dos genótipos. A fusão nuclear é a razão mais comum para a duplicação cromossômica espontânea. A divisão síncrona de diferentes núcleos nos estágios iniciais do desenvolvimento do embrião pode resultar em uma placa metafásica e fibras do fuso comuns, o que por sua vez leva à duplicação cromossômica espontânea (SUNDERLAND, 1974). Além disto, a duplicação

cromossômica espontânea também pode ocorrer por meio de fusão de células somáticas, endoreduplicação, endomitose e outros mecanismos, sendo que mais de um mecanismo pode operar simultaneamente nesse evento (HUMPHREYS e KNOX, 2015). A taxa de duplicação cromossômica espontânea na inflorescência masculina de milho varia de 2,8% a 46%, enquanto na inflorescência feminina varia de 25% a 94% (CHAIKAM et al., 2019).

Para a exploração da duplicação cromossômica espontânea no milho em escala comercial faz necessária uma taxa de duplicação espontânea de no mínimo 8% a 10%, podendo eliminar a necessidade de tratamento com colchicina ou outros agentes antimitóticos (Maqbool et al., 2020). Essa exploração também economiza tempo, recursos e custos de mão de obra, além de reduzir os riscos para a saúde humana e as mutações de sementes associadas à colchicina. O custo de desenvolvimento de linhagens pode ser reduzido em até 91%, quando a duplicação cromossômica espontânea foi empregada, em relação ao tratamento com colchicina (DE LA FUENTE, 2015). Além disso os haplóides derivados da duplicação espontânea podem ser semeados diretamente em casas de vegetação ou no campo, eliminando os custos associados ao plantio de mudas, tratamento químico de haplóides e transplântio (Boerman et al. 2020).

Embora a tecnologia duplo haploide possa ser utilizada para incorporar a duplicação cromossômica espontânea em diferentes germoplasmas, não é um processo simples, pois se trata de uma característica complexa e de expressão variável, dependendo do ambiente e das interações genótipo x ambiente (DE LA FUENTE, 2015). Recentemente, um QTL principal foi identificado no cromossomo 5, responsável por 45% da variância observada para a duplicação espontânea. (TRAMPE et al., 2020). No entanto, como esta região está próxima do centrômero, onde a recombinação geralmente é suprimida, há uma maior dificuldade no melhoramento para essa característica (VERZEGNAZZI, et al., 2021).

Na maioria dos casos, faz-se necessária a utilização da duplicação cromossômica artificial que é realizada através do tratamento dos haploides com substâncias antimitóticas. Diferentes fatores, como a base genética do germoplasma, a natureza e o tipo de agente antimitótico, concentração e duração do tratamento, podem afetar a eficiência da duplicação cromossômica artificial (SORIANO et al., 2007).

A colchicina (C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>N) é uma substância amplamente utilizada na produção de linhagens DH em milho (CHAIKAM et al., 2012; MELCHINGUER et al., 2016). Ela atua na  $\beta$ -tubulina, e inibe a formação de dímeros de tubulina evitando assim a formação de microtúbulos. A falta de microtúbulos durante a mitose impede a separação dos cromossomos duplicados, resultando em células com o dobro de cromossomos (CHAIKAM et al., 2019).

No trabalho realizado por Melchinguer et al. (2016) foram propostos indicadores para sucesso na produção de linhagens e da duplicação cromossômica em haploides de milho, sendo estes: taxa de sobrevivência (número de plantas sobreviventes até o florescimento dividido pelo número de plântulas tratadas com agentes antimitóticos), taxa de reprodução (número de espigas D<sub>0</sub> dividido pelo número de plantas sobreviventes até o florescimento) e taxa de sucesso geral (número de espigas D<sub>0</sub> produzidas dividido pelo número de plântulas tratadas). Este trabalho mostra que um dos elementos que dificultavam a comparação dos diferentes métodos de duplicação cromossômica era a falta de padronização nas medidas de sucesso da duplicação cromossômica e da produção de linhagens DH's.

Diferentes técnicas são empregadas na duplicação cromossômica utilizando soluções de colchicina com diferentes concentrações e tempo de exposição, dentre elas: imersão de sementes (REN et al., 2018); imersão de plântulas recém germinadas (GAYEN et al., 1994), injeção direta no tecido meristemático basal (EDER e CHALYK, 2002) e submersão de raízes (CHAIKAM et al., 2020), dentre outros.

No método proposto por REN et al. (2018) de imersão das sementes, as sementes haploides são embebidas em água durante 6 horas à temperatura ambiente, posteriormente são realizados cortes no escutelo para melhorar a exposição do embrião aos agentes antimitóticos. As sementes cortadas são imersas em diferentes soluções, com destaque para o tratamento com 15 $\mu$ M de APM 0.1% Tween-20 e 2% DMSO, por 16 horas e lavados com água corrente por 30 minutos. Por meio do método de contagem cromossômica, foi obtido 45% de duplicação cromossômica. Contudo, a contagem cromossômica não é suficiente para a comprovação da eficiência de um método sendo necessárias avaliações relacionadas ao número de linhagens produzidas. Além disto, os cortes no escutelo deste método são muito laboriosos para uma produção em larga escala e podem gerar altas taxas de mortalidade, demandando extrema habilidade manual.

O protocolo de imersão de plântulas recém germinadas (GAYEN et al., 1994;) já foi utilizado pelo CYMMIT e outras instituições com adaptações. Inicialmente, as sementes haploides são germinadas em papel germiteste por 96 a 120 horas, até que o coleóptilo tenha cerca de 2 cm de comprimento, posteriormente a ponta do coleóptilo é cortada antes da submersão, em uma solução de 0,06% de colchicina e 0,5% de sulfóxido de dimetil (DMSO), pelo período de 12 horas, à 18°C, em ambiente sem luz (PRASANNA et al., 2012; PRIGGE et al., 2012). Posteriormente, as plântulas são lavadas em água corrente por 30 minutos e transplantadas em substrato vegetal em bandejas ou vasos e mantidas em casas de vegetação, até atingirem o estágio de três folhas (10 a 15 dias), quando são transplantados definitivamente para o campo. Neste método, são relatadas taxas de sucesso de 10-30% dependendo da população e das condições de manejo (Chaikam e Mahuku, 2012; Melchinger et al., 2016).

No método proposto por Eder e Chalyk (2002) é realizada a aplicação da solução de colchicina (0,125%) e DMSO (0,5%) no tecido meristemático basal, por meio da injeção na porção central do colmo das plântulas no estágio foliar de V2-V3, cultivadas por semeadura direta em casas de vegetação. O uso desta forma de tratamento promove taxas de eficiência em torno de 27,5% na duplicação.

A metodologia de duplicação cromossômica apresentada por Chaikam et al., (2020) envolve a imersão de raízes de plantas em estágio fenológico V2 em uma solução de colchicina, as SH's são semeadas em substrato a base de cinza vulcânica até atingirem o estágio V2. Posteriormente, as plantas são cuidadosamente retiradas do substrato e as raízes passam por um processo de lavagem em água corrente de torneira. Já com as raízes expostas, as plantas são agrupadas em conjuntos de 120 a 130 mudas e inseridas em recipientes com a capacidade volumétrica de 2 litros. Posteriormente, adiciona-se a solução de colchicina (0,1% de colchicina e 0,5% de DMSO) no recipiente até que a coroa da planta esteja coberta, 2 a 3 cm a cima do nível da coroa das plântulas, que são mantidas na solução por 5 horas. Posteriormente, a solução de colchicina é descartada de maneira segura, as raízes das plantas são lavadas em abundância utilizando água corrente e são transplantadas diretamente em vasos ou a campo. O trabalho de Chaikam et al. (2020) revelou que este método foi mais eficiente na obtenção de DH's em relação ao método de imersão de plântulas, obtendo uma taxa de sucesso geral médio de aproximadamente 36%.

Ainda que muito utilizada em diferentes protocolos de duplicação

cromossômica, a colchicina é uma substância extremamente tóxica e cara, necessitando de muitos cuidados ao ser manuseada e descartada (CHAIKAM et al., 2012), sendo uma substância altamente cancerígena (MELCHINGUER et al., 2016).

Diferentes alternativas ao uso da colchicina para a duplicação cromossômica em milho foram apresentadas na literatura e envolvem o emprego de: óxido nítrico ( $N_2O$ ) (KATO et al., 2002); cafeína; paclitaxel (ARSHAD et al., 2023); herbicidas antimitóticos (MELCHINGUER et al., 2016) e estresses físicos, envolvendo temperatura, altas pressões, correntes elétricas (HÄNTZSCHEL et al., 2010).

O uso do óxido nítrico ( $N_2O$ ) na forma gasosa foi uma das primeiras alternativas avaliadas para a duplicação cromossômica de haploides em milho (KATO et al., 2002). Porém, a aplicação de óxido nítrico na planta adulta não é viável em larga escala (MELCHINGUER et al., 2016).

A utilização de estresses físicos (temperatura, altas pressões, correntes elétricas) foram utilizados para bloquear a mitose nas raízes de milho, mas não obtiveram sucesso (HÄNTZSCHEL et al., 2010).

Em estudos recentes, ARSHAD et al. (2023) revelam os efeitos potenciais da cafeína e paclitaxel no aumento da fertilidade de plântulas haploides de milho, mas sem evidências de seu real potencial na produção de linhagens DH's.

A literatura apresenta resultados promissores para o emprego de herbicidas antimicrotúbulos com a capacidade de duplicar cromossomos, dentre estes: a trifluralina (KATO, 1997), orizalina (BARTELS e HILTON 1973), pendimetalina (ZHOU et al., 2009), APM (WAN et al., 2000) e o pronamida (BARTELS e HILTON 1973). Contudo, estes trabalhos não demonstram a capacidade destas substâncias em restaurar a fertilidade de indivíduos haploides, para a produção de linhagens, em milho.

Posteriormente Melchinguer et al. (2016) estudou a eficiência de uma solução contendo APM ( $20 \text{ mg L}^{-1}$ ) e pronamida ( $4 \text{ mg L}^{-1}$ ), empregando o método de submersão de raízes por 8 horas. Como resultado foi observada uma taxa de sucesso geral (16,1%) que não difere em relação ao tratamento com colchicina (22,1%). Contudo, ainda que a solução herbicida apresente taxas de sucesso geral satisfatórias, a mortalidade resultante da alta concentração dos herbicidas foi um ponto negativo da utilização das diluições e tempo de exposição apresentados, resultando em uma taxa de sobrevivência de 46,5%. Estes resultados indicam a

necessidade de estudos envolvendo a utilização destes herbicidas, para atingir um método mais ajustado e que se aproxime à eficácia da colchicina na duplicação cromossômica de haploides em milho.

## 2.6 MULTIPLICAÇÃO DE SEMENTES DUPLO HAPLOIDES

As plântulas originadas das sementes haploides e que passaram pelo tratamento de duplicação cromossômica normalmente tem baixo vigor e são muito suscetíveis a estresses (MAHUKU et al., 2012), pois o processo de duplicação cromossômica, pode não ter ocorrido em todas as células da planta, sendo observado um elevado nível de quimerismo. A exposição aos tratamentos de duplicação cromossômica aumenta a mortalidade de plântulas, e os haploides, tratados com substância antimitóticas, precisam de um manejo cuidadoso para que possam completar seu ciclo (CHAIKAM et al., 2019).

O cultivo de plântulas haploides deve ser realizado em condições ambientais ideais para o desenvolvimento da cultura do milho, com água suficientemente para evitar o déficit hídrico. Além disto, todos os manejos relacionados a proteção de plantas, controle de plantas daninhas, insetos pragas e doenças, devem ser realizados cuidadosamente para minimizar a perda do estande de plantas haploides e obter um maior número de sementes por planta (MAQBOOL et al., 2020).

As plantas  $DH_0$  possuem a produção de pólen como fator limitante para a obtenção de sementes. Os pendões apresentam diferentes padrões de fertilidade de acordo com o sucesso na duplicação, tendo-se pendões estéreis, com apenas uma ramificação fértil ou normais. As plantas  $DH_0$  necessitam de acompanhamento diário e auto fecundações repetidas para assegurar o sucesso na produção de sementes, que é atingido quando a planta produz pólen viável com uma espiga receptiva produzindo ao menos uma semente DH.

Devido ao baixo número de sementes produzido pelas plantas  $DH_0$  pode ser necessária uma segunda geração de autofecundação para aumentar o número de sementes das linhagens DH's produzidas.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL GENÉTICO

Foram utilizadas três linhagens indutoras CIM2GTAIL-P1 (P1), CIM2GTAIL-P2 (P2) e CIM2GTAIL-P3 (P3) e suas três combinações híbridas (P1xP2, P1xP3 e P2xP3), totalizando um conjunto de seis indutores de haploidia gimnogenéticos. Essas linhagens pertencem ao CIMMYT e foram liberadas para a pesquisa, por meio de acordo de licença de uso.

A obtenção das combinações híbridas e multiplicação das linhagens foram realizadas em casas de vegetação na Universidade Estadual de Londrina e na área experimental da empresa Tropical Melhoramento Genética (TMG), durante a segunda safra de 2021.

Oito genótipos de milho branco (PB01, PB10, PB15, PB20, PB25, PB30, PB35, PB40), cedidos pelo Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná (IDR-PR), foram utilizadas como populações doadoras.

#### 3.2 INDUÇÃO DAS POPULAÇÕES

Durante a safra 2021/2022, foram realizados cruzamentos entre as oito populações de milho branco, utilizadas como fêmeas, e os seis genótipos indutores, por meio de polinizações manuais na Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina (23°20'S; 51°33'W; 576 m altitude), em clima Subtropical Úmido Mesotérmico: verões com temperatura superior a 22°C; no inverno temperatura inferior a 18°C e geadas pouco frequentes; precipitação anual de 1658 mm.

Cada população doadora foi semeada em blocos de seis fileiras de 16 m de comprimento, no espaçamento de 0,80 m entre fileiras e 0,20 m entre plantas. Os indutores foram semeados em blocos de oito fileiras de 10 m de comprimento, no mesmo espaçamento citado anteriormente, sendo as fileiras divididas em duas partes iguais, semeadas cinco e dez dias após a semeadura das populações doadoras. Este procedimento visou sincronizar o florescimento feminino das populações de milho branco com o florescimento masculino dos indutores.

As polinizações foram realizadas manualmente, visando obter cerca de 40

espigas induzidas/população e produzir sementes haploides putativas em quantidades suficientes para os estudos pretendidos.

A condução agronômica foi realizada seguindo as recomendações técnicas para a cultura do milho.

### 3.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE INDUÇÃO DOS INDUTORES

As sementes obtidas a partir dos cruzamentos de indução foram classificadas de acordo com a marcação conferida pelo gene *R1-nj*, pela presença ou ausência da marcação de antocianina nas sementes, em três categorias: a) diploides (sementes com a pigmentação púrpura no endosperma e no embrião; b) haploides putativos (sementes com pigmentação púrpura somente no endosperma, mantendo o embrião sem antocianina); c) diploides resultantes de contaminação ou da inibição da expressão do gene *R1-nj* (sementes sem qualquer marcação).

Foram avaliadas as taxas de indução de haploides (TI) pela razão entre o número de SHP's pelo total de sementes marcadas. Posteriormente, foi contabilizado o número de indivíduos falsos haploides, por meio de características morfológicas típicas de cada nível de ploidia, na etapa de plântulas V2 em bandejas e plantas V6 em vasos e na colheita, quando as plantas autofecundadas apresentaram espigas com grãos segregantes e com a expressão do gene *R1-nj*. A partir destes resultados foram estimadas as taxas de falsos haploides (TFH) dentro das SHP's e a taxa de indução real (TIR), dado por:  $TIR = TI - (TFH \times TI)$ .

### 3.4 MÉTODOS DE DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA

As SHP's obtidas, de cada uma das oito populações de milho branco, foram embebidas em água de torneira, por seis horas para homogeneizar a germinação. Posteriormente, foi realizada a germinação das sementes haploides putativas em bandejas plásticas de 200 células com substrato turfa Sphagnum pura, em casa de vegetação. Após 10 a 11 dias da semeadura, as plântulas no estágio V2 tiveram suas raízes cuidadosamente lavadas para remoção do substrato e exposição das raízes.

As plântulas lavadas foram agrupadas e alinhadas no nível da semente para a formação de maços presos por uma fita de papel alumínio e elástico, que foram

inseridos em beckers de 1 litro. Foram alocadas 90 a 100 plântulas por becker, para a submersão das raízes em 4 diferentes tratamentos de duplicação cromossômica (1 - controle negativo com apenas água; 2 - solução de 4,56 mg L<sup>-1</sup> de APM, 3 mg L<sup>-1</sup> de pronamide, 0,1% de Tween-20 e 0,5% de DMSO; 3 - solução contendo 0,07% de colchicina e 0,5% de DMSO; 4 - solução de 10 mg L<sup>-1</sup> de pronamide, 0,1% de Tween-20 e 0,1% de DMSO), até 2 a 3 cm acima do nível da região da coroa da plântula. O tempo de exposição dos tratamentos foram 5, 16, 5 e 4 horas, respectivamente, no escuro e em temperatura ambiente, com base no método de imersão de raízes apresentado por Chaikam et al. (2020) e com as devidas modificações.

A escolha do método de duplicação cromossômica teve como base o protocolo de imersão de raízes, estabelecido por Chaikam et al. (2020), onde os autores demonstram que a dose de 0,07% não diferem significativamente para TS, TR e TSG da dose de 0,1%. Com isso, optou-se pela dose de 0,07% devido a utilizar uma menor quantidade de princípio ativo, o que diminui os riscos e custos da operação. Além disto, o tratamento de imersão de raízes com colchicina foi utilizado como tratamento controle para efeito de comparação com os demais tratamentos antimitóticos alternativos.

Os herbicidas antimitóticos e suas dosagens tiveram base em seus mecanismos de ação na duplicação cromossômica e em relatos que indicaram o potencial do APM e o pronamide na duplicação de haploides em milho (Wan et al., 1991; Melchinguer et al., 2016; Ren et al., 2018), sendo idealizadas modificações da metodologia utilizada por Chaikam et al. (2020).

O tratamento APM+pronamide foi selecionado com base no efeito de sinergia entre essas substancias reportado por Melchinguer et al., (2016), demonstrando o potencial na utilização em conjunto do APM com o pronamide. Porém, a dose de 20 mg L<sup>-1</sup> de APM e 4 mg L<sup>-1</sup> de pronamide, utilizada pelo autor, resultou em uma baixa TS (46%). Desta forma, a redução na concentração de APM e pronamide somada ao aumento do tempo de exposição, assim como relatado por REN et al. (2018), aumentaram significativamente a TS mantendo uma TR elevada, em relação aos resultados obtidos por Melchinguer et al. (2016).

A opção de utilizar o pronamide isoladamente como tratamento está relacionada ao baixo custo dessa substância quando comparada a colchicina sal toxicidade. A escolha da dose utilizada foi feita com base em resultados de estudos

prévios (pré-ensaios) de sobrevivência de plântulas aos diferentes tempos de exposição pelo Laboratório de Melhoramento Genético/ Departamento de Biologia Geral/UEL.

Após cada tempo de exposição aos tratamentos, os maços de plântulas foram retirados dos beckers e as raízes foram lavadas abundantemente por 30 minutos em água corrente, a fim de eliminar resíduos das soluções, sendo transplantadas a seguir para vasos contendo solo.

Para cada combinação de tratamento de plântulas haploides das oito populações de milho branco foram transplantadas, aproximadamente, 46 plântulas em cada uma das duas casas de vegetação, utilizadas como blocos experimentais.

Os transplantios foram realizados em vasos de 12 L contendo a mistura de terra, areia e adubo orgânico nas proporções de 3:1:1, respectivamente.

O manejo do experimento envolveu o uso de irrigação por gotejamento e fertirrigação, com a finalidade de reduzir estresses e oferecer as melhores condições para o desenvolvimento das plantas DHs.

Todo resíduo das soluções utilizadas como tratamentos de duplicação cromossômica, foram coletados separadamente e acondicionados em galões plásticos para realização do descarte adequado, por empresa especializada.

O controle negativo foi utilizado para identificar o potencial de duplicação espontânea das populações de milho branco tropical.

### 3.5 AVALIAÇÕES DO POTENCIAL DE DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA

Todas as combinações de tratamentos e populações foram avaliadas quanto aos números de: (1) sementes haploides putativas usadas; (2) sementes germinadas; (3) plântulas submetidas a tratamento; (4) plântulas transplantadas; (5) plantas  $D_0$  sobreviventes até a fase de polinização; (6) plantas  $D_0$  polinizadas; (7)  $D_0$  que produziram sementes  $D_1$ ; (8) Plantas macho estéril;

Posteriormente foram estimadas as seguintes taxas: a) autofecundação (TA) = plantas autofecundadas / plantas sobreviventes até a polinização; b) eficiência de autofecundação (EA) = número de plantas  $D_0$  que produziram semente/ número de plantas autofecundadas; c) macho estéril (ME) = plantas com espiga fértil e pendão estéril/ plantas sobreviventes até a autofecundação); d) taxa de sobrevivência (TS) =

número de plantas sobreviventes à polinização / plantas submetidas ao tratamento; e) taxa de reprodução (TR) = número de plantas  $D_0$  que produziram sementes / número de plantas  $D_0$  sobreviventes na polinização; f) taxa de sucesso geral (TSG) = número de plantas  $D_0$  que produziram sementes / número de plântulas haploides putativas submetidas a tratamento de duplicação de cromossomos.

Em todos os experimentos, as taxas de germinação de sementes, desbaste de plantas nos vasos, plantas falso haploides e sobrevivência de plântulas antes do tratamento de duplicação cromossômica não foram consideradas no cálculo das taxas de sucesso da duplicação cromossômica, uma vez que essas perdas não são resultantes da utilização do método de duplicação dos tratamentos de haploides. As plantas que apresentaram espigas segregantes também não foram utilizadas na estimação das taxas, sendo consideradas falso haploides.

Para análise da quantidade de sementes oriundas de plantas férteis  $D_0$ , as espigas  $D_1$  obtidas foram categorizadas em espigas com: (1) menos de cinco sementes; (2) cinco a 25 sementes; e (3) 26 a 50 sementes; (4) 51 a 100 sementes; (5) mais de 100 sementes. A proporção de espigas  $D_1$  em cada tratamento foi obtida pela divisão do número de espigas nessa categoria pelo número total de espigas.

### 3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os índices e taxas foram comparados pelo teste de Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ), para comparação das taxas de sucesso e insucesso encontradas, avaliando a média dos genótipos indutores dentro de cada população doadora, e a média das populações para cada indutor segundo a expressão:

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

Em que:  $N_i$  = 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  $\sum n_i / \sum N_i$

Para a análise das taxas relacionadas ao sucesso da duplicação cromossômica e obtenção de DH's foi utilizado um delineamento experimental em blocos completamente casualizados, segundo um arranjo 4x8 (quatro tratamentos de

duplicação cromossômica x oito populações de milho branco tropical), com parcelas de aproximadamente 48 plantas, acondicionadas em 24 vasos, sendo alocadas duas plântulas tratadas por vaso, repetidos em dois blocos (Tabela 1). Os blocos foram constituídos de duas casas de vegetação diferentes junto ao Laboratório de Melhoramento Genético do Departamento de Biologia Geral da UEL.

O modelo utilizado para a análise de variância fatorial 4x8 foi o seguinte:

$$Y_{ijk} = m + B_k + T_i + P_j + TP_{ij} + e_{ijk}, \text{ onde:}$$

$m$  = média geral do experimento;

$B_k$  = efeito aleatório do  $k$ -ésimo bloco ( $k = 1, 2, \dots, K$ );

$T_i$  = efeito fixo do  $i$ -ésimo tratamento de duplicação cromossômica ( $i = 1, 2, \dots, I$ );

$P_j$  = efeito fixo do  $j$ -ésima população de milho branco ( $j = 1, 2, \dots, J$ );

$TP_{ij}$  = efeito da interação do  $i$ -ésimo tratamento com a  $j$ -ésima população;

$e_{ijk}$  = erro aleatório.

As variáveis TA, ME, TR, TSG tiveram seus quadrados médios submetidos a transformação por raiz quadrada.

As médias dos tratamentos de duplicação cromossômica e das populações de milho branco e suas interações foram agrupadas pelo método de Scott e Knott a 5% de probabilidade.

Foi realizado um teste de correlação de Pearson entre as variáveis TA, TR, TSG e ME.

#### **4. ARTIGO**

Idéias Principais:

- As substâncias APM e pronamide, associadas, tem potencial para substituir o uso da colchicina no processo de duplicação cromossômica na produção de linhagens duplo haploides em milho.
- A eficácia na duplicação cromossômica das substâncias antimitóticas varia em função da população doadora utilizada para a obtenção de duplo haploides.
- É possível identificar populações de milho branco tropical com elevada capacidade de duplicação cromossômica espontânea.
- A taxa de indução tem interação complexa entre indutores e populações doadoras utilizadas.

#### **ALTERNATIVAS À COLCHICINA NA PRODUÇÃO DE LINHAGENS DUPLO HAPLOIDES EM MILHO BRANCO TROPICAL**

Bruno Figueiró Fregonezi; Josué Maldonado Ferreira

Afiliações: Universidade Estadual de Londrina

## RESUMO

A colchicina é eficaz e amplamente utilizada no processo de produção de linhagens duplo haploides em milho, mas apresenta custo e toxicidade elevados, que impelem a busca por alternativas para sua substituição. Os objetivos foram: determinar a eficácia do uso de soluções de pronamide e Amiprofos methyl, em substituição à colchicina, na duplicação cromossômica via imersão de raízes de plântulas; identificar o potencial de duplicação cromossômica espontânea das populações de milho branco tropical; comparar as taxas de indução de três linhagens indutoras tropicalizadas desenvolvidas pelo Centro internacional de Melhoramento de Milho e Trigo (CIM2GTAIL-P1, CIM2GTAIL-P2 e CIM2GTAIL-P3) e suas três combinações híbridas cruzadas com milho branco tropical. Oito populações de milho branco foram polinizadas por seis genótipos indutores gimnogenéticos e estimadas as taxas de indução à haploidia. No estágio V2 as plântulas haploides tiveram suas raízes lavadas e imersas em quatro tratamentos para a duplicação cromossômica (controle negativo com água; solução de APM+pronamide; solução de colchicina; solução de pronamide). Foram estimadas: taxas de autofecundação, eficiência da autofecundação, porcentagem de machos estéreis, sobrevivência, reprodução e sucesso geral. As espigas D<sub>1</sub> obtidas foram categorizadas em cinco classes de acordo com o número de sementes por espiga. As populações estudadas apresentaram taxas de duplicação cromossômica espontânea entre 7,9% a 38,3%. O tratamento APM+pronamide é uma alternativa eficaz na produção de linhagens duplo haploides em milho branco tropical. A combinação híbrida CIM2GTAIL-P1 x CIM2GTAIL-P2 apresentou maior taxa de indução média para as populações de milho branco tropical utilizadas.



#### 4.1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a tecnologia duplo haploide (DH) surgiu como uma alternativa eficiente para a produção de linhagens de milho 100% homozigóticas, demandando de duas a três gerações. Esta metodologia envolve a indução à haploidia, seleção de indivíduos haploides, duplicação cromossômica e multiplicação de sementes DH's (Chaikam et al., 2019; Maqbool et al., 2020).

Em milho, a frequência de indivíduos haploides naturais é, comumente, menor que 0,1%, sendo necessário empregar indutores de haploidia que podem ser gimnogenéticos ou androgenéticos, doadores e receptores de pólen, respectivamente, no cruzamento com populações doadoras (Hu et al., 2016; Kelliher et al., 2017). Os genótipos indutores gimnogenéticos são os mais utilizados, pois promovem maiores taxa de indução e permitem a manutenção do citoplasma do genótipo doador (Chaikam et al., 2019).

Os primeiros indutores gimnogenético e androgenético foram o Stock 6 (Coe, 1959) e Wisconsin 23 (Kermicle, 1969), com taxas de indução variando de 1% a 3,2%, respectivamente, sendo utilizados como base genética para o desenvolvimento dos indutores modernos, que viabilizaram a exploração da tecnologia DH em escala comercial. Dentre estes, pode-se destacar as taxas de indução de 3% a 5% para o WS14 (Lashermes; Beckert, 1988); 6,5% para o MHI (Chalyk, 1999); 8% a 12% para o RWS (Prigge et al., 2011); acima de 10 % para UH400 e de 12% a 15% para os indutores PK6, HZI1, CAUHOI e PHI (Barret; Brinkmann; Beckert, 2008; LI et al., 2009; Rotarenco et al., 2010; Zhang et al., 2008), todos indutores produzidos com germoplasma temperado e avaliados para condições de climas temperados. Contudo, a utilização destes indutores em ambientes tropicais é limitada pela sua baixa capacidade de adaptação e desempenho agrônômico, com elevada susceptibilidade a doenças tropicais, dificultando o processo de multiplicação e a sua utilização em lotes isolados de indução.

A partir de 2012, o Centro internacional de Melhoramento de Milho e Trigo (CIMMYT), em conjunto com a Universidade de Hohenhein, desenvolveram a primeira geração de Linhagens Indutoras Adaptadas a Ambientes Tropicais (TAIL's), com taxas médias de indução entre 6% e 9%. Posteriormente, o CIMMYT desenvolveu a segunda geração das TAIL's (CIM2GTAIL's) com maior taxa de indução (9% a 14%)

e melhor adaptação e níveis de resistência a doenças tropicais (Chaikam et al., 2018). No entanto, existem poucos relatos da utilização da segunda geração de linhagens indutoras do CIMMYT no Brasil e em cruzamentos com germoplasma brasileiro, sobretudo em milho branco tropical.

Após a indução à haploidia, faz-se necessário a duplicação cromossômica para a restauração de fertilidade. Normalmente, a taxa de duplicação espontânea em milho é extremamente baixa e resulta em indivíduos estéreis, o que impede a autofecundação para a obtenção dos DH's. Contudo, alguns genótipos de milho possuem capacidade de duplicar os cromossomos de forma espontânea, mesmo sem a utilização de tratamentos artificiais (Wei e Chen 2006; Maqbool et al., 2020). A duplicação espontânea pode implicar em economia de tempo, recursos e custos de mão de obra, além de reduzir os riscos para a saúde humana e as mutações de sementes associadas à colchicina (de La Fuente, 2015; Verzeznazzi, et al., 2021). Segundo Maqbool et al. (2020), taxas de duplicação cromossômica de 8% a 10% são requisitos mínimos para a produção de linhagens DH's sem a utilização de substâncias antimitóticas. Desta forma, a identificação de populações com taxas adequadas de duplicação espontânea pode auxiliar no processo de obtenção de linhagens duplo haploides, por meio de estudos da herança desta característica e do melhoramento de populações doadoras, que não necessitem o emprego de substâncias antimitóticas para a duplicação.

Independente da ocorrência de duplicação espontânea, geralmente se emprega a colchicina (C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>N) como uma substância antimitótica para a produção de linhagens DH's em milho (Prasanna et al., 2012; Melchinguer et al., 2016). A colchicina é utilizada em soluções para tratamento de haploides por meio da: imersão de sementes (Ren et al., 2018); imersão de plântulas recém germinadas (Gayen et al 1994; Prigge; Melchinger, 2012), injeção direta no tecido meristemático basal (Eder, Chalyk, 2002) e submersão de raízes (Chaikam et al., 2020), dentre outros. Porém, esta substância é altamente tóxica para a saúde humana, além de causar danos ao meio ambiente. Sua intoxicação leva a inibição de funções celulares cruciais, como divisão celular, montagem de proteínas no complexo de Golgi, endocitose e exocitose (Finkelstein et al., 2010), requerendo um manuseio extremamente cuidadoso desde a diluição até o descarte (Melchinguer et al., 2016).

Cada vez mais, estudos têm sido realizados buscando alternativas ao uso da colchicina na duplicação cromossômica de haploides em milho, devido aos problemas inerentes a sua utilização. Os herbicidas antimitóticos como: a trifluralina (Kato, 1997), orizalina (Bartels e Hilton 1973), pendimetalina (Zhou et al., 2009), APM e o pronamide (Wan et al., 2000). têm sido estudados quanto sua eficiência na duplicação cromossômica. Contudo, estes trabalhos não demonstram a capacidade destas substâncias em restaurar a fertilidade de indivíduos haploides, para a produção de linhagens em milho.

Na literatura existem alguns trabalhos que demonstram o potencial da utilização destes herbicidas na duplicação cromossômica de haploides em milho. No trabalho de Ren et al. (2018), por meio da contagem cromossômica foram verificadas elevadas taxas de duplicação via imersão de sementes em uma solução de APM. Contudo, estes autores empregaram a contagem cromossômica que não é suficiente para a comprovação da eficiência de um método de duplicação cromossômica para a obtenção de DH's, pois não revela a real capacidade de produzir linhagens duplo haploides de milho. O trabalho de Melchinguer et al. (2016), utilizando uma solução com APM e pronamide, atingiu taxas de sucesso geral que não diferiram em relação ao tratamento com colchicina, mas apresentou elevada mortalidade, resultando na redução da eficiência na a produção de linhagens. Isto indica que, existe a necessidade de mais estudos envolvendo a utilização destes herbicidas.

Dessa forma, os objetivos foram: (I) determinar a eficácia do uso de soluções de pronamide e Amiprofos methyl (APM), em substituição à colchicina, na duplicação cromossômica via imersão de raízes de plântulas; (II) identificar o potencial de duplicação cromossômica espontânea das populações de milho branco tropical; (III) comparar as taxas de indução de três linhagens indutoras tropicalizadas desenvolvidas pelo CIMMYT e Trigo (CIM2GTAIL-P1, CIM2GTAIL-P2 e CIM2GTAIL-P3) e suas três combinações híbridas no cruzamento com populações de milho branco tropical.

## 4.2 MATERIAL E METODOS

### 4.2.1 Material Genético

Foram utilizadas as linhagens indutoras CIM2GTAIL-P1 (P1), CIM2GTAIL-P2 (P2) e CIM2GTAIL-P3 (P3) e suas três combinações híbridas (P1xP2, P1xP3 e P2xP3), totalizando um conjunto de seis genótipos indutores de haploidia gimnogenéticos, que utilizam o gene *R1-nj* como marcador de haploidia. As populações doadoras de milho branco tropical induzidas são genótipos experimentais e foram disponibilizadas pelo Programa de Melhoramento do Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná (IDR-PR) (PB01, PB10, PB15, PB20, PB25, PB30, PB35, PB40). O programa do IDR-PR tem sido responsável por desenvolver alguns dos principais genótipos comerciais de milho Branco no Brasil.

### 4.2.2 Indução das Populações doadoras

Durante a safra 2021/2022, foram realizadas os cruzamentos para a indução de haploidia na Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina (23°20'S; 51°33'W; 576 m altitude), que apresenta clima Subtropical Úmido Mesotérmico: temperatura superior a 22°C, nos meses mais quentes; temperatura inferior a 18°C, nos meses mais frios; precipitação média anual de 1658,43 mm. Foram realizados cruzamentos entre as oito populações de milho branco doadoras, utilizadas como fêmeas, e os seis genótipos indutores como machos. As polinizações foram realizadas manualmente, visando obter cerca de 40 espigas induzidas/população cruzadas com cada indutor e produzir sementes haploides putativas em quantidades suficientes para os estudos pretendidos.

### 4.2.3 Avaliação do Potencial de Indução à Haploidia dos Genótipos Indutores

As espigas obtidas a partir dos cruzamentos de indução foram classificadas de acordo com a marcação conferida pelo gene *R1-nj*, pela presença ou ausência da marcação de antocianina nas sementes. As sementes induzidas foram classificadas segundo a expressão do gene *R1-nj*, em três categorias: a) diploides (sementes que

expressam a pigmentação púrpura na aleurona e no embrião); b) haploides putativos (sementes com pigmentação púrpura somente no endosperma, mantendo o embrião sem antocianina); c) diploides resultantes de contaminação ou da inibição da expressão do gene *R1-nj* (sementes sem marcação).

As taxas de indução de haploides (TI) obtidas pela razão entre o número de SHP's pelo total de sementes marcadas. Posteriormente, foi contabilizado o número de indivíduos falso haploides no estágio V2, V6 e na colheita, por meio de características morfológicas típicas de cada nível de ploidia e espigas com grãos segregantes para a expressão do gene *R1-nj*. A estimativa da porcentagem de falso haploide (FH) foi obtida pela razão entre os números de indivíduos falso haploides e SHP's, que permitiu estimar a taxa de indução real (TIR), dado por:  $TIR = TI - (FH \times TI)$ .

#### 4.2.4 Tratamentos de Duplicação Cromossômica

As SHP's obtidas foram embebidas em água de torneira por seis horas, separadamente por população doadora, visando homogeneizar a germinação. Posteriormente, semeadas em bandejas plásticas de 200 células com substrato turfa Sphagnum, em casa de vegetação. Após 10 a 11 dias da semeadura, as plântulas no estágio V2 tiveram suas raízes cuidadosamente lavadas em água corrente para remoção do substrato nas raízes. As plântulas lavadas foram alinhadas no nível da semente em fitas de papel alumínio, para a formação de maços de 90 a 100 plântulas por tratamento, que foram inseridos em beckers com volume de 1 litro. Nos beckers foram inseridos 4 diferentes tratamentos de duplicação cromossômica: 1 - controle negativo, com apenas água; 2 - solução de 4,56 mg L<sup>-1</sup> de APM, 3 mg L<sup>-1</sup> de pronamide, 0,1% de Tween-20 e 0,5% de DMSO dissolvida em água filtrada; 3 - solução contendo 0,7% de colchicina e 0,5% de DMSO; 4 - solução de 10mg L<sup>-1</sup> de pronamide, 0,1% de Tween-20 e 0,1% de DMSO dissolvida em água filtrada. Foi inserida solução suficiente de cada tratamento para atingir de 2 a 3 cm acima do nível da região da coroa da plântula. O tempo de exposição dos tratamentos foram 5, 16, 5 e 4 horas, respectivamente, no escuro e em temperatura ambiente, como uma adaptação ao método apresentado por Chaikam et al. (2020).

A escolha do método de duplicação cromossômica teve como base o protocolo de imersão de raízes, estabelecido por Chaikam et al. (2020), onde os autores demonstram que a dose de 0,07% não diferem significativamente para TS, TR e TSG da dose de 0,1%. Com isso, optou-se pela dose de 0,07% devido a utilizar uma menor quantidade de princípio ativo, o que diminui os riscos e custos da operação. Além disto, o tratamento de imersão de raízes com colchicina foi utilizado como tratamento controle para efeito de comparação com os demais tratamentos antimitóticos alternativos.

Os herbicidas antimitóticos e suas dosagens tiveram base em seus mecanismos de ação na duplicação cromossômica e em relatos que indicaram o potencial do APM e o pronamide na duplicação de haploides em milho (Wan et al., 1991; Melchinguer et al., 2016; Ren et al., 2018), sendo idealizadas modificações da metodologia utilizada por Chaikam et al. (2020).

O tratamento APM+pronamide foi selecionado com base no efeito de sinergia entre essas substâncias reportado por Melchinguer et al., (2016), demonstrando o potencial na utilização em conjunto do APM com o pronamide. Porém, a dose de 20 mg L<sup>-1</sup> de APM e 4 mg L<sup>-1</sup> de pronamide, utilizada pelo autor, resultou em uma baixa TS (46%). Desta forma, a redução na concentração de APM e pronamide somada ao aumento do tempo de exposição, assim como relatado por REN et al. (2018), aumentaram significativamente a TS mantendo uma TR elevada, em relação aos resultados obtidos por Melchinguer et al. (2016).

A opção de utilizar o pronamide isoladamente como tratamento está relacionada ao baixo custo dessa substância quando comparada a colchicina sal toxidade. A escolha da dose utilizada foi feita com base em resultados de estudos prévios (pré-ensaios) de sobrevivência de plântulas aos diferentes tempos de exposição pelo Laboratório de Melhoramento Genético/ Departamento de Biologia Geral/UEL.

Após cada tempo de exposição aos tratamentos, os maços de plântulas foram retirados dos beckers e as raízes foram lavadas abundantemente em água corrente por 30 minutos, a fim de eliminar resíduos das soluções. Todo resíduo das soluções utilizadas como tratamentos de duplicação cromossômica foi coletado separadamente e acondicionados galões plásticos, para realização do descarte adequado por empresa especializada.

Imediatamente após a lavagem, as plântulas foram transplantadas para vasos de 12 L, contendo a mistura de solo argiloso, areia e adubo orgânico, nas proporções de 3:1:1, respectivamente. Para cada combinação de tratamento de plântulas haploides das oito populações de branco foram transplantadas, aproximadamente, 46 plântulas em cada uma das duas casas de vegetação, utilizadas como blocos experimentais.

O manejo do experimento envolveu o uso de irrigação por gotejamento e fertirrigação, com a finalidade de reduzir estresses e oferecer as melhores condições para o desenvolvimento das plantas DH's, seguindo as recomendações agronômicas da cultura do milho.

O controle negativo foi utilizado para identificar o potencial de duplicação espontânea das populações de milho branco tropical.

#### 4.2.5 Avaliação do Potencial de Duplicação Cromossômica dos Tratamentos.

Todas as combinações de tratamentos e populações foram avaliadas os números de: (1) sementes haploides putativas utilizadas; (2) sementes germinadas; (3) plântulas submetidas a tratamento; (4) plântulas transplantadas; (5) plantas  $D_0$  sobreviventes até a fase de polinização; (6) número de plantas  $D_0$  polinizadas; (7) plantas  $D_0$  que produziram sementes  $D_1$ ; (8) Plantas macho estéril;

Posteriormente, foram estimadas as seguintes taxas de: a) autofecundação (TA) = plantas autofecundadas/plantas sobreviventes até a polinização; b) eficiência de autofecundação (EA) = número de plantas  $D_0$  que produziram semente/número de plantas autofecundadas; c) macho estéril (ME) = plantas com espiga fértil e pendão estéril/plantas sobreviventes até a autofecundação; d) taxa de sobrevivência (TS) = número de plantas sobreviventes até a polinização/plantas submetidas ao tratamento; taxa de reprodução (TR) = número de plantas  $D_0$  que produziram sementes/número de plantas  $D_0$  sobreviventes até a polinização; f) taxa de sucesso geral (TSG) = número de plantas  $D_0$  que produziram sementes/número de plântulas haploides putativas submetido a tratamento. As estimativas das taxas TS, TR e TSG foram sugeridas por Melchinguer et al. (2016), para a padronização da estimativa da eficiência de diferentes métodos de duplicação cromossômica de haploides em milho.

Em todos os experimentos, as taxas de germinação de sementes, desbaste de

plantas nos vasos, plantas falso haploides e sobrevivência de plântulas antes do tratamento de duplicação cromossômica não foram consideradas no cálculo das taxas de sucesso da duplicação cromossômica, uma vez que essas perdas não são resultantes da utilização do método de duplicação de haploides. As plantas que apresentaram espigas segregantes também não foram utilizadas na estimação das taxas, sendo consideradas falso haploides.

Para avaliação da quantidade de sementes oriundas de plantas férteis  $D_0$ , as espigas  $D_1$  obtidas foram categorizadas em espigas com: (1) menos de cinco sementes; (2) cinco a 25 sementes; e (3) 26 a 50 sementes; (4) 51 a 100 sementes; (5) mais de 100 sementes. A proporção de espigas  $D_1$  em cada tratamento foi obtida pela divisão do número de espigas nessa categoria pelo número total de espigas DH's obtidas em cada população e tratamento.

#### 4.2.6 Avaliações Estatísticas

As taxas de indução e taxa de indução real foram comparadas pelo teste de Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ), para comparação das taxas de sucesso e insucesso encontradas, avaliando a média dos genótipos indutores dentro de cada população doadora, e a média das populações para cada indutor segundo a expressão:

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

Em que:  $N_i$  = 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  $\sum n_i/\sum N_i$

Para a análise das taxas relacionadas ao sucesso da duplicação cromossômica e obtenção de DH's foi utilizado um delineamento experimental em blocos completamente casualizados, segundo um arranjo fatorial 4x8 (quatro tratamentos de duplicação cromossômica x oito populações de milho branco tropical), com parcelas de aproximadamente 48 plantas, acondicionadas em 24 vasos, sendo alocadas duas plântulas tratadas por vaso, repetidos em dois blocos. Os blocos foram constituídos de duas casas de vegetação diferentes, alocadas junto ao Laboratório de Melhoramento Genético do Departamento de Biologia Geral da UEL.



O modelo utilizado para a análise de variância fatorial 4x8 foi o seguinte:

$$Y_{ijk} = m + B_k + T_i + P_j + TP_{ij} + e_{ijk}, \text{ onde:}$$

$m$  = média geral do experimento;  $B_k$  = efeito aleatório do k-ésimo bloco ( $k = 1, 2, \dots, K$ );  $T_i$  = efeito fixo do i-ésimo tratamento ( $i = 1, 2, \dots, I$ );  $P_j$  = efeito fixo da j-ésima população ( $j = 1, 2, \dots, J$ );  $TP_{ij}$  = efeito da interação do i-ésimo tratamento com a j-ésima população;  $e_{ijk}$  = erro aleatório do i-ésimo tratamento, a j-ésima população e k-ésimo bloco.

As variáveis TA, ME, TR, TSG tiveram seus quadrados médios submetidos a transformação por raiz quadrada.

As médias dos tratamentos de duplicação cromossômica, populações e suas interações foram agrupadas pelo método de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

Foi realizado um teste de correlação de Pearson entre as variáveis TA, TR, TSG e ME.

#### 4.3 RESULTADOS

Neste experimento foram utilizadas um total de 116.003 sementes induzidas e marcadas pela expressão do gene *R1-nj*, sendo 15.851 haploides putativas, resultando em uma média geral de 13,7% de TI, sendo que a taxa média de falso haploides entre as populações foi de 16,3%, resultando em TIR médio de 11,3% (Tabela 1).

As médias de TI e TIR dos indutores dentro de cada população foram significativamente diferentes, sendo que para as populações PB15 e PB35 foram alcançada as maiores TIR e menores para PB01, PB20, PB25 e PB30, com valores entre 9,6% a 10,5% (Tabela 1). As maiores porcentagens de falsos haploides foram observadas na indução das populações PB10 e PB30 com valores iguais a 29,0% e 30,7%, respectivamente.

A capacidade média de indução dos genótipos indutores, em cruzamento com as oito populações de milho branco, variou significativamente para TI e TIR, mostrando que a combinação híbrida indutora P1xP2 apresentou o melhor desempenho, seguida pelas combinações híbridas P1xP3 e P2xP3 e o genitor P1, com estimativas acima de 13% para TI e 11% para TIR (Tabela 1).

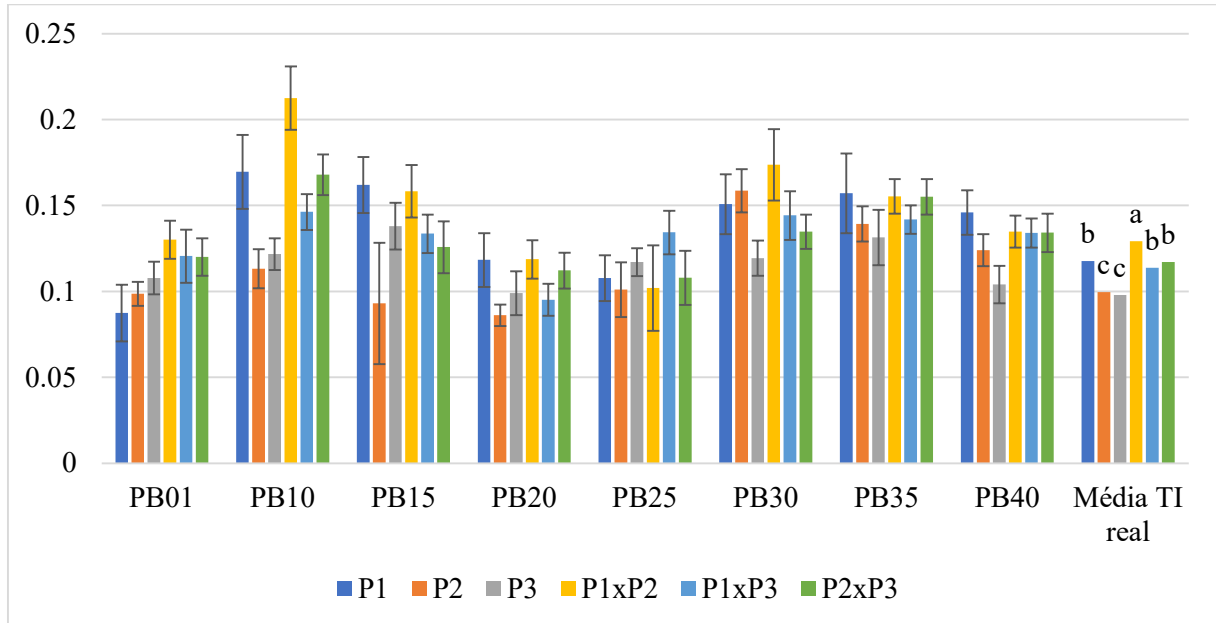
**Tabela 1** - Taxas de indução e taxas de indução real dos seis genótipos indutores sobre as diferentes populações de milho branco tropical e porcentagem de falso haploides das populações induzidas

Genótipos	NEI	Sementes marcadas	No. SHP	Média TI (%)	Falso Haploide (%)	Média TI real (%)
<b>Contagens e taxas por população</b>						
Indutores/PB01	102	11609	1371	11,8d	18,3	9,6c
Indutores/PB10	157	20071	3144	15,7a	29,0	11,1b
Indutores/PB15	56	8686	1180	13,6c	7,2	12,6a
Indutores/PB20	81	9789	1025	10,5e	4,6	10,0c
Indutores/PB25	75	9719	1111	11,4d	7,8	10,5c
Indutores/PB30	143	20783	3029	14,6b	30,7	10,1c
Indutores/PB35	163	19853	2958	14,9b	19,3	12,0ab
Indutores/PB40	117	15493	2033	13,1c	13,5	11,4b
<b>Contagens e taxas por genótipos indutores</b>						
P1	81	8590	1208	14,1b	---	11,8b
P2	116	16163	1923	11,9c	---	10,0c
P3	131	14465	1693	11,7c	---	9,8c
P1xP2	191	26996	4167	15,4a	---	12,9a
P1xP3	196	25098	3408	13,6b	---	11,4b
P2xP3	179	24691	3452	14,0b	---	11,7b
Total	894	116003	15851	---	---	---
Média	---	---	---	13,7	16,3	11,3

**Notas:** SHP= sementes haploides putativas; TI= taxa de indução; NEI= Número de espigas induzidas; médias pelas mesmas letras não apresentam diferença significativa em níveis de 0,05 de probabilidade pelo teste de X<sup>2</sup>.

Por meio das médias e desvio padrão da média de TI foi possível verificar combinações específicas entre populações doadoras e genótipos indutores (Figura 1). Contudo, o indutor P1xP2 está entre os melhores genótipos indutores para TI's, em todas as combinações com as populações doadoras de milho branco tropical, refletindo em maior média de TIR.

**Figura1.** Taxas de indução (TI) dos seis genótipos indutores nas diferentes populações de milho branco tropical e média de TI real por indutor.



**Notas:** Barra de desvios = desvio padrão da média; médias pelas mesmas letras não apresentam diferença significativa em níveis de 0,05 de probabilidade pelo teste de  $\chi^2$ .

Houve diferença significativa entre os tratamentos para a TS, sendo que os agentes antimetabólicos não promoveram maior mortalidade que o controle negativo com água. Os tratamentos pronamida e APM+pronamida apresentaram maiores TS's que o tratamento com colchicina (Tabela 2, Figura 2).

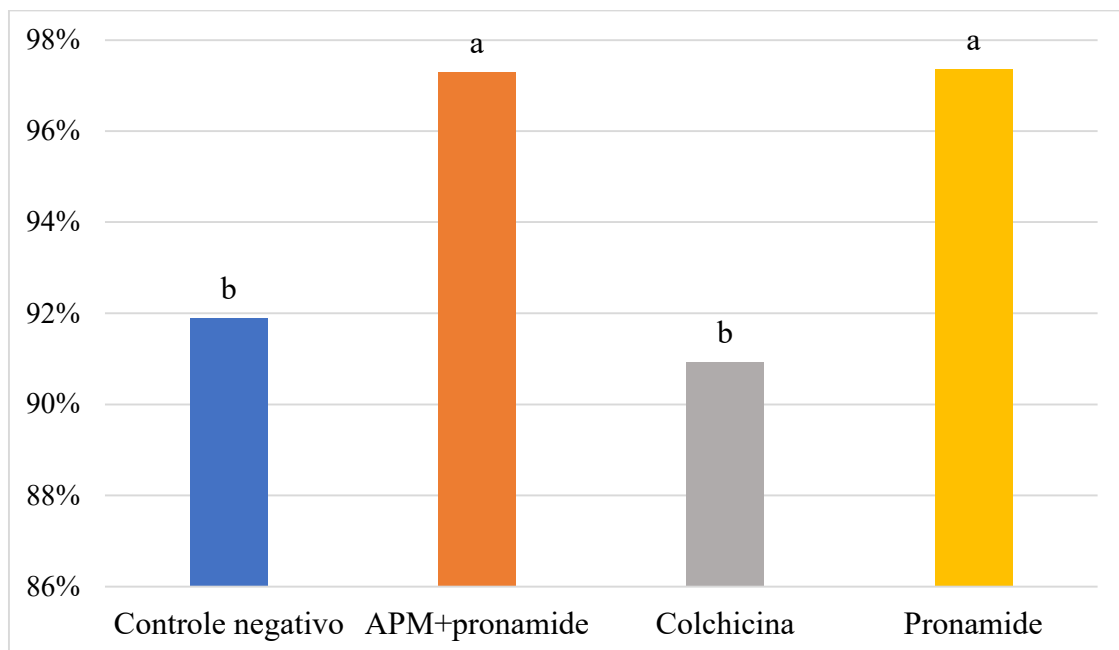
A análise de variância revelou efeitos significativos para os tratamentos, populações e de interação entre tratamento x população para a característica TA (Tabela 2). Em média, a TA foi significativamente menor para o controle negativo em relação aos tratamentos com substância antimetabólicas (Figura 3). Dentre as populações de milho branco, a população PB25 apresentou as menores médias de TA, revelando menor resposta aos tratamentos de duplicação cromossômica. As demais populações apresentaram respostas diferenciadas aos tratamentos para restaurar a fertilidade. O tratamento APM+pronamida foi significativamente melhor para PB40 e o pior para a PB35. Nas populações PB15, PB20, PB25, PB30 e PB35 o controle negativo está agrupado entre as maiores médias de TA, sendo observado TA's entre 22,2% a 76,0%.

**Tabela 2** - Quadrados médios e respectivos níveis de significância para quatro tratamentos de duplicação cromossômica, por imersão de raiz em plântulas V2, em oito populações de milho branco tropical e suas interações.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio					
		TS	TA <sup>ψ</sup>	ME <sup>ψ</sup>	EA <sup>ψ</sup>	TR <sup>ψ</sup>	TSG <sup>ψ</sup>
<b>Bloco</b>	<b>1</b>	0,0540ns	0,4390ns	7,2080*	3,4030ns	3,0710*	2,7910*
<b>Tratamento (T)</b>	<b>3</b>	189,45*	2,2740*	1,4480*	3,0250ns	2,2120*	1,7580*
<b>População (P)</b>	<b>7</b>	48,708ns	6,7440*	5,6340*	1,9930ns	5,3620*	5,3840*
<b>Interação TxP</b>	<b>21</b>	57,346ns	1,3640*	2,6180*	1,4200ns	1,8790*	1,7850*
<b>Erro</b>	<b>31</b>	39,034	0,291	0,4730	11,760	0,5110	0,5380
<b>Média (%)</b>		94,4	54,4	37,8	42,2	23,4	22,11
<b>CV%</b>		6,6	7,4	11,5	17,0	15,3	16,2

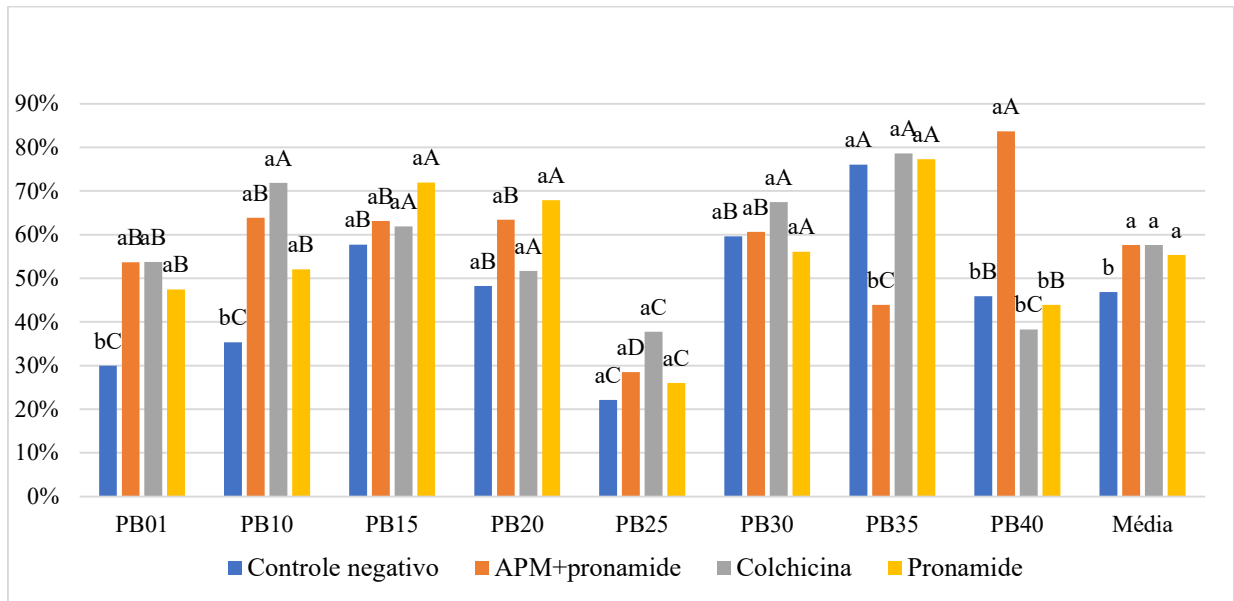
**Notas:** GL=Graus de liberdade; CV%= Coeficiente de variação em %; TS= taxa de sobrevivência; EA= eficiência da autofecundação; TA= taxa de autofecundação; TR= taxa de reprodução; TSG= taxa de sucesso geral; ME= porcentagem de macho estéril; ns,\*= não significativo e significativo, respectivamente, em nível 0,05 de probabilidade pelo teste F. <sup>ψ</sup>= quadrados médios e CV% com base em dados transformados por raiz quadrada.

**Figura 2** -Taxa de sobrevivência média dos diferentes tratamentos de duplicação cromossômica



**Notas:** médias seguidas da mesma letra pertencem ao mesmo agrupamento de médias dos pelo teste de Scott & Knott em nível de 0,05 de probabilidade.

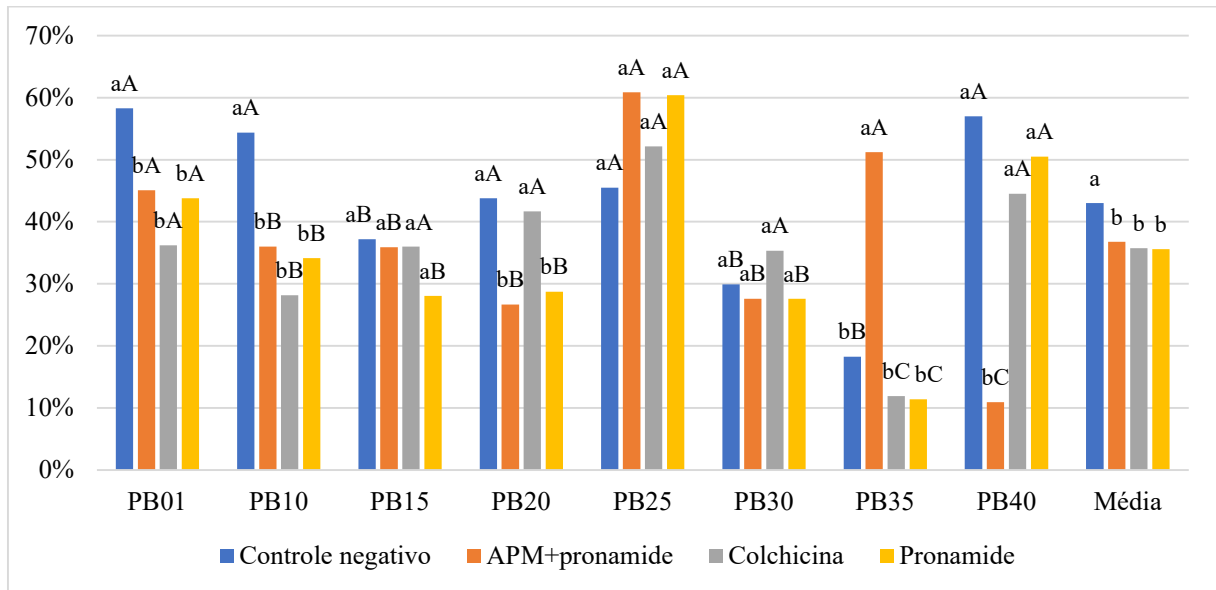
**Figura 3** - Taxa de autofecundação média de 8 populações de milho branco sobre diferentes tratamentos de duplicação cromossômica



**Notas:** médias seguidas pela mesma letra minúscula pertencem ao mesmo agrupamento de médias entre tratamentos dentro de populações e médias seguidas da mesma letra maiúscula pertencem ao mesmo agrupamento de médias das populações dentro dos tratamentos pelo teste de Scott & Knott em nível de 0,05 de probabilidade.

A análise de variância também revelou efeitos significativos de ME para tratamento, população e a interação entre população x tratamento (Tabela 2). O controle negativo apresentou uma maior média de macho estéreis em relação aos tratamentos com substâncias antimitóticas, que ficaram no mesmo agrupamento de médias (Figura 4). A população PB25 apresentou maior média de macho estéreis em relação as demais populações. Todos os tratamentos antimitóticos foram eficientes para reduzir o ME nas populações PB01, PB10, sendo que para a PB20 os tratamentos APM+pronamide e pronamide foram efetivos para reduzir ME. Na PB35 os tratamentos colchicina e pronamide reduziram ME e na PB40 apenas APM+pronamide foi capaz de reduzir ME.

**Figura 4** - Porcentagem média de macho-esterilidade nas 8 populações de milho branco sobre diferentes tratamentos de duplicação cromossômica



**Notas:** médias seguidas pela mesma letra minúscula pertencem ao mesmo agrupamento de médias entre tratamentos dentro de populações e médias seguidas da mesma letra maiúscula pertencem ao mesmo agrupamento de médias das populações dentro dos tratamentos pelo teste de Scott & Knott em nível de 0,05 de probabilidade.

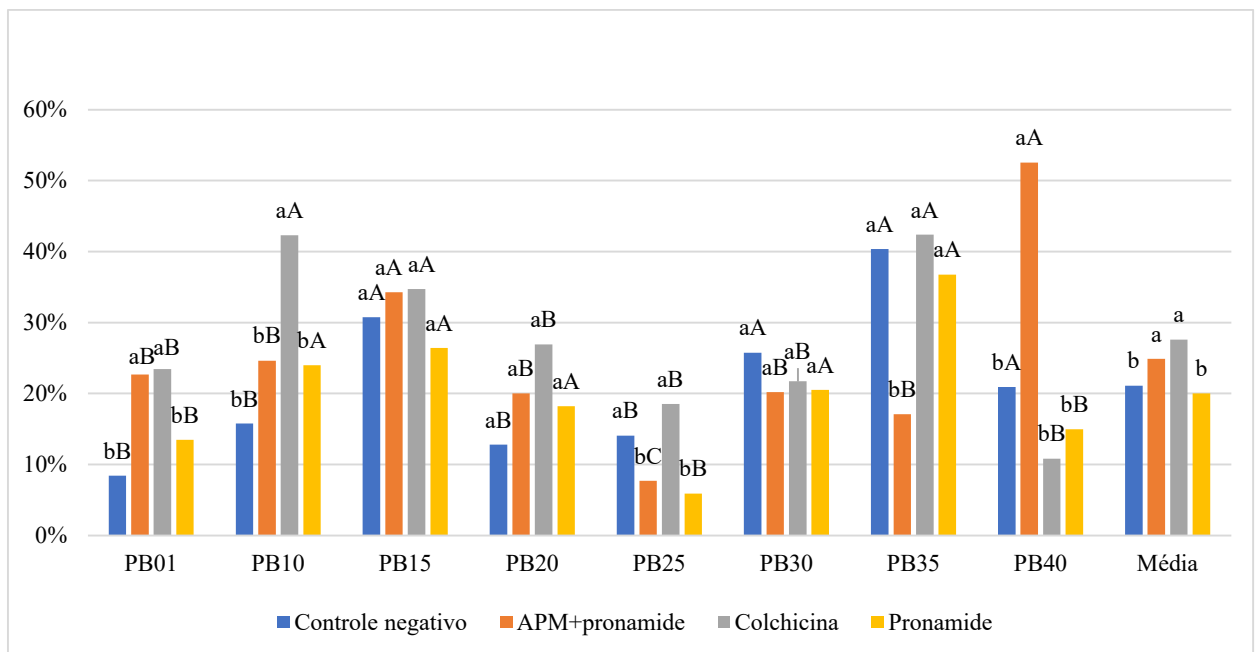
Houve elevada correlação entre as estimativas de TR e TSG para as combinações de tratamentos de duplicação cromossômica e populações doadoras, com estimativa igual a 0,99, revelando comportamento semelhantes destas taxas. Também sendo observado efeitos significativos na análise de variância para os tratamentos, populações e na interação tratamento x população para ambas características (Tabela 2). Para estas taxas o APM+pronamide e a colchicina apresentaram maiores médias geral em relação ao controle negativo e ao pronamide (Figuras 5 e 6). A população PB25 apresenta desempenho inferior em resposta aos tratamentos para a TR e TSG. Em relação aos demais tratamentos, para estas características, APM+pronamide foi significativamente melhor e pior para as populações PB40 e PB35, respectivamente. Enquanto, a colchicina foi o melhor tratamento para a população PB10, quando comparada aos demais tratamentos.

Nas populações PB15, PB25, PB30 e PB35, a média de TR e TSG do controle negativo ficou agrupada as médias dos tratamentos antimitóticos. Mesmo com o controle negativo empregando água, as populações de milho branco tropical

apresentaram estimativas de TR variando entre 8,4% a 40,4% e de TSG variando de 7,9% a 38,3%, indicando consideráveis taxas de duplicação espontânea.

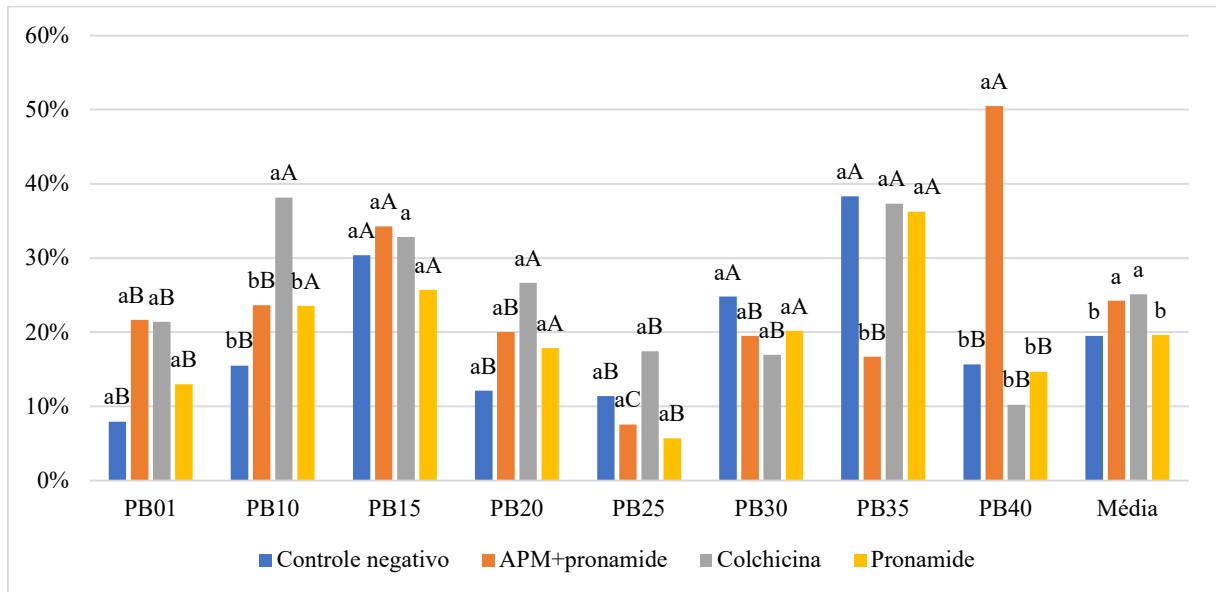
A partir das médias das taxas de sucesso de duplicação e de macho esterilidade foi verificado que a ME apresenta estimativas de correlação de Pearson iguais a -0,90 com TA, -0,80 com TR e -0,81 com TSG, indicando que quanto maior a ME menor serão os índices de sucesso na duplicação cromossômica.

**Figura 5.** Taxa de reprodução média de 8 populações de milho branco sobre diferentes tratamentos de duplicação cromossômica



**Notas:** médias seguidas pela mesma letra minúscula pertencem ao mesmo agrupamento de médias entre tratamentos dentro de populações e médias seguidas da mesma letra maiúscula pertencem ao mesmo agrupamento de médias das populações dentro dos tratamentos pelo teste de Scott & Knott em nível de 0,05 de probabilidade.

**Figura 6** - Taxa de sucesso geral média de 8 populações de milho branco sobre diferentes tratamentos de duplicação cromossômica



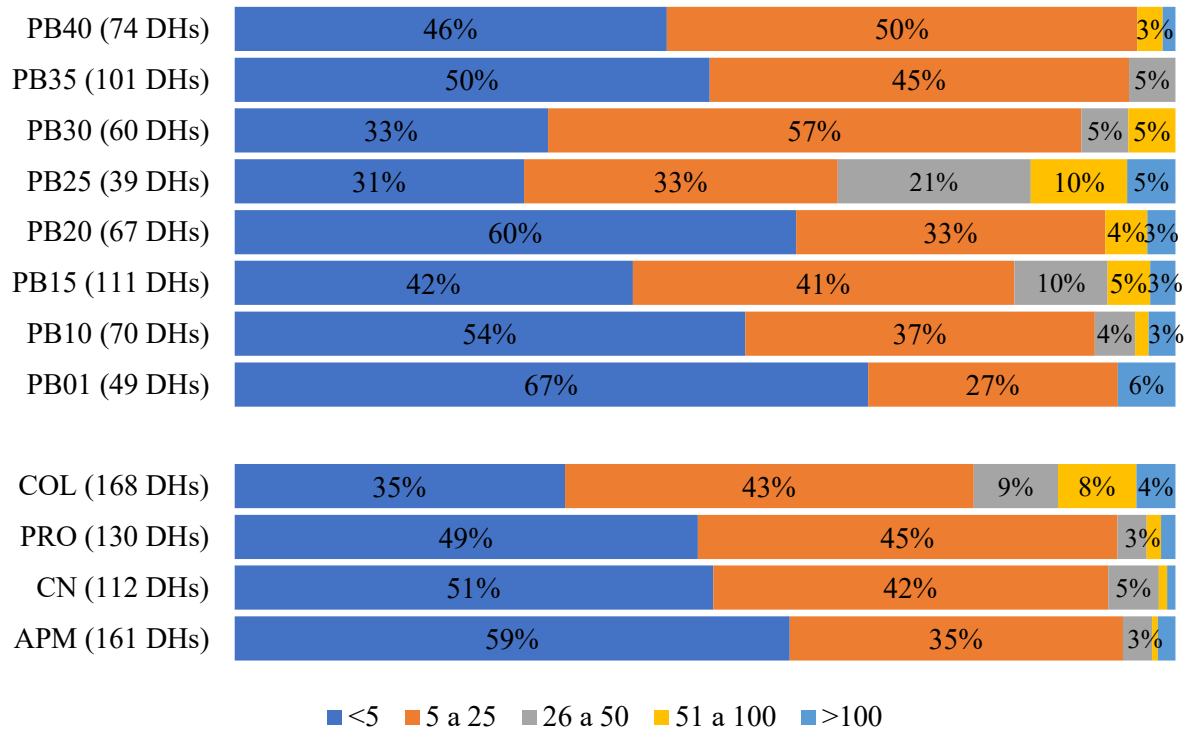
**Notas:** médias seguidas pela mesma letra minúscula pertencem ao mesmo agrupamento de médias entre tratamentos dentro de populações e médias seguidas da mesma letra maiúscula pertencem ao mesmo agrupamento de médias das populações dentro dos tratamentos pelo teste de Scott & Knott em nível de 0,05 de probabilidade.

Com base no número total de espigas DH's obtidas da soma de todos os tratamentos em cada população e de seus respectivos números de sementes por espiga, foi possível verificar que as populações PB15 e PB35 apresentaram uma melhor resposta à duplicação cromossômica e produção de linhagens DH's (Figura 7).

A partir dos totais de espigas DH's de cada tratamento, somando-se todas os resultados das oito populações de milho branco e de seus respectivos números de sementes por espiga, foram obtidos números semelhantes de espigas DH's empregando colchicina ou APM+pronamide, superando o tratamento com pronamide e o controle negativo (Figura 7). O elevado número de espigas alcançado pelo controle negativo pode estar relacionado à elevada taxa de duplicação espontânea observada em algumas das populações de milho branco tropical. O tratamento com colchicina promoveu o aumento da frequência de espigas com mais de 26 sementes por espiga e menor frequência de espigas com uma a cinco sementes.



**Figura 7** - Porcentagem de linhagens duplo haploides nas diferentes classes de número de sementes por espiga



**Notas:** COL= tratamento com colchicina; PRO= tratamento com pronamide; APM= tratamento com APM+pronamide; CN= controle negativo com água; DHS= Número de linhagens duplo haploides obtidas.

#### 4.4 DISCUSSÃO

##### 4.4.1 Taxas de Indução à haploidia

As TI obtidas dos cruzamentos entre os genótipos indutores CIM2GTAIL e as populações de milho branco tropical, variaram de 11,7% a 15,4% (Tabela 1), sendo semelhantes as observadas por Chaikam et al. (2018) no México, Kahrman et al (2022) na Turquia e Kaur et al. (2023) na Índia, utilizando indutores adaptados ao ambiente tropical de segunda geração desenvolvidos pelo CIMMYT. Isto indica que, mesmo em diferentes ambientes, o padrão da TI destes genótipos se mantém. Logo, ainda que exista a variação na taxa de indução dependendo da população doadora e dos ambientes, é seguro afirmar que a variação para estes indutores CIM2GTAIL's deve ficar próximas de 8% a 14% (Chaikam et al., 2018).

Parte da variação nas TI's ocorre devido a interação dos genótipos indutores com as populações doadoras (Prigge et al., 2011). Neste estudo foi possível observar que o híbrido P1xP2 apresentou as maiores médias na TI e TIR, porém em determinados cruzamentos a linhagem indutora P1 alcançou maiores médias de TI (Figura 1), indicando a existência interação do tipo complexa entre os genótipos indutores e as populações doadoras. Essa interação se confirma ao comparar as médias TI's observadas neste estudo com os resultados obtidos por Kaur et al (2023), onde, a linhagem P2 apresentou maior TI média (10%) em relação a P1 (7,46%), impossibilitando a escolha um único genótipo indutor, que possua a maior taxa de indução, em cruzamento com todas as populações, sendo necessário o estudo prévio da interação entre indutores e populações doadoras utilizadas, para maximizar a eficiência da produção de linhagens DH's.

Assim como em outros estudos, a identificação de haploides baseada apenas na expressão do gene *R1-nj* apresenta falhas na identificação dos indivíduos realmente haploides (Röber et al. 2005; Prigge et al. 2011; Melchinger et al. 2014; Chaikam et al. 2016), em função das populações doadoras induzidas. Algumas combinações resultantes do cruzamento entre genótipos indutores e populações de milho branco tropical doadoras apresentaram elevadas taxas de falsos haploides, mostrando que o sucesso da indução e da correta identificação dos haploides é dependente da população doadora. Com isso, é essencial aliar a seleção a partir da expressão do gene *R1-nj* com a utilização de características alternativas que diferenciem haploides e diploides (Choe et al., 2012; Melchinger et al., 2014; Wang et al. 2016; Sekiya et al., 2020; Souza et al., 2024) para aumentar a eficiência na obtenção de linhagens DHs, principalmente quando viabilizam a eliminação de falsos haploides antes do tratamento com soluções antimitóticas. Além disto, o reconhecimento das possíveis porcentagens de falsos haploides, em função das populações doadoras, auxilia no planejamento e quantificação do número de SHP's necessárias para alcançar um número desejado de DH's por população.

#### 4.4.2 Eficácia das alternativas a colchicina

A TS (Figura 2) dos tratamentos não foram inferiores às do controle negativo, demonstrando uma baixa mortalidade de plantas resultante da exposição as substâncias antimitóticas e reduzida mortalidade, quando comparando com outros trabalhos que utilizaram imersão de raízes com colchicina, 52,7% (Kaur et al., 2023) 75,8%, ( Melchinguer et al., 2016), 87,7% (Chaikam et al., 2020),

Neste estudo, as TR's (Figura 5) dos tratamentos com colchicina (27,6%), APM+pronamide (24,9%), controle negativo (21,1%) e pronamide (20,0%) foram semelhantes ao obtido por Melchinguer et al., (2016), que apresentaram uma média de TR igual a 29,2% no seu melhor tratamento utilizando colchicina. Contudo, embora tenha sido empregado o mesmo protocolo de duplicação cromossômica com colchicina descrito por Chaikam et al. (2020), as TR's ficaram a baixo da melhor TR de 41,5% observada por estes autores em diferentes populações. Isto indica que o sucesso da duplicação cromossômica em haploides de milho vai depender das populações doadoras e do ambiente.

A TSG dos tratamentos com colchicina (25,1%), APM+pronamide (24,2%), controle negativo (19,5%) e pronamide (19,7%), superam os resultados obtidos por Kaur et al., 2023 (18,71%) e se aproximam dos valores obtidos por Melchinguer al. (2016) (22,1%), ambos utilizando soluções de colchicina, porém o trabalho de Chaikam et al., (2020) resulta em um maior valor de TSG de 36.5% em comparação com o presente estudo. Assim, os resultados obtidos demonstram que todos os tratamentos apresentaram médias satisfatórias, principalmente para TSG, e semelhantes aos resultados da literatura. Destacando o APM+pronamide, que no presente estudo não diferiu significativamente da colchicina para TA, TR e TSG, sendo uma solução antimitótica promissora para a substituição da colchicina na produção de linhagens duplo haploides em milho.

As frequências de espigas DH classificadas com base no número de sementes por espiga, observadas neste trabalho por meio do tratamento com colchicina, ficaram dentro dos intervalos apresentados por Chaikam et al. (2020), empregando o mesmo método. Contudo, os tratamentos de duplicação cromossômica envolvendo APM e pronamide e o controle negativo apresentaram menor frequência de espigas com mais

de 25 sementes. Isto indica que o método de imersão de raízes utilizando colchicina, promove o aumento do número de sementes produzidos por espiga DH.

Além disso todos os tratamentos com agentes antimitóticos resultaram em uma diminuição de ME (Figura 5) média em relação ao controle negativo, ressaltando a capacidade das substâncias antimitóticas em restaurar da fertilidade masculina dos haploides (Chaikam et al., 2020; Maqbool et al., 2020).

O mecanismo de ação do pronamídeo e do APM são diferentes, em quanto o pronamídeo causa um encurtamento nos microtúbulos (Vaughan et al., 1987.) o APM atua na  $\beta$ -tubulina inibindo a formação de dímeros de tubulina evitando assim a formação de microtúbulos (Chaikam et al., 2019) Dessa forma, o sucesso na duplicação cromossômica obtido pelo tratamento APM+pronamídeo pode estar relacionado ao sinergismo destas moléculas e seus mecanismos de ação.

Com base no levantamento de custos para a produção de um litro de solução de cada tratamento, pode-se verificar que os tratamentos APM+pronamídeo e pronamídeo representam uma redução aproximada de 37 e 61 vezes do custo, em relação ao tratamento com colchicina, respectivamente.

#### 4.4.3 Influência das populações doadoras sobre o sucesso nos tratamentos de duplicação cromossômica artificial e na duplicação espontânea.

A interação tratamento x população revelou que, dependendo da população doadora utilizada, existe um comportamento diferenciado da duplicação cromossômica em resposta aos diferentes tratamentos (Prigge et al., 2012), ocorrendo interação do tipo complexa, o que limita o sucesso de um único tratamento para todas as populações. Isto pode ser evidenciado na TA, TR e TSG para as populações PB035 e PB040, com o APM+pronamídeo sendo o pior tratamento na primeira e o melhor tratamento na segunda população, respectivamente. Este fato pode explicar a variação do sucesso dos métodos e de substâncias antimitóticas em estudos envolvendo diferentes populações. Desta forma, as populações doadoras tem influência direta no sucesso da duplicação cromossômica de haploides.

O controle negativo permitiu a identificação de populações com elevadas taxas de duplicação espontânea, revelando a importância deste tratamento nos estudos do potencial de duplicação cromossômica artificial.

A revisão de Maqbool et al. (2020) cita que é necessária uma duplicação espontânea de no mínimo 8% a 10%, para ser considerada viável a obtenção de DH's sem o uso de substâncias antimitóticas. Assim, segundo este critério, pode-se afirmar que as populações de milho branco tropical estudadas tem potencial de duplicação espontânea e para estudos genéticos, visando o melhoramento desta característica, ficando dentro da variação de 2,8 a 46% para duplicação cromossômica espontânea na inflorescência masculina, citada por Wei e Chen (2006). A exploração da duplicação espontânea em haploides de milho pode reduzir o custo de produção de linhagens DH's em até 91% (De La Fuente et al., 2015), além de reduzir a periculosidade pelo manuseio das substâncias antimitóticas.

#### 4.4.4 Potencial do uso de herbicidas na duplicação cromossômica de haploides em milho.

A alta toxicidade da colchicina ao ser humano e meio ambiente é o principal fator que leva à busca de produtos alternativos para duplicação cromossômica (Melchinguer et al 2016; Ren et al., 2018; Chaikam et al., 2019), já que são necessários cuidados especiais em seu manuseio e medidas rigorosas de segurança no descarte . Neste sentido, tanto o pronamide quanto o APM se destacam por apresentar menor toxicidade ao ser humano, sendo o APM ineficaz na inibição da formação de tubulinas em animais (Morejohn and Fosket, 1984). Além disso, o emprego da colchicina apresenta maior custo com o APM e pronamide.

O uso da colchicina em diferentes protocolos se encontra bastante avançado, definindo as melhores formas de sua utilização no processo de produção de linhagens duplo haploides (Gayen et al., 1994; Eder e Chalyk, 2002; Chaikam et al., 2012; Prigge et al., 2012; Chaikam et al., 2020). Assim, ter identificado um protocolo que não diferiu significativamente do sucesso colchicina na obtenção de DH's, representa um importante passo na substituição deste agente antimitótico. Contudo, são necessárias mais pesquisas empregando a solução de APM+pronamide, visando uma melhor adequação do método quanto as doses e tempos de exposição, para aumentar as taxas de duplicação e a produção de um maior número de sementes por espiga das plantas DH<sub>0</sub>.

Os resultados deste trabalho permitem concluir que: existe interação entre os genótipos indutores CIM2GTAIL e populações de milho branco tropical para a taxa de

indução e que o indutor híbrido P1xP2 apresenta a maior taxa de indução média; o sucesso na duplicação cromossômica é dependente da população doadora utilizada; o tratamento APM+pronamide é a alternativa promissora ao uso da colchicina na duplicação cromossômica de haploides; as populações de milho branco tropical estudadas apresentam taxas de duplicação cromossômica espontânea, com potencial para melhoramento genético e produção de linhagens DH's sem o uso de substâncias antimitóticas.

### **AGRADECIMENTOS**

Agradecimentos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa; ao Centro Internacional De Melhoramento De Milho E Trigo pelos genótipos indutores utilizados. Pelo Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná pelas populações de milho branco tropical Fundação de Apoio ao Desenvolvimento da Universidade Estadual de Londrina (FAUEL) e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina pelo apoio à pesquisa.

### **CONFLITO DE INTERESSES**

O autor declara que não existe conflito de interesses

### **ORCID**

<https://orcid.org/0009-0000-0330-3427>

## REFERÊNCIAS

- Barret, P., Brinkmann, M., & Beckert, M. (2008). A major locus expressed in the male gametophyte with incomplete penetrance is responsible for in situ gynogenesis in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, 117(4), 581-594.
- Bartels, P. G., & Hilton, J. L. (1973). Comparison of trifluralin, oryzalin, pronamide, propham, and colchicine treatments on microtubules. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 3(4), 462-472.
- Chaikam, V., Gowda, M., Martinez, L., Ochieng, J., Omar, H. A., & Prasanna, B. M. (2020). Improving the efficiency of colchicine-based chromosomal doubling of maize haploids. *Plants*, 9(4), 459.
- Chaikam, V., Martinez, L., Melchinger, A. E., Schipprack, W., & Boddupalli, P. M. (2016). Development and validation of red root marker-based haploid inducers in maize. *Crop Science*, 56(4), 1678-1688.
- Chaikam, V., Molenaar, W., Melchinger, A. E., & Boddupalli, P. M. (2019). Doubled haploid technology for line development in maize: technical advances and prospects. *Theoretical and Applied Genetics*, 132, 3227-3243.
- Chaikam, V., Nair, S. K., Martinez, L., Lopez, L. A., Utz, H. F., Melchinger, A. E., & Boddupalli, P. M. (2018). Marker-assisted breeding of improved maternal haploid inducers in maize for the tropical/subtropical regions. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1527.
- Chalyk, S. T. (1999). Creating new haploid-inducing lines of maize. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*, 73, 53-53.
- Choe, E., Carbonero, C. H., Mulvaney, K., Rayburn, A. L., & Mumm, R. H. (2012). Improving in vivo maize doubled haploid production efficiency through early detection of false positives. *Plant Breeding*, 131(3), 399-401.
- COE, E. H. A line of maize with high haploid frequency. *American Naturalist*, v.93, p.381-382, 1959.

De La Fuente, G. N. (2015). Improvements to the maize (*Zea mays* L.) in vivo maternal doubled haploid system (Doctoral dissertation, Iowa State University).

Eder, J., & Chalyk, S. (2002). In vivo haploid induction in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, 104, 703-708.

Finkelstein, Y., Aks, S. E., Hutson, J. R., Juurlink, D. N., Nguyen, P., Dubnov-Raz, G., ... & Bentur, Y. (2010). Colchicine poisoning: the dark side of an ancient drug. *Clinical toxicology*, 48(5), 407-414.

Gayen, P., Madan, J. K., Kumar, R., & Sarkar, K. R. (1994). Chromosome doubling in haploids through colchicine.

Gerald, N. (2015). Improvements to the maize (*Zea mays* L.) in vivo maternal doubled haploid system (Doctoral dissertation, Iowa State University).

Hu, H., Schrag, T. A., Peis, R., Unterseer, S., Schipprack, W., Chen, S., ... & Melchinger, A. E. (2016). The genetic basis of haploid induction in maize identified with a novel genome-wide association method. *Genetics*, 202(4), 1267-1276.

Kahriman, F., Songur, U., Dişbudak, A., Kizik, S., & Vural, B. (2022). Effects of donor x inducer interaction on the success of haploid induction and comparison of haploid seed identification methods in the in vivo maternal haploid technique in maize. *Journal of Agricultural Sciences*, 22-22.

Kato, A., & Geiger, H. H. (2002). Chromosome doubling of haploid maize seedlings using nitrous oxide gas at the flower primordial stage. *Plant breeding*, 121(5), 370-377.

Kaur, H., Kyum, M., Sandhu, S., Singh, G., & Sharma, P. (2023). Protocol optimization and assessment of genotypic response for inbred line development through doubled haploid production in maize. *BMC Plant Biology*, 23(1), 219.

Kebede, A. Z., Dhillon, B. S., Schipprack, W., Araus, J. L., Bänziger, M., Semagn, K., ... & Melchinger, A. E. (2011). Effect of source germplasm and season on the in vivo haploid induction rate in tropical maize. *Euphytica*, 180, 219-226.



Kelliher, T., Starr, D., Richbourg, L., Chintamanani, S., Delzer, B., Nuccio, M. L., ... & Martin, B. (2017). MATRILINEAL, a sperm-specific phospholipase, triggers maize haploid induction. *Nature*, 542(7639), 105-109.

Kermicle, J. L. (1969). Androgenesis conditioned by a mutation in maize. *Science*, 166(3911), 1422-1424.

Lashermes, P., & 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.

Maqbool, M. A., Beshir, A., & Khokhar, E. S. (2020). Doubled haploids in maize: Development, deployment, and challenges. *Crop Science*, 60(6), 2815-2840.

Melchinger, A. E., Molenaar, W. S., Mirdita, V., & Schipprack, W. (2016). Colchicine alternatives for chromosome doubling in maize haploids for doubled-haploid production. *Crop Science*, 56(2), 559-569.

Melchinger, A. E., Schipprack, W., Friedrich Utz, H., & Mirdita, V. (2014). In vivo haploid induction in maize: identification of haploid seeds by their oil content. *Crop Science*, 54(4), 1497-1504.

Morejohn, L. C., & Fosket, D. E. (1984). Inhibition of plant microtubule polymerization in vitro by the phosphoric amide herbicide amiprofos-methyl. *Science*, 224(4651), 874-876.

Prasanna, B. M., Chaikam, V., & Mahuku, G. (2012). Doubled haploid technology in maize breeding: theory and practice. *Cimmyt*.

Prigge, V., & Melchinger, A. E. (2012). Production of haploids and doubled haploids in maize. *Plant cell culture protocols*, 161-172.

Prigge, V., Sánchez, C., Dhillon, B. S., Schipprack, W., Araus, J. L., Bänziger, M., & Melchinger, A. E. (2011). Doubled haploids in tropical maize: I. Effects of inducers and source germplasm on in vivo haploid induction rates. *Crop science*, 51(4), 1498-1506.

References and citations should follow APA style. For more information about reference formatting, please see our style guide, starti

Ren, X. (2018). Doubling effect of anti-microtubule herbicides on the maize haploid. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 903-908.

Röber, F. K., Gordillo, G. A., & Geiger, H. H. (2005). In vivo haploid induction in maize. Performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding [*Zea mays* L.]. *Maydica* (Italy), 50(3).

Rotarencu, V. A., Dicu, G., & Sarmaniu, M. (2009). Induction of maternal haploids in maize. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*, 83, 21.

Sekiya, A., Pestana, J. K., Silva, M. G. B. D., Krause, M. D., Silva, C. R. M. D., & Ferreira, J. M. (2020). Haploid induction in tropical supersweet corn and ploidy determination at the seedling stage. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 55.

Souza, L. F., Fregonezi, B. F., Oliveira, J. M. M., Lucena, V. J., Hoda, O. G. L., Duarte, I. A. Ferreira, J. M. (2024). Early haploid identification by stomatal guard cell length in tropical supersweet corn using different inducers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 24(1) e46052414.

Vaughan, M. A., & Vaughn, K. C. (1987). Pronamide disrupts mitosis in a unique manner. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 28(2), 182-193.

Verzegnazzi, A. L., Dos Santos, I. G., Krause, M. D., Hufford, M., Frei, U. K., Campbell, J., ... & Lübberstedt, T. (2021). Major locus for spontaneous haploid genome doubling detected by a case–control GWAS in exotic maize germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, 134, 1423-1434..

Wan, Y., Duncan, D. R., Rayburn, A. L., Petolino, J. F., & Widholm, J. M. (1991). The use of antimicrotubule herbicides for the production of doubled haploid plants from anther-derived maize callus. *Theoretical and applied Genetics*, 81, 205-211.

Wang, H., Liu, J., Xu, X., Huang, Q., Chen, S., Yang, P., ... & Song, Y. (2016). Fully-automated high-throughput NMR system for screening of haploid kernels of maize (corn) by measurement of oil content. *PloS one*, 11(7), e0159444.

Wei, J. J., & Chen, M. X. (2006). Primary study on the natural fertility of maize haploids. *Journal of Maize Science*, 14(2), 24-26.

Zhang, Z., Qiu, F., Liu, Y., Ma, K., Li, Z., & Xu, S. (2008). Chromosome elimination and in vivo haploid production induced by Stock 6-derived inducer line in maize (*Zea mays* L.). *Plant cell reports*, 27, 1851-1860.

Zhou, X., Cheng, Z., & Meng, H. (2009). Effects of pendimethalin on garlic chromosome doubling in vitro. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 29(12), 2571-2575.

## 5. CONCLUSÃO GERAL

O indutor híbrido CIM2GTAIL-P1x CIM2GTAIL-P2 apresenta a maior taxa de indução média em cruzamento com as populações de milho branco tropical utilizadas.

Existe interação entre os genótipos indutores CIM2GTAIL e populações de milho branco tropical para a taxa de indução.

O tratamento APM+pronamide é uma alternativa eficaz ao uso da colchicina na duplicação cromossômica de haploides, para as populações de milho branco tropical utilizadas.

As populações de milho branco tropical apresentam taxas de duplicação cromossômica espontânea, com potencial para melhoramento genético e produção de linhagens DH's sem o uso de substâncias antimitóticas.

## REFERÊNCIAS

- ARSHAD, S., MENGLI, W., QURBAN, A.; GHULAM, M.; ZHENGQIANG, M.; YUANXIN, Y. Paclitaxel and Caffeine–Taurine, New Colchicine Alternatives for Chromosomes Doubling in Maize Haploid Breeding. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 19, p. 14659, 2023.
- 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, p. e38422145, 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.
- BARTELS, Paul G.; HILTON, James L. Comparison of trifluralin, oryzalin, pronamide, propham, and colchicine treatments on microtubules. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 3, n. 4, p. 462-472, 1973.
- BOERMAN, N. A., FREI, U.K., LÜBBERSTEDT, T. Impact of spontaneous haploid genome doubling in maize breeding. **Plants**, v. 9, n. 3, p. 369, 2020.
- BEAL, W. J. Crossing and hybridizing plants. 15th Rep. **Michigan Board of Agriculture**, Lansing, 1876.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de plantas 6th ed.** Viçosa-MG: UFV, 2013.
- CHAIKAM V., MAHUKU G. **Doubled haploid: Technology in maize breeding: theory and practice.** International Maize and Wheat Improvement Center, Mexico, p. 9-13, 2012.
- CHAIKAM, V., NAIR S.K., BABU R., MARTINEZ, L., TEJOMURTULA, J., PRASANNA.M.B. Analysis of effectiveness of R1-nj anthocyanin marker for in vivo haploid identification in maize and molecular markers for predicting the inhibition of R1-nj expression. **Theoretical and Applied Genetics**. v.128, p. 159–171, 2015.

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.459, 2020.

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, p.3227–3243, 2019.

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. **Plant Science**, v.9,2018.

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

CHASE, S. S. **Monoploids in maize. Ames: Iowa State College Press**, p.389-399, 1952.

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

CHEN, S.J.; SONG, T.M. Identification haploid with high oil xenia effect in maize. **Acta Agronomica Sinica**, v. 29, n. 4, p. 587-590, 2003.

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

COE. E.H.; SARKAR, K.R. The detection of haploids in maize. **Journal of Heredity**, v. 55, n.5, p. 231–233,1964.

COUTO, E. G. O., DAVIDE, L. M. C., BUSTAMANTE, F.O., PINHO, R. G., SILVA, T. N. Identificação de milho haploide por citometria de fluxo, marcadores morfológicos e moleculares. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 37, p. 25-31, 2013.

DE LA FUENTE, G. N. **Improvements to the maize (*Zea mays* L.) in vivo maternal doubled haploid system**. 2015. Tese de Doutorado. Iowa State University.

DONG, L., LIU, C. GENG, S., LI, X., HUANG, C., MAO, L., CHEN, S., XIE., C. Genome editing and double-fluorescence proteins enable robust maternal haploid induction and identification in maize. **Molecular plant**, v. 11, n. 9, p. 1214-1217, 2018.

DONG, X., Xu, X., Li, L., LIU, C, TIAN, X., LI, W., CHEN, S. Marker-assisted selection and evaluation of high oil in vivo haploid inducers in maize. **Molecular Breeding**, v. 34, p. 1147-1158, 2014.

EAST, E.M. Inbreeding in corn. **Connecticut Agricultural Experimental Station Report**. p.419-428, 1908.

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

EVANS, M.M. The indeterminate gametophyte1 gene of maize encodes a LOB domain protein required for embryo sac and leaf development. **The Plant Cell**, v. 19, n. 1, p. 46-62, 2007.

Ferreira, A.C. **A epopeia bandeirante: letrados, instituições, invenção histórica (1870-1940)**. São Paulo, SP: Unesp, 2002.

GAYEN, P. Madan, J. K., Kumar, R., Sarkar, K. R. Chromosome doubling in haploids through colchicine. 1994.

GILLES, Laurine M., CALHAU, A.R.M., PADULA V., JACQUIER, N.M.A., LIONNET, C., MARTINANT, J., ROGOWSKY, P. M., WIDIEZ, TI. Lipid anchoring and electrostatic interactions target NOT-LIKE-DAD to pollen endo-plasma membrane. **Journal of Cell Biology**, v. 220, n. 10, p. e202010077, 2021.

GILLES, L. M., KHALED, A. K., LAFFAIRE, J. L., CHAIGNON, S. C., GENDROT, G. G., LAPLAIGE, J. L., BERGÈS, H. B., BEYDON, G. B., BAYLE, V. B., BARRET, P. B., COMADRAN, J. C., MARTINANT, J. P. M., ROGOWSKY, P. M., WIDIEZ, T. W. Loss of pollen-specific phospholipase NOT LIKE DAD triggers gynogenesis in maize. **The EMBO journal**, v. 36, n. 6, p. 707-717, 2017.

HÄNTZSCHEL, K.R., WEBER, G. Blockage of mitosis in maize root tips using colchicine-alternatives. **Protoplasma**, v.241, p.99-104,2010.

HU, H., SCHRAG, T. A., PEIS, R., UNTERSEER, S., SCHIPPRACK, W., CHEN, S., LAI, J., YAN, J., PRASANNA, B. M., NAIR, S. K., CHAIKAM, V., ROTARENCO, V., SHATSKAYA, O. A., ZAVALISHINA, A., SCHOLTEN, S., SCHÖN, C.-C., MELCHINGER, A. E., The genetic basis of haploid induction in maize identified with a novel genome-wide association method. **Genetics**, v. 202, n. 4, p. 1267-1276, 2016.

HUMPHREYS, D. G., KNOX, R. E. **Doubled haploid breeding in cereals. Advances in plant breeding strategies: breeding, biotechnology and molecular tools**, p. 241-290, 2015.

JIANG, C., SUN, J., LI, R., YAN, S., CHEN, W., GUO, L., QIN, G., WANG, P., LUO, C., HUANG, W., ZHANG, Q., FERNIE, A. R., JACKSON, D., LI, X., YAN, . A reactive oxygen species burst causes haploid induction in maize. **Molecular Plant**, v. 15, n. 6, p. 943-955, 2022.

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

KAHRIMAN, F., GÜZ, A. M., PEHLIVAN, İ. Use of machine learning models-based image analysis for classification of haploid and diploid maize. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 23, p. e45322349, 2023.

KATO, A., GEIGER, H. H. Chromosome doubling of haploid maize seedlings using nitrous oxide gas at the flower primordial stage. **Plant breeding**, v. 121, n. 5, p. 370-377, 2002.

KATO, A. Induced single fertilization in maize. **Sexual Plant Reproduction**, v. 10, p. 96-100, 1997.

KAUR, H., KYUM, M., SANDHU, S., SINGH, G., SHARMA, P. Protocol optimization and assessment of genotypic response for inbred line development through doubled haploid production in maize. **BMC Plant Biology**, v. 23, n. 1, p. 219, 2023.

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, p. 219-226, 2011.

KELLIHER, T., STARR, D., RICHBURG, L., CHINTAMANANI, S., DELZER, B., NUCCIO, M. L., GREEN, J., CHEN, Z., MCCUISTON, J., WANG, W., LIEBLER, T., BULLOCK, P., MARTIN, B. MATRILINEAL, a sperm-specific phospholipase, triggers maize haploid induction. **Nature**, v. 542, n. 7639, p. 105-109, 2017.

KERMICLE, J. Androgenesis and the indeterminate gametophyte mutation: source of the cytoplasm. **Maize genetics cooperation news letter**, 1973.

KERMICLE, J. L. Pleiotropic effects on seed development of the indeterminate gametophyte gene in maize. **American Journal of Botany**, v. 58, n. 1, p. 1-7, 1971.

KERMICLE, J. L. **Indeterminate gametophyte (ig): biology and use. In: The maize handbook.** New York, NY: Springer New York, 1994. p. 388-393.

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

KHULBE, R. K., PATTANAYAK, A. Doubled haploid production in maize using in vivo maternal haploid induction system. **Genetics**, v. 1, p. 2, 2021.

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, 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.

LI, Y., LIN, Z., YUE, Y., ZHAO, H., FEI, X., E., L., LIU, C., CHEN, S., LAI, J., SONG, W. Loss-of-function alleles of ZmPLD3 cause haploid induction in maize. **Nature plants**, v. 7, n. 12, p. 1579-1588, 2021.

LIU, C., LI, X., MENG, D., ZHONG, Y., CHEN, C., DONG, X., XU, X., CHEN, B., LI, W., LI, L., TIAN, X., ZHAO, H., SONG, W., LUO, H., ZHANG, Q., LAI, J., JIN, W., YAN,

J., CHEN, S. A 4-bp insertion at ZmPLA1 encoding a putative phospholipase A generates haploid induction in maize. **Molecular plant**, v. 10, n. 3, p. 520-522, 2017.

MAHUKU, G. **Putative DH seedlings: from the lab to the field, Doubled haploid technology in maize breeding: theory and practice**. CIMMYT, Mexico, DF, p 30–38, 2012.

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

MAZZARI, M. R.; COELHO, D. T.; PAPE, G.; KIBUUKA, G. K. **Fubá de milho branco cru e prégelatinizado por extrusão, em mistura com farinha de trigo, para a produção de pães: II. Qualidade e avaliação tecnológica dos pães obtidos**. Rio de Janeiro: Embrapa-CTAA, 1983.

MELCHINGER, A. E., BÖHM, J., UTZ, H. F., MÜLLER, J., MUNDER, S., MAUCH, F. J. High-throughput precision phenotyping of the oil content of single seeds of various oilseed crops. **Crop Science**, v. 58, n. 2, p. 670-678, 2018.

MELCHINGER, A. E.; MOLENAAR, W.; MIRDITA, V.; SCHIPPRACK, W. Colchicine alternatives for chromosome doubling in maize haploids for doubled haploid production. **Crop Science**, v. 56, p.1–11, 2016.

MELCHINGER, A. E.; SCHIPPRACK, W.; UTZ, F.; MIRDITA, V. In vivo haploid induction in maize: identification of haploid seeds by their oil content. **Crop Science**, v.54, p.1-8, 2014.

MELCHINGER, A. E., MUNDER, S., MAUCH, F. J., MIRDITA, V., BÖHM, J., MÜLLER, J. High-throughput platform for automated sorting and selection of single seeds based on time-domain nuclear magnetic resonance (TD-NMR) measurement of oil content. **Biosystems Engineering**, v. 164, p. 213-220, 2017.

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

OLADAPO, A. S Adepeju, A. B., Akinyele, A. A., Adepeju, D. M. The proximate, functional and anti-nutritional properties of three selected varieties of maize (Yellow, White and Pop Corn) flour. **International Journal of Scientific Engineering and Science**, v. 1, n. 2, p. 23-26, 2017.

OLIVEIRA, J.P.; CHAVES, L.J.; DUARTE, J.B.; BRASIL, E.M.; RIBEIRO, K. O. **Qualidade física do grão em populações de milho de alta qualidade protéica e seus cruzamentos**. Pesquisa Agropecuária Tropical, Goiânia, v. 37, n. 4, p. 233-241, 2007

PATERNIANI, E. **Estudos recentes sobre heterose**. Boletim no 1. Fundação Cargill, São Paulo, pp.36, 1974.

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

PRECIADO-ORTIZ, Ricardo E. et al., Response of recurrent selection on yield, kernel oil content and fatty acid composition of subtropical maize populations. **Field Crops Research**, v. 142, p. 27-35, 2013.

PRIGGE, V.; MELCHINGER, A. E. Production of haploids and doubled haploids in maize. **Plant cell culture protocols**, p. 161-172, 2012.

PRIGGE, V., SÁNCHEZ, C., DHILLON, B. S., SCHIPPRACK, W., ARAUS, J. L., BÄNZIGER, M., 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.

REN, X.; CI, J.; CUI, X.; YANG, W. Doubling effect of anti-microtubule herbicides on the maize haploid, **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v.30, n.10, 2018.

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

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.,FUJA, S. New inducers of maternal haploids in maize, **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v.84, 2010

ROVARIS, S. R. S., OLIVEIRA, A. L. B.; SAWAZAKI, E., GALLO, P. B.; PATERNIANI, M. E. A. G. Genetic parameter estimates and identification of superior white maize populations, **Acta Scientiarum**, v. 39, n.2, 2017.

SAWAZAKI, E.; RAMOS JUNIOR, E. U.; ITO, M. A.; PATERNIANI, M. E. A. G. Z.; DUARTE, A. P.; AZEVEDO FILHO, J. A. **Capacidade combinatória de variedades e híbridos de milho branco**. Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 27., 2008, Londrina. Resumo expandido. Londrina: IAPAR; 2008. 720 p

SEKIYA, A., PESTANA, J. K., SILVA, M. G. B. D., KRAUSE, M. D., 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.

SORIANO, M., CISTUÉ, L., VALLÉS, M. P., CASTILLO, A. M. Effects of colchicine on anther and microspore culture of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 91, p. 225-234, 2007.

SOUZA, L. F.; FREGONEZI, B. F.; OLIVEIRA, M. M.; LUCENA, V. J.; HODA, O. G. L.; DUARTE, I. A.; FERREIRA, J. M. Early haploid identification by stomatal guard cell length in tropical supersweet corn using different inducers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.24, n.1, 2024.

SUNDERLAND, N. **Another culture as a means of haploid induction. Haploid in higher plants, advances and potential**, p. 91-122, 1974.

TEIXEIRA, F. F.; ARAÚJO, G. R.; SILVA, T. R.; COELHO, R. S. **Diversidade Genética entre Acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Milho com Grãos Brancos do Tipo Dentado**. DOCUMENTOS 233. Sete Lagoas MG: Embrapa Milho e Sorgo, 2019

TIAN, X.; QIN, Y.; CHEN, B.; LIU, C.; WANG, L.; LI, X.; DONG, X.; LIU, L.; CHEN, S. Hetero-fertilization together with failed egg–sperm cell fusion supports single fertilization involved in in vivo haploid induction in maize, **Journal of Experimental Botany**. V.69, n.20, p.4689-4701, 2018.

TRENTIN, H. U., KRAUSE, M. D., ZUNJARE, R. U., ALMEIDA, V. C., PETERLINI, E., ROTARENCO, V., FREI, U. K., BEAVIS, W. D., LÜBBERSTEDT, T. Genetic basis of maize maternal haploid induction beyond MATRILINEAL and ZmDMP. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, p. 1218042, 2023.

VERZEGNAZZI, A. L., DOS SANTOS, I. G., KRAUSE, M. D., HUFFORD, M., FREI, U. K., CAMPBELL, J., ALMEIDA, V. C., ZUFFO, L. T., BOERMAN, N., LÜBBERSTEDT, T. Major locus for spontaneous haploid genome doubling detected by a case–control GWAS in exotic maize germplasm. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 134, p. 1423-1434, 2021.

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

YU, W.; BIRCHLER, J.A. A green fluorescent protein-engineered haploid inducer line facilitates haploid mutant screens and doubled haploid breeding in maize, **Molecular Breeding**, v.36, n.5, 2016.

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, p.721–731, 2013.

ZHONG, Y., LIU, C., QI, X., JIAO, Y., WANG, D., WANG, Y., LIU, Z., CHEN, C., CHEN, B., TIAN, X., LI, J., CHEN, M., DONG, X., XU, X., LI, L., LI, W., LIU, W., JIN, W., LAI,

J., CHEN, S. Mutation of ZmDMP enhances haploid induction in maize. **Nature plants**, v. 5, n. 6, p. 575-580, 2019.

ZHOU, X., CHENG, Z., MENG, H. Effects of pendimethalin on garlic chromosome doubling in vitro. **Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica**, v. 29, n. 12, p. 2571-2575, 2009.