



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

IRAN DE AZEVEDO DUARTE

**PRODUÇÃO DE LINHAGENS DUPLO-HAPLOIDES EM
MILHO SUPERDOCE COM O USO DE INDUTORES
CIM2GTAIL'S**

Londrina
2024

IRAN DE AZEVEDO DUARTE

**PRODUÇÃO DE LINHAGENS DUPLO-HAPLOIDES EM
MILHO SUPERDOCE COM O USO DE INDUTORES
CIM2GTAIL'S**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina para a obtenção do título de Doutor 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

D812p Duarte, Iran de Azevedo.

Produção de Linhagens Duplo-Haploides em Milho Superdoce com o uso de Indutores CIM2GTAIL's / Iran de Azevedo Duarte. - Londrina, 2024.
109 f. : il.

Orientador: Josué Maldonado Ferreira.

Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2024.
Inclui bibliografia.

1. duplo-haploides - Tese. 2. Indutor maternal - Tese. 3. duplicação cromossômica - Tese. 4. Colchicina - Tese. I. Ferreira, Josué Maldonado . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDU 63

IRAN DE AZEVEDO DUARTE

**PRODUÇÃO DE LINHAGENS DUPLO-HAPLOIDES EM
MILHO SUPERDOCE COM O USO DE INDUTORES
CIM2GTAIL'S**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina para a obtenção do título de Doutor em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Juliano Tadeu Vilela Resende
Universidade Estadual de Londrina - UEL

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

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

Dr. João Vitor Maldonado dos Santos
Tropical Melhoramento & Genética - TMG

Londrina, 30 de setembro de 2024

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu Mestre e Senhor, fonte de sabedoria e vida, pão de cada dia. Muito obrigado, não foi pela minha força, mas sim pela sua maravilhosa graça.

A Universidade Estadual de Londrina (UEL), ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da UEL (PPGA) e a todos os professores pelos ensinamentos que fundamentaram a minha formação.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Josué Maldonado Ferreira, com admiração pelo seu talento, excelência acadêmica, comprometimento e conselhos.

À minha esposa, Deosana Peres Duarte, pelo incentivo, sabedoria e colaboração, sem os quais não teria forças para alcançar mais esta vitória.

Aos meus filhos amados, Hernandes, Gabriel e Eduardo, presentes que Deus me confiou, fontes de inspiração para a busca e superação.

Aos meus pais, Irani (*in memoriam*) e Marli, pessoas maravilhosas, que me prepararam para o mundo com amor incondicional, apoio inesgotável e exemplos de busca e retidão.

Às minhas irmãs, Cristiane e Priscila e ao meu cunhado Cleberli, minha gratidão pela consideração, amizade e conselhos.

Aos amigos do Laboratório de Melhoramento Genético (Bruno, Vitor, Juliana, Otávio, Letícia, Maria Eduarda, João, Lucas, Guilherme, Alesson, Ricky, Helton, Gabriel e Igor) pelo convívio, pelo ambiente alegre, didático, enriquecedor e por todas as contribuições no desenvolvimento desta pesquisa.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Juliano Tadeu Vilela Resende, Prof. Dr. Leandro Simões Azeredo Gonçalves, Prof. Dr. Deoclécio Domingos Garbuglio e Dr. João Vitor Maldonado dos Santos, pelas valorosas contribuições na avaliação deste trabalho.

Ao Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo (CIMMYT) pela licença de uso dos genótipos indutores de haploidia.

A Fundação de Apoio ao Desenvolvimento da UEL (FAUEL) e a Tropical Melhoramento & Genética (TMG), pelos recursos e colaborações na realização deste projeto.

À equipe da Fazenda Escola da UEL (FAZESC) pelo suporte e colaboração na condução dos experimentos a campo.

*Aos meus pais, Irani (in memoriam) e Marli, a
minha esposa Deosana e aos meus filhos
Hernandes, Gabriel e Eduardo.*

Dedico.

Não digam, pois, no coração: “A minha capacidade e a força das minhas mãos, ajuntaram para mim toda esta riqueza”. Antes, lembre-se do SENHOR, o seu Deus, pois é ele quem dá a vocês a capacidade de produzir riqueza, confirmando a aliança que jurou aos seus antepassados, conforme hoje se vê.

Deuteronômio 8:17-18.

RESUMO

DUARTE, Iran de Azevedo. **Produção de linhagens duplo-haploides em milho superdoce com o uso de indutores CIM2GTAIL's**. 2024. 109 páginas. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

A tecnologia de duplo-haploides (DH) está bem estabelecida em ambiente temperado, mas a sua adoção ainda é limitada em ambientes tropicais e em milhos especiais como o milho superdoce, pois ainda necessitam de indutores de haploidia adaptados.

Neste contexto, o Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo desenvolveu linhagens indutoras de segunda geração (CIM2GTAIL's) para licenciamento e uso em ambientes (sub) tropicais. Adicionalmente, a identificação e adequação de métodos mais eficazes na duplicação cromossômica em ambientes tropicais são fundamentais para otimizar a obtenção das linhagens DH's. Os objetivos foram: a) determinar o potencial adaptativo e reprodutivo de três linhagens indutoras CIM2GTAIL's e suas três combinações híbridas, em diferentes anos e épocas de semeadura no Brasil; b) estimar o potencial de indução de seis indutores sobre oito populações de milho superdoce tropical; c) identificar a ocorrência de interação indutor x população para taxas de indução em milho superdoce; d) comparar a eficácia de três métodos de duplicação cromossômica, que empregam solução de colchicina, para produção de linhagens DH's em populações de milho superdoce. Seis indutores e dois híbridos comerciais precoces, com ampla adaptação no Brasil, foram avaliados para 20 características agrônômicas, em seis experimentos, instalados em blocos completamente casualizados, com três repetições, empregando parcelas de quatro fileiras de 4,0 m, no espaçamento 0,8 m x 0,2 m, em diferentes anos e épocas de semeadura. Foram realizados cruzamentos entre estes seis genótipos indutores CIM2GTAIL's e oito populações de milho superdoce, visando estimar as taxas de indução, com base nas frequências de haploides e diploides, identificados pelas marcações típicas do gene *R1-nj* nas sementes e pelo tipo de coloração da primeira bainha foliar das plântulas. As plântulas originadas de sementes haploides foram tratadas empregando três métodos de duplicação cromossômica, utilizando soluções de colchicina e um controle negativo, para avaliar as taxas de sobrevivência (TS), taxa de reprodução (TR) e taxa de sucesso geral (TSG). A taxa média de indução real sobre as oito populações doadoras variou de 9,5% a 13,2%, com destaques para CIM2GTAIL-P1 e para a combinação CIM2GTAIL-P1 x CIM2GTAIL-P3. Apesar de ter sido observada interação indutor x população doadora, as melhores taxas de indução sobre as populações ocorreram empregando a linhagem CIM2GTAIL-P1. Os genótipos indutores apresentaram adaptação para a início da safra de milho, com baixa adaptação em semeaduras tardias ou de segunda safra, quando os estresses ambientais e epidemiológicos foram mais acentuados. Houve superioridade adaptativa dos indutores F_1 's sobre os indutores *per se*. O método de imersão de plântulas apresentou a menor TS e a maior frequência de espigas DH's com mais de 26 sementes. Os métodos de injeção e imersão de plântula tiveram TR superiores aos demais métodos. Os métodos de injeção e imersão de raízes apresentaram as melhores estimativas TSG e produziram maior número de linhagens DH's.

Palavras-chave: *Zea mays* L. var. *saccharata*; indução à haploidia; maternal; gene

R1-nj; duplicação cromossômica; colchicina.

ABSTRACT

DUARTE, Iran de Azevedo. **Production of doubled haploid lines in supersweet corn using CIM2GTAIL's inducers**. 2024. 109 pages. Thesis (Doctorate in Agronomy) - State University of Londrina, Londrina, 2024.

Doubled haploid (DH) technology is well established in temperate environments, but its adoption is still limited in tropical environments and in special corns such as supersweet corn, as they still require adapted haploidy inducers. In this context, the International Maize and Wheat Improvement Center has developed second-generation inducer lines (CIM2GTAIL's) for licensing and use in (sub)tropical environments. Additionally, the identification and adaptation of more effective methods for chromosome doubling in tropical environments are essential to optimize the production of DH's lines. The objectives were: a) to determine the adaptive and reproductive potential of three CIM2GTAIL's inducer lines and their three hybrid combinations, in different years and seasons in Brazil; b) estimate the induction potential of six inducers on eight populations of tropical supersweet corn; c) identify the occurrence of inducer x population interaction for induction rates in super sweet corn; d) compare the effectiveness of chromosome doubling of three methodologies, which use colchicine solution, for the production of DH's in supersweet corn. Six inducers and two early commercial hybrids, with wide adaptation in Brazil, were evaluated for 20 agronomic traits, in six experiments, installed in completely randomized blocks, with three replications, using plots of four rows of 4.0 m, at spacing 0.8 m x 0.2 m, in different years and seasons. Crosses were carried out between these six CIM2GTAIL's inducing genotypes and eight populations of super sweetcorn, aiming to estimate the induction rates, based on the frequencies of haploids and diploids, identified by the typical markings of the *R1-nj* gene in the seeds and the type of the first leaf sheath color on seedlings. Seedlings originating from haploid seeds were treated using three chromosome doubling methods, using colchicine solutions and a negative control, to evaluate survival rate (SR), reproduction rate (RR) and overall success rate (OSR). The real average induction rate across the eight donor populations ranged from 9.5% to 13.2%, with highlights for CIM2GTAIL-P1 and the combination CIM2GTAIL-P1 x CIM2GTAIL-P3. Although an inducer x donor population interaction was observed, the best induction rates in the populations occurred using the CIM2GTAIL-P1 inbred line. The inducing genotypes showed adaptation for the beginning of the corn season, with low adaptation in late sowings or second season, when environmental and epidemiological stresses were more accentuated. There was adaptive superiority of F_1 's inducers over inducers *per se*. The seedling submersion method showed the lowest SR, and the highest frequency of DH ears with more than 26 seeds. The injection and seedling submersion methods had higher RR than the other methods. The root injection and immersion methods presented the best OSR estimates and produced the greatest number of DH lines.

Keywords: *Zea mays* L. var. *saccharata*; haploidy induction; maternal; *R1-nj* gene; chromosome doubling; colchicine.

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Quantificações de espigas induzidas sem e com segregação para a expressão do gene *R1-nj*; números de sementes haploides putativas, diploides e sem marcação de antocianina; frequência do alelo inibidor da expressão do gene *R1-nj*, porcentagem de sementes com inibição e porcentagem de indivíduos haploides dentro das sementes sem marcação 41

Tabela 3.2 - Resumo da análise de variância conjunta, quadrados médios e níveis de significância para caracterização agrônômica e componentes de rendimento de seis indutores de haploidia (CIM2GTAIL's) e duas testemunhas comerciais para seis épocas de cultivo durante as safras 2021/2022, 2022/2022 e 2022/2023 45

Tabela 3.3 - Análise do desempenho agrônômico médio de seis indutores de haploidia (CIM2GTAIL's) e duas testemunhas comerciais para seis épocas de semeadura durante as safras 2021/2022, 2022/2022 e 2022/2023 46

Tabela 3.4 - Análise de componentes de rendimento de seis indutores de haploidia (CIM2GTAIL's) e duas testemunhas comerciais em diferentes épocas nas safras 2021/2022, 2022/2022 e 2022/2023 48

Tabela 3.5 - Análise do grau de severidade a doenças de seis indutores de haploidia (CIM2GTAIL's) e duas testemunhas comerciais em diferentes épocas nas safras 2021/2022, 2022/2022 e 2022/2023.....50

Tabela 4.1 - Médias (em %) não transformadas e quadrados médios transformados para raiz quadrada da análise de variância conjunta de anos (2022 e 2023), para métodos de duplicação cromossômica, populações de milho superdoce e suas interações. 73

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Médias (em %) e respectivos desvios padrões da média para taxa de indução obtidas em oito populações de milho superdoce induzidas a haploidia por linhagens CIM2GTAIL's e suas combinações híbridas; Taxa de indução haploide média (TIH) com base na marcação do gene *R1-nj* e Taxa de indução média real (TIR), onde colunas seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente pelo teste de qui-quadrado (χ^2) em nível de 5% de probabilidade 43

Figura 4.1 - Médias (em %) de Taxa de Sobrevivência (TS) para cada combinação de população de milho superdoce e método de duplicação cromossômica, com base na observação de um total de cerca de 192 plantas, avaliadas em dois experimentos, com duas repetições, em parcelas de 48 plantas. Letras maiúsculas agrupam médias de populações dentro de cada método e minúsculas médias de métodos dentro de cada população pelo teste de Scott & Knott 74

Figura 4.2 - Taxas médias (em %) de sobrevivência (TS), eficiência da autofecundação (EA), autofecundação (TA), reprodução (TR) e de sucesso geral (TSG) para cada população superdoce, com base na observação de um total de cerca de 768 plantas tratadas. Letras iguais agrupam médias de populações dentro de cada taxa, pelo teste de Scott & Knott. 75

Figura 4.3 - Médias (em %) de Taxa de Sobrevivência (TS) para cada combinação de método de duplicação cromossômica e anos, com base na observação de um total de 768 plantas, pela avaliação de oito populações de milho superdoce, empregando experimentos com duas repetições, em parcelas de 48 plantas. Letras maiúsculas agrupam médias de anos dentro de cada método e minúsculas médias de métodos dentro de cada ano, pelo teste de Scott & Knott.. 76

Figura 4.4 - Taxas médias (em %) de autofecundação (TA), reprodução (TR), sucesso geral (TSG) e de sucesso em vaso (TSV) para cada método de duplicação cromossômica, com base na observação de um total de cerca de 1536 plantas, empregados no tratamento de plântulas de oito populações de milho superdoce, em dois experimentos com duas repetições, em parcelas de 48 plantas. Letras iguais

agrupam médias de métodos dentro de cada taxa, pelo teste de Scott & Knott. 77

Figura 4.5 - (A) Médias (em %) de Taxa de Sucesso Geral (TSG) para cada combinação de método de duplicação cromossômica e ano, com base na observação de um total de cerca de 768 plantas, onde as letras maiúsculas agrupam médias de anos dentro de cada método e minúsculas médias de métodos dentro de cada ano, pelo teste de Scott & Knott. (B) Médias (em %) de Taxa de Sucesso Geral (TSG) para cada combinação de população e ano, com base na observação de um total de cerca de 384 plantas, onde as letras maiúsculas agrupam médias de anos dentro de cada população e minúsculas as médias de populações dentro de cada ano, pelo teste de Scott & Knott. 78

Figura 4.6 - Totais de espigas DH's e frequências médias de quantidades de sementes por espiga obtidos em dois anos, para oito populações de milho superdoce e métodos de duplicação cromossômica. 79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------------|---|
| BOD | Demanda Bioquímica de Oxigênio |
| CIM2GTAIL | 2ª Geração de Linhagem Indutora Tropicalmente Adaptada |
| CIMMYT | Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo |
| DBC | Delineamento em Blocos Completamente Casualizados |
| DH | Duplo-Haploide |
| DMSO | Sulfóxido de Dimetil |
| FAUEL | Fundação de Apoio ao Desenvolvimento da UEL |
| FAZESC | Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina |
| IAC | Instituto Agronômico de Campinas |
| IDR | Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná |
| LMG | Laboratório de Melhoramento Genético |
| OC | Oil content (teor de óleo) |
| OSR | Overall Success Rate |
| PPGA | Programa de Pós-Graduação em Agronomia |
| QTL | Quantitative Trait Loci (Loci de características quantitativas) |
| <i>R1-nj</i> | <i>R1-Navajo</i> |
| RR | Reproduction Rate |
| SHP | Sementes Haploides Putativas |
| SIMEPAR | Sistema Meteorológico do Paraná |
| SR | Survival Rate |
| TA | Taxa de Autofecundação |
| TAIL | 1ª Geração de Linhagem Indutora Tropicalmente Adaptada |
| TIH | Taxa de Indução Haploide |
| TIR | Taxa de Indução Real |
| TMG | Tropical Melhoramento & Genética |
| TR | Taxa de Reprodução |
| TS | Taxa de Sobrevivência |
| TSG | Taxa de Sucesso Geral |
| UEL | Universidade Estadual de Londrina |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 17 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 19 |
| 2.1 | HISTÓRICO DO INÍCIO DO MELHORAMENTO DO MILHO HÍBRIDO | 19 |
| 2.2 | MILHO DOCE E SUPERDOCE | 20 |
| 2.3 | ACELERAÇÃO DA OBTENÇÃO DE LINHAGENS E SEUS BENEFÍCIOS..... | 21 |
| 2.4 | INDUÇÃO DE HAPLOIDIA | 22 |
| 2.5 | IDENTIFICAÇÃO DE HAPLOIDES | 27 |
| 2.6 | DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA | 29 |
| 3 | ARTIGO 1 - ADAPTAÇÃO E TAXAS DE INDUÇÃO HAPLOIDE DE LINHAGENS CIM2GTAIL's E SUAS COMBINAÇÕES SOBRE POPULAÇÕES DE MILHO SUPERDOCE EM AMBIENTE TROPICAL | 32 |
| 3.1 | INTRODUÇÃO | 35 |
| 3.2 | MATERIAL E MÉTODOS | 38 |
| 3.2.1 | MATERIAL VEGETAL E PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL | 38 |
| 3.2.2 | COLETA DE DADOS FENOTÍPICOS DOS INDUTORES | 38 |
| 3.2.3 | ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS | 39 |
| 3.2.4 | AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE INDUÇÃO À HAPLOIDIA | 40 |
| 3.3 | RESULTADOS | 42 |
| 3.4 | DISCUSSÃO | 52 |
| 3.5 | REFERÊNCIAS | 59 |
| 4 | ARTIGO 2 - EFICÁCIA DE MÉTODOS DE DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA NA OBTENÇÃO DE DUPLOS HAPLOIDES EM MILHO SUPERDOCE TROPICAL | 65 |
| 4.1 | INTRODUÇÃO | 68 |
| 4.2 | MATERIAL E MÉTODOS | 70 |
| 4.2.1 | MATERIAL E PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL | 70 |
| 4.2.2 | MÉTODOS DE DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA | 71 |
| 4.2.3 | OBTENÇÃO DE DADOS E ESTIMAÇÃO DE TAXAS DE SUCESSO | 72 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| <u>4.2.4</u> | ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS TAXAS DE SUCESSO DA DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA.. | 73 |
| <u>4.3</u> | RESULTADOS | 75 |
| <u>4.4</u> | DISCUSSÃO | 82 |
| <u>4.5</u> | REFERÊNCIAS | 87 |
| 5. | CONCLUSÃO | 94 |
| 6. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 95 |

1 INTRODUÇÃO

A tecnologia de duplo-haploides (DH) em milho teve início em ambientes de clima temperado, sendo rapidamente adotada graças aos avanços na identificação e desenvolvimento de genótipos indutores adaptados, com taxas atuais de indução à haploidia entre 8% a 15%. Esta tecnologia permite a obtenção de linhagens completamente homozigóticas em apenas duas ou três gerações, enquanto o processo convencional requer de seis a oito gerações de autofecundação, sem atingir 100% de homozigose. Além disso, a tecnologia DH oferece outras vantagens como permitir uma maior exploração da variância genética, realizar *topcross* precoce, melhor atendimento aos critérios de proteção de cultivares, reduzir os custos associados à autofecundação, além de facilitar os processos de seleção assistida por marcadores moleculares, introgressão e piramidação de genes.

Apesar dos benefícios obtidos pela tecnologia DH no melhoramento de híbridos de milho para ambientes temperados, em ambientes tropicais ainda é necessário aprimorar as etapas de indução haploide, identificação de haploides, duplicação cromossômica e multiplicação de sementes. Além destas necessidades, existem poucos estudos sobre o uso e desenvolvimento desta tecnologia em tipos especiais de milho, sobretudo em milho superdoce, tanto em climas temperados como em tropicais. Neste contexto, a disponibilidade de indutores adaptados e com elevadas taxas de indução é um fator preponderante para a ampliação e sucesso da adoção da tecnologia DH em ambientes tropicais. Desta forma, o Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo (CIMMYT) desenvolveu linhagens indutoras de segunda geração (CIM2GTAIL) disponíveis para licenciamento e uso em ambientes (sub) tropicais, com taxa de indução comparável à dos indutores de clima temperado. Estes indutores foram avaliados quanto à capacidade de indução e adaptação em alguns países de ambiente (sub) tropical, embora ainda não existem informações publicadas de seus desempenhos para as diferentes condições ambientais brasileiras.

Embora diversos estudos sobre duplicação cromossômica com o uso de soluções de colchicina estejam disponíveis para germoplasma de milho comum em ambientes temperados, ainda são escassas as publicações sobre a eficácia de diferentes metodologias de duplicação cromossômicas, em diferentes

estádios vegetativos de milhos comuns ou superdoce tropicais, utilizando amostras representativas de indivíduos tratados e parâmetros uniformes para sua avaliação de sucesso.

Assim, os objetivos foram: a) determinar o potencial adaptativo e reprodutivo de seis genótipos indutores de haploidia em milho (três linhagens CIM2GTAIL's e suas respectivas combinações híbridas), em diferentes anos e épocas de semeadura; b) estimar o potencial de indução destes seis indutores sobre oito populações doadoras de milho superdoce tropical; c) identificar a ocorrência de efeitos de interação indutores x populações doadoras de milho superdoce para as taxas de indução à haploidia; d) comparar a eficácia de três métodos de duplicação cromossômica, que empregam solução de colchicina, para produção de linhagens DH's em populações de milho superdoce.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HISTÓRICO DO INÍCIO DO MELHORAMENTO DO MILHO HÍBRIDO

A produção de linhagens homozigotas, para uso como parentais de híbridos ou variedades sintéticas, é um componente importante dos programas de melhoramento de milho. Os primeiros relatos que envolveram hibridação controlada em milho foram conduzidos por Beal (1876; 1882). A seguir, East (1908) e Shull (1908; 1909) apresentaram estudos com cruzamentos entre linhagens endogâmicas e revelaram o potencial produtivo dos híbridos simples, que não puderam ser explorados economicamente, devido ao baixo desempenho *per se* das linhagens disponíveis até então. Somente após Jones (1918) propor a síntese de híbridos duplos, que os híbridos de linhagens passaram a ser amplamente utilizados na agricultura.

No Brasil, os primeiros trabalhos de hibridação foram produzidos pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC), lançando o primeiro híbrido duplo em 1939. A hibridação proporcionou grandes avanços, permitindo associar caracteres de genitores distintos, utilizar interações gênicas favoráveis, gerar genótipos uniformes, reduzir a interação genótipo x ambiente na geração F_1 e produzir sementes de milho híbrido em escala comercial (Paterniani, 1974). Atualmente, no Brasil, quase a totalidade das cultivares de milho comum disponíveis no mercado são híbridos de linhagens, sendo 79,7% híbridos de alta tecnologia (híbridos simples e simples modificados), 16,3% de híbridos de média a alta tecnologia (híbridos triplos e duplos), 4,0% de média a média/baixa tecnologia (sintéticos e variedades de populações) (Pereira Filho & Borgui, 2022).

Em nível mundial, a cultura do milho vem desempenhando papel fundamental nos sistemas agroalimentares e está em pleno processo de expansão, especialmente em ambientes tropicais (Erenstein et al., 2022; Bigolin & Talamini, 2024), sendo considerado o cereal mais cultivado do mundo, devido a sua ampla variabilidade genética, versatilidade de uso e adaptabilidade, gerando diferentes formas de consumo, seja na produção de grãos secos (*commodities*) ou de milhos especiais (Swapna et al., 2020).

2.2 MILHO DOCE E SUPERDOCE

O milho superdoce (*Zea mays* L. var. *saccharata*) é um tipo de milho especial e originado de mutações recessivas naturais, controlada pelos genes *shrunk-2* (*sh2*); *brittle-2* (*bt2*); *shrunk-4* (*sh4*) e *brittle1* (*bt1*), enquanto o milho doce possui o gene *sugary1* (*su1*) (Tracy, 2001; Sousa et al., 2012). Estes genes podem atuar de forma independente ou ainda em combinações duplas ou triplas. Estas mutações promovem alterações bioquímicas na via metabólica que converte açúcares em amido, especialmente a sacarose, impedindo parcialmente a ação das enzimas de conversão destes carboidratos, localizadas no citosol e no amiloplasto das células do endosperma (Denyer et al., 1996; Sousa et al., 2012). Assim, o aumento da sacarose nos grãos do milho doce e superdoce condiciona o caráter enrugado das sementes na fase de grão seco. Na fase de milho verde, o conteúdo de amido nos grãos cai para 30% a 35%, elevando os teores de açúcar para 9% a 14% em milho doce e até 25% para o milho superdoce, enquanto para o milho verde comum tem-se de 60% a 70% de amido e 3% de açúcar (Sousa et al., 2012; Pereira Filho, 2003). Desta forma, o milho doce e superdoce apresentam sementes com menor reserva no endosperma e suas espigas são mais suscetíveis ao ataque de pragas e doenças, devido ao seu maior teor de açúcares, quando comparado ao milho comum (Oliveira Junior et al., 2006; Kwiatkowsky & Clemente, 2007; Sousa et al., 2012).

O milho superdoce é destinado exclusivamente para o consumo humano, podendo ser consumido *in natura* ou na forma industrializada (Araujo et al., 2006; Oliveira Junior et al., 2006; Pereira Filho, et al., 2009). Os Estados Unidos é o principal produtor de milho superdoce, ocupando o segundo lugar dentre as culturas utilizadas na indústria de conservas, ficando apenas atrás da cultura do tomate. Estima-se que na safra de 2021, este país obteve uma renda de 774 milhões de dólares com milho superdoce, onde 75% da produção foi destinada para consumo *in natura* e 25% utilizada para o processamento (AgMRC, 2022). No Brasil, não se encontram informações recentes sobre a produção de milho superdoce, mas estimativas de 2005 revelaram um faturamento de 550 milhões de reais em aproximados 36 mil hectares (Barbieri, 2005), sendo destinado principalmente para o uso em conserva no estágio imaturo, exigindo então que o material seja produzido ao longo do ano. As indústrias responsáveis pelo

processamento desta olerícola exigem cultivares que apresentem uniformidade de maturação, tamanho e forma das espigas e de grãos. Portanto, os híbridos de linhagens são as cultivares que melhor atendem às demandas da indústria de conservas de milho superdoce (Kwiatkowski & Clemente, 2007; Teixeira et al., 2013; Luz et al., 2014).

2.3 ACELERAÇÃO DA OBTENÇÃO DE LINHAGENS E SEUS BENEFÍCIOS

Antes da tecnologia de DH's, a obtenção de linhagens de milho dependia exclusivamente de sucessivos ciclos de autofecundações, consumindo de seis a oito gerações, para alcançar quase 100% de homozigose (Hallauer et al. 2010), sendo considerada uma etapa demorada e com custos elevados (Chaikam et al., 2019). Uma vez obtidas as linhagens endogâmicas, estas necessitam ser observadas quanto ao potencial *per se* e combinatório. As combinações híbridas são avaliadas e selecionadas por meio de extensos ensaios de campo, conduzidos em diferentes condições ambientais. Após esta fase, os híbridos superiores são registrados no serviço nacional de cultivares e produzidos em larga escala para serem comercializados, em um ciclo que pode durar cerca de 8 a 10 anos para o lançamento comercial de uma nova cultivar. Por isto, existe a necessidade de um esforço contínuo para desenvolver tecnologias para aceleração do processo de produção de linhagens homozigotas (Chaikam et al., 2019) e reduzir o tempo para desenvolver novas cultivares (Seitz, 2005; Bordes et al., 2006).

A tecnologia de DH surgiu como uma alternativa ao método tradicional de autofecundações sucessivas, reduzido o tempo de obtenção de linhagens homozigotas para duas ou três gerações (Pierre et al., 2011; Prassana et al., 2012; Fritsche-Neto et al., 2013). A tecnologia DH oferece várias vantagens, quando comparado ao processo de autofecundações sucessivas, dentre elas: maior velocidade de obtenção de linhagens 100% homozigóticas; maior exploração da variância genética; permitir realizar *testcross* desde a primeira geração; diminuir o número de gerações demandadas; atender melhor aos critérios de distinção, uniformidade e estabilidade para proteção intelectual de cultivares; reduzir tempo e custos com autofecundação; facilitar a seleção assistida por marcadores moleculares, introgressão e piramidação de genes (Geiger & Gordillo, 2009; Prassana et al., 2012). Estas vantagens justificam a rápida adoção desta tecnologia

pelos grandes e organizados programas de melhoramento de milho.

O processo de obtenção de linhagens DH's pode ser feito *in vitro* ou *in vivo*. O método *in vitro* utiliza a cultura de tecidos haploides da planta, como anteras e grãos de pólen (Santos & Zanettini, 2002; Chaikam et al., 2012; Borém & Miranda, 2013). Porém, o sucesso deste método está limitado pelas taxas reduzidas da produção de embriões e pela especificidade dos genótipos aos meios de cultura (Petolino & Thompson, 1987; Spitzkó et al., 2006; Spitzkó et al., 2010).

No método *in vivo*, os haploides são obtidos por meio de cruzamentos entre plantas doadoras com genótipos indutores de haploidia, originando embriões haploides em uma parte das sementes produzidas nestes cruzamentos (Pierre et al., 2011). As pesquisas conduzidas por Coe e Sarkar (1964) foram fundamentais para o estabelecimento da produção de haploides *in vivo* e, conjuntamente com a incorporação de marcadores de antocianina, facilitaram a identificação de haploides ainda no estágio de sementes (Nanda & Chase, 1966; Chase et al., 1969; Prasanna et al., 2012). Estas e outras particularidades, fizeram com que o método *in vivo* fosse mais empregado em milho, devido ser mais eficiente e confiável para produzir linhagens DH's em larga escala.

A tecnologia DH *in vivo* foi amplamente adotada pelos programas comerciais de melhoramento de milho na Europa, América do Norte e China (Molenaar & Melchinger, 2019). Embora nos trópicos a implementação desta tecnologia em programas de melhoramento tenha ocorrido de forma mais lenta (Kebede et al. 2011; Prasanna et al., 2012), esforços vêm sendo desenvolvidos para torná-la mais acessível as diferentes organizações públicas e privadas.

2.4 INDUÇÃO DE HAPLOIDIA

A primeira descrição de uma planta haploide de milho foi apresentada simultaneamente por Stadler & Randolph na reunião da Associação Americana para o Avanço da Ciência em 1929 (Randolph, 1932). Contudo, Chase (1952) foi quem propôs o uso de haploides como aceleradores no processo de obtenção de linhagens endogâmicas em milho, identificando haploides naturais e duplicando seus cromossomos para restaurar a fertilidade das plantas. Inicialmente, foram observadas limitações de performance que inviabilizavam a sua

exploração em escala comercial (Pierre et al., 2011).

A ocorrência natural de haploides em milho é insuficiente para ser explorada pelos programas de melhoramento, pois ocorre na taxa de um haploide para cada mil indivíduos diploides, podendo ser ainda menos frequente, dependendo da base genética dos genitores envolvidos e das condições ambientais presentes (Chase, 1963). Esta limitação foi suplantada pela identificação de genótipos indutores, que apesar de inicialmente produzirem baixas taxas de indução à haploidia (TIH), foram fundamentais para o desenvolvimento da tecnologia de DH's (Chase 1969). A seguir, o melhoramento destes indutores visando o aumento da TIH, associada à incorporação de genes marcadores para diferenciação de indivíduos haploides e diploides, em diferentes estádios de desenvolvimento, aumentou a eficiência da tecnologia de DH's (Trentin et al., 2020). A TIH é calculada por meio da razão entre o número de sementes haploides putativas (SHP) obtidas, dividida pelo número total de sementes marcadas pelo gene *R1-nj*, produzidas pela indução haploide, sendo o parâmetro comum para comparar a eficiência da indução de diferentes indutores (Melchinger et al., 2016a).”

O início do melhoramento de indutores ocorreu com a identificação das linhagens Stock 6 e Wisconsin-23 (W23). A Stock 6 apresentava TIH de ~3% e mecanismo de indução gimnogenético ou maternal, atuando como fornecedor de pólen para a população doadora (Coe, 1959). A W23 apresentava TIH variando entre 1% e 3% e mecanismo de indução androgenético ou paternal, atuando como receptora de pólen da população doadora (Kermicle, 1969; Kermicle, 1973; Pollacsek, 1992; Kermicle, 1994).

A taxa de indução haploide de indutores maternais é conhecida por estar sob controle poligênico (Röber et al., 2005; Prigge et al., 2012b; Zhong et al., 2019), enquanto em indutores paternais, o gene gametófito indeterminado (*ig*) induz a produção de haploides como uma característica genética única (Kermicle, 1969; Kermicle et al., 1971; Evans et al., 2007).

Atualmente, os indutores gimnogenéticos maternais são mais comumente empregados na obtenção de linhagens DH's, pois apresentam maiores TIH's, mantêm o citoplasma da população doadora (Chaikam et al., 2012; Prigge et al., 2012a) e permitem a indução em lotes isolados.

A Stock 6 deu origem a vários genótipos indutores maternais,

(Prasanna et al., 2012; Chaikam et al., 2020; Trentin et al., 2020), com destaque para: a população indutora Zarodishevsky Marker Krasnodar (ZMK1, com TIH entre 6% e 8%), e o indutor ZMK1U, com TIH entre 11 e 13% (Zabirova et al., 1996; Shatskaya, 2010), desenvolvidos na Rússia; na França, Lashermes e Beckert (1988), cruzando os indutores W23 e Stock 6, geraram o indutor WS14 (TIH 3% a 5%); na Alemanha, Röber et al. (2005) desenvolveram o indutor RWS (TIH ~8%) e UH400 (TIH 8% a 15%), derivada da Krasnodar Embryo Marker Synthetic (KEMS, com TIH ~7%) (Chang & Coe, 2009); na Moldávia, Chalyk (1999) desenvolveu os Moldovian Haploid Inducers (MHI, com TIH de 7% a 9%), contendo os alelos *A1*, *B1*, *C1* e *R1-nj*, que em conjunto sintetizam a produção de antocianina em diferentes tecidos; a empresa romena Procera desenvolveu os indutores PHI's (TIH entre 10 e 15%), com os alelos marcadores do indutor MHI e mais o gene marcador de raízes púrpuras *PI1* (Rotarencu et al., 2010). Todos esses indutores possuem o marcador de antocianina *R1-nj* para identificação haploide no estágio de semente. Outros indutores equipados com alto teor de óleo (OC) foram desenvolvidos na China, gerando o indutor CAUHOI (TIH ~3%), desenvolvido pela Universidade de Agricultura (Chen & Song, 2003), e os indutores CAU5 e CAU079, com maiores OC's e TIH's entre 6% e 8% (Xu et al. 2013; Dong et al., 2014). Esforços para automatizar a seleção haploide de indutores OC foram conduzidos na Alemanha, gerando a seleção dos indutores UH600 e UH601-OC com TIH ~10% (Melchinger et al., 2013; Melchinger et al., 2014; Melchinger et al., 2018). Os avanços obtidos no melhoramento dos indutores haploides maternos permitiram alcançar uma TIH superior a 15% (Rotarencu et al., 2010), enquanto os indutores paternos atingem apenas 6% (Kindiger & Hamann, 1993).

O mecanismo de indução à haploidia maternal ainda não é bem conhecido, mas acredita-se que os indivíduos haploides resultem de uma falha na fertilização, promovida pelos gametas masculinos ou femininos, em que a oosfera cresce e se diferencia em um embrião (Sarkar & Coe, 1966). Existem duas hipóteses que tentam explicar a indução haploide e propõem que ela ocorra a partir: a) de uma fertilização única (do endosperma) em vez de fertilização dupla normal (endosperma e embrião); b) da exclusão seletiva dos cromossomos indutores após a fertilização normal (Zhao et al., 2013; Qiu et al., 2014). A fertilização única ocorre quando apenas o óvulo ou a célula central são fertilizados, gerando grãos com endosperma defeituoso ou com embrião haploide,

respectivamente (Sarkar & Coe, 1966).

A exclusão seletiva dos cromossomos do indutor foi observada por Zhao et al. (2013). Eles verificaram que a maior parte dos cromossomos indutores foram excluídos das células embrionárias haploides na primeira semana após a polinização e em 15 dias para as células de endosperma de grãos defeituosos. Estudos conduzidos por Li et al. (2009), observaram que 43,2% dos haploides derivados de cruzamentos com o indutor CAUHOI (Chen & Song, 2003) carregavam, em média, 1,8% do genoma do indutor. Esses haploides apresentavam a expressão de genes específicos dos indutores, como o *R1-nj*, além de genes que influenciam a OC, ao longo do seu desenvolvimento.

Estudos genéticos indicam que a herança da TIH é regulada por locos de efeito principal e quantitativos, que possuem efeitos menores e acumulativos (QTL's) (Barret et al., 2008; Prigge et al., 2012b). Um estudo de QTL's envolvendo quatro populações cruzadas com a linhagem indutora UH400, identificou oito QTL's associados à TIH. Entre esses, os QTL's *qhir1* e *qhir8* destacaram-se como os principais, localizados nos cromossomos 1 e 9, explicando 66% e 20% da variância genética, respectivamente (Prigge et al., 2012b). O QTL *qhir1* desempenha um papel crucial na indução de haploidia, influenciando na distorção da segregação gametofítica e o aborto embrionário (Deimling et al., 1997; Barret et al., 2008; Prigge et al., 2012b; Xu et al., 2013).

A produção de sementes haploides em cruzamentos com indutores maternos é dependente de uma inserção de quatro pares de bases no último éxon do gene GRMZM2G471240, que codifica uma fosfolipase específica do pólen. Este gene foi identificado simultaneamente por diferentes grupos de pesquisadores, resultando em nomes distintos: *MATRILINEAL (MTL)* (Kelliher et al., 2017), *ZEA MAYS PHOSPHOLIPASE A1 (ZmPLA1)* (Liu et al., 2017) e *NOT LIKE DAD (NLD)* (Gilles et al., 2017). Estes estudos demonstraram que a mutação do gene *MTL/ZmPLA1/NLD* na região *qhir1* é responsável por uma TIH de até 6,7% (Gilles et al., 2017; Kelliher et al., 2017; Liu et al., 2017). O gene RMZM2G465053, conhecido como *ZmDMP*, que codifica uma proteína de membrana com domínio *DUF679*, é o alelo subjacente responsável pelo QTL *qhir8* (Zhong et al., 2019). Este gene contribui para um aumento de 2 a 3 vezes na TIH. É importante destacar que *MTL/ZmPLA1/NLD* e *ZmDMP* atuam de forma sinérgica, o que indica um potencial de aumento substancial de 5 a 6 vezes na TIH, quando estas mutações

estão associadas (Zhong et al., 2019). Porém, genótipos que possuem somente a mutação de *ZmDMP* apresenta uma TIH muito baixa, sendo aproximadamente igual a 0,15% (Zhong et al., 2019).

O efeito sinérgico das mutações *MTL* e *ZmDMP* sugere que as interações genéticas após a polinização contribuem para a elevação da TIH nos indutores modernos (Jacquier et al., 2020). Os estudos de Khammona et al. (2024) confirmam que, a presença do gene *qhir1* isolado em um genótipo indutor, não é suficiente para obter TIH elevadas, sendo recomendado TIH's superiores a 10%. Novos genes como *DUF679* (Zhong et al., 2019), *ZmPLD3* (Li et al., 2021) e *ZmPOD65* (Jiang et al., 2022) foram identificados como tendo um papel significativo na indução de haploidia. Mutações no gene *ZmPLD3* resultaram em uma TIH comparável à observada com o gene *MTL* homocigoto recessivo. Essas mutações demonstraram efeitos sinérgicos, ao invés de redundância funcional, na triplicação do HIR na presença do gene *MTL* homocigoto recessivo.

Estudo conduzidos por Chaikam et al. (2018) revelaram que, a extensão do efeito positivo do gene *qhir1* na TIH, é influenciada tanto pelo genitor doador quanto pelos genitores indutores. Estudando genitores doadores tropicais, as progênies *qhir1+* associadas à linhagem CML269 mostraram maior média de taxa de indução, seguidas pelas progênies *qhir1+* associadas à linhagem CML495. Os autores também destacam que, quando há disponibilidade de vários indutores com taxas de indução semelhantes, é preferível escolher indutores com melhor desempenho agrônomico e adaptação ao ambiente alvo.

As condições ambientais como temperatura e umidade no momento da polinização, também exercem influências sobre a TIH. Em pesquisa conduzida no México por Kebede et al. (2011), foram observados índices de TIH mais elevados no inverno em comparação aos índices obtidos no verão. De maneira similar, De La Fuente et al. (2018) observaram TIH mais altas em verão com temperaturas elevadas, em comparação a outro verão com temperaturas amenas em Iowa, EUA. Alterações nos índices de TIH também foram associadas ao modo de obtenção dos haploides, sendo observadas taxas de TIH mais elevadas em campos de polinizações manuais, em relação aos lotes isolados (Rotarencu et al., 2012).

A literatura indica que a TIH de indutores temperados utilizados em ambientes tropicais é mantida nos níveis do seu ambiente de origem, porém estes

indutores apresentam desempenho agrônomico limitado, baixa adaptação, baixa produção de pólen, florescimento super precoce, baixa produção de sementes e elevados níveis de podridões na espiga, além da alta suscetibilidade a doenças (sub) tropicais (Prigge et al., 2012a). As limitações observadas nos indutores temperados resultaram em grandes dificuldades para sua manutenção e uso em escala comercial, levando a uma adoção mais lenta da tecnologia DH em ambientes tropicais, em relação aos ambientes temperados (Kebede et al., 2011; Prasanna et al., 2012). Visando atender a esta necessidade, o CIMMYT em colaboração com a Universidade de Hohenheim (UH), geraram primeiramente as linhagens indutoras tropicalmente adaptadas (TAIL's) com TIH entre 8% e 10% e depois a segunda geração de melhoramento de indutores (CIM2GTAIL's), com TIH entre 8% e 15% e com melhor desempenho agrônomico em ambientes tropicais (Prigge et al., 2012a; Chaikam et al., 2018).

2.5 IDENTIFICAÇÃO DE HAPLOIDES

A identificação precoce de indivíduos haploides previne gastos desnecessários com a condução de diploides, que não resultarão em linhagens DH's. Uma das formas de identificar indivíduos haploides, pode ser feita com base em marcadores fenotípicos integrados aos indutores haploides, que são marcadores genéticos herdados e expressos nas fases de semente, plântula e planta adulta (Chaikam, et al., 2019). A maioria dos marcadores fenotípicos, utilizados para distinguir sementes haploides de diploides, são dominantes para a síntese de antocianina, que se expressam em tecidos diploides ou triploides normais, mas não em embriões e tecidos haploides (Trentin, et al., 2020).

A identificação visual de haploides foi facilitada pelo desenvolvimento de estoques de marcadores fenotípicos integrados aos indutores (Chase, 1947; Nanda & Chase, 1966). A expressão do gene *R1-navajo* (*R1-nj*) resulta na produção de antocianina na aleurona e no escutelo das sementes, sendo amplamente utilizado na indução *in vivo* (Chaikam & Prasanna 2012; Melchinger et al., 2013), podendo se expressar em combinação com outros genes envolvidos na via biosintética da antocianina (*A1*, *A2*, *C2*, *Bz1* e *Bz2*) (Nanda & Chase, 1966; Greenblatt & Bock, 1967). A presença ou ausência da pigmentação púrpura no escutelo permite identificar se as sementes são: a) diploide (pigmentação púrpura

na aleurona do endosperma e no escutelo ou embrião); b) haploides putativos (pigmentação púrpura somente na aleurona do endosperma e sem pigmentação púrpura no escutelo ou embrião); c) contaminantes ou com inibição do gene *R1-nj* (não expressam pigmentação púrpura na semente).

Os genes *C2* ou *Whp1*, *A1* e *A2* são essenciais para a produção de antocianina e genótipos homozigotos recessivos para qualquer um destes genes interrompe a sua produção na camada de aleurona (Ford, 2000). Os genes *Bz1* e *Bz2* atuam nas etapas seguintes da via de produção de antocianina e, na ausência de qualquer um destes genes, leva a uma pigmentação marrom-avermelhada (Coe, 1994). A visibilidade da pigmentação do escutelo também é afetada pela morfologia da semente, sendo que sementes chatas oferecem melhor visibilidade em relação as sementes arredondadas (Trentin et al., 2020).

O uso do marcador fenotípico *R1-nj* pode ser limitado por mutações dos genes *C1* e *C2*, envolvidos na biossíntese de antocianina (Paz-Ares et al., 1990; Della Vedova et al., 2005). Como exemplo, o gene inibidor *C1-I* (*Colorless1 – Inhibitor*) bloqueia a expressão deste gene marcador, inibindo a produção de antocianina em germoplasma de origem temperada (Röber et al., 2005; Dang et al., 2012) e, mais frequentemente, em germoplasma de origem tropical (Chaikam et al., 2015), podendo levar a seleção de um grande número de falsos haploides (Röber et al., 2005; Prigge et al., 2011; Chaikam et al., 2016).

Embora o gene *R1-nj* atue como marcador dominante para cor, facilitando o rastreamento de indivíduos haploides, sua expressão pode ser influenciada por diversos fatores, dependendo da origem do germoplasma induzido e do indutor de haploidia, além de fatores ambientais presentes (Röber et al., 2005; Kebede et al., 2011; Prigge et al., 2011; Prigge et al., 2012b; Wang et al., 2016).

Mecanismos genéticos adicionais para identificar e confirmar plântulas haploides oriundas da classificação de sementes com base no marcador fenotípico *R1-nj* foram desenvolvidos (Rotarencó et al., 2010; Chaikam et al., 2016). Como exemplo, o gene *PI1* é responsável pela produção de antocianina nas raízes, independentemente da exposição a luz (Chandler et al., 1989). No entanto, alguns genótipos podem adquirir a coloração vermelha nas raízes das plântulas quando expostas à luz, o que torna a classificação baseada em *PI1* também suscetível a erros. Contudo, o gene *B1* combinado ao *PI1* promovem a produção de antocianina nos coleóptilos das plântulas, nas pontas e margens das folhas e

nas bainhas (Coe, 1994), melhorando o processo de diferenciação. Plantas homozigotas dominantes para *B1* e *PI1* desenvolvem uma pigmentação roxa escura na palha e no colmo (Coe, 1994).

2.6 DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA

As plantas diploides são formadas pela união dos gametas genitores, somando o conjunto de seus cromossomos. No sistema de indução de haploidia maternal, os indivíduos haploides contêm apenas os cromossomos do genitor feminino, o que os torna estéreis (Chaikam & Mahuku, 2012). Portanto, é necessário duplicar os seus cromossomos para restaurar a fertilidade e produzir linhagens duplo-haploides (Prassana, et al., 2012; Wu et al., 2017).

Entretanto, a duplicação espontânea dos cromossomos para garantir a fertilidade dos haploides, é um fenômeno de baixa frequência ou nulo, especialmente no milho, limitando a autofecundação para a obtenção dos DH's em escala comercial. Embora a ocorrência de duplicação espontânea seja incerta, seus mecanismos ainda não estão totalmente compreendidos. Uma das explicações para a duplicação cromossômica espontânea é a fusão nuclear, onde nos estádios iniciais do desenvolvimento embrionário, a divisão síncrona de diferentes núcleos pode resultar em uma placa metafásica compartilhada e com fibras do fuso em comum, podendo levar à duplicação espontânea dos seus cromossomos (Sunderland, 1974). Além disso, a duplicação cromossômica espontânea também pode ocorrer por meio da fusão de células somáticas, através da endoreduplicação ou da endomitose, além de outros mecanismos, que podem atuar simultaneamente nesse processo (Humphreys & Knox, 2015).

Apesar disso, a literatura apresenta vários estudos sobre a indução de haploidia (Coe, 1959; Kermicle, 1969; Rotarencu et al., 2010; Röber, 2012; Prigge et al., 2012b; Prasanna, 2012; Chaikam et al., 2020; Trentin et al., 2020); seleção genética de linhagens DH's (Longin et al., 2006; Longin et al., 2007a, b; Gordillo & Geiger, 2008; Prigge et al., 2012a; Beyene et al., 2013; Krchov & Bernardo, 2015) e aplicabilidade da tecnologia (Dang et al., 2012; Lubberstedt & Frei, 2012; Fritsche-Neto et al., 2013; Strigens et al., 2013). Contudo, apesar da duplicação cromossômica ser um dos passos mais importantes para a produção de DH's, existem um número relativamente menor de publicações sobre este assunto, que apresentem informações detalhadas dos processos e que garantam uma repetibilidade das taxas de duplicação (Chaikam et al., 2020). Assim, as empresas privadas detêm protocolos ajustados às suas demandas que são mantidos em sigilo.

Em milho, a colchicina (Gayen et al., 1994; Deimling et al., 1997; Chalyk, 2000), herbicidas antimitóticos (Melchinger et al., 2016a) e gás óxido nitroso (N₂O) (Kato & Geiger, 2002; Molenaar et al., 2018) podem ser utilizados para a duplicação cromossômica e restaurar a fertilidade dos indivíduos haploides. Dentre estes, a colchicina é o agente antimitótico mais utilizado, devido à sua eficiência, facilidade de acesso e protocolos de uso bem estabelecidos, apesar de ser mais tóxica do que o gás N₂O e os herbicidas antimitóticos.

A colchicina (C₂₂H₂N₅) exibe um efeito antimitótico e de duplicação do número de cromossomos (Chase, 1969; Chaikam & Mahuku, 2012; Melchinger et al., 2016b), pois se liga à β-tubulina, evitando a formação de dímeros de tubulina e os microtúbulos na mitose celular, fundamentais para a separação dos cromossomos homólogos, migração polar e divisão celular. Entre os protocolos que empregam solução de colchicina para duplicação cromossômica se destacam: imersão sementes (Gayen et al., 1994; Chalyk, 2000; Ren et al., 2018); injeção de solução no tecido basal do meristema apical de plântulas (Zabirova et al., 1996; Eder & Chalyk, 2002); imersão de raízes (Deimling et al., 1997; Chaikam et al., 2020); imersão de plântulas após 3 a 4 dias de germinação (Chaikam & Mahuku 2012; Prigge & Melchinger, 2012), sendo este último o protocolo com maior número de citações de uso na literatura.

O protocolo do método de imersão de sementes inicia-se com a embebição das mesmas em água à temperatura ambiente. Posteriormente, as sementes, recebem um pequeno corte na porção superior da plúmula (Gayen et al., 1994; Chalyk, 2000) ou ainda cortadas levemente ao redor do embrião (Ren et al., 2018), antes de serem imersas em solução contendo colchicina. Este método não tem sido utilizado em larga escala devido ao fato de ser muito laborioso, demandar extrema habilidade manual e gerar altas taxas de mortalidade.

No método de injeção é aplicada uma solução de colchicina com o uso de seringa hipodérmica 2-3 mm acima do tecido meristemático basal, na porção central do colmo das plântulas no estágio V₂ (Zabirova et al., 1996). O uso desta forma de tratamento promove taxas de eficiência na duplicação cromossômica em torno de 27,5% (Eder & Chalyk, 2002).

No protocolo de imersão de plântulas, as sementes haploides são germinadas em papel germitest e mantidas até que o coleóptilo atinja cerca de 2 cm de comprimento. Neste momento, a ponta do coleóptilo é cortada e as plântulas

são imersas em solução contendo colchicina à temperatura ambiente e sem luz (Deimling et al., 1997; Prasanna et al., 2012; Chaikam & Mahuku, 2012; Prigge et al., 2012a; Prigge & Melchinger 2012). Neste método, são relatadas taxas de sucesso entre 10% e 30%, dependendo da população e das condições de manejo (Chaikam & Mahuku, 2012; Melchinger et al., 2016b).

O tratamento de raízes de plântulas no estágio V_2 - V_3 com solução de colchicina foi avaliado por Deimling et al. (1997) e com soluções de herbicidas antimitóticos por Melchinger et al. (2016b) se mostraram menos eficientes na duplicação dos genomas haploides, em comparação aos tratamentos de imersão de plântulas. Recentemente, Chaikam et al. (2020) apresentaram um método ajustado de imersão de raízes até a região da coroa de plântulas no estágio V_2 , em solução de colchicina. Neste método foram relatadas taxas de sucesso entre 23,5% e 58,5%, dependendo da população e das condições de manejo (Chaikam et al., 2020).

No geral, as plantas haploides são fracas e suscetíveis a vários estresses bióticos e abióticos, podendo ocorrer altas taxas de mortalidade, tanto nas estufas quanto no campo, necessitando de um manejo cuidadoso desde a duplicação, transplante, crescimento, até a obtenção final das sementes DH's (Mahuku, 2012). Assim, é indicado o uso de irrigação, controle de plantas daninhas, pragas e doenças, aplicação de fertilizantes foliares e de solo, via fertirrigação.

As espigas com sementes, colhidas de plantas D_0 , passam a ser referidas como geração D_1 , podendo a partir do número de sementes produzidas, serem multiplicadas via autofecundação e avaliadas para desempenho *per se* e em *testcross*.

3. ARTIGO 1

**ADAPTAÇÃO E TAXAS DE INDUÇÃO HAPLOIDE DE LINHAGENS
CIM2GTAIL's E SUAS COMBINAÇÕES SOBRE POPULAÇÕES DE MILHO
SUPERDOCE EM AMBIENTE TROPICAL**

RESUMO

A tecnologia de duplo-haploides (DH) está bem estabelecida em ambiente temperado e possui diversos indutores adaptados ao seu ambiente de uso. Em ambiente tropical, sua adoção é limitada, pela dificuldade de acesso e disponibilidade de indutores com elevadas taxas de indução e adaptação agrônômica. Neste sentido, o Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo (CIMMYT) desenvolveu as linhagens indutoras CIM2GTAIL's para licenciamento e uso em ambientes (sub) tropical. Os objetivos deste trabalho foram: a) determinar o potencial adaptativo e reprodutivo de três linhagens indutoras CIM2GTAIL's e suas combinações híbridas, em diferentes épocas de semeadura no Brasil; b) estimar o potencial de indução destes seis indutores sobre oito populações de milho superdoce tropical; c) identificar a ocorrência de interação de indutor x população para taxas de indução em milho superdoce. Os seis indutores e dois híbridos comerciais precoces, com ampla adaptação no Brasil, foram avaliados em seis experimentos, instalados em blocos completamente casualizados, com três repetições, empregando parcelas úteis de quatro fileiras de 4,0 m, no espaçamento 0,8 m x 0,2 m, em diferentes anos e épocas de semeadura. O desempenho agrônômico e os componentes de rendimento dos genótipos indutores foram avaliados para 20 características fenotípicas. Com base na marcação das sementes pelo gene *R1-nj*, foram estimadas as taxas de indução à haploidia. A taxa média de indução real sobre as oito populações doadoras variou de 9,5% a 13,2%, com destaques para CIM2GTAIL-P1 e para a combinação CIM2GTAIL-P1 x CIM2GTAIL-P3. Apesar da ocorrência da interação indutor x população doadora, as melhores taxas de indução sobre as populações ocorreram empregando a linhagem CIM2GTAIL-P1. A superioridade no desempenho dos indutores F_1 's sobre os indutores *per se* para as diferentes características agrônômicas, sugere que o emprego de híbridos triplos de linhagens CIM2GTAIL's para ambientes tropicais pode ser vantajoso. Os indutores apresentam adaptação para a semeadura no início da primeira safra brasileira de milho, mas tem fraco desempenho em semeaduras mais tardias ou em segunda safra, quando se tem maior probabilidade de epidemias causadas por doenças da cultura do milho. As taxas de indução a haploidia destes indutores em cruzamentos com populações de milho superdoce tropical são semelhantes às observadas com indutores temperados em cruzamentos com milho comum, em seus ambientes de origem.

Palavras-chave: *Zea mays* L. var. *saccharata*; indução à haploidia; indução *in vivo*; gene *R1-nj*; desempenho agrônômico; maternal.

ABSTRACT

The doubled haploid (DH) technology is well established in temperate environments and has several inducers adapted to their environment of use. In tropical environments, its adoption is limited due to the difficulty of accessing and availability of inducers with high induction rates and agronomic adaptation. In this sense, the International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT) developed the CIM2GTAIL's inducer lines for licensing and use in (sub)tropical environments. The objectives of this study were: a) to determine the adaptive and reproductive potential of three CIM2GTAIL's inducer lines and their hybrid combinations, in different sowing seasons in Brazil; b) to estimate the induction potential of these six inducers on eight tropical supersweet corn populations; c) to identify the occurrence of inducer x population interaction for induction rates in supersweet corn. The six inducers and two early commercial hybrids, widely adapted in Brazil, were evaluated in six experiments, installed in completely randomized blocks, with three replicates, using useful plots of four 4.0 m rows, at a spacing of 0.8 m x 0.2 m, in different years and sowing times. The agronomic performance and yield components of the inducer genotypes were evaluated for 20 phenotypic traits. Based on the seed marking by the *R1-nj* gene, the haploidy induction rates were estimated. The average real induction rate on the eight donor populations ranged from 9.5% to 13.2%, with highlights for CIM2GTAIL-P1 and for the combination CIM2GTAIL-P1 x CIM2GTAIL-P3. Despite the occurrence of the inducer x donor population interaction, the best induction rates on the populations occurred using the CIM2GTAIL-P1 line. The superior performance of F_1 's inducers over inducers *per se* for different agronomic traits suggests that the use of triple hybrids of CIM2GTAIL's lines for tropical environments may be advantageous. The inducers are adapted for sowing at the beginning of the first Brazilian corn harvest, but have poor performance in later sowings or in the second harvest, when there is a greater probability of epidemics caused by corn diseases. The haploidy induction rates of these inducers in crosses with tropical supersweet corn populations are similar to those observed with temperate inducers in crosses with common corn in their environments of origin.

Keywords: *Zea mays* L. var. *saccharata*; haploidy induction; *in vivo* induction; *R1-nj* gene; agronomic performance; maternal.

3.1 INTRODUÇÃO

Em programas privados de melhoramento de milho comum, as linhagens para síntese de híbridos são extensivamente obtidas com a metodologia de duplo-haploides (DH).

Contudo, em milho superdoce ainda existem poucos relatos envolvendo a obtenção de linhagens com esta técnica. Uma das grandes vantagens desta tecnologia se relaciona ao tempo reduzido para se produzir linhagens homozigotas em duas ou três gerações de cultivo, utilizando a indução haploide em genótipos fontes, seguidas da duplicação do conteúdo cromossômico (Pierre et al., 2011; Prassana et al., 2012; Fritsche-Neto et al., 2013). O uso de DH's oferece vantagens em relação aos métodos tradicionais que utilizam autofecundações sucessivas, dentre elas destacam-se: a máxima variância genética entre linhagens *per se*; a possibilidade de realizar *testcross* desde a primeira geração; o menor número de ciclo de reprodução; o perfeito atendimento aos critérios de distinção, uniformidade e estabilidade para proteção de cultivares; redução de custos com autofecundação; maior eficiência na seleção assistida por marcadores moleculares e a maior facilidade de introgressão e piramidação de genes em uma linhagem (Geiger & Gordillo, 2009).

A obtenção de DH's pode ser realizada por meio de métodos *in vitro* e *in vivo*. No método *in vivo*, os haploides são obtidos por meio de cruzamentos entre populações doadoras e genótipos indutores de haploidia, originando embriões haploides em uma parte das sementes produzidas nestes cruzamentos (Pierre et al., 2011). Este tipo de indução pode ser classificado em androgenético ou paternal, quando o indutor de haploidia é usado como receptor de pólen e gimnogenético ou maternal, quando os genótipos indutores são utilizados como doadores de pólen (Silva et al., 2009; Chaikam et al., 2012a; Trentin et al., 2020). Os indutores maternos são mais comumente empregados, devido aos menores custos de utilização, manutenção da herança extracromossômica dos genótipos induzidos (Chaikam et al., 2012; Prigge et al., 2012a; Trentin et al., 2020) e facilidade de serem utilizados em esquemas envolvendo muitos cruzamentos em lotes isolados (Trentin et al., 2020). Não demorou muito tempo para que os pesquisadores percebessem o potencial das plantas haploides no melhoramento do milho e começaram a desenvolver

genótipos indutores com marcadores fenotípicos, que permitiram diferenciar plantas haploides e diploides, nos diferentes estádios de desenvolvimento (Trentin et al., 2020). Inicialmente, duas linhagens se destacaram para a indução haploides *in vivo*: a Stock 6, com mecanismo de indução maternal e taxa de indução média de 3,2% (Coe, 1959), e a Wisconsin-23 (W23), com mecanismo de indução paternal e taxa de indução entre 1% e 3% (Kermicle, 1969 e 1973). A Stock6 deu origem a muitas linhas indutoras maternais, que na atualidade apresentam maiores taxas de indução, sendo preferida pelos programas de melhoramento, devido gerar linhagens que conservam o citoplasma da população doadora (Prasanna, 2012).

O mecanismo de indução ainda não é bem conhecido, mas acredita-se que os haploides resultem de uma falha na fertilização, promovidas pelos gametas masculinos ou femininos, em que a oosfera cresce e se diferencia em um embrião (Sarkar & Coe, 1966). Estes autores, ao analisarem grãos de pólen da Stock 6, identificaram que todos eles possuíam três núcleos, descartando a possibilidade de monospermia como causa da indução à haploidia (Chase, 1964a; Sarkar & Coe, 1966). Existem duas hipóteses que tentam explicar a indução à haploidia e propõem que ela ocorra por: a) fertilização única em vez de fertilização dupla normal; b) eliminação de cromossomos paternos após a fertilização normal (Zhao et al., 2013; Qiu et al., 2014). Corroborando com parte das hipóteses, Zhao et al. (2013) detectaram que a maior parte dos cromossomos indutores foram excluídos das células embrionárias haploides dentro de uma semana após a polinização e de células de endosperma de grãos defeituosos em 15 dias após a polinização.

Atualmente, os progressos obtidos com o melhoramento dos indutores haploides maternos podem exceder a 15% de taxa de indução (Rotarenco et al., 2010), enquanto para os indutores paternos atingem apenas 6% (Kindiger & Hamann, 1993). A taxa de indução haploide é calculada com o número de sementes haploides putativas obtidas, dividida pelo número total de sementes marcadas pelo gene *R1-nj*, produzidas em um cruzamento com o indutor haploide, sendo o parâmetro comum para comparar a eficiência da indução haploide de diferentes indutores (Melchinger et al., 2016b). A taxa de indução haploide (TIH) de indutores maternos é conhecida por estar sob controle poligênico (Röber, 2005; Prigge et al., 2012b; Zhong et al., 2019), enquanto em indutores paternos, o gene gametófito indeterminado (*ig*) é responsável pela indução haploide como uma

característica genética única (Kermicle, 1969).

Muitos esforços vêm sendo realizados para melhorar a taxa de indução haploide e a adaptação de indutores a diferentes ambientes a partir da Stock 6. A literatura relaciona um aumento eficaz da taxa de indução haploide (6% a 15%) bem como do desempenho agrônomo dos indutores nas últimas duas décadas, entre eles UH400 (Hohenheim University), RWS (Röber et al., 2005), MHI (Chalyk, 1999) e PHI (Rotarencó et al., 2010), com adaptação a ambientes temperados.

A velocidade de adoção da tecnologia DH para obtenção de linhagens de milho comum em países tropicais não tem avançado tanto quanto nos países temperados, em parte devido à falta de indutores adaptados aos ambientes (sub) tropicais (Prasanna et al., 2012; Trentin et al., 2020) e também ao sigilo mantido pelas empresas privadas de melhoramento, que restringem o acesso às informações geradas. Em relação ao milho superdoce, embora os DH's possam representar importante avanço para o melhoramento de híbridos, tanto em países tropicais como em temperados, há uma carência de relatos na literatura científica sobre o emprego desta tecnologia.

Com o objetivo de desenvolver e disponibilizar indutores de haploidia adaptados para ambientes (sub) tropicais, o Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo (CIMMYT) e a Universidade de Hohenheim desenvolveram as linhagens CIM2GTAIL's com taxas de indução comparáveis aos indutores de clima temperado (Prigge et al., 2012; Prasanna et al., 2012; Chaikam et al., 2018). Os indutores CIM2GTAIL's já foram avaliados quanto a sua capacidade de indução e adaptação em ambientes do México e Quênia (Chaikam et al., 2018), Turquia (Kahriman et al., 2022) e na Índia (Kaur et al., 2023), revelando que a capacidade de indução a haploidia dos indutores se mantiveram em intervalos médios de 8% a 15% de TIH's (Chaikam et al., 2018). Entretanto, o potencial de adaptação agrônoma e taxas de indução destes indutores *per se* e suas combinações híbridas ainda não estão determinadas para as condições ambientais brasileiras. Desta forma, os objetivos deste artigo foram: a) determinar o potencial adaptativo e reprodutivo de seis genótipos indutores de haploidia em milho (três linhagens tropicalizadas desenvolvidas pelo CIMMYT e suas respectivas combinações híbridas), em diferentes épocas de semeadura, em Londrina, Paraná, Brasil; b) estimar o potencial de indução destes seis genótipos empregando oito

populações de milho superdoce tropicais, como doadoras de linhagens; c) identificar a ocorrência de efeitos de interação indutores x populações doadoras de milho superdoce quanto as taxas de indução à haploidia.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 MATERIAL VEGETAL E PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Durante a segunda safra de 2021, as linhagens indutoras CIM2GTAIL-P1 (P1), CIM2GTAIL-P2 (P2) e CIM2GTAIL-P3 (P3), desenvolvidas e cedidas pelo CIMMYT, foram multiplicadas e cruzadas entre si (P1 x P2, P1 x P3 e P2 x P3) em casa de vegetação, do Laboratório de Melhoramento Genético (LMG), da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Paraná, Brasil, totalizando um conjunto de seis genótipos indutores maternos.

Os seis genótipos indutores e dois híbridos comerciais (DKB 390 e P30F53, pertencentes as empresas Bayer e Pioneer, respectivamente), utilizados como testemunhas, foram avaliados à campo na Fazenda Escola da UEL – FAZESC (23°20'S; 51°33'W; altitude 576 m; clima subtropical úmido mesotérmico), quanto ao potencial agrônômico adaptativo e reprodutivo, em seis épocas de semeadura (setembro e novembro de 2021; janeiro, fevereiro, outubro e novembro de 2022), simulando diferentes condições ambientais. Os experimentos foram conduzidos empregando o delineamento em blocos completamente casualizados, com três repetições, em parcelas de seis fileiras de 4,0 m de comprimento, no espaçamento 0,80 x 0,20 m, visando uma densidade populacional de 62.500 plantas ha⁻¹. Apenas as quatro fileiras centrais de cada parcela foram utilizadas para coleta de dados. Os experimentos foram conduzidos segundo as recomendações técnicas para a cultura, mas sem a aplicação de fungicidas, com o objetivo de avaliar a resistência natural destes genótipos a doenças fúngicas.

3.2.2 COLETA DE DADOS FENOTÍPICOS DOS INDUTORES

Os genótipos foram avaliados para 20 características fenotípicas: 1) florescimento feminino médio (FFM) - dias entre a semeadura até o momento em que 50% das espigas apresentaram exteriorização de pelo menos 1 cm do estilo-estigma; 2) início do florescimento masculino (IFM) – dias entre a semeadura até a liberação de pólen nos primeiros pendões da parcela; 3) florescimento masculino médio (FMM) – dias desde a semeadura até o momento em que 50% das plantas apresentavam 1/3 do pendão com anteras liberando pólen; 4) término do

florescimento masculino (TFM) – dias entre a semeadura das plantas até o término da emissão de pólen nos pendões da parcela; 5) Amplitude da antese masculina (TFM-IFM); 6) tamanho da haste principal do pendão (THP) - medida do ponto da inserção da folha bandeira até o final da haste central do pendão (cm); 7) tamanho do pendão (TP) – com base em três notas (1 = pequeno, 2 = médio e 3 = grande), por meio da observação geral da parcela; 8) ramificações do pendão (RP) - contagem do número de ramos primários que se ramificaram diretamente na haste principal; 9) altura da planta (AP) - medida da superfície do solo até a inserção da folha bandeira (cm); 10) altura da espiga (AE) - distância da superfície do solo até o ponto de inserção da espiga superior (cm); 11) estande de plantas (ST) – contagem do número de plantas da parcela; 12) produtividade de grãos corrigidos (PGC) - pesagem de grãos das parcelas, corrigida para estande ideal e para 13,5% de umidade, extrapolados para kg ha⁻¹; 13) peso de mil sementes (P1000) - pesagem da amostra de mil sementes de cada parcela (g); 14) diâmetro médio de espiga (DE); 15) comprimento médio de espigas (CE); 16) número médio de fileiras de grãos (NFG); 17) número médio de grãos por fileira (NGF); 18) porcentagem de plantas com diplodia (DIPLO, em %) – relação do número de plantas da parcela com sintomas visíveis de *Diplodia* spp., causada por *Stenocarpella* spp., dividido pelo ST; 19) porcentagem de plantas com enfezamento (ENF, em %) - relação do número de plantas da parcela com sintomas visíveis de enfezamento, dividido pelo ST; 20) Nota de severidade para *Exserohilum Turcicum* (ET) – de 1 (alta resistência) a 6 (alta suscetibilidade), segundo o diagrama AGROCERES (1996). As características THP, NRP, AP e AE foram estimadas com base na média de 12 medições por parcela. As características CE, DE, NFG e NGF foram estimados com base na média de cinco espigas representativas por parcela.

3.2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

As análises de variâncias individuais foram realizadas com base nos totais de tratamentos, segundo o modelo de blocos completamente casualizados a seguir:

onde: y_{ij} é a observação do i -ésimo genótipo no j -ésimo bloco; \bar{y} é a média geral do experimento; μ_j é o efeito aleatório do j -ésimo bloco; α_i é o efeito fixo do i -ésimo

genótipo; é o erro aleatório da observação do i -ésimo genótipo no j -ésimo bloco.

Após a verificação da existência de homogeneidade das variâncias dos erros entre os experimentos das diferentes épocas, por meio do teste de F máximo (Pimentel, 1987), foram realizadas as análises de variâncias conjuntas para as diferentes épocas de cultivo, conforme o modelo a seguir:

onde: y_{ijk} é a observação do i -ésimo genótipo, no j -ésimo bloco, da k -ésima época; μ é a média geral dos experimentos; α_i é o efeito fixo do i -ésimo genótipo; β_k é o efeito aleatório do k -ésima época; γ_{ij} é o efeito aleatório da interação do i -ésimo genótipo com o k -ésima época; δ_{jk} é o efeito aleatório do j -ésimo bloco dentro da k -ésima época; ϵ_{ijk} é o erro aleatório da observação do i -ésimo genótipo, no j -ésimo bloco, da k -ésima época.

As médias dos genótipos dentro de cada época de semeadura foram agrupadas pelo teste de Scott & Knott, em nível de 5% de probabilidade e empregadas na estimação dos efeitos de heterose (h) nas combinações das linhagens indutoras, por meio da expressão:

onde: h_{ij} é a observação da heterose obtida na combinação entre o i -ésimo e o j -ésimo genitor; \bar{h} é a média observada para o híbrido resultante do cruzamento; \bar{h}_i é a média observada para o i -ésimo genitor; \bar{h}_j é a média observada para o j -ésimo genitor;

A partir das médias dos tratamentos foram estimadas as correlações de Pearson entre PGC com as demais características agrônômicas, sendo empregada a estatística t , em nível de 5% de probabilidade.

3.2.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE INDUÇÃO À HAPLOIDIA

Na safra 2021/2022, na FAZESC foram realizadas as combinações entre seis genótipos indutores e oito populações doadoras de milho superdoce tropical homozigóticas para o gene *shrunken-2* (sh_2) (PD2004, PD2005, PD2006, SD3001, SD3002, SD3003, SD3005 e SD3006), desenvolvidas pelo LMG.

As populações doadoras foram dispostas em blocos de seis fileiras de 16 m de comprimento, no espaçamento 0,80 x 0,20 m. Os indutores foram

conduzidos em blocos de oito fileiras de 10 m de comprimento, nos mesmos espaçamentos das populações, sendo suas fileiras divididas em duas épocas de semeadura, cinco e dez dias após a semeadura das populações, visando gerar sincronismo entre os florescimentos feminino das populações e masculino dos indutores. As polinizações foram realizadas manualmente, obtendo-se aproximadamente 30 espigas F_1 's induzidas para cada uma das 48 combinações.

As espigas F_1 's resultantes de cada combinação, foram colhidas e classificadas em dois grupos: não segregantes (100% de sementes marcadas com coloração púrpura) e segregantes, onde apenas parte das sementes apresentaram marcação púrpura, resultantes da inibição da expressão do gene *R1-nj*.

As sementes induzidas foram classificadas pela expressão do gene *R1-nj*, por meio da presença ou ausência da marcação de antocianina, sendo separadas em três categorias: a) diploides (sementes lisas que expressam a pigmentação no endosperma e no embrião); b) haploides putativos (sementes lisas que expressam a pigmentação somente no endosperma, mantendo o embrião sem antocianina); c) diploides resultantes de contaminação ou da inibição da expressão do gene *R1-nj* (sementes lisas ou enrugadas sem nenhuma marcação).

A taxa de indução haploide (TIH) das diferentes populações induzidas, foi avaliada pela razão entre o número de sementes haploides putativas (SHP) obtidas pelo total de sementes marcadas. A taxa de indução real (TIR) foi confirmada com a identificação e subtração dos falsos haploides (diploides erroneamente considerados como haploides, devido a falhas no processo de classificação de sementes), entre as SHP de cada população, no estágio V_2 . Os falsos haploides apresentam vigor elevado e padrões morfológicos típicos de diploides, com a presença de coloração púrpura na primeira bainha foliar, característica peculiar do indutor e ausente nas populações superdoces, conforme observado em estudo realizado por Sekiya et al. (2020), utilizando as mesmas populações. A partir das observações das taxas de falsos haploides (TFH) dentro das SHP de cada população, foram estimadas as taxas de indução real (TIR), apresentada a seguir: .

As análises de TIH e TIR foram realizadas por meio do desdobramento do teste de Qui-Quadrado (χ^2), para comparar as taxas de sucesso e insucesso obtidas com a indução, avaliando as médias dos genótipos indutores

dentro de cada população doadora e a média das populações doadoras em cada genótipo indutor segundo a expressão:

onde: n_i é o número total de indivíduos do i -ésimo tratamento; $n_{i,s}$ corresponde ao número total de indivíduos do i -ésimo tratamento que obtiveram sucesso; p_i é a proporção de sucesso do i -ésimo tratamento, dado pela razão $n_{i,s}/n_i$; \bar{p} é a proporção média de sucesso considerando os tratamentos conjuntamente, dado pela razão $\Sigma n_{i,s}/\Sigma n_i$.

3.3 RESULTADOS

A partir do cruzamento manual de seis genótipos indutores e oito populações de milho superdoce foi obtido um total de 1515 espigas, cerca de 166 a 335 espigas induzidas por indutor e 153 a 235 espigas induzidas de cada população. Foram obtidas de 17876 a 35620 sementes marcadas por população, sendo identificadas de 2354 a 4536 SHP's (Tabela 3.1).

A inibição da expressão do gene *R1-nj* foi observada em apenas quatro populações (PD2004, PD2005, PD2006 e SD3001), em um total de 244 espigas, com inibição parcial ou total das sementes de cada espiga (Tabela 3.1). Estas espigas produziram cerca de 50% de sementes não marcadas por população. Por meio da expressão fenotípica da primeira bainha foliar verde das plântulas foi possível discriminar haploides e diploides, dentre as plântulas originadas das sementes F_1 's com inibição da expressão do gene *R1-nj*, pois é uma característica recessiva. A população SD3001 apresentou a maior frequência do alelo inibidor (0,47), superando os valores observados para PD2004, PD2005 e PD2006, com frequências entre 0,08 e 0,11 (Tabela 3.1). Assim, para as sementes não marcadas nas populações PD2004, PD2005, PD2006 e SD3001 foram observadas taxas médias de induções entre 6,5% e 13,7%, empregando o fenótipo da primeira bainha foliar verde.

Tabela 3.1 - Quantificações de espigas induzidas sem e com segregação para a expressão do gene *R1-nj*; números de sementes haploides putativas, diploides e sem marcação de antocianina; frequência do alelo inibidor da expressão do gene *R1-nj*, porcentagem de sementes com inibição e porcentagem de indivíduos haploides dentro das sementes sem marcação.

| Indutores | CIM2GTAIL's | | | | | | | |
|--|-------------|--------|--------|---------|---------|---------|--------|--------|
| | P1 | P2 | P3 | P1 x P2 | P1 x P3 | P2 x P3 | | |
| Número total de espigas induzidas | 257 | 245 | 335 | 166 | 281 | 231 | | |
| Número de sementes marcadas | 31353 | 33352 | 43284 | 23442 | 36097 | 28285 | | |
| Sementes haploides putativas | 4711 | 3605 | 4864 | 2868 | 4813 | 3375 | | |
| Sementes diploides | 26642 | 29747 | 38420 | 20574 | 31284 | 24910 | | |
| Populações induzidas | PD2004 | PD2005 | PD2006 | SD3001 | SD3002 | SD3003 | SD3005 | SD3006 |
| Número total de espigas induzidas | 235 | 192 | 179 | 183 | 216 | 176 | 181 | 153 |
| Espigas sem a ocorrência de sementes com inibição do gene <i>R1-nj</i> | | | | | | | | |
| Número de espigas | 197 | 152 | 145 | 51 | 216 | 176 | 181 | 153 |
| Sementes haploides putativas | 4110 | 2675 | 2478 | 1043 | 3253 | 2965 | 2661 | 2354 |
| Sementes diploides | 28401 | 19657 | 18768 | 6276 | 25542 | 20565 | 19666 | 16263 |
| Espigas segregantes com a ocorrência de sementes com inibição do gene <i>R1-nj</i> | | | | | | | | |
| Número de espigas | 38 | 40 | 34 | 132 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Frequência do alelo inibidor | 0,084 | 0,110 | 0,100 | 0,472 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Sementes haploides putativas | 426 | 457 | 315 | 1499 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Sementes diploides | 2683 | 2669 | 2029 | 9058 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Sementes lisas e não marcadas | 2756 | 2783 | 2260 | 11052 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Porcentagem de sementes com inibição | 47,0% | 47,1% | 49,1% | 51,1% | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Amostra de sementes não marcadas e semeadas | 200 | 400 | 400 | 2400 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Porcentagem de germinação | 91,5% | 86,0% | 84,0% | 71,2% | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Haploides dentro das sementes não marcadas | 13,7% | 11,9% | 6,5% | 7,0% | 0 | 0 | 0 | 0 |

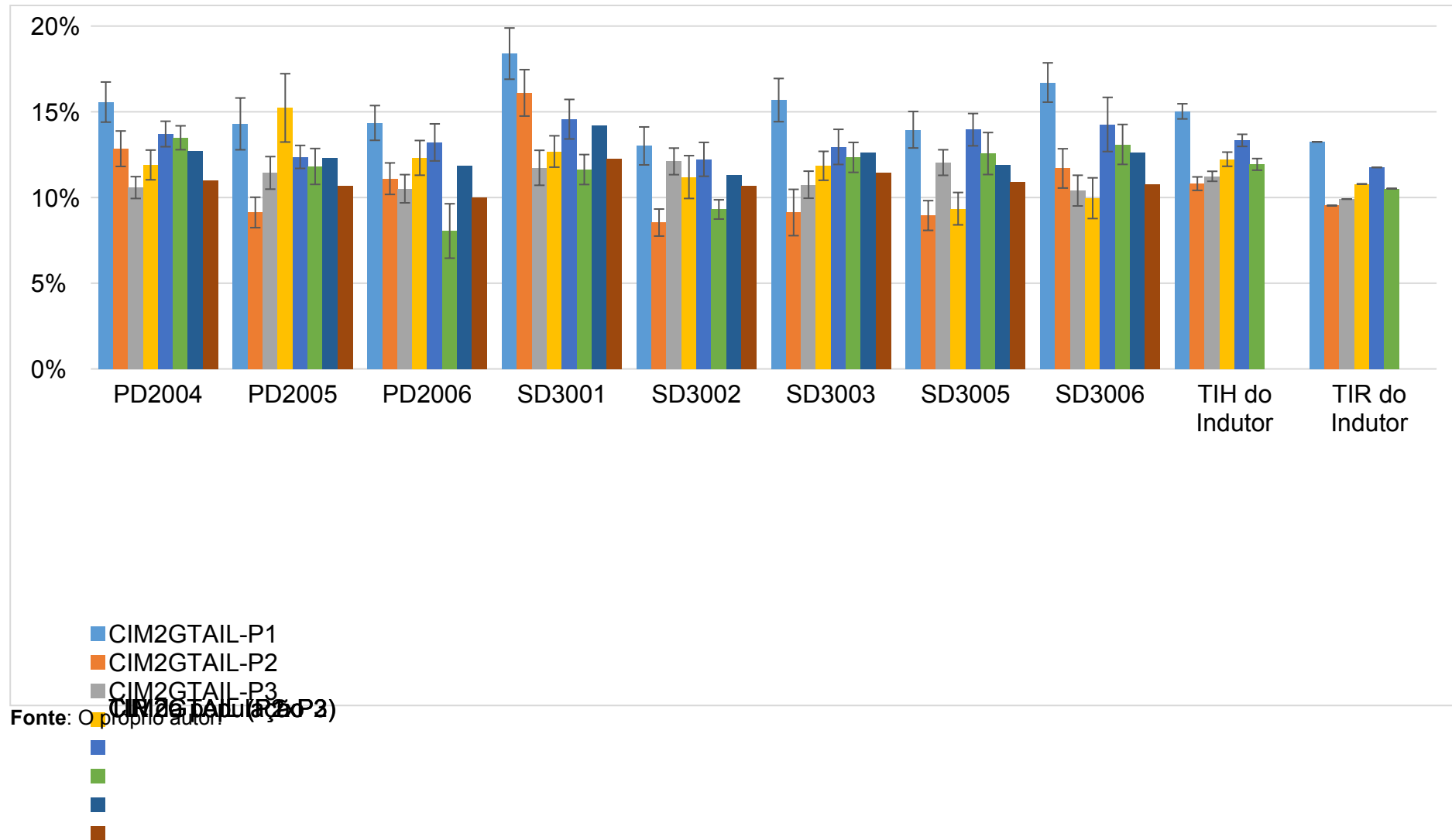
Fonte: O próprio autor.

Os genótipos indutores se diferenciaram quanto as médias gerais de TIH com base na marcação das sementes pela expressão do gene *R1-nj* e de TIR, após a eliminação dos falsos haploides durante o processo de obtenção de DH's, sobre oito populações de milho superdoce doadoras (Figura 3.1). A TIR foi de 1,3% (CIM2GTAIL-P2) a 1,8% (CIM2GTAIL-P1) menor que a TIH média. Contudo, estas diferenças não foram suficientes para alterar o posicionamento do desempenho médio de indução dos genótipos indutores sobre as populações de milho superdoce. Assim, considerando TIH e TIR média de populações, respectivamente, o indutor *per se* CIM2GTAIL-P1 se destacou com taxas iguais a 15,0% e 13,2%, seguido pela combinação CIM2GTAIL-P1 x CIM2GTAIL-P3 com estimativas de 13,3% e 11,8%. Os outros dois indutores *per se* ficaram agrupados e diferiram das outras duas combinações híbridas de indutores, apresentando cerca de 11% e 12% de TI e 10% e 11% de TIR, respectivamente. De igual modo, com base no efeito médio do conjunto dos seis indutores, as TIH's e TIR's observadas para cada população doadora se diferenciaram, com TIR de 0,6% (SD3002) a 2,0% (SD3001) menores que o observado para TIH.

As heteroses para TIR's, estimadas com base na superioridade do desempenho do indutor F_1 em relação à média dos seus indutores genitores, foram iguais a -0,6%, 0,2% e 0,8%, para as combinações CIM2GTAIL-P1 x CIM2GTAIL-P2, CIM2GTAIL-P1 x CIM2GTAIL-P3 e CIM2GTAIL-P2 x CIM2GTAIL-P3, respectivamente.

A população SD3001, embora tenha apresentado a maior frequência do alelo inibidor na expressão do gene *R1-nj* e de sementes não marcadas, apresentou as maiores médias de TIH e TIR, com valores iguais a 14,2% e 12,3%, respectivamente. Nas demais populações foram observadas TIR médias de seis indutores entre 10,0% e 11,5%. As combinações entre indutores e populações apresentaram estimativas de TIH's diferenciadas, indicando a ocorrência de interação indutor x população (Figura 3.1). Contudo, o indutor CIM2GTAIL-P1 esteve entre as melhores estimativas de TIH para todas as populações doadoras de milho superdoce, mas não diferiu das TIH's observadas pelos cruzamentos entre os indutores CIM2GTAIL-P2 com SD3001 e CIM2GTAIL-P3 com SD3002; nem nas combinações F_1 's dos indutores CIM2GTAIL-P1 x CIM2GTAIL-P3 nos cruzamentos com PD2006, SD3002, SD3005 e SD3006; CIM2GTAIL-P1 x CIM2GTAIL-P2 com PD2005 e SD3002 e de CIM2GTAIL-P2 x CIM2GTAIL-P3 com SD3005.

Figura 3.1 – Médias (em %) e respectivos desvios padrões da média para taxa de indução obtidas em oito populações de milho superdoce induzidas a haploidia por linhagens CIM2GTAIL's e suas combinações híbridas; Taxa de indução haploide média (TIH) com base na marcação do gene *R1-nj* e Taxa de indução média real (TIR), onde colunas seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente pelo teste de qui-quadrado (χ^2) em nível de 5% de probabilidade.



Além dos genótipos indutores apresentarem elevada taxa de indução de haploidia, é necessário que eles também sejam adaptados ao ambiente de cultivo, apresentando uma série de características agronômicas que viabilizem a sua utilização na obtenção de indivíduos haploides. Neste sentido, os indutores CIM2GTAIL's e duas testemunhas híbridas comerciais, de ciclo precoce, adaptadas e amplamente utilizadas em diferentes regiões do Brasil, foram avaliados em seis experimentos, em diferentes anos e épocas de semeadura. As análises de variâncias individuais revelaram homogeneidade de variâncias do erro, permitindo a análise de variância conjunta, sendo observados coeficientes de variação experimental adequados para todas as características estudadas (Tabela 3.2).

As análises de variâncias conjuntas revelaram efeitos significativos dos experimentos em diferentes épocas de semeadura e da interação experimento x tratamento para todas as características avaliadas, não sendo observado efeitos significativos de tratamentos apenas para a amplitude da antese masculina (Tabela 3.2).

As médias de dias para a antese masculina e feminino de tratamentos nos diferentes experimentos variaram de 52 a 74 dias para os indutores e de 56 a 69 dias para as testemunhas (Tabela 3.3). Em função da safra e da época de cultivo, houve uma oscilação expressiva dos dias necessários para florescimento masculino e feminino, com diferenças de 10 a 15 dias dos genótipos indutores e de 11 a 13 dias para as testemunhas.

O intervalo de polinização, dado pela amplitude da antese masculina, foi menor nos experimentos semeados em janeiro e fevereiro de 2022, quando as condições foram menos favoráveis, devido aos estresses ambientais provocados pela maior ocorrência de doenças, sendo a redução mais intensa observada nas linhagens indutoras e nas testemunhas, com valores entre 5 e 7 dias. Os híbridos indutores apresentaram as maiores amplitudes de florescimento masculino, com valores entre 7 e 12 dias nos diferentes ambientes, se igualando ou superando a amplitude de pelo menos um dos híbridos utilizados como testemunha.

No geral, com base nas médias das características associadas à maior produção de pólen, os híbridos indutores superaram todas as linhagens indutoras quanto ao tamanho da haste principal e ao tipo de pendão. Contudo, a linhagem CIM2GTAIL-P3 apresentou uma média de número de ramificações do

pendão, que foi superada apenas pelo híbrido indutor CIM2GTAIL-P1 x CIM2GTAIL-P3.

Tabela 3.2 – Resumo da análise de variância conjunta, quadrados médios e níveis de significância para caracterização agrônômica e componentes de rendimento de seis indutores de haploidia (CIM2GTAIL's) e duas testemunhas comerciais para seis épocas de cultivo durante as safras 2021/2022, 2022/2022 e 2022/2023.

| Características | Exp | Trat | Exp x Trat | Erro | Média | CV% |
|------------------------------------|------------|-------------|-------------------|-------------|--------------|------------|
| GL | 5 | 7 | 34 | 80 | | |
| Flor feminino médio | 492,53* | 84,300* | 4,9374* | 0,8451 | 61,5 | 1,5 |
| Flor masculino médio | 575,14* | 103,29* | 2,7580* | 0,5476 | 60,2 | 1,2 |
| Amplitude da antese | 21,520* | 6,0692ns | 3,8093* | 0,7562 | 8,0 | 10,9 |
| Tamanho da haste principal | 363,91* | 564,58* | 9,5476* | 2,9685 | 40,5 | 4,3 |
| Tamanho de pendão | 0,4602* | 10,554* | 0,1780* | 0,0509 | 2,4 | 9,5 |
| Ramificações do pendão | 22,582* | 130,40* | 4,9650* | 0,9836 | 10,6 | 9,4 |
| Altura de planta | 24266* | 18738* | 453,98* | 48,375 | 179 | 3,9 |
| Altura de espiga | 8843,1* | 6921,6* | 175,65* | 25,064 | 97,0 | 5,1 |
| GL | 4 | 7 | 27 | 62 | | |
| Produtividade de grãos | 83,587* | 167,67* | 4,7249* | 0,1962 | 5,30 | 8,4 |
| Peso de mil grãos | 85660* | 70383* | 2035,5* | 273,98 | 306 | 5,4 |
| Diâmetro de espiga | 2,2505* | 8,4617* | 0,2597* | 0,0142 | 4,10 | 2,9 |
| Comprimento de espiga | 21,981* | 132,45* | 2,7189* | 0,2379 | 14,1 | 3,5 |
| Número de fileiras de grãos | 11,219* | 29,300* | 2,6064* | 0,3248 | 14,6 | 3,9 |
| Número de grãos por fileira | 52,593* | 911,83* | 13,692* | 1,6482 | 23,2 | 5,5 |
| GL | 4 | 7 | 27 | 66 | | |
| % Plantas com diplodia | 56,908* | 41,142* | 4,4553* | 0,0446 | 16,6 | 6,2 |
| % Plantas com enfezamento | 208,53* | 45,224* | 6,8295* | 0,2964 | 31,4 | 12,1 |
| GL | 3 | 7 | 20 | 53 | | |
| Nota severidade <i>E. turcicum</i> | 3,5974* | 0,6071* | 0,1237* | 0,0652 | 3,1 | 13,9 |

Notas: GL= graus de liberdade; Exp= épocas de semeadura; Trat= tratamentos; CV%= coeficiente de variação; ns, *= não significativo e significativo em nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Fonte: O próprio autor.

No geral, os híbridos indutores apresentaram alturas de planta maiores que as linhagens indutoras e menores que as testemunhas comerciais e, mesmo em condições mais adversas de ambiente, alcançaram altura suficiente para polinizar as espigas das testemunhas (Tabela 3.3). As linhagens indutoras foram significativamente mais baixas que as testemunhas, chegando a ter altura de planta menor que a altura das espigas das testemunhas, principalmente nas condições ambientais desfavoráveis, observada para os experimentos semeados em janeiro e fevereiro de 2022.

Tabela 3.3 – Análise do desempenho agrônômico médio de seis indutores de haploidia (CIM2GTAIL's) e duas testemunhas comerciais para seis épocas de semeadura durante as safras 2021/2022, 2022/2022 e 2022/2023.

| Semeadura | P1 | P2 | P3 | P1xP2 | P1xP3 | P2xP3 | P30F53 | DKB390 |
|--|------|------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|
| Florescimento feminino médio (dias) | | | | | | | | |
| Set 21 | 69b | 68b | 74a | 66c | 67c | 66c | 69b | 69b |
| Nov 21 | 59c | 58d | 66a | 56e | 57e | 56e | 60c | 61b |
| Jan 22 | 59b | 58b | 61a | 52c | 57b | 57b | 57b | 57b |
| Fev 22 | 61a | 62a | --- | 56b | 60a | 59a | 62a | 61a |
| Out 22 | 67d | 64e | 70a | 64e | 64e | 63f | 68c | 69b |
| Nov 22 | 59a | 59a | 59a | 56c | 58b | 57b | 60a | 60a |
| Florescimento masculino médio (dias) | | | | | | | | |
| Set 21 | 70a | 68b | 71a | 63d | 65c | 63d | 68b | 68b |
| Nov 21 | 58d | 57d | 64a | 55e | 56e | 55e | 60c | 61b |
| Jan 22 | 56b | 54c | 60a | 52d | 54c | 52d | 56b | 56b |
| Fev 22 | 59b | 58b | --- | 54c | 55c | 55c | 60a | 59a |
| Out 22 | 67d | 64e | 70a | 64e | 64e | 62f | 68c | 69b |
| Nov 22 | 60a | 59a | 59a | 55c | 57b | 56c | 59a | 60a |
| Amplitude da antese masculina (dias) | | | | | | | | |
| Set 21 | 10b | 9c | 12a | 8c | 9c | 8c | 8c | 8c |
| Nov 21 | 9b | 8b | 7b | 9b | 11a | 10a | 9a | 9b |
| Jan 22 | 6c | 7b | 6c | 9a | 7b | 8a | 5c | 6c |
| Fev 22 | 5c | 5c | --- | 8a | 9a | 8a | 6b | 6b |
| Out 22 | 8a | 7a | 10a | 7a | 8a | 8a | 8a | 7a |
| Nov 22 | 8a | 8a | 9a | 7a | 9a | 8a | 8a | 8a |
| Tamanho da haste principal (cm) | | | | | | | | |
| Média | 32d | 36c | 34c | 46a | 43b | 45a | 43b | 44b |
| Tipo de pendão (notas: 1=pequeno; 2=médio; 3=grande) | | | | | | | | |
| Média | 1,0c | 1,7b | 1,6b | 2,9a | 2,7a | 3,0a | 3,0a | 2,9a |
| Número de ramificações do pendão | | | | | | | | |
| Média | 9,7c | 7,2d | 11,6b | 11,2b | 14,9a | 11,3b | 6,8d | 12,6b |
| Altura de planta (cm) | | | | | | | | |
| Set 21 | 144c | 125d | 148c | 180b | 182b | 174b | 200a | 203a |
| Nov 21 | 178d | 150e | 160e | 204c | 237b | 216c | 243b | 254a |
| Jan 22 | 101e | 130d | 94e | 168c | 142d | 159c | 181b | 210a |
| Fev 22 | 87g | 102f | --- | 157c | 124e | 142d | 166b | 185a |
| Out 22 | 170e | 150f | 185d | 199c | 217b | 202c | 232a | 238a |
| Nov 22 | 179d | 156e | 176d | 224c | 238b | 228c | 250a | 249a |
| Altura de espiga (cm) | | | | | | | | |
| Set 21 | 59e | 67d | 74d | 88c | 82c | 89c | 96b | 111a |
| Nov 21 | 88d | 88d | 92d | 108c | 126b | 121b | 133b | 145a |
| Jan 22 | 50e | 80d | 56e | 90c | 73d | 96c | 103b | 121a |
| Fev 22 | 39e | 62d | --- | 81c | 58d | 80c | 90b | 104a |
| Out 22 | 79c | 90c | 105b | 106b | 110b | 113b | 127a | 136a |
| Nov 22 | 89f | 101e | 87f | 127d | 133c | 145a | 139b | 144a |

Nota: Médias nas linhas seguidas das mesmas letras pertencem ao mesmo agrupamento de médias definido pelo teste de Scott & Knott em nível de 5% de probabilidade.

Fonte: O próprio autor.

O experimento semeado em janeiro de 2022 foi acometido por um vendaval na fase pós florescimento, não permitindo a coleta de dados de produtividade e da severidade de doenças, devido ao índice elevado de acamamento das plantas. Nos experimentos semeados em setembro de 2021, outubro e novembro de 2022, onde as épocas de semeadura são consideradas mais favoráveis para cultura do milho no Brasil, foram observadas uma menor frequência na severidade de doenças foliares e do complexo de enfezamento, sendo obtidas produtividades entre 1,93 e 3,35 t ha⁻¹ para as linhagens indutoras; 5,25 a 6,61 t ha⁻¹ para os indutores híbridos e de 10,88 a 15,14 t ha⁻¹ para os híbridos comerciais (Tabela 3.4). Em relação ao peso de 1000 grãos, foram observados valores variando de 242 a 299 g para as linhagens indutoras; 317 a 375 g para os indutores híbridos e de 420 a 470 g para os híbridos comerciais.

Os experimentos semeados em novembro de 2021 e fevereiro de 2022 se caracterizaram por expressar os ambientes mais desfavoráveis, sendo que neste último experimento ocorreu a perda das parcelas da linhagem indutora CIM2GTAIL-P3, devido ao elevado grau de severidade das doenças ocorridas (Tabela 3.4). Nestes experimentos foram observadas as maiores porcentagens de plantas com sintomas para o complexo de enfezamento e Diplodia, que resultaram em perdas expressivas de produtividade, sendo observados valores entre 0 e 1,36 t ha⁻¹ para as linhagens indutoras; 0,12 e 3,99 t ha⁻¹ para os indutores híbridos e 2,37 a 9,64 t ha⁻¹ para as testemunhas comerciais. No experimento semeado em fevereiro de 2022, o híbrido P30F53 chegou a apresentar 100% de plantas com sintomas do complexo de enfezamento e a menor produtividade entre as testemunhas. Assim, como discorrido para produtividade, foram observadas perdas expressivas no peso de 1000 grãos para estes experimentos.

Com base na produtividade de grãos corrigida para estande ideal e no peso de 1000 sementes, é possível estimar o número médio de sementes produzido por planta nas diferentes condições ambientais (Tabela 3.4). Assim, estimaram-se números de sementes por planta entre 40 e 219 para as linhagens indutoras, 22 e 313 para os indutores híbridos e 170 e 515 para as testemunhas comerciais. Na média dos ambientes avaliados, os indutores CIM2GTAIL-P1, CIM2GTAIL-P2, CIM2GTAIL-P3, CIM2GTAIL-P1 x CIM2GTAIL-P2, CIM2GTAIL-P1 x CIM2GTAIL-P3 e CIM2GTAIL-P2 x CIM2GTAIL-P3 produziram em média 145, 105, 156, 206, 213 e 209 sementes por planta, indicando que os F₁'s das combinações

híbridas dos indutores apresentam potencial de produzir cerca de 1,55 vezes mais sementes que as linhagens *per se*, com sementes maiores e maior reserva fisiológica para germinar. Esta vantagem poderia ser utilizada no caso de empregar híbridos triplos de linhagens indutoras, que mantenham níveis adequados de indução.

Tabela 3.4 - Análise de componentes de rendimento de seis indutores de haploidia (CIM2GTAIL's) e duas testemunhas comerciais em diferentes épocas nas safras 2021/2022, 2022/2022 e 2022/2023.

| Semeadura | P1 | P2 | P3 | P1xP2 | P1xP3 | P2xP3 | P30F53 | DKB390 |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|
| Produtividade de grãos (PGC, em t ha ⁻¹) | | | | | | | | |
| Set 21 | 3,31d | 2,61d | 2,98d | 5,25c | 6,06c | 5,67c | 12,89a | 10,88b |
| Nov 21 | 1,25e | 1,26e | 1,36e | 3,99c | 3,16d | 3,76c | 7,41b | 9,64a |
| Fev 22 | 0,11c | 0,26c | --- | 1,00c | 0,12c | 0,47c | 2,37b | 7,10a |
| Out 22 | 2,33e | 1,93e | 3,05d | 5,46c | 5,60c | 5,75c | 13,46b | 15,14a |
| Nov 22 | 3,35c | 1,97d | 3,05c | 5,82b | 6,61b | 6,26b | 13,19a | 12,41a |
| Peso de mil grãos (P ₁₀₀₀ , em g) | | | | | | | | |
| Set 21 | 242e | 251e | 279d | 317c | 346b | 343b | 449a | 432a |
| Nov 21 | 159d | 211c | 199c | 307b | 263b | 289b | 317b | 392a |
| Fev 22 | 64e | 103d | --- | 235b | 90d | 199c | 223b | 352a |
| Out 22 | 245e | 277d | 299d | 375b | 345c | 352c | 451a | 470a |
| Nov 22 | 269e | 281e | 268e | 361c | 337d | 364c | 420b | 450a |
| Número sementes por planta | | | | | | | | |
| Set 21 | 219 | 166 | 171 | 265 | 280 | 265 | 459 | 403 |
| Nov 21 | 126 | 96 | 109 | 208 | 192 | 208 | 374 | 394 |
| Fev 22 | 64 | 40 | --- | 69 | 22 | 38 | 170 | 323 |
| Out 22 | 152 | 111 | 163 | 233 | 260 | 262 | 477 | 515 |
| Nov 22 | 200 | 112 | 182 | 258 | 313 | 275 | 503 | 441 |
| Diâmetro de espiga (DE, em cm) | | | | | | | | |
| Máximo | 3,8 | 3,7 | 3,9 | 4,3 | 4,1 | 4,4 | 5,4 | 5,7 |
| Mínimo | 2,8 | 3,0 | 2,1 | 4,1 | 2,8 | 3,7 | 4,1 | 5,3 |
| Média | 3,4b | 3,4b | 3,3b | 4,2b | 3,8b | 4,0b | 5,0a | 5,5a |
| Comprimento de espiga (CE, em cm) | | | | | | | | |
| Máximo | 14,6 | 13,5 | 15,0 | 15,7 | 15,4 | 15,1 | 16,7 | 17,2 |
| Mínimo | 11,3 | 10,5 | 8,8 | 14,4 | 13,7 | 13,8 | 15,9 | 16,1 |
| Média | 13,2f | 12,4g | 12,6g | 15,2c | 14,8d | 14,4e | 16,3b | 16,7a |
| Número de fileiras de grãos na espiga (NFG) | | | | | | | | |
| Máximo | 11,4 | 13,0 | 11,7 | 15,3 | 13,9 | 15,3 | 19,4 | 19,5 |
| Mínimo | 7,9 | 9,5 | 8,3 | 14,0 | 9,4 | 13,1 | 14,2 | 17,1 |
| Média | 10,2c | 11,4c | 10,3c | 14,7b | 12,7c | 14,4b | 18,1a | 18,6a |
| Número de grãos por fileira (NGF) | | | | | | | | |
| Máximo | 17,1 | 21,0 | 16,7 | 24,1 | 21,9 | 25,3 | 38,0 | 37,0 |
| Mínimo | 11,2 | 11,9 | 8,0 | 20,1 | 17,3 | 20,9 | 28,5 | 34,3 |
| Média | 15,0e | 18,0d | 13,7f | 21,7b | 19,6c | 22,6b | 35,5a | 35,6a |

Nota: Médias nas linhas seguidas das mesmas letras pertencem ao mesmo agrupamento de médias definido pelo teste de Scott & Knott em nível de 5% de probabilidade.

Fonte: O próprio autor.

Por meio da predição de médias, baseada no desempenho dos híbridos F_1 's, é possível estimar taxas de indução real iguais a 11,1%, 10,7% e 11,3% para os híbridos triplos resultantes dos cruzamentos (CIM2GTAIL-P1 x CIM2GTAIL-P2) x CIM2GTAIL-P3, (CIM2GTAIL-P1 x CIM2GTAIL-P3) x CIM2GTAIL-P2 e (CIM2GTAIL-P2 x CIM2GTAIL-P3) x CIM2GTAIL-P1, respectivamente.

Para as características de espiga como diâmetro, comprimento, número de fileiras de grãos e número de grãos por fileira, foi dado ênfase nos resultados de médias dos tratamentos para os cinco experimentos, pois sumariza melhor o desempenho de cada grupo de genótipos, como pode ser constatado pelos valores máximos e mínimos observados (Tabela 3.4). De modo geral, o desempenho dos híbridos indutores para estas características foi inferior ao das testemunhas, mas frequentemente superou as linhagens indutoras ou não diferiram destas.

Dentre os genótipos avaliados, apenas o híbrido DKB390 apresentou tolerância ao complexo de enfezamento, sendo observada a redução mais drástica da produtividade e das características das espigas e na contagem de grãos para todos os seis genótipos indutores avaliados, quando em condições de epidemia desta doença (Tabela 3.5).

Em situação de epidemia severa, as linhagens indutoras apresentaram 100% de plantas com sintomas visíveis do ataque de *Diplodia*, sendo observado para as mesmas condições um máximo de 26,6% de plantas sintomáticas nos híbridos indutores (Tabela 3.5). A linhagem indutora CIM2GTAIL-P2 foi o genótipo que apresentou a maior porcentagem de plantas com sintomas de *Diplodia* em todos os experimentos.

Os resultados observados para nota de severidade à mancha de *E. turcicum* revelam que os indutores apresentaram mediana resistência a mediana suscetibilidade, enquanto as testemunhas se apresentaram com maior resistência para esta característica.

A produtividade de grãos apresentou correlações positivas e elevadas com peso de mil sementes, diâmetro e comprimentos de espigas, número de fileiras de grãos nas espigas e número de grãos por fileira, mas negativas e significativas para notas de severidade à mancha de *E. turcicum*, porcentagens de plantas com *diplodia* e do complexo enfezamento (Tabela 3.5).

Tabela 3.5 - Análise do grau de severidade a doenças de seis indutores de haploidia (CIM2GTAIL's) e duas testemunhas comerciais em diferentes épocas nas safras 2021/2022, 2022/2022 e 2022/2023.

| Semeadura | P1 | P2 | P3 | P1xP2 | P1xP3 | P2xP3 | P30F53 | DKB390 |
|---|-------------------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Porcentagem de plantas com diplodia (DIPLO, em %) | | | | | | | | |
| Set 21 | 0,0b | 65,7a | 0,0b | 0,0b | 0,0b | 0,0b | 0,0b | 0,0b |
| Nov 21 | 13,4c | 33,1a | 20,4b | 13,2c | 10,4c | 22,4b | 5,0d | 5,5d |
| Fev 22 | 100,0a | 100,0a | --- | 26,6b | 25,6b | 23,4b | 19,9c | 4,9d |
| Out 22 | 5,4b | 41,3a | 5,5b | 5,2b | 5,7b | 5,5b | 4,9b | 4,8b |
| Nov 22 | 4,7c | 37,6a | 4,8c | 5,2b | 5,1b | 4,7c | 4,4d | 4,8c |
| Porcentagem de plantas com complexo enfezamento (ENF, em %) | | | | | | | | |
| Set 21 | 8,0b | 25,3a | 18,5a | 9,5b | 7,5b | 19,1a | 1,6c | 0,4c |
| Nov 21 | 72,6b | 88,9a | 87,4a | 32,7c | 55,8b | 63,4b | 28,9c | 0,0d |
| Fev 22 | 100,0a | 100,0a | --- | 100,0a | 100,0a | 100,0a | 100,0a | 0,0b |
| Out 22 | 5,4b | 24,3a | 4,1b | 0,9c | 0,5c | 1,4c | 0,0c | 0,0c |
| Nov 22 | 8,0a | 12,1a | 12,0a | 9,1a | 4,6a | 6,9a | 0,4b | 0,7b |
| Nota severidade <i>E. turcicum</i> (nota 1= alta resistência a 6= alta suscetibilidade) | | | | | | | | |
| Set 21 | 5,3a | 5,7a | 5,7a | 4,0b | 3,7b | 3,7b | 3,3b | 2,0c |
| Nov 21 | 3,0a | 3,0a | 3,0a | 3,3a | 4,7a | 2,7a | 1,3b | 1,7b |
| Fev 22 | 5,0a | 5,0a | --- | 5,3a | 5,7a | 3,7b | 3,0b | 2,0c |
| Nov 22 | 1,0a | 3,7a | 1,4a | 1,0a | 1,0a | 1,0a | 1,0a | 1,0a |
| Correlação de PGC com demais características | | | | | | | | |
| | P ₁₀₀₀ | DE | CE | NFG | NGF | DIPLO | ENF | ET |
| PGC | 0,90* | 0,89* | 0,71* | 0,88* | 0,85* | -0,51* | -0,66* | -0,59* |

Nota: Médias nas linhas seguidas das mesmas letras pertencem ao mesmo agrupamento de médias definido pelo teste de Scott & Knott em nível de 5% de probabilidade; * = Correlação de Pearson empregando estatística t, em nível de 5% de probabilidade.

Fonte: O próprio autor.

3.4 DISCUSSÃO

O emprego dos indutores CIM2GTAIL's, para a obtenção de SHP's de populações doadoras de milho superdoce, permitiu produzir quantidades de sementes com marcação do gene *R1-nj* suficientes para condução dos experimentos e com tamanho amostral adequado para estimar as TIH's e TIR's dos indutores (Tabela 3.1). As amostras empregadas foram significativamente maiores que as utilizadas em diversos trabalhos com milhos comuns e especiais (Prigge et al., 2011; Chaikam et al., 2016; Chaikam et al., 2018; Korkut & Cengiz, 2022; Kaur et al., 2023).

Segundo Tracy (2001), os genótipos de milho superdoce frequentemente carregam o alelo *C1-I*, o que dificulta a identificação dos haploides via marcação de sementes pelo gene *R1-nj*. Contudo neste estudo, apenas metade das populações de milho superdoce apresentaram uma parte das espigas com

inibição da coloração de antocianina nas sementes, tendo diferentes frequências de ocorrência de espigas com inibição e variação do número de sementes sem coloração púrpura por espiga. A variação nas frequências de espigas e nas frequências alélicas do gene de inibição destacou as diferentes origens das populações de milho superdoce. As populações PD são originárias de ambientes tropicais, enquanto as populações SD têm origem em ambientes temperados.

Normalmente, a literatura cita a ocorrência de inibição da expressão do gene *R1-nj*, principalmente em germoplasma tropical, promovida por genes inibidores tais como *C1-I*, *C2-Idf* e *in-ID* (Prasanna et al., 2012; Chaikam et al., 2015), mas não apresentam as taxas de indução à haploidia ocorridas nas populações e suas sementes com inibição da marcação de antocianina. Neste estudo verificou-se que as TIR's foram similares, independentemente da inibição da marcação de antocianina. Isso indica que a presença de genes inibidores não influenciou na taxa de indução e que a seleção via coloração verde da primeira bainha foliar foi eficiente para identificar haploides nas populações analisadas, como observado por Sekyia et al. (2020).

Assim, em populações como estas de milho superdoce, que também possuem a característica da cor da primeira bainha foliar verde, é possível identificar plântulas haploides mesmo com inibição da expressão do gene *R1-nj* ou utilizá-las em cruzamentos para testes precoces de seleção de progênies indutoras, visando o melhoramento da taxa de indução, como se pode fazer com genótipos contendo o gene *liguleless* (Prasanna et al., 2012).

Como os indutores são homozigotos dominantes para o gene que confere a cor púrpura na primeira bainha foliar e as plântulas F_1 's diploides apresentam este mesmo fenótipo, na ocorrência de genes inibidores em populações doadoras, é importante empregar indutores com mais de uma característica de marcação para diferenciar plântulas haploides e diploides (Choe et al., 2012; Melchinger et al., 2014; Wang et al. 2016; Souza et al., 2024), especialmente antes do tratamento de duplicação cromossômica com soluções antimitóticas algo ainda não disponível nos indutores CIM2GTAIL's utilizados neste estudo.

As taxas médias de indução TIH e TIR observadas para as três linhagens indutoras e suas combinações híbridas em cruzamentos com as populações de milho superdoce, em ambiente tropical no Brasil foram semelhantes as taxas observadas para os indutores do CIMMYT em cruzamento com diferentes

genótipos de milho no México e Quênia (Chaikam et al., 2018), Turquia (Kahriman et al., 2022) e na Índia (Kaur et al., 2023), revelando que a capacidade de indução a haploidia dos indutores se mantém em intervalos médios de 8% a 15% de TIH's, com destaques diferenciados de indutores conforme o ambiente e populações induzidas, superando os indutores TAIL's (Chaikam et al., 2018). Estes indutores apresentaram TIH's e TIR's comparáveis aos indutores de origem temperada, avaliados em seu ambiente de origem, onde são relatadas TIH's de 6,0 a 7,9% para KEMS (Shatskaya et al., 1994); 8% para RWS (Röber et al., 2005); 9% a 10% para RWK-76 (Geiger, 2009); 8% a 15% para UH400 (Chang & Coe, 2009); 6,5% a 7,2% para MHI e 12,1% a 14,5% para PHI's (Rotarenco et al., 2010); 11% a 14% para BHI201 e BHI306 (Liu et al., 2016).

As heteroses das combinações híbridas entre as linhagens indutoras avaliadas para TIH's indicaram que os efeitos aditivos foram mais importantes para as taxas de indução, que os desvios de dominância. Da mesma forma, as heteroses que podem ser estimadas a partir das médias de TIH observadas no trabalho de Chaikam et al. (2018) foram: -0,3% para TAIL9 x TAIL8; -1,9% para CIM2GTAIL009 x CIM2GTAIL006 e 1,8% para RWS x UH400; e no trabalho de Prigge et al. (2011) uma média de 1,5% para RWS x UH400 para diferentes populações doadoras. Em todos os casos, o efeito de heterose não contribuiu para aumentar ou reduzir a TIH em mais do que 2%.

Assim como observado neste trabalho, alguns estudos têm demonstrado que os indutores CIM2GTAIL's apresentam comportamentos diferenciados para TIH, em função da base genética das populações doadoras, revelando a existência de interação indutores x populações (Kahriman et al., 2022; Kaur et al., 2023). Desta forma, um determinado indutor poderá se sobressair quanto as TIH's e TIR's, dependendo das populações doadoras e dos ambientes de indução. Neste trabalho houve uma superioridade do CIM2GTAIL-P1 na indução de populações de milho superdoce, enquanto no trabalho de Kaur et al. (2023) se destacou o CIM2GTAIL-P2 para indução de outras populações de milho. Contudo, a diferença média obtida entre CIM2GTAIL-P1 e a combinação híbrida CIM2GTAIL-P1 x CIM2GTAIL-P3 observada neste trabalho foi de apenas 1,7% de TIH e 1,4% para TIR, valores que podem ser não suficientes para justificar o uso de uma linhagem *per se* em relação ao seu F_1 , mais vigoroso e com maior capacidade de adaptação ao ambiente tropical.

Deste modo, além de apresentar TIH elevada e permitirem a adequada identificação de haploides, os indutores devem ser adaptados ao ambiente de cultivo e possuir as seguintes características agronômicas que favoreçam a indução de haploidia *in vivo*: altura de planta e pendão que fique acima da altura das espigas das plantas doadoras, mas que não sejam tão altas ao ponto de potencializar o acamamento e quebramento das plantas; pendão grande, com maior número de ramificações e que produza bastante pólen; produzir espigas saudáveis e com grande número de sementes, que facilitem o processo de multiplicação de sementes; tolerância e resistência às principais doenças nos diferentes ambientes de cultivo (Trentin et al., 2020). Este conjunto de características desejadas nos indutores contribuem para a multiplicação de suas sementes e para o sucesso na obtenção de número suficiente de haploides com menor dispêndio de recursos no estabelecimento e condução dos campos de indução, por polinização manual ou em lotes isolados.

As épocas de semeadura dos experimentos e os efeitos dos genótipos utilizados como tratamento foram responsáveis em promover as maiores variações das características agronômicas avaliadas. Nas condições ambientais deste trabalho, as semeaduras dos indutores em setembro e outubro, tanto para multiplicação de sementes quanto para indução, foram as épocas mais favoráveis aos indutores, alcançando as melhores produtividades e desempenho agrônomo para as demais características. As semeaduras mais tardias, no mês de novembro ainda ofereceram condições ambientais favoráveis, mas com maiores riscos de ocorrência de epidemias causando danos expressivos no desempenho agrônomo dos indutores, como observado na semeadura de novembro de 2021. Os resultados obtidos sinalizam que a semeadura destes indutores a campo em épocas tardias ou em condições de segunda safra no Brasil, não são recomendáveis para o estabelecimento de campos de multiplicação ou de indução, pois é o período em que se observa os maiores estresses bióticos e abióticos. A susceptibilidade observada para os indutores indica a necessidade de controle cuidadoso de insetos vetores do complexo de enfezamento e de doenças fúngicas, mesmo nas épocas mais favoráveis de semeadura.

Uma vez que os genótipos indutores de haploidia tem a finalidade de fornecer pólen para as espigas dos genótipos doadores, é importante reconhecer o sincronismo entre as estruturas reprodutivas nas diferentes épocas de semeadura e

anos de cultivo. A linhagem indutora CIM2GTAIL-P3 se caracterizou como sendo a mais tardia entre os genótipos avaliados, apresentando um florescimento masculino cerca de 3 dias após o florescimento feminino do híbrido comercial mais tardio, utilizado como testemunha. Em contrapartida, as linhagens CIM2GTAIL-P1 e CIM2GTAIL-P2 apresentaram florescimento masculino cerca de 3 e 5 dias mais precoce que o florescimento masculino da testemunha mais tardia, respectivamente. De forma geral, os híbridos indutores apresentaram florescimento masculino com cerca de 3 a 8 dias mais precoce que o florescimento feminino da testemunha mais tardia. O reconhecimento das diferenças entre o número de dias para o florescimento masculino e feminino entre genótipos indutores e genótipos induzidos são fundamentais para o planejamento e instalação de campos isolados ou de polinização manual, quanto ao escalonamento da semeadura dos diferentes genótipos.

Houve maior coincidência da antese masculina dos indutores *per se* com a antese feminina das testemunhas, em relação as combinações F_1 's dos indutores, indicando que para indução de genótipos precoces como estas testemunhas, os F_1 's indutores necessitariam ser semeados em pelo menos duas etapas, aos 3 e 7 dias após a semeadura da população doadora. Os valores médios dos dias para as anteses foram similares aos apresentados por Chaikam et al. (2018), em diferentes famílias de linhagens CIM2GTAIL's, e superiores aos observados por Trindade et al. (2017), usando GTAIL de primeira geração. Contudo, as semeaduras mais tardias promoveram reduções na amplitude da antese, altura de planta e de espigas, parâmetros de rendimento, além do aumento da vulnerabilidade dos indutores as diferentes doenças, inviabilizando a sua utilização em campos de indução e produção de sementes, sendo mais intensa nos indutores *per se* do que os indutores F_1 's.

O desempenho médio observado para características do pendão foi similar aos resultados observados por Trindade et al. (2017) e Chaikam et al. (2018) estudando linhagens indutoras do CIMMYT, sejam *per se* ou em combinações. No geral, os indutores híbridos resultaram em plantas com pendões maiores e mais ramificados em relação aos indutores *per se*.

A altura de planta do genótipo indutor deve ser levada em consideração para o cruzamento com os genótipos doadores a campo, pois influencia na proporção de fileiras entre eles, sendo ideal que o pendão do indutor

fique acima da altura das espigas dos genótipos doadores, visando garantir maior eficiência da polinização e obtenção de sementes induzidas. Por outro lado, indutores com altura média, podem fornecer melhor ergonomia para o manejo tanto em trabalhos desenvolvidos em casa de vegetação, quanto em campos de polinização manual (Trentin et al., 2020). Os resultados obtidos indicaram que os indutores híbridos tiveram médias de altura de planta e tamanho de pendão maiores do que os indutores *per se*, o que está positivamente relacionado com a produção de pólen e negativamente com maiores riscos de acamamento (Flint-Garcia et al., 2003; Trentin et al., 2020). Neste sentido, independentemente do tipo de indutor utilizado, torna-se necessária atenção ao conjunto geral de necessidades, para oferecer altura de pendão compatível as espigas das populações doadoras, quantidade de pólen abundante, boa ergonomia para o manejo e reduzido risco de acamamento.

A avaliação dos indutores quanto aos caracteres associados à produtividade e a resistência às doenças em diferentes ambientes, como épocas de semeadura e locais, não está centrada na produtividade de grãos, mas refletem a capacidade de adaptação dos indutores e o potencial de multiplicação de sementes para uso em campos de indução a haploidia. Os ambientes desfavoráveis representados pelas adversidades bióticas e abióticas, proporcionaram reduções expressivas no rendimento e no peso de 1000 grãos com maior intensidade nas linhagens indutoras do que nos indutores híbridos e testemunhas, demonstrando que as condições ambientais desfavoráveis afetaram o peso e o tamanho das sementes.

O número de grãos por planta é uma variável importante para dimensionar o planejamento de campos de indução e a produção de sementes. Os indutores híbridos apresentaram acréscimos médios de número de sementes por planta de 1,4 a 2,0 vezes em relação aos indutores *per se*, semelhantes aos intervalos observados por Trindade et al. (2017) e Chaikam et al. (2018). Desta forma, os indutores híbridos F_1 's, apresentaram número de sementes superiores aos indutores *per se*, o que pode ser explicado pelo vigor híbrido, resultando em maior produtividade, resistência a doenças e melhor adaptação aos ambientes. Neste sentido, a utilização de indutores híbridos representa uma estratégia eficiente ao combinar em um único genitor características fenotípicas distintas.

A superioridade dos F_1 's sobre os indutores *per se* para as diferentes características, sugere que o emprego de híbridos triplos de linhagens CIM2GTAIL's

pode ser vantajoso, pois permite obter sementes maiores e com mais reservas para a germinação, com estimativas que proporcionam ganhos importantes na produção de sementes com valores entre 5,46 e 6,44 t ha⁻¹ nas épocas de semeadura setembro de 2021 e em outubro e novembro de 2022 (dados não apresentados), mantendo as estimativas de TIR's em cerca de 11%.

Para os parâmetros relacionados a espiga: diâmetro, comprimento, número de fileiras de grãos e número de grãos por fileira, foi observado que o desempenho dos híbridos indutores frequentemente superou ou não diferiu das linhagens indutoras, a exemplo dos estudos conduzidos por Trindade et al (2017), ao utilizar indutores TAIL's de primeira geração. Os indutores *per se*, oferecem maiores dificuldades para adaptação ambiental, multiplicar sementes, resistência a doenças e maior propensão a podridões de espigas, enquanto indutores híbridos oferecem vantagens expressivas sobre estes quesitos (Eller et al., 2010; Trentin et al., 2020).

As condições de pressão de doenças promoveram efeitos significativos na redução das características agrônômicas para todos os genótipos indutores avaliados. Em situação de epidemia severa, as linhagens indutoras apresentaram grande fragilidade as epidemias de complexo de enfezamento e Diplodia, enquanto para *E. turcicum* revelaram mediana resistência e mediana suscetibilidade.

As correlações entre produtividade de grãos e demais características avaliadas em ambiente tropical revelam que, além dos cuidados com o melhoramento dos indutores para taxas de indução, multiplicação de sementes e manutenção processo de indução, é de fundamental importância selecionar genótipos indutores tolerantes as principais doenças tropicais e que produzam espigas com maiores diâmetros e comprimentos, maiores números de fileiras de grãos e de grãos por fileira.

Os resultados observados para as linhagens indutoras CIM2GTAIL's e suas combinações F₁'s estudadas em ambiente tropical permitem concluir que: a) estes indutores apresentam adaptação para a semeadura no início da primeira safra brasileira de milho, mas tem fraco desempenho em semeaduras mais tardias ou em segunda safra, quando se tem maior probabilidade de epidemias causadas por doenças da cultura do milho; b) as taxas de indução a haploidia destes indutores em cruzamentos com populações de milho superdoce tropical são semelhantes às

observadas com indutores temperados em cruzamentos com milho comum, em seus ambientes de origem; c) o indutor CIM2GTAIL-P1 e a combinação CIM2GTAIL-P1 x CIM2GTAIL-P3 apresentam as maiores taxas de indução em cruzamento com as populações de milho superdoce tropical; d) existe interação destes indutores e as populações doadoras de milho superdoce para as taxas de indução.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo (CIMMYT) pelos genótipos indutores utilizados. À Tropical Melhoramento & Genética (TMG), Fundação de Apoio ao Desenvolvimento da Universidade Estadual de Londrina (FAUEL) e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina (PPGA) pelo apoio à pesquisa.

CONFLITO DE INTERESSES

O autor declara que não existe conflito de interesses.

ORCID

<https://orcid.org/0000-0003-1813-2557>

3.5 REFERÊNCIAS

AGROCERES, **Guia Agroceres de sanidade**. 2. ed. São Paulo: Sementes Agroceres, p. 72, 1996.

BIGOLIN T, TALAMINI E. Impacts of Climate Change Scenarios on the Corn and Soybean Double-Cropping System in Brazil. **Climate**. 12(3), 42, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/cli12030042>

CHALYK, S.T. Creating new haploid-inducing lines of maize. **Maize Genet. Coop. News**. v.73, pp.53-54, 1999. <https://mnl.maizegdb.org/mnl/73/51chalyk.html>

CHAIKAM, V. *In vivo* maternal haploid induction in maize. In: Prasanna BM, Chaikam

V, Mahuku G. **Doubled haploid: Technology in maize breeding**: theory and practice. International Maize and Wheat Improvement Center, Mexico, pp. 9-13, 2012a. <http://hdl.handle.net/10883/1351>

CHAIKAM V, NAIR SK, BABU R et al 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, pp. 159–171, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00122-014-2419-3>

CHAIKAM, V.; MARTINEZ, L.; MELCHINGER, A.E.; SCHIPPRACK, W.; BODDUPALLI, P.M. Development and Validation of Red Root Marker-Based Haploid Inducers in Maize. **Crop Science**, 56: 1678-1688. 2016. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci2015.10.0653>

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. *Front. Plant Science*, v.9, art.1527, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01527>

CHANG, M-T.; COE, E. **Doubled Haploids**. In book: Molecular Genetic Approaches to Maize Improvement. pp.127-142, 2009. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-68922-5_10

CHASE, S.S. Parthenogenesis. **Maize Genet Coop News Lett**, pp.38-46, 1964a.

CHOE, E.; CARBONERO, F.C.; MULVANEY, K.; RAYBURN, A.L.; MUMM, R.H. Improving *in vivo* maize doubled haploid production efficiency through early detection of false positives. **Plant Breeding**. 131(3), pp. 399-401, 2012 DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0523.2012.01962.x>

COE, E. H. A line of maize with high haploid frequency. **American Naturalist**, v.93, pp.381-382, 1959. DOI: <https://doi.org/10.1086/282098>

CRUZ, C.D. **Programa Genes**: Biometria. Editora UFV. Viçosa (MG). 382p. 2006.

ELLER, M.S.; PAYNE, G.A.; HOLLAND, J.B. Selection for reduced Fusarium ear rot and fumonisin content in advanced backcross maize lines and their topcross hybrids.

Crop Science, 50, pp. 2249–2260, 2010. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci2009.11.0683>

ERENSTEIN, O; JALETA, M.; SONDER, K; MOTTALEB, K.; PRASANNA, B.M. Global maize production, consumption and trade: trends and R&D implications. **Food Security**. 14: 1295-1319, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12571-022-01288-7>

FLINT-GARCIA, S.A.; MCMULLEN, M.D.; DARRAH, L.L. Genetic Relationship of Stalk Strength and Ear Height in Maize. **Crop Science**. 43: 23-31, 2003. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci2003.2300a>

FRITSCHÉ-NETO, R.; GARBUGLIO, D. D.; BORÉM, A. Cap. 8 – Duplo-haploides. In: BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. **Biotechnologia aplicada ao melhoramento de plantas**. Universidade Federal de Viçosa, pp.267-301, 2013.

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

KAHRIMAN, F., SONGUR, U., DIŞBUDAK, A., KIZIK, S.; VURAL, B. 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**, 28(3), 385-395, 2022. DOI: <https://doi.org/10.15832/ankutbd.824114>

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**. v23:219, pp 1-9, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04228-5>

KERMICLE, J.L. Androgenesis conditioned by a mutation in maize. **Science**, v.166, pp. 1422–1424, 1969. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.166.3911.1422>.

KERMICLE, J.L. Androgenesis and the indeterminate gametophyte mutation: source of the cytoplasm. **Maize Genetics Cooperation News Letter**, v.47, pp. 208–209, 1973.

KINDIGER, B.; HAMANN, S. Generation of Haploids in Maize: A Modification of the

Indeterminate Gametophyte (*ig*) System. **Crop Science**, v33, pp. 342–344, 1993. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci1993.0011183X003300020027x>

KORKUT, K. & CENGIZ, R. Development of doubled haploid maize lines by using *in vivo* haploid technique. **Biotech Studies** 29(1), 1-7, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.38042/biost.2020.29.01.01>

LIU, X., HUANG, M., FAN, B., BUCKLER, E. S., AND ZHANG, Z. Iterative usage of fixed and random effect models for powerful and efficient genome-wide association studies. **PloS Genet.** 12 (3), 2016. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005767>

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, pp. 1-8, 2014. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci2013.12.0851>

MELCHINGER, A.E.; BRAUNER, P.C.; BÖHM, J; SCHIPPRACK, W. *In vivo* haploid induction in maize: comparison of different testing regimes for measuring haploid induction rates. **Crop Science**, v.56, pp. 1127–1135, 2016b. DOI: <https://doi.org/10.2135/CROPSCI2015.11.0668>

PIERRE, P.M.O.; DAVIDE, L.M.C.; COUTO, E.G.O.; SILVA, T.N.; RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B. Duplo-haploides: estratégias para obtenção e importância no melhoramento genético do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.10, p. 1-16, 2011. DOI: <https://doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v10n1p1-16>

PRASANNA, B. N. Cap.1 - Doubled Haploid (DH) technology in maize breeding: an overview. In: PRASANNA, B. M.; CHAIKAM, V.; MAHUKU, G. **CIMMYT – Doubled Haploid Technology in Maize Breeding**: Theory and Practice, Mexico, pp. 1-8, 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, pp. 1498-1506, 2011. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci2010.10.0568>

PRIGGE, V.; MELCHINGER, A.E. Production of haploids and doubled haploids in

maize. In: Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N (eds) **Plant cell culture protocols**. Springer, Berlin, pp 161–172, 2012. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-61779-818-4_13

PRIGGE, V.; BABU, R.; DAS, B.; RODRIGUEZ, M. H.; ATLIN, G. N.; MELCHINGER, A. E. Doubled haploids in tropical maize: II. Quantitative genetic parameters for testcross performance. **Euphytica**, v.185, pp. 453-463, 2012a. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10681-012-0626-z>

PRIGGE, V.; XU, X.; LI, L.; BABU, R.; CHEN, S.; ATLIN, G. N.; MELCHINGER, A. E. New insights into the genetics of *in vivo* induction of maternal haploids, the backbone of doubled haploid technology in maize. **Genetics**, v.190, pp. 781-793, 2012b. DOI: <https://doi.org/10.1534/genetics.111.133066>

QIU, F.; LIANG, Y.; LI, Y.; LIU, Y.; WANG, L.; ZHENG, Y. Morphological, cellular and molecular evidences of chromosome random elimination *in vivo* upon haploid induction in maize. **Current Plant Biology**. 2014, 1, 83–90. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2014.04.001>

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, pp. 275-283, 2005. <http://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=17583781>

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

SARKAR, K. R.; COE, E. H. A genetic analysis of the origin of maternal haploids in maize. **Genetics**, v.54, pp.453-464, 1966. DOI: <https://doi.org/10.1093/genetics/54.2.453>

SAS Institute. **SAS language and procedures: usage**. Version 9.1. [CD-ROM]. Cary: SAS Institute; 2004.

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. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s1678-3921.pab2020.v55.00968>

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

SILVA, G. J.; GUIMARÃES, C. T.; PARENTONI, S. N.; RABEL, M.; LANA, U. G. P.; PAIVA, E. **Produção de haploides androgenéticos em milho**. EMBRAPA Milho e Sorgo. ISSN 1518-4277, Sete Lagoas, Minas Gerais, 2009.

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. DOI: <https://doi.org/10.1590/1984-70332024v24n1a04>

TRACY, W.F. Sweet Corn. In: **Specialty Corns**, 2a ed. CRC Press, pp. 162-204, 2001.

TRENTIN, H.U.; FREI, U.K.; LÜBBERSTEDT, T. Breeding maize maternal haploid inducers. **Plants**, v.9, 614; 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants9050614>

TRINDADE, R. dos S.; GUIMARAES, L. J. M.; NETTO, D. A. M.; SOUZA, I. R. P. de; GUIMARAES, P. E. de O.; SILVA, A. C. A. da; GUIMARÃES, S. A.; MARIZ, B. L. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 161, Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2017.

WANG, H.; LIU, J.; XU, X.; HUANG, Q.; CHEN, S.; YANG, P.; CHEN, S.; SONG, Y. Fully-automated high-throughput NMR system for screening of haploid kernels of maize (corn) by measurement of oil content. **PLoS ONE**, pp. 1-14, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159444>

ZHAO, X.; XU, X.; XIE, H.; CHEN, S.; JIN, W. Fertilization and uniparental chromosome elimination during crosses with maize haploid inducers. **Plant Physiology**. 2013, v.163, pp. 721–731. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.113.223982>

ZHONG, Y.; LIU, C.; QI, X.; JIAO, Y.; WANG, D.; WANG, Y.; LIU, Z.; CHEN, C.; CHEN, B.; TIAN, X.; et al. Mutation of *ZmDMP* enhances haploid induction in maize. **Nature Plants**, v.5, pp. 575–580, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0443-7>

4. ARTIGO 2**EFICÁCIA DE MÉTODOS DE DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA NA OBTENÇÃO
DE DUPLO-HAPLOIDES EM MILHO SUPERDOCE TROPICAL**

RESUMO

Os programas de melhoramento de milho têm sido acelerados pela obtenção de linhagens duplo-haploides (DH's), porém existem poucos relatos sobre o uso desta tecnologia em milho superdoce, especialmente em ambiente tropical. O desenvolvimento e identificação de métodos mais eficazes na duplicação cromossômica, por meio de experimentos com amostra suficientemente grande de indivíduos tratados e utilizando parâmetros uniformes de avaliação do sucesso geral, são fundamentais para otimização dos recursos na obtenção das linhagens DH's. O objetivo foi comparar a eficácia de três métodos de duplicação cromossômica, que empregam solução de colchicina, para produção de linhagens DH's em populações de milho superdoce tropical. Foram realizados cruzamentos entre oito populações de milho superdoce com seis genótipos indutores tropicalizados desenvolvidos pelo Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo (CIMMYT). As sementes haploides putativas (SHP) de oito populações de milho superdoce, identificadas pela expressão do gene *R1-nj*, foram utilizadas em três métodos de duplicação cromossômica e um controle negativo. Os métodos foram avaliados quanto as taxas de sobrevivência (TS), taxa de reprodução (TR), taxa de sucesso geral (TSG) e taxa de sucesso em vaso (TSV), empregando amostras de 1536 indivíduos tratados para comparação de métodos, 768 e 384 indivíduos para os estudos de interações método x ano e população x ano, respectivamente. Embora os efeitos de métodos e de populações tenham sido significativos, foi observada interação método x população apenas para TS, indicando que não houve um efeito diferenciado de duplicação cromossômica e de sucesso na obtenção de DH's dos métodos sobre as populações. Os métodos de controle, injeção e imersão de raízes em soluções de colchicina apresentaram as maiores estimativas de TS. O método de imersão de plântula apresentou a maior taxa de mortalidade, mas também a maior frequência de linhagens com mais de 26 sementes por espiga. Os métodos de injeção e imersão de plântula tiveram TR superiores aos demais métodos. A população SD3003 permitiu a obtenção do maior número de linhagens DH's e, junto com a população SD3002, apresentou as maiores frequências de espigas com mais de 26 sementes e as menores frequências de espigas com poucas sementes. O método de imersão de plântula promove a maior taxa de sucesso geral após transplante para o vaso. O método de imersão de plântulas é mais eficaz para produzir espigas com maior número de sementes. O método de injeção e de imersão de raízes permitem obter maiores taxas de sucesso geral, considerando o número de indivíduos tratados e sobreviventes. As condições ambientais mais favoráveis têm efeito benéfico sobre o aumento da taxa de duplicação cromossômica e sobre o sucesso geral.

Palavras-chave: *Zea mays* L. var. *saccharata*; linhagens; colchicina; haploides; injeção; imersão.

ABSTRACT

Corn breeding programs have been accelerated by obtaining doubled haploid (DH) lines, but there are few reports on the use of this technology in supersweet corn, especially in tropical environments. The development and identification of more effective methods for chromosome doubling, through experiments with a sufficiently large sample of treated individuals and using uniform parameters for evaluating overall success, are essential for optimizing resources for obtaining DH lines. The objective was to compare the effectiveness of three chromosome doubling methods, which employ colchicine solution, for the production of DH lines in tropical supersweet corn populations. Crosses were performed between eight supersweet corn populations with six tropicalized inducer genotypes developed by the International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT). Putative haploid seeds (SHP) from eight supersweet corn populations, identified by the expression of the *R1-nj* gene, were used in three chromosome doubling methods and a negative control. The methods were evaluated for survival rate (SR), reproduction rate (RR), overall success rate (OSR) and pot success rate (PSR), using samples from 1536 treated individuals for method comparison, 768 and 384 individuals for method x year and population x year interaction studies, respectively. Although the effects of methods and populations were significant, method x population interaction was observed only for SR, indicating that there was no differentiated effect of chromosome doubling and success in obtaining DH's of the methods on the populations. The control methods, injection and root immersion in colchicine solutions showed the highest SR estimates. The seedling immersion method showed the highest mortality rate, but also the highest frequency of lines with more than 26 seeds per spike. The injection and seedling immersion methods had higher TR than the other methods. The SD3003 population allowed the production of the highest number of DH lines and, together with the SD3002 population, presented the highest frequencies of spikes with more than 26 seeds and the lowest frequencies of ears with few seeds. The seedling immersion method promotes the highest overall success rate after transplanting to the pot. The seedling immersion method is more effective for producing ears with a higher number of seeds. The injection and root immersion methods allow for higher overall success rates, considering the number of treated and surviving individuals. More favorable environmental conditions have a beneficial effect on increasing the chromosome doubling rate and overall success.

Keywords: *Zea mays* L. var. *saccharata*; inbred line; colchicine; haploid; injection; immersion.

4.1 INTRODUÇÃO

O milho superdoce (*Zea mays* L. var. *saccharata*) é um tipo de milho especial, com maior concentração de açúcares no grão na fase de milho verde, sendo destinado exclusivamente para o consumo humano (Sousa et al., 2012), podendo ser consumido *in natura* ou industrializado (Araujo et al., 2006a; Oliveira Junior et al., 2006; Pereira Filho, et al., 2009). Os híbridos de linhagens representam a principal cultivar empregada na produção de milho superdoce. Nesse sentido, a tecnologia dos DH's pode representar um avanço valioso para o melhoramento genético desta cultura, acelerando o processo de obtenção de linhagens homozigotas, assim como já se tem observado para o milho comum (Pierre et al., 2011; Prassana et al., 2012; Fritsche-Neto et al., 2013).

A literatura apresenta vários estudos sobre as diferentes etapas de produção de DH's em milho, que envolvem desde a indução haploide (Coe, 1959; Kermicle, 1969; Röber et al., 2005; Rotarenco et al., 2010; Prigge et al., 2012b; Prasanna et al., 2012; Chaikam et al., 2020; Trentin et al., 2020), duplicação cromossômica (Bordes et al., 1997; Kato & Geiger, 2002; Castillo et al., 2008; Dhooghe et al., 2011; Vanous, 2011; Couto et al., 2015), seleção das linhagens DH's (Longin et al., 2006; Longin et al., 2007a, b; Gordillo & Geiger, 2008; Prigge et al., 2012a; Beyene et al., 2013; Krchov & Bernardo, 2015), aplicabilidade da tecnologia (Dang et al., 2012; Lubberstedt & Frei, 2012; Fritsche-Neto et al., 2013; Strigens et al., 2013) além de métodos alternativos à duplicação cromossômica via tratamento com colchicina (Melchinger et al., 2016b; Ren et al., 2018).

A etapa de duplicação cromossômica é o processo utilizado para restaurar a fertilidade dos indivíduos haploides (Chaikam & Mahuku, 2012b; Prassana, et al., 2012; Wu et al., 2017), sendo dispendiosa e determinante para o sucesso na obtenção de linhagens DH's em milho (Chaikam et al., 2012a; Dang et al. 2012; Chaikam et al. 2020). A colchicina ($C_{22}H_{25}N_5$) é a substância mais empregada no processo de duplicação cromossômica, atuando na inibição da formação das fibras do fuso na mitose celular (Chase, 1969; Chaikam & Mahuku, 2012b; Melchinger et al., 2016b). Entre os protocolos que empregam solução de colchicina se destacam: imersão sementes (Chalyk, 2000; Ren et al., 2018); injeção de solução no tecido basal do meristema apical de plântulas (Zabirova et al., 1996; Eder & Chalyk, 2002); imersão de raízes (Deimling et al., 1997; Chaikam et al.,

2020); imersão de plântulas após 3 a 4 dias de germinação (Eder & Chalyk, 2002), sendo este último o protocolo com maior número de citações literais.

Alguns estudos utilizaram como indicadores de sucesso de duplicação cromossômica a contagem de cromossomos (Gayen et al., 1994), a produção de pólen (Chalyk, 2000) e a produção de sementes (Eder & Chalyk, 2002), sem levar em consideração a taxa de mortalidade. No entanto, a taxa de mortalidade pode ser um parâmetro crucial na avaliação da eficiência de protocolos de duplicação cromossômica, uma vez que altas taxas de mortalidade podem comprometer a viabilidade dos protocolos e, conseqüentemente, o sucesso na obtenção de linhagens DH's. Embora a literatura apresenta um número variado de protocolos de duplicação cromossômica, a comparação adequada de suas eficiências exige amostras suficientemente grandes de indivíduos tratados e o uso de parâmetros uniformes de avaliação de sucesso.

O protocolo de imersão de sementes tem início com a embebição das mesmas em água à temperatura ambiente. Posteriormente as sementes recebem um pequeno corte na porção superior da plúmula (Gayen et al., 1994; Chalyk, 2000) ou ainda cortadas levemente ao redor do embrião (Ren et al., 2018), antes de serem imersas em solução contendo colchicina. Este método não tem sido utilizado em larga escala devido ao fato de ser muito laborioso, demandar extrema habilidade manual e gerar altas taxas de mortalidade.

No método de injeção é aplicada uma solução de colchicina com o uso de seringa hipodérmica 2-3 mm acima do tecido meristemático basal, na porção central do colmo das plântulas no estágio V₂ (Zabirova et al., 1996). O uso desta forma de tratamento promove taxas de eficiência na duplicação cromossômica em torno de 27,5% (Eder & Chalyk, 2002).

No protocolo de imersão de plântulas, as sementes haploides são germinadas em papel germitest e mantidas até que o coleóptilo atinja cerca de 2 cm de comprimento. Neste momento, a ponta do coleóptilo é cortada e as plântulas são imersas em solução contendo colchicina à temperatura ambiente e sem luz (Deimling et al., 1997; Prasanna et al., 2012; Chaikam & Mahuku, 2012; Prigge et al., 2012a; Prigge & Melchinger 2012). Neste método, são relatadas taxas de sucesso entre 10% e 30%, dependendo da população e das condições de manejo (Chaikam & Mahuku, 2012; Melchinger et al., 2016b).

O tratamento de raízes de plântulas no estágio V_2 - V_3 com solução de colchicina foi avaliado por Deimling et al. (1997) e com soluções de herbicidas antimitóticos por Melchinger et al. (2016b), mas se mostraram menos eficientes na duplicação dos genomas haploides em comparação aos tratamentos de imersão de plântulas. Recentemente, Chaikam et al. (2020) apresentaram um método ajustado de imersão de raízes até a região da coroa de plântulas no estágio V_2 , em solução de colchicina. Neste método foram relatadas taxas de sucesso entre 23,5% e 58,5%, dependendo da população e das condições de manejo (Chaikam et al., 2020).

Na literatura, estão disponíveis vários estudos sobre métodos de duplicação cromossômica em germoplasma de milho comum e nas condições de ambiente temperado, mas ainda existe uma carência de publicações sobre estas metodologias e seu nível de sucesso para os diferentes germoplasmas tropicais, com amostras representativas e, sobretudo, em milho superdoce. Desta forma, objetivou-se comparar a eficácia de três metodologias de duplicação cromossômica na produção de DH's em populações de milho superdoce tropical, empregando solução de colchicina como agente antimitótico e um controle negativo.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 MATERIAL E PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Durante a segunda safra de 2021, as linhagens indutoras CIM2GTAIL-P1 (P1), CIM2GTAIL-P2 (P2) e CIM2GTAIL-P3 (P3), desenvolvidas pelo CIMMYT, foram multiplicadas e cruzadas (P1 x P2, P1 x P3 e P2 x P3) em casa de vegetação, alocada junto ao Laboratório de Melhoramento Genético (LMG), da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Paraná, Brasil.

Na safra 2021/2022, no campo experimental da Fazenda Escola da UEL (23°20'S; 51°33'W; altitude 576 m; clima subtropical úmido mesotérmico), os seis genótipos indutores foram cruzados manualmente com oito populações doadoras de milho superdoce tropical, homocigóticas para o gene *shrunken-2* (*sh₂*), desenvolvidas pelo LMG (PD2004, PD2005, PD2006, SD3001, SD3002, SD3003, SD3005 e SD3006). Em cada uma das 48 combinações indutor x população doadora foram obtidas cerca de 30 espigas.

As sementes induzidas foram classificadas pela expressão do gene

R1-nj, por meio da presença ou ausência da marcação de antocianina, sendo separadas em três categorias: a) diploides (sementes lisas que expressam a pigmentação no endosperma e no embrião); b) haploides putativos (sementes lisas que expressam a pigmentação somente no endosperma, mantendo o embrião sem antocianina); c) diploides resultantes de contaminação ou da inibição da expressão do gene *R1-nj* (sementes lisas ou enrugadas sem nenhuma marcação).

4.2.2 MÉTODOS DE DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA

As sementes haploides putativas (SHP's), selecionadas em cada população doadora de milho superdoce, foram submetidas à três métodos de duplicação cromossômica e um controle negativo, avaliadas em experimentos conduzidos em casa de vegetação no LMG, com semeadura em abril de 2022 e fevereiro de 2023, como descrito a seguir:

a) método I (Imersão de plântulas em solução de colchicina) – as SHP's separadas para cada população doadora, foram colocadas para germinar em rolos de papel Gernitest umedecidos com água filtrada e mantidas em incubadora BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio), em temperatura de 28 °C, sem luz, durante 3 dias. Após a germinação, as plântulas com cerca de 2 cm de coleótilo e 3 cm de raízes receberam um corte na ponta do coleótilo, com lâmina estéril (bisturi). Em seguida, as plântulas foram acondicionadas em beckers de vidro, sendo submersas em solução aquosa contendo 0,04% de colchicina e 0,5% DMSO (Dimetilsulfóxido), por 12 horas à temperatura ambiente, conforme procedimento descrito por Chaikam e Mahuku (2012b). Após este tratamento, as plântulas foram retiradas da solução e acondicionadas em sacos de malha e lavadas abundantemente em água corrente, durante 30 minutos, sendo em seguida transplantadas em bandejas de 64 células e preenchidas com turfa *Sphagnum*. As plântulas foram mantidas por dez dias nas bandejas em casa de vegetação, até serem transplantadas para o ambiente definitivo de desenvolvimento.

b) método II (Imersão de raízes em solução de colchicina) - as SHP's foram semeadas em bandejas plásticas de 64 células contendo turfa *Sphagnum* e mantidas em casa de vegetação, durante dez dias após a semeadura, até atingirem o estágio V₂, quando foram retiradas das bandejas para remoção do substrato das raízes, por meio da lavagem com água corrente de torneira. As plântulas com raízes

nuas foram dispostas lado a lado sobre uma fita de papel alumínio, mantendo o alinhamento das sementes, para formação de maços contendo cerca de 120 plântulas. A fixação dos maços foi realizada com a fita de alumínio e um elástico contendo uma etiqueta de identificação da população doadora. Os maços de plântulas foram acondicionados em beakers com capacidade volumétrica de 1 litro e preenchidos com uma solução aquosa de 0,07% de colchicina e 0,5% de DMSO até atingir o volume de 2 a 3 cm acima do nível da coroa da plântula, durante cinco horas em temperatura ambiente, segundo o método apresentado por Chaikam et al. (2020). Após o tratamento, os maços de plântulas passaram por uma lavagem das raízes em água corrente de torneira durante 30 minutos, para remover resíduos da solução, sendo em seguida transplantadas no ambiente definitivo de desenvolvimento.

c) método III (Injeção de solução de colchicina sobre o meristema basal da plântula) - as SHP's foram germinadas em bandejas de 64 células contendo Turfa *Sphagnum*, em casa de vegetação. As plântulas foram conduzidas até alcançar o estágio V₂, quando foi injetado uma dose de 100 µL da solução aquosa de 0,125% de colchicina e 0,5% de DMSO por plântula, diretamente no tecido meristemático basal, próximo à parte central da primeira bainha foliar, utilizando seringa e agulha hipodérmica (Zabirova et al., 1996; Eder & Charlyk, 2002). No dia seguinte, as plântulas tratadas foram transplantadas para o seu local definitivo de desenvolvimento.

d) controle negativo - foi conduzido de forma semelhante ao método III, mas sem conter a solução de colchicina e DMSO, apenas com a injeção de água filtrada. O controle negativo, foi utilizado para identificar o nível de ocorrência da taxa de duplicação espontânea dentro de cada população estudada.

4.2.3 OBTENÇÃO DE DADOS E ESTIMAÇÃO DE TAXAS DE SUCESSO

As plântulas tratadas foram transplantadas para vasos de 12 L, contendo uma mistura de solo, areia e adubo orgânico nas proporções de 3:1:1, respectivamente. O experimento foi conduzido em casa de vegetação do LMG, utilizando fertirrigação, controles de pragas e plantas daninhas, objetivando reduzir estresses durante as fases de desenvolvimento.

Neste estudo, foram tomados os seguintes dados de contagem de:

a) sementes haploides putativas utilizadas em cada experimento (SHP); b) sementes

germinadas (NSG); c) plântulas submetidas ao tratamento (NPT); d) plantas haploides submetidas ao tratamento e mantidas após o *roguing* para eliminação dos falsos haploides (PHT); e) plântulas transplantadas (NT); f) plantas D_0 sobreviventes até a fase de polinização (NSP); g) plantas D_0 autofecundadas (PA); h) plantas D_0 que produziram sementes D_1 (PPS).

A partir destas contagens, foram estimadas as seguintes taxas: sobrevivência ($TS = NSP/PHT$); autofecundação ($TA = PA/NSP$); eficiência de autofecundação ($EA = PPS/PA$); reprodução ($TR = PPS/NSP$); sucesso geral padrão ($TSG = PPS/PHT$), conforme descritos por Melchinger et al. (2016a); sucesso geral em vaso ($TSV = PPS/NT$), o que promove alteração na estimativa apenas para o método de imersão de plântula, pois as plântulas tratadas são transplantadas primeiro para a bandeja e, apenas as sobreviventes e úteis, são posteriormente transplantadas para o ambiente definitivo de desenvolvimento. Nos outros métodos as plântulas tratadas são imediatamente transplantadas para o local definitivo de desenvolvimento.

As sementes não germinadas, mortalidade de plântulas antes do tratamento, plântulas albinas e de baixo vigor, plantas desbastadas nos vasos e plantas falso haploides não participaram dos cálculos das taxas estudadas em todos os métodos, uma vez que estas perdas não foram resultantes da utilização do método de duplicação cromossômica em haploides.

As espigas obtidas das plantas férteis D_0 foram categorizadas segundo o número de sementes obtidas por espiga, da seguinte forma: a) menor que cinco sementes; b) cinco a 25 sementes; c) 26 a 50 sementes; d) 51 a 100 sementes; e) mais de 100 sementes. Estas categorias foram utilizadas para comparar os efeitos das populações, métodos de duplicação cromossômica e anos na quantidade de sementes DH's obtidas. Os percentuais foram calculados pela razão entre o número de espigas D_1 obtidas em cada categoria pelo número total de espigas produzidas em cada método ou em cada população.

4.2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS TAXAS DE SUCESSO DA DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA

As análises exploratórias dos dados de taxas de sucesso indicaram a necessidade de transformação dos dados para raiz quadrada das taxas estimadas para ajuste da distribuição normal.

As análises estatísticas das taxas de sucesso obtidas pelos métodos de duplicação cromossômica e controle negativo, em haploides de oito populações de milho superdoce, foram realizadas segundo o arranjo fatorial 4x8, empregando o delineamento de blocos completamente casualizados, com duas repetições, em dois anos. As parcelas foram constituídas por 48 plantas, sendo alocadas duas plântulas tratadas por vaso, repetidos em dois blocos (casas de vegetação), alocadas junto ao LMG. O modelo utilizado para a análise de variância fatorial 4x8 em cada ano é apresentado a seguir:

onde: y_{ijk} é a observação do i-ésimo método, na j-ésima população, do k-ésimo bloco; \bar{y} é a média geral dos experimentos; σ^2_k é o efeito aleatório do k-ésimo bloco; μ_i é o efeito fixo do i-ésimo método de duplicação cromossômica); μ_j é o efeito fixo da j-ésima população de milho superdoce doadora; μ_{ij} é o efeito fixo da interação do i-ésimo método com a j-ésima população doadora; σ^2_{ijk} é o erro aleatório da observação do i-ésimo método, na j-ésima população doadora, do k-ésimo bloco.

O teste de F máximo (Pimentel, 1990) revelou a existência de homogeneidade das variâncias dos erros entre os dois anos de avaliação, permitindo a análise de variância conjunta, conforme o modelo a seguir:

onde: y_{ijk} é a observação do i-ésimo tratamento, no j-ésimo bloco, do k-ésimo ano; \bar{y} é a média geral dos experimentos; μ_i é o efeito fixo do i-ésimo tratamento; μ_k é o efeito fixo do k-ésimo ano; μ_{ik} é o efeito fixo da interação do i-ésimo tratamento com o k-ésimo ano; σ^2_{jk} é o efeito aleatório do j-ésimo bloco dentro do k-ésimo ano; σ^2_{ijk} é o erro aleatório da observação do i-ésimo tratamento, no j-ésimo bloco, do k-ésimo ano.

As análises de variâncias individuais e conjuntas foram realizadas utilizando o programa Statistical Analysis System – SAS (Version 9.1, 2004) e as médias dos métodos, populações doadoras e suas combinações em cada ano foram agrupadas pelo teste de Scott & Knott, em nível de 5% de probabilidade, empregando o Programa Genes, versão 2013.5.1 (Cruz, 2006).

4.3 RESULTADOS

A análise de variância revelou efeitos significativos de anos para TA e TSG e suas médias foram cerca de 1,4 vezes maiores em 2023 em relação a 2022, demonstrando que estas taxas foram influenciadas pelo ano e a época de semeadura (Tabela 4.1). Apenas para EA não foi detectada diferenças significativas de tratamentos e nem de interação tratamentos x anos, mostrando que a eficiência da autofecundação foi a mesma em todas as situações. Assim, em média 48,5% das plantas autofecundadas geraram espigas DH's com sementes (Tabela 4.1).

O desdobramento dos efeitos de tratamentos significativos pelo teste F para as diferentes taxas de sucesso, também revelaram efeitos de métodos e de populações significativos, sendo observado efeitos de interação método x população somente para a TS. No geral, com base na magnitude dos quadrados médios, pode-se inferir que os efeitos de métodos de duplicação cromossômica contribuíram mais para a variação do que as populações e que não houve um comportamento diferenciado na combinação entre métodos e populações para as taxas estudadas na obtenção de DH's (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 – Médias (em %) não transformadas e quadrados médios transformados para raiz quadrada da análise de variância conjunta de anos (2022 e 2023), para métodos de duplicação cromossômica, populações de milho superdoce e suas interações.

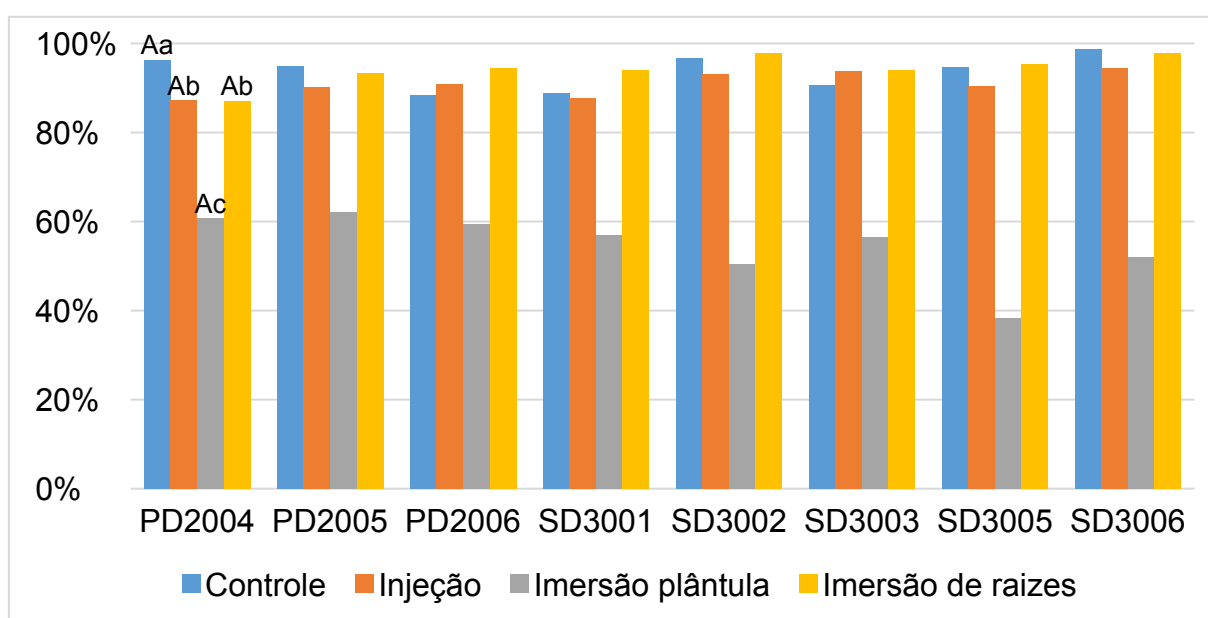
| FV | GL | TS | EA | TA | TR | TSG | TSV |
|-------------------|----|---------|----------|---------|---------|---------|---------|
| Bloco/Ano | 2 | 0,107ns | 39,004* | 2,222* | 14,89* | 14,83* | 13,58* |
| Ano | 1 | 0,025ns | 10,046ns | 50,51* | 36,44ns | 38,74ns | 28,39* |
| Tratamentos (T) | 31 | 4,421* | 3,9572ns | 3,943* | 4,742* | 4,305* | 3,484* |
| Método (M) | 3 | 41,99* | 24,649* | 7,048* | 20,30* | 17,94* | 11,75* |
| População (P) | 7 | 0,238* | 3,948ns | 11,80* | 9,403* | 8,948* | 7,551* |
| Interação M x P | 21 | 0,448* | 1,004ns | 0,880ns | 0,965ns | 0,808ns | 0,947ns |
| Interação T x Ano | 31 | 0,418* | 2,176ns | 1,009ns | 1,266ns | 1,156ns | 1,280* |
| M x Ano | 3 | 2,279* | 6,003* | 1,218ns | 3,689* | 3,508* | 4,949* |
| P x Ano | 7 | 0,207ns | 3,106ns | 2,401* | 2,916* | 2,599* | 2,613* |
| M x P x Ano | 21 | 0,222* | 1,319ns | 0,515ns | 0,369ns | 0,340ns | 0,312ns |
| Resíduo | 62 | 0,105 | 2,136 | 0,651 | 0,865 | 0,823 | 0,725 |
| Média 2022 (%) | | 83,12 | 46,49 | 35,80 | 18,14 | 16,48 | 14,50 |
| Média 2023 (%) | | 83,59 | 50,43 | 50,81 | 26,27 | 24,78 | 21,15 |
| Média (%) | | 83,36 | 48,46 | 43,31 | 22,20 | 20,63 | 17,82 |
| CV% | | 3,6 | 21,6 | 12,5 | 20,6 | 20,9 | 21,0 |

Notas: ns, *= não significativo e significativo em nível de 5% de probabilidade pelo teste F; fonte de variação (FV); graus de liberdade (GL); coeficiente de variação (CV%); taxa de sobrevivência (TS); eficiência da autofecundação (EA); taxa de autofecundação (TA); taxa de reprodução (TR) e taxa de sucesso geral (TSG) e taxa de sucesso em vaso (TSV).

Fonte: O próprio autor.

Embora tenha sido detectada a interação método x população significativa para TS, foi verificado que o controle negativo, e os métodos de injeção e imersão de raízes apresentaram estimativas acima de 87,1% para todas as populações, enquanto para o método de imersão de plântula a TS sempre foi inferior, com valores entre 38,4% e 62,2% (Figura 4.1).

Figura 4.1 – Médias (em %) de Taxa de Sobrevivência (TS) para cada combinação de população de milho superdoce e método de duplicação cromossômica, com base na observação de um total de cerca de 192 plantas, avaliadas em dois experimentos, com duas repetições, em parcelas de 48 plantas. Letras maiúsculas agrupam médias de populações dentro de cada método e minúsculas médias de métodos dentro de cada população pelo teste de Scott & Knott.



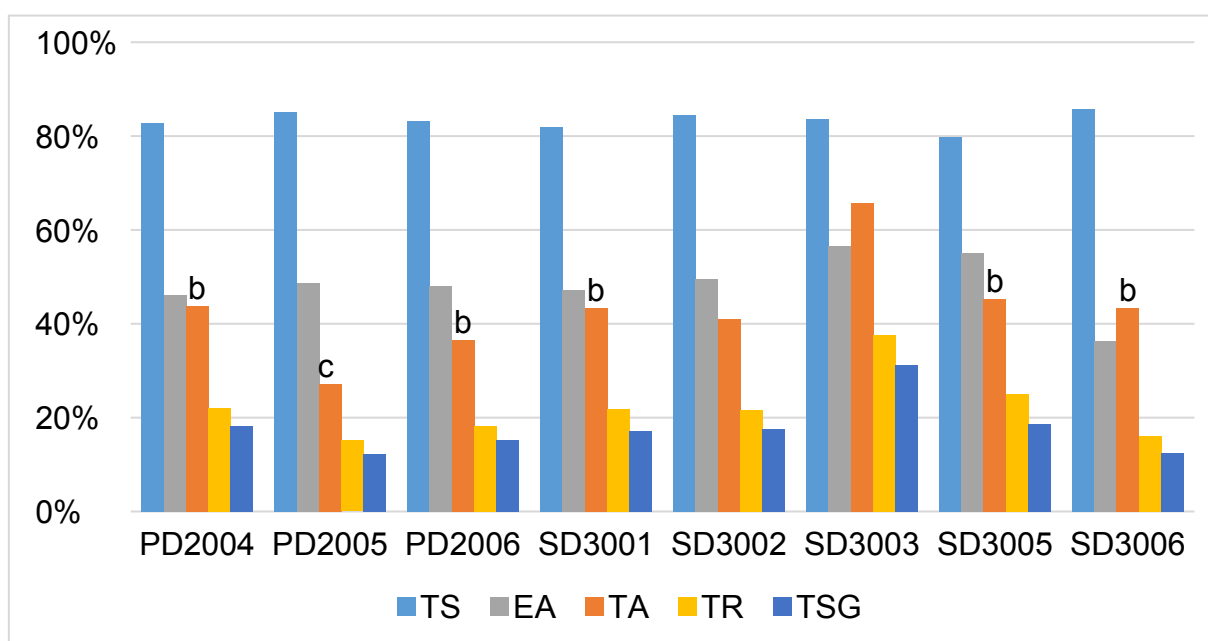
Fonte: O próprio autor.

Ainda pode-se destacar que o método de imersão de plântula promoveu a maiores taxas de mortalidade nas populações SD3005, SD3006 e SD3002, em ordem crescente, sendo que as demais populações ficaram no mesmo agrupamento de médias. As populações apresentaram médias gerais de TS para todos os métodos variando entre 79,7% e 85,8% e somente SD3005 se diferenciou com a menor estimativa de sobrevivência (Figura 4.2).

Os efeitos significativos da interação tratamentos x ano e o desdobramento métodos x anos foram significativos somente para TS e TSV, demonstrando que pelo menos um dos métodos apresentou comportamento diferenciado nos anos avaliados (Tabela 4.1). A interação método x ano para TS foi

do tipo simples sendo observado uma redução de 11,7% do método de imersão de plântula de 2022 para 2023, enquanto os demais métodos apresentaram acréscimos entre 3,6% e 5,1% (Figura 4.3).

Figura 4.2 – Taxas médias (em %) de sobrevivência (TS), eficiência da autofecundação (EA), autofecundação (TA), reprodução (TR) e de sucesso geral (TSG) para cada população superdoce, com base na observação de um total de cerca de 768 plantas tratadas. Letras iguais agrupam médias de populações dentro de cada taxa, pelo teste de Scott & Knott.



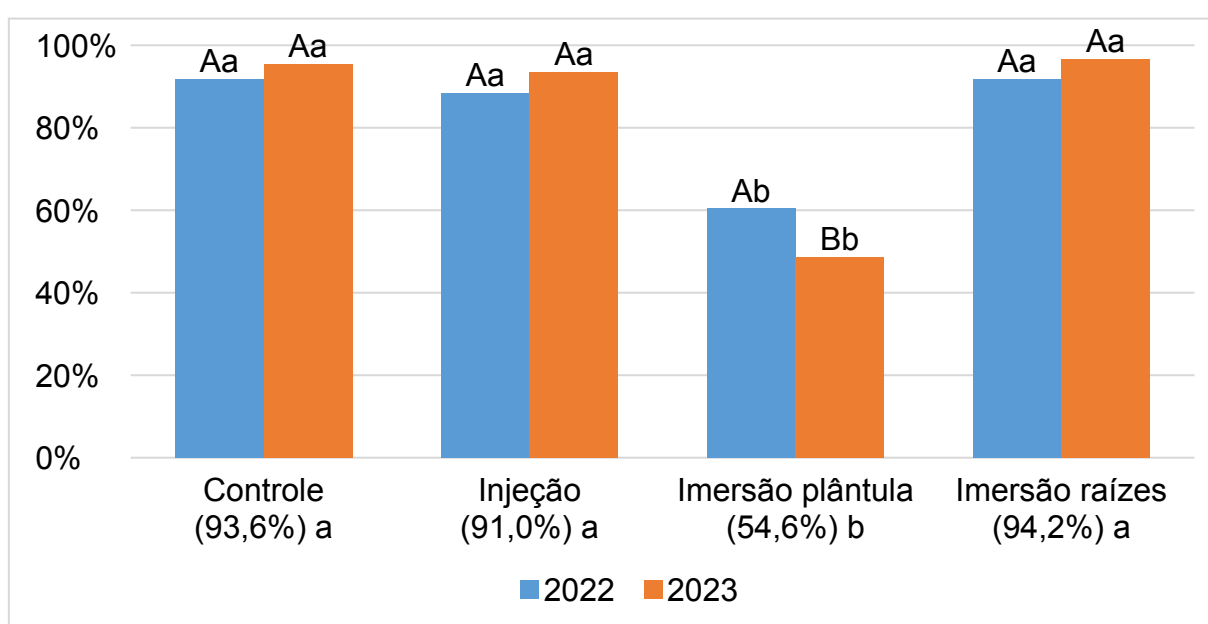
Fonte: O próprio autor.

O desdobramento do efeito de tratamentos para TA e TR revelaram que os métodos e as populações foram as principais fontes de variação, não havendo interação de método x população ou interações com anos (Tabela 4.1).

Os métodos de injeção e imersão de plântula apresentaram o mesmo agrupamento de médias gerais de TA, com valores iguais a 47,1% e 48,3%, e de TR iguais a 24,9% e 28,5%, respectivamente (Figura 4.4). A média de TA destes dois métodos superou em mais de 6% o método de imersão de raízes e 11% o controle. Já para TR, os métodos de injeção e imersão de plântula, superaram em apenas 2,4% e 6,1% a média do método de imersão de raízes e em 11,9% a 15,6% a média do controle, respectivamente. As maiores TA's estão relacionadas as maiores taxas de plantas com pendão e espiga férteis e com o melhor sincronismo entre as estruturas reprodutivas, permitindo obter um maior percentual de plantas autofecundadas. Enquanto as maiores TR's estão relacionadas a capacidade dos

métodos em restaurar a fertilidade das plantas e obter sementes DH's. A média de TR dos métodos de duplicação foi quase o dobro do controle, demonstrando que a duplicação cromossômica proposta pelos diferentes métodos foi eficiente para restaurar a fertilidade e produzir sementes DH's.

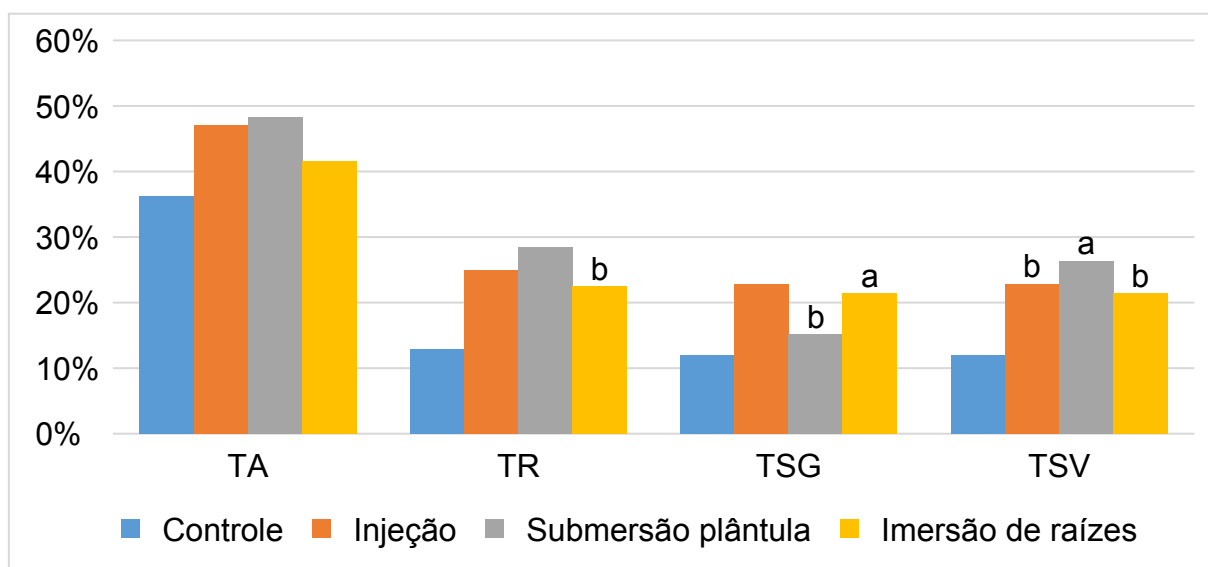
Figura 4.3 – Médias (em %) de Taxa de Sobrevivência (TS) para cada combinação de método de duplicação cromossômica e anos, com base na observação de um total de 768 plantas, pela avaliação de oito populações de milho superdoce, empregando experimentos com duas repetições, em parcelas de 48 plantas. Letras maiúsculas agrupam médias de anos dentro de cada método e minúsculas médias de métodos dentro de cada ano, pelo teste de Scott & Knott.



Fonte: O próprio autor.

Para TR a população SD3003 também se destacou com a maior média (37,7%) e as populações PD2005, PD2006 e SD3006 formaram o grupo das menores médias (15,1% a 18,2%) (Figura 4.2). Os resultados demonstram que o efeito médio de todos os métodos utilizados para restauração da fertilidade e produção de espigas DH's não foi o mesmo para cada população de milho superdoce, revelando há existência de populações que respondem melhor ao processo de restauração da fertilidade.

Figura 4.4 – Taxas médias (em %) de autofecundação (TA), reprodução (TR), sucesso geral (TSG) e de sucesso em vaso (TSV), para cada método de duplicação cromossômica, com base na observação de um total de cerca de 1536 plantas, empregados no tratamento de plântulas de oito populações de milho superdoce, em dois experimentos com duas repetições, em parcelas de 48 plantas. Letras iguais agrupam médias de métodos dentro de cada taxa, pelo teste de Scott & Knott.



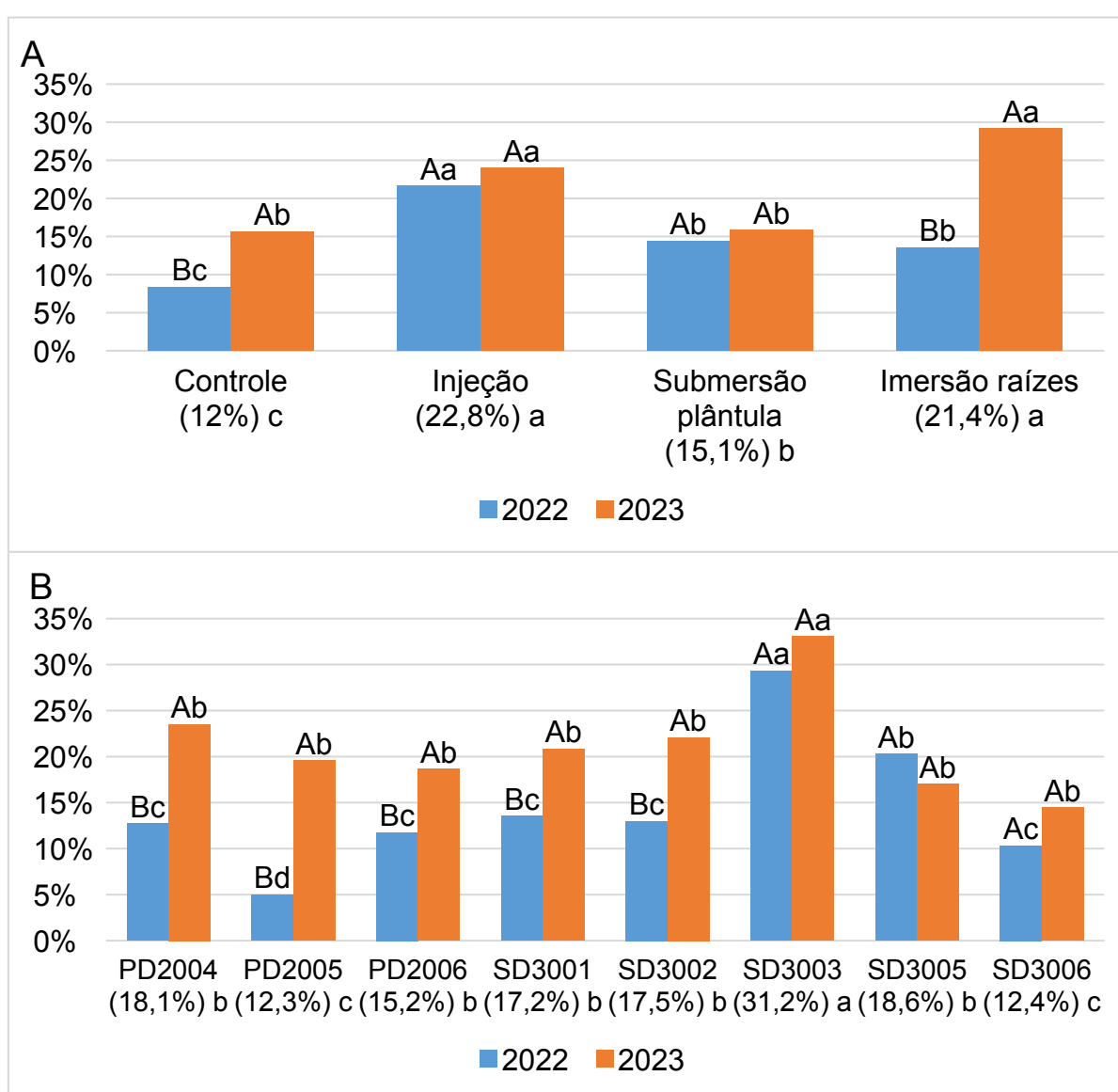
Fonte: O próprio autor.

Para a TSG, estimada com base na razão do número de espigas DH's obtidas pelo número de plântulas tratadas, foram observados efeitos significativos de método, população e suas interações com anos, mas não foi observada interação significativa de método x população, indicando que não ocorreu combinações específicas entre método e população (Tabela 4.1). Em média, os métodos de injeção (22,8%) e imersão de raízes (21,4%) promoveram as melhores estimativas de TSG, sendo que o método de injeção quase não variou de um ano para o outro, enquanto o método de imersão de raízes mais que dobrou em 2023 (Figura 4.5 A). Por outro lado, na média dos anos o método de imersão de plântula superou o controle para TSG, mas considerando os anos individualmente, não diferiram em 2023. No geral, o ano de 2023 favoreceu o aumento das estimativas de TSG, sendo observado uma resposta cerca de 2 vezes maior para o controle e o método de imersão de raízes neste ano, em relação a 2022 (Figura 4.5 A).

As diferentes populações apresentaram média de TSG para o controle que dobrou de 2022 (8,4%) para 2023 (15,6%), obtida somente com a aplicação de água filtrada como tratamento de duplicação cromossômica, indicando a ocorrência de duplicação cromossômica espontânea equivalente ao método de

imersão de plântula (15,8%) em 2023 e que a duplicação cromossômica é extremamente dependente do ambiente (Figura 4.5 A).

Figura 4.5 – (A) Médias (em %) de Taxa de Sucesso Geral (TSG) para cada combinação de método de duplicação cromossômica e ano, com base na observação de um total de cerca de 768 plantas, onde as letras maiúsculas agrupam médias de anos dentro de cada método e minúsculas médias de métodos dentro de cada ano, pelo teste de Scott & Knott. (B) Médias de Taxa de Sucesso Geral (TSG) para cada combinação de população e ano, com base na observação de um total de cerca de 384 plantas, onde as letras maiúsculas agrupam médias de anos dentro de cada população e minúsculas as médias de populações dentro de cada ano, pelo teste de Scott & Knott.



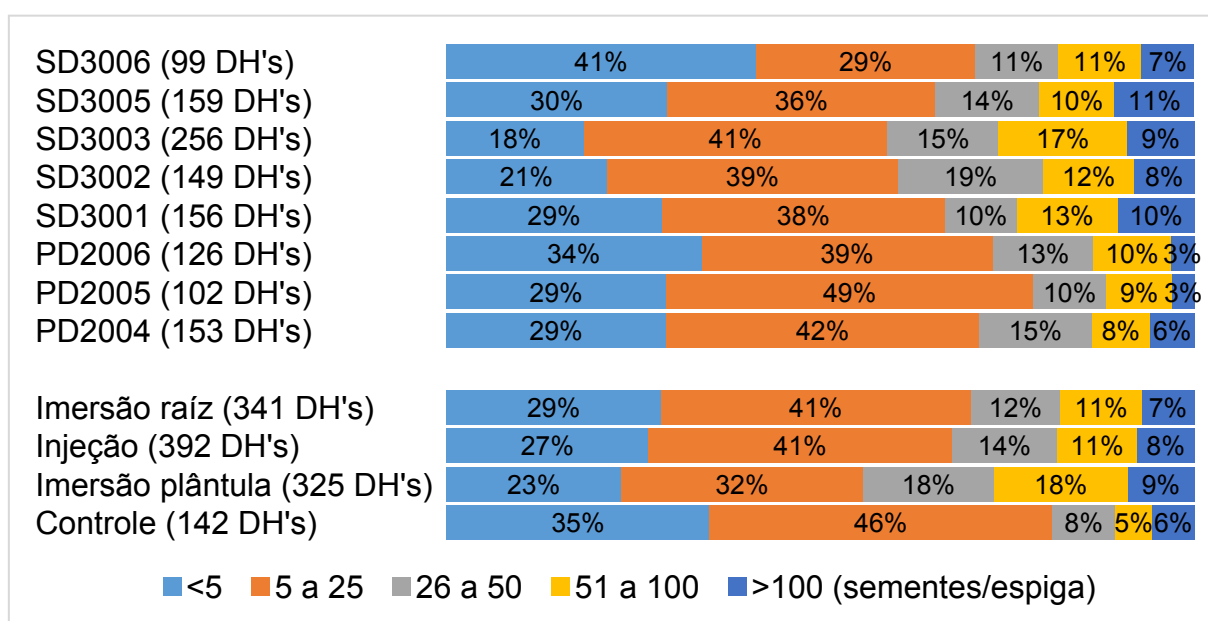
Fonte: O próprio autor.

Na média dos tratamentos de duplicação cromossômica, a população SD3003 (31,2%), em ambos os anos, atingiu as melhores estimativas de

TSG, enquanto as populações PD2005 (12,3%) e SD3006 (12,4%) apresentaram as menores estimativas, demonstrando que o sucesso do método de duplicação cromossômica é dependente da população (Figura 4.5 B). Além disto, as populações SD3003 e SD3005, não apresentaram TSG que variaram expressivamente de um ano para o outro, enquanto as demais populações responderam com aumentos entre 1,4 e 3,9 vezes no ano 2023, em relação ao ano anterior.

Um total de 1200 espigas DH's foram obtidas durante a realização dos experimentos em dois anos de avaliação. A separação das espigas obtidas em categorias, segundo o número de sementes por espiga, foi utilizada para indicar os melhores métodos de duplicação cromossômica e as populações de milho superdoce mais favoráveis para a obtenção de DH's (Figura 4.6).

Figura 4.6 – Totais de espigas DH's e frequências médias de quantidades de sementes por espiga obtidos em dois anos, para oito populações de milho superdoce e métodos de duplicação cromossômica.



Fonte: O próprio autor.

O método de imersão de plântula apresentou a vantagem de permitir a obtenção da maior frequência de linhagens com produção acima de 26 sementes por espiga (45%), superando os métodos de injeção (33%), imersão de raízes (30%) e controle (19%). Os métodos de imersão de raízes e injeção apresentaram resultados semelhantes para as diferentes categorias de quantidade de sementes. A eficiência dos métodos que utilizam colchicina pode ser evidenciado pelos resultados

do controle negativo que concentrou o maior número de espigas nos intervalos com menor número de sementes.

De forma geral, as populações apresentaram diferentes frequências para as categorias de quantidades de sementes por espiga, variando de 18% (SD3003) a 41% (SD3006) na categoria menor que 5 sementes; 29% (SD3006) a 49% (PD2005) entre 5 a 25 sementes por espiga e de 22% (PD2005) e 41% (SD3003) para mais de 25 sementes por espiga. Além disto, considerando a soma do número de espigas obtidas nos diferentes métodos, a população SD3003 permitiu a obtenção do maior número de linhagens DH's e PD2005 e SD3006 os menores números (Figura 4.6).

A população SD3003 permitiu a obtenção do maior número de linhagens DH's e se destacou juntamente com a população SD3002 atingindo uma frequência média em torno de 20% de espigas com menos de cinco sementes, além das maiores frequências de espigas acima de 26 sementes (40%). No entanto, a população PD2005 apresentou a maior frequência de espigas com até 25 sementes e a menor frequência de espigas com 26 sementes ou mais (Figura 4.6). Isto mostra que, além do método de duplicação cromossômica utilizado, as populações têm efeito importante sobre a frequência de espigas com maior ou menor número de sementes.

4.4 DISCUSSÃO

Neste estudo foram empregadas as TS, TR e TSG em tamanhos amostrais de 1536 indivíduos para comparação de métodos, 768 e 384 indivíduos para os estudos de interações método x ano e população x ano, respectivamente, em tamanhos suficientemente grandes e comparáveis as amostras dos estudos conduzidas por Melchinger et al. (2016a) e Chaikam et al. (2020).

As taxas TA e TSV foram influenciadas pelos anos de avaliação, que de certa forma promoveram efeitos ambientais diferentes, mesmo os experimentos sendo conduzidos em casa de vegetação, houve maior sucesso geral no experimento conduzido em 2023, marcado pela semeadura dentro do período indicado para a cultura do milho, enquanto que o experimento de 2022 foi semeado no outono (Tabela 4.1). Em trabalhos como o de Melchinger et al. (2016a), que apresentam resultados de diferentes experimentos empregando imersão de

plântulas, também foi possível observar variações como estas, chegando a dobrar o valor de TSG entre experimentos. Na literatura existe uma carência de estudos para determinar o efeito do ambiente e de suas interações com método e populações sobre as taxas de sucesso de duplicação, assim como foi observado neste trabalho.

A interação significativa de método x população para TS revelou que as populações apresentaram níveis de sobrevivência diferenciados em função do método empregado, sendo que o método de imersão de plântula foi quem mais contribuiu para esta interação e promoveu as maiores reduções com valores de TS abaixo de 40%, verificado na população SD3005 (Figura 4.1). No geral, as TS do controle e dos métodos de injeção e imersão de raízes observado dentro das diferentes populações não diferiram significativamente entre si. Chaikam et al. (2020) também observaram a ocorrência de interação entre métodos de imersão de plântula e imersão de raízes, encontrando uma diferenciação menor que 14% de TS das populações nestes dois métodos.

As TS observadas neste estudo para injeção e imersão de raízes foram semelhantes as observadas por Chaikam et al. (2020) para imersão de raízes. Contudo, as estimativas de TS obtidas para imersão de plântula foram inferiores as observadas por Chaikam et al. (2020) e Zararsiz et al. (2019), semelhantes ao observado por Melchinger et al. (2016a), mas superiores ao observado por Kaur et al. (2023), quando utilizaram este mesmo método.

As estimativas de média geral de TA, TR e TSG para cada uma das populações de milho superdoce, englobando todos os métodos de duplicação cromossômica, revelam que existem populações que apresentam maior facilidade para a restauração da fertilidade e obtenção de linhagens DH's, independentemente do método utilizado (Figura 4.4). Nos estudos de sucesso de duplicação cromossômica realizados por Zararsiz et al. (2019), Chaikam et al. (2020) e Kaur et al. (2023) também foram observados que as populações não apresentaram o mesmo efeito.

A interação populações x anos observada neste estudo para TSG é predominantemente simples e revela que a melhoria do ambiente, proporcionado pelo experimento instalado durante o verão de 2023, promoveu um aumento diferenciado da taxa de sucesso nas diferentes populações, em relação ao experimento instalado no início do outono de 2022 (Figura 4.5 B), revelando que a melhoria das condições ambientais promoveu o aumento das taxas de sucesso geral

de duplicação cromossômica. Em estudos anteriores, também foram detectadas influências genótípicas sobre a TSG na duplicação cromossômica artificial em haploides (Kleiber et al., 2012), bem como da ocorrência de duplicação cromossômica espontânea (Chaikam et al., 2019; Wu et al., 2017; Ma et al., 2018).

A TSG é apresentada por Chaikam et al. (2020) como a medida mais importante na produção de linhagens DH's em milho, pois resume o conjunto de taxas utilizadas como medidas de sucesso geral. A menor TSG observada neste trabalho para o método de imersão de plântula está diretamente associada a mortalidade das plântulas entre a fase do tratamento com o agente antimutagênico e a sua recuperação em bandejas. Assim como verificado por Zararsiz et al. (2019), que utilizando este mesmo método, também se observou taxas de mortalidade relativamente baixas após transplante para o local definitivo de desenvolvimento. Isto ocorre devido as plântulas mais jovens serem mais sensíveis à colchicina e ao manuseio durante o tratamento e transplante para a bandeja, onde permanecem em casa de vegetação por um período de adaptação até o transplante final. Neste sentido, foi sugerida uma taxa de sucesso geral em vaso (TSV), estimada com base na razão do número de espigas DH's obtidas pelo número de plântulas tratadas e transplantadas para o ambiente definitivo de desenvolvimento. Assim, a TSV obtida para o método de imersão de plântula, expressa um valor que mais se aproxima do valor obtido pela TR quando comparada a TSG e reflete melhor a capacidade de duplicação cromossômica deste método em relação aos demais, que pode ser vantajoso no caso de se dispor de um maior número de SHP.

O controle negativo, sem o uso do agente antimutagênico, revelou uma média geral de TSG igual a 12%, indicando uma taxa significativa de duplicação espontânea, em plântulas haploides de populações de milho superdoce cultivadas em casa de vegetação. Embora a duplicação espontânea em milho seja geralmente considerada baixa ou inexistente, algumas populações de milho superdoce apresentaram taxas de duplicação espontânea comparáveis às obtidas por meio da duplicação cromossômica artificial. O valor médio obtido excedeu o limite de TSG de 8% a 10% sugerido por Maqbool et al. (2020), indicando a viabilidade da produção de DH's sem a necessidade de agentes antimutagênicos. Essa possibilidade pode resultar em economia de tempo, recursos e custos de mão de obra, além de reduzir riscos para a saúde humana associados ao uso de agentes químicos.

As TSG observadas para obtenção de DH's a partir de populações

de milho superdoce, em ambiente de casa de vegetação, foram compatíveis ao apresentado na literatura para tratamentos com colchicina. A TSG média observada para o método de injeção ficou entre as estimativas apresentadas por Eder & Chalyk (2002) para condições de casa de vegetação e campo. Para o método de imersão de plântula, a TSG média observada ficou entre o observado por Melchinger et al (2016a) e acima do apresentado por Chaikam et al. (2020), que também empregaram solução de 0,04% de colchicina por 12 horas, mas inferiores ao apresentado por Eder & Chalyk (2002), que utilizaram solução de 0,06% de colchicina. A TSG para o método de imersão de raízes ficou um pouco abaixo do apresentado por Chaikam et al. (2020), ao empregar a mesma concentração de colchicina.

A interação métodos x anos observada para TSG mostrou uma melhoria significativa desta taxa para os métodos de imersão de raízes e controle no ano de 2023, não sendo observada alteração importante entre anos para os métodos de injeção e imersão de plântula, mostrando maior estabilidade de resultados nestes métodos (Figura 4.5 A).

As frequências de espigas DH's de milho superdoce de dois anos, categorizadas por número de sementes por espiga para os métodos de imersão de raízes e de injeção, foram semelhantes aos resultados apresentados por Chaikam et al. (2020), para imersão de raízes em milho comum (Figura 4.6). Contudo, ao comparar os métodos de imersão de plântulas e imersão de raízes foram identificadas diferenças entre os valores observados por esses autores. Eles relataram uma maior frequência de espigas na classe de 1 a 5 sementes (56,8%) e uma menor frequência de espigas com mais de 25 sementes (12,6%) para o método de imersão de plântulas, em comparação com o método de imersão de raízes, que apresentou 38,9% e 25,1% para essas mesmas classes, respectivamente. Para o intervalo entre 5 e 25 sementes por espiga, as frequências de DH's obtidos ficaram semelhantes em ambos os métodos e estudos. A maior frequência de espigas com mais sementes observada para imersão de plântula reforça a discussão realizada com base nas estimativas de TSV, de que o método de imersão de plântula apresentou o melhor efeito geral na duplicação cromossômica das plântulas e na restauração da fertilidade de plantas haploides.

Assim como observado por Chaikam et al. (2020), este trabalho permitiu identificar a existência de variação nas frequências de espigas com maiores

e menores números de sementes, em função das populações doadoras. Estas variações sugerem que algumas populações apresentam maior aptidão para produção de espigas com maior número de sementes, resultando na produção de maiores quantidades de sementes por espiga. De modo geral, todos os métodos de duplicação cromossômica que utilizaram solução de colchicina empregados neste estudo, resultaram em uma maior frequência de espigas com maior número de sementes em relação ao observado por Chaikam et al. (2020). Isto deve estar associado ao maior controle ambiental possível em casa de vegetação e ao fato de neste estudo terem sido realizadas repetições do processo de autofecundação por mais de duas vezes em cada planta, de acordo com a disponibilidade de pólen.

A definição do método de duplicação cromossômica impacta diretamente na composição dos custos de obtenção de plantas DH's, dentre eles o consumo de produto para elaboração de soluções antimitóticos, número de etapas necessárias e a utilização de mão de obra. Com base na experiência adquirida pelo LMG, para se tratar 1000 indivíduos serão necessários pelo menos: 100 ml para injeção direta sobre o tecido meristemático basal (132 mg de colchicina com um mínimo de 95% de pureza, na concentração de 0,125% de colchicina); 1750 ml para imersão de plântulas recém germinadas (737 mg de colchicina com um mínimo de 95% de pureza, na concentração de 0,04% de colchicina) e 3750 ml para imersão de raízes até a região da coroa (2763 mg de colchicina com um mínimo de 95% de pureza, na concentração de 0,07% de colchicina). Assim, os métodos de imersão de plântula e imersão de raízes irão demandar cerca de 6 e 21 vezes mais colchicina, respectivamente, que o método de injeção. Além do menor consumo de colchicina, o método de injeção tem a vantagem de requerer uma menor quantidade de etapas de trabalho, resultando na economia de recursos em um processo rápido, sem gerar resíduos tóxicos após o tratamento. Em contrapartida, vai exigir uma maior quantidade de pessoas com domínio desta técnica, o que pode gerar variações na taxa de sucesso geral, além de maiores riscos de contaminação por exposição. De forma geral, o método de imersão de plântula requer o uso intensivo de mão-de-obra, demandado pelas etapas de germinação por 3 a 4 dias em papel germitest, corte da ponta dos coleóptilos, tratamento com agente antimitótico por 12 horas, plantio nas bandejas, recuperação em estufa por 10 a 12 dias e transplântio no campo. O método de injeção juntamente com o método de imersão de raízes oferece a vantagem de consumir um menor número de etapas, oferecendo maior

facilidade de manuseio até serem transplantadas no ambiente definitivo de desenvolvimento.

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que: a) o método de imersão de plântula resulta em menores taxas de sobrevivência, enquanto os demais métodos produzem resultados semelhantes à sobrevivência observada para o controle; b) o método de imersão de plântula e de injeção promovem maiores taxas de reprodução; c) o método de imersão de plântula promove a maior taxa de sucesso geral após transplante para o vaso; d) o método de imersão de plântulas é mais eficaz para produzir espigas com maior número de sementes; e) o método de injeção e de imersão de raízes permitem obter maiores taxas de sucesso geral, considerando o número de indivíduos tratados e sobreviventes; f) as condições ambientais mais favoráveis tem efeito benéfico sobre o aumento da taxa de duplicação cromossômica e sobre o sucesso geral.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo (CIMMYT) pelos genótipos indutores utilizados. A Fundação de Apoio ao Desenvolvimento da Universidade Estadual de Londrina (FAUEL) e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina (PPGA) pelo apoio à pesquisa.

CONFLITO DE INTERESSES

O autor declara que não existe conflito de interesses.

ORCID

<https://orcid.org/0000-0003-1813-2557>

4.5 REFERÊNCIAS

ARAUJO, E.F.; ARAUJO, R.F.; SOFIATTI, V.; SILVA, R.F. Maturação de sementes de milho-doce – grupo superdoce. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 2,

pp.69-76, 2006a. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-31222006000200009>

BEYENE, Y.; MUGO, S.; SEMAGN, K.; ASEA G.; TREVISAN, W.; TAREKEGNE, A.; TEFERA T.; GETHI J.; KIULA, B.; GAKUNGA, J.; KARAYA H.; CHAVANGI A. Genetic distance among doubled haploid maize lines and their testcross performance under drought stress and non-stress conditions. **Euphytica**. v.192, pp.379-392, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10681-013-0867-5>

BORDES, J.; VAULX, R. D.; POLLACSEK, M. Haplodiploidization of maize (*Zea mays* L) through induced gynogenesis assisted by glossy markers and its use in breeding. **Plants Genetics and Breeding**, v.17, pp.291-297, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1051/agro:19970504>

CASTILLO, A. M.; CISTUÉ, L.; VALLÉS, M. P.; SORIANO, M. Chromosome doubling in monocots. Advances in Haploid Production in Higher Plants. In: TOURAEV, A.; FORSTER, B. P.; JAIN, S. M. New York: **Science**, pp.329-338, 2008. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8854-4_27

CHAIKAM, V. *In vivo* maternal haploid induction in maize. In: Prasanna BM, Chaikam V, Mahuku G. **Doubled haploid: Technology in maize breeding**: theory and practice. International Maize and Wheat Improvement Center, Mexico, pp. 9-13, 2012a. <http://hdl.handle.net/10883/1351>

CHAIKAM, V.; MAHUKU, G. **Chromosome Doubling of Maternal Haploids**. In Doubled Haploid Technology in Maize Breeding: Theory and Practice; Prasanna, B.M., Chaikam, V., Mahuku, G., Eds.; CIMMYT: El Batán, Mexico, pp. 24–29, 2012b. <http://hdl.handle.net/10883/1351>

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, pp.3227–3243, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03433-x>

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**, 9, 459, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants9040459>

CHALYK, S. (2000) Changing fertility potential in maize maternal haploids. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**. 74, p17–18, 2000.

CHASE, S.S. Monoploids and monoploid-derivatives in maize (*Zea mays* L.). **The Botanical Reviews**, v.35, pp.117–167, 1969. <https://www.jstor.org/stable/4353768>

COE, E. H. A line of maize with high haploid frequency. **American Naturalist**, v.93, pp.381-382, 1959. *DOI*: <https://doi.org/10.1086/282098>

COUTO, E. G. O.; VON PINHO, E. V. R.; VON PINHO, R. G.; VEIGA A. D. BUSTAMANTE, F. O.; DIAS, K. O. G. *In vivo* haploid induction and efficiency of two chromosome duplication protocols in tropical maize. **Ciência Agrotecnológica**, v.39, pp.435-442, 2015. *DOI*: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542015000500002>

CRUZ, C.D. **Programa Genes**: Biometria. Editora UFV. Viçosa (MG). 382p. 2006.

DANG, N. C.; MUNSCH, M.; AULINGER, I.; RENLAI, W.; STAMP, P. Inducer line generated double haploid seeds for combined waxy and opaque 2 grain quality in subtropical maize (*Zea mays* L.). **Euphytica**, v.183, pp.153-160, 2012. *DOI*: <https://doi.org/10.1007/s10681-011-0423-0>

DEIMLING, S.; RÖBER, F.; GEIGER, H. H. Methodik und genetik der in-vivo haploides induktion bei mais. **Vontrage Pflanzenzüchtung**, v.38, pp.203-224, 1997.

DE LA FUENTE, G.N.; FREI, U.K.; TRAMPE, B.; NETTLETON, D.; ZHANG, W.; LÜBBERSTEDT, T. A diallel analysis of a maize donor population response to *in vivo* maternal haploid induction: I. inducibility. **Crop Science**. 2018, 58, 1830–1837. *DOI*: <https://doi.org/10.1002/csc2.20021>

DHOOGHE, E.; VAN LAERE, K.; EECKHAUT, T.; LEUS, L.; VAN HUYLENBROECK, J. Mitotic chromosome doubling of plant tissue *in vitro*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.104, pp. 359-373, 2011. *DOI*: <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-010-9786-5>

EDER, J.; CHALYK, S. *In vivo* haploid induction in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v.104, pp.703-708, 2002. *DOI*: <https://doi.org/10.1007/s00122-001-0773-4>

FRITSCHÉ-NETO, R.; GARBUGLIO, D. D.; BORÉM, A. Cap. 8 – Duplo-haploides.

In: BORÉM. A.; FRITSCHÉ-NETO, R. **Biotecnologia aplicada ao melhoramento de plantas**. Universidade Federal de Viçosa, pp.267-301, 2013.

GAYEN, P.; MADAN, J.K.; KUMAR, R.; SARKAR, K.R. Chromosome doubling in haploids through colchicine. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**. 7, pp. 68-65, 1994.

GORDILLO, G. A.; GEIGER, H. H. Alternative recurrent selection strategies using doubled haploid lines in hybrid maize breeding. **Crop Science**, v.48, pp. 911-922, 2008. DOI: <https://doi.org/10.2135/CROPSCI2007.04.0223>

KATO, A.; GEIGER, H.H. Chromosome doubling of haploid maize seedlings using nitrous oxide gas at the flower primordial stage. **Plant Breeding**, v.121, pp. 370-377, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2002.743321.x>

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**, 23: 219, pp 1-9, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04228-5>

KERMICLE, J.L. Androgenesis conditioned by a mutation in maize. **Science**, v.166, pp. 1422–1424, 1969. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.166.3911.1422>.

Kleiber, D.; Prigge, V.; Melchinger, A.E.; Burkard, F.; San Vicente, F.; Palomino, G.; Gordillo, G.A. Haploid fertility in temperate and tropical maize germplasm. **Crop Science**. 52, pp. 623–630, 2012. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci2011.07.0395>

KRCHOV, L. M.; BERNARDO, R. Relative efficiency of genomewide selection for testcross performance of doubled haploid lines in a maize breeding program. **Crop Science**, v.55, pp. 2091-2099, 2015. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci2015.01.0064>

LONGIN, C. F. H.; UTZ, H.; REIF, J. C.; WEGENAST, T. W.; SCHIPPRACK, W.; MELCHINGER, A. E. (b) Hybrid maize breeding with doubled haploid: III. Efficiency of early testing prior to double haploid production in two-stage selection for testcross performance. **Theoretical and Applied Genetics**, v.115, pp. 519-527, 2007a. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00122-007-0585-2>

LONGIN, C. F. H.; UTZ, H. F.; MELCHINGER, A. E.; REIF, J. C. (a) Hybrid maize breeding with doubled haploids: II. Optimum type and number of testers in two-stage selection for general combining ability. **Theoretical and Applied Genetics**, v.114, pp. 393-402, 2007b. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0422-z>

MA, H.; LI, G.; WÜRSCHUM, T.; ZHANG, Y.; ZHENG, D.; YANG, X.; LI, J.; LIU, W.; YAN, J.; CHEN, S. Genome-wide Association Study of Haploid Male Fertility in Maize (*Zea mays* L.). **Frontiers Plant Science**. v9, 974, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00974>

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. DOI: <https://doi.org/10.1002/csc2.20261>

MELCHINGER, A.; MOLENAAR, W.; MIRDITA, V.; SCHIPPRACK, W. Colchicine alternatives for chromosome doubling in maize haploids for doubled haploid production. **Crop Science**, v. 56, pp. 1–11, 2016a. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci2015.06.0383>

MELCHINGER, A.E.; BRAUNER, P.C.; BÖHM, J; SCHIPPRACK, W. *In vivo* haploid induction in maize: comparison of different testing regimes for measuring haploid induction rates. **Crop Science**, v.56, pp. 1127–1135, 2016b. DOI: <https://doi.org/10.2135/CROPSCI2015.11.0668>

OLIVEIRA JUNIOR, L.F.G.; DELIZA, R.; BRESSAN-SMITH, R.; PEREIRA, M.G.; CHIQUIERE, T.B. Seleção de genótipos de milho mais promissores para o consumo in natura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.1, pp. 159-165, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612006000100026>

PEREIRA FILHO. I. A., CRUZ. J. C., **Milhos especiais**. Alternativas para agregar valor. DBO Agrotecnologia. pp. 20-22, 2009.

PIERRE, P.M.O.; DAVIDE, L.M.C.; COUTO, E.G.O.; SILVA, T.N.; RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B. Duplo-haploides: estratégias para obtenção e importância no melhoramento genético do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.10, p. 1-16, 2011. DOI: <https://doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v10n1p1-16>

PRASANNA, B. N. Cap.1 - Doubled Haploid (DH) technology in maize breeding: an overview. In: PRASANNA, B. M.; CHAIKAM, V.; MAHUKU, G. **CIMMYT – Doubled Haploid Technology in Maize Breeding: Theory and Practice**, Mexico, pp. 1-8, 2012.

PRIGGE, V.; MELCHINGER, A.E. Production of haploids and doubled haploids in maize. In: Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N (eds) **Plant cell culture protocols**. Springer, Berlin, pp 161–172, 2012. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-61779-818-4_13

PRIGGE, V.; BABU, R.; DAS, B.; RODRIGUEZ, M. H.; ATLIN, G. N.; MELCHINGER, A. E. Doubled haploids in tropical maize: II. Quantitative genetic parameters for testcross performance. **Euphytica**, v.185, pp. 453-463, 2012a. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10681-012-0626-z>

PRIGGE, V.; XU, X.; LI, L.; BABU, R.; CHEN, S.; ATLIN, G. N.; MELCHINGER, A. E. New insights into the genetics of *in vivo* induction of maternal haploids, the backbone of doubled haploid technology in maize. **Genetics**, v.190, pp. 781-793, 2012b. DOI: <https://doi.org/10.1534/genetics.111.133066>

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, pp. 903-908, 2018, DOI: <https://doi.org/10.9755/ejfa.2018.v30.i10.1828>.

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, pp. 275-283, 2005. <http://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=17583781>

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

SAS Institute. **SAS language and procedures: usage**. Version 9.1. [CD-ROM]. Cary: SAS Institute; 2004.

SOUSA, S.M.; PAES, M.C.D.; TEIXEIRA, F.F. **Milho doce**: origem das mutações naturais. EMBRAPA Milho e Sorgo, ISSN 1518-4277, Sete Lagoas, Minas Gerais,

2012.

STRIGENS, A.; SCHIPPRACK, W.; REIF, J. C.; MELCHINGER, A. E. Unlocking the genetic diversity of maize landraces with doubled haploid opens origin new avenues for breeding. **PLoS One**, v.8, pp. 1-11, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057234>

TRENTIN, H.U.; FREI, U.K.; LÜBBERSTEDT, T. Breeding maize maternal haploid inducers. **Plants**, v.9, 614; 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants9050614>

VANOUS, A. E. **Optimization of doubled haploid production in maize (*Zea mays* L.)**. Master' Degree of Science Thesis. Iowa State University. Ames, Iowa, 2011. DOI: <https://doi.org/10.31274/etd-180810-335>

WU, P.; REN, J.; TIAN, X. et al. New Insights into the genetics of haploid male fertility in Maize. **Crop Science**, v.57, pp. 637–647, 2017. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci2016.01.0017>

~~KAJIKAWA, S. et al. (1995) Production of homozygous lines in maize using a technology of the mass accelerated production of homozygous lines. **Kukuruza Sorgo**, Moskova, v4, p.17–19, 1996.~~

ZARARSIZ, D.; ÖZTÜRK, L.; YANIKOĞLU, S.; TURGUT, İ.; KIZIK, S.; BILGIN, B. Production of Double Haploid Plants Using *In Vivo* Haploid Techniques in Corn. **Tarım Bilimleri Dergisi**. 25, p62-69, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.15832/ankutbd.539000>

5. CONCLUSÃO

Os resultados observados para as linhagens indutoras CIM2GTAIL's e suas combinações F_1 's estudadas em ambiente tropical permitem concluir que:

- a) estes indutores apresentam adaptação para a semeadura no início da primeira safra brasileira de milho, mas tem fraco desempenho em semeaduras mais tardias ou em segunda safra, quando se tem maior probabilidade de epidemias causadas por doenças da cultura do milho;
- b) as taxas de indução a haploidia destes indutores em cruzamentos com populações de milho superdoce tropical são semelhantes às observadas com indutores temperados em cruzamentos com milho comum, em seus ambientes de origem;
- c) o indutor CIM2GTAIL-P1 e a combinação CIM2GTAIL-P1 x CIM2GTAIL-P3 apresentam as maiores taxas de indução em cruzamento com as populações de milho superdoce tropical;
- d) existe interação destes indutores e as populações doadoras de milho superdoce para as taxas de indução.

O estudo da eficácia dos métodos de duplicação cromossômica na produção de DH's permitem concluir que:

- a) o método de imersão de plântula resulta em menores taxas de sobrevivência, enquanto os demais métodos produzem resultados semelhantes à sobrevivência observada para o controle;
- b) o método de imersão de plântula e de injeção promovem maiores taxas de reprodução;
- c) o método de imersão de plântula promove a maior taxa de sucesso geral após transplântio para o vaso;
- d) o método de imersão de plântulas é mais eficaz para produzir espigas com maior número de sementes;
- e) o método de injeção e de imersão de raízes permitem obter maiores taxas de sucesso geral, considerando o número de indivíduos tratados e sobreviventes;
- f) as condições ambientais mais favoráveis têm efeito benéfico sobre o aumento da taxa de duplicação cromossômica e sobre o sucesso geral.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROCERES, **Guia Agroceres de sanidade**. 2. ed. São Paulo: Sementes Agroceres, p.72, 1996.

Agricultural Marketing Resource Center (2024, agosto). **Sweet corn**. Disponível em: <https://www.agmrc.org/commodities-products/vegetables/sweet-corn>. Acesso em: 05 agosto 2024.

ARAUJO, E.F.; ARAUJO, R.F.; SOFIATTI, V.; SILVA, R.F. Maturação de sementes de milho-doce – grupo superdoce. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 2, pp.69-76, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-31222006000200009>

BARBIERI, V.H.B.; LUZ, J.M.Q.; BRITO, C.H.; DUARTE, J.M.; GOMES, L.S.; SANTANA, D.G. Produtividade e rendimento industrial de híbridos de milho doce em função de espaçamentos e populações de plantas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.3, p.826-830, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-05362005000300027>

BARRET, P.; BRINKMANN, M.; BECKERT, M. A major locus expressed in the male gametophyte with incomplete penetrance is responsible for *in situ* gynogenesis in maize. **Theoretical and Applied Genetics**. 117:581–594, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00122-008-0803-6>

BEAL, W.J. Crossing and hybridizing plants. 15th Rep. **Michigan Board of Agric., Lansing**. 1876. DOI: <https://doi.org/10.2134/agronj2007.0011cs>

BEAL, W. J. Experiments in cross-breeding Indian corn with flowers of the same variety, the seed of which was raised one hundred miles away. **American Journal of Science**, 3-24(144), 452, 1882. DOI: <https://doi.org/10.2475/ajs.s3-24.144.452>

BEYENE, Y.; MUGO, S.; SEMAGN, K.; ASEA G.; TREVISAN, W.; TAREKEGNE, A.; TEFERA T.; GETHI J.; KIULA, B.; GAKUNGA, J.; KARAYA H.; CHAVANGI A. Genetic distance among doubled haploid maize lines and their testcross performance under drought stress and non-stress conditions. **Euphytica**. v.192, pp.379-392, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10681-013-0867-5>

BIGOLIN T, TALAMINI E. Impacts of Climate Change Scenarios on the Corn and

Soybean Double-Cropping System in Brazil. **Climate**. 12(3), 42, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/cli12030042>

BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de plantas 6th ed.** Viçosa-MG: UFV, 2013.

BORDES, J.; VAULX, R. D.; POLLACSEK, M. Haplodiploidization of maize (*Zea mays* L) through induced gynogenesis assisted by glossy markers and its use in breeding. **Plants Genetics and Breeding**, v.17, pp.291-297, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1051/agro:19970504>

BORDES, J; CHARMET, G.; DE VAULX, R.D.; LAPIERRE, A.; POLLACSEK, M. P.; BECKERT, M.; GALLAIS, A. Doubled haploid versus S₁ family recurrent selection for testcross performance in a maize population. **Theoretical and Applied Genetics** 112:1063–1072, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10681-006-9266-5>

CASTILLO, A. M.; CISTUÉ, L.; VALLÉS, M. P.; SORIANO, M. Chromosome doubling in monocots. Advances in Haploid Production in Higher Plants. In: TOURAEV, A.; FORSTER, B. P.; JAIN, S. M. New York: **Springer Science**, pp.329-338, 2008. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8854-4_27

CHALYK, S.T. Creating new haploid-inducing lines of maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**. v.73, pp.53-54, 1999. <https://mnl.maizegdb.org/mnl/73/51chalyk.html>

CHALYK, S.T. Obtaining fertile pollen in maize maternal haploids. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**. v74, pp.17–18, 2000.

CHAIKAM, V. *In vivo* maternal haploid induction in maize. In: Prasanna BM, Chaikam V, Mahuku G. **Doubled haploid: Technology in maize breeding**: theory and practice. International Maize and Wheat Improvement Center, Mexico, pp. 9-13, 2012a. <http://hdl.handle.net/10883/1351>

CHAIKAM, V.; MAHUKU, G. **Chromosome Doubling of Maternal Haploids**. In Doubled Haploid Technology in Maize Breeding: Theory and Practice; Prasanna, B.M., Chaikam, V., Mahuku, G., Eds.; CIMMYT: El Batán, Mexico, pp. 24–29, 2012b. <http://hdl.handle.net/10883/1351>

CHAIKAM V, NAIR SK, BABU R et al 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, pp. 159–171, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00122-014-2419-3>

CHAIKAM, V.; MARTINEZ, L.; MELCHINGER, A.E.; SCHIPPRACK, W.; BODDUPALLI, P.M. Development and Validation of Red Root Marker-Based Haploid Inducers in Maize. **Crop Science**, 56: 1678-1688. 2016. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci2015.10.0653>

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. *Front. Plant Science*, v.9, art.1527, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01527>

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, pp.3227–3243, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03433-x>

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*, 9, 459, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants9040459>

CHANG, M-T.; COE, E. **Doubled Haploids**. In book: *Molecular Genetic Approaches to Maize Improvement*. pp.127-142, 2009. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-68922-5_10

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

CHAIKAM V, SK NAIR, S. T. COE, E. et al. Marker-assisted selection for improved maternal haploids. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**. 74, p17–18, 2000.

CHANDLER, V.L.; RADICELLA, J.P.; ROBBINS, T.P.; CHEN, J.; TURKS, D. Two regulatory genes of the maize anthocyanin pathway are homologous: Isolation of B

utilizing R genomic sequences. **Plant Cell**, pp.1175–1183, 1989. DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.1.12.1175>

CHANG, MT., COE, E.H. (2009). **Doubled Haploids**. In: Kriz, A.L., Larkins, B.A. (eds) *Molecular Genetic Approaches to Maize Improvement*. Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol 63. Springer, Berlin, Heidelberg. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-540-68922-5_10

CHASE, S. S. Techniques for isolating haploid plants. **American Journal of Botany**. 34, 579–609, 1947.

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

CHASE, S. S. Androgenesis, its use for transfer of maize cytoplasm. **Heredity**, Edinburgh, v. 54, pp. 152- 158, 1963. DOI: <https://doi.org/10.1093/jhered/54.4.152>

CHASE, S.S. Parthenogenesis. **Maize Genetics Cooperation News Letter**, pp.38-46, 1964a.

CHASE, S.S. Monoploids and monoploid-derivatives in maize (*Zea mays* L.). **The Botanical Reviews**, v.35, pp.117–167, 1969. <https://www.jstor.org/stable/4353768>

CHEN, S.; SONG, T. Identification haploid with high oil xenia effect in maize. **Acta Agronomica Sinica**. 29(4), pp.587-590, 2003.

CHOE, E.; CARBONERO, F.C.; MULVANEY, K.; RAYBURN, A.L.; MUMM, R.H. Improving *in vivo* maize doubled haploid production efficiency through early detection of false positives. **Plant Breeding**. 131(3), pp. 399-401, 2012 DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0523.2012.01962.x>

COE, E. H. A line of maize with high haploid frequency. **American Naturalist**, v.93, pp.381-382, 1959. DOI: <https://doi.org/10.1086/282098>

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

COE, E.H. Anthocyanin Genetics. In **The Maize Handbook**; Springer: New York, NY, USA, 1994; pp. 279–281.

COUTO, E. G. O.; VON PINHO, E. V. R.; VON PINHO, R. G.; VEIGA A. D. BUSTAMANTE, F. O.; DIAS, K. O. G. *In vivo* haploid induction and efficiency of two chromosome duplication protocols in tropical maize. **Ciência Agrotecnológica**, v.39, pp.435-442, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542015000500002>

CRUZ, C.D. **Programa Genes**: Biometria. Editora UFV. Viçosa (MG). 382p. 2006.

DANG, N. C.; MUNSCH, M.; AULINGER, I.; RENLAI, W.; STAMP, P. Inducer line generated double haploid seeds for combined waxy and opaque 2 grain quality in subtropical maize (*Zea mays*. L.). **Euphytica**, v.183, pp.153-160, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10681-011-0423-0>

DE LA FUENTE, G.N.; FREI, U.K.; TRAMPE, B.; NETTLETON, D.; ZHANG, W.; LÜBBERSTEDT, T. A diallel analysis of a maize donor population response to *in vivo* maternal haploid induction: I. inducibility. **Crop Science**. 58, pp.1830–1837, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1002/csc2.20021>

DEIMLING, S.; RÖBER, F.; GEIGER, H. H. Methodik und genetik der *in vivo* haploides induktion bei mais. **Vontrage Pflanzenzüchtung**, v.38, pp.203-224, 1997.

DENYER, K.; DUNLAP, F.; THORBJORNSSEN, T.; KWWLING, P.; SMITH, A. M. The major form of ADP-glucose pyrophosphorylase in maize endosperm is extra plastidial. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 112, pp. 779-785, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.112.2.779>

DHOOGHE, E.; VAN LAERE, K.; EECKHAUT, T.; LEUS, L.; VAN HUYLENBROECK, J. Mitotic chromosome doubling of plant tissue *in vitro*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.104, pp. 359-373, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-010-9786-5>

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** 34:1147–1158, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-014-0106-3>

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

EDER, J.; CHALYK, S. *In vivo* haploid induction in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v.104, pp.703-708, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00122-001-0773-4>

ELLER, M.S.; PAYNE, G.A.; HOLLAND, J.B. Selection for reduced Fusarium ear rot and fumonisin content in advanced backcross maize lines and their topcross hybrids. **Crop Science**, 50, 2249–2260, 2010. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci2009.11.0683>

ERENSTEIN, O; JALETA, M.; SONDER, K; MOTTALEB, K.; PRASANNA, B.M. Global maize production, consumption and trade: trends and R&D implications. **Food Security**. 14: 1295-1319, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12571-022-01288-7>

EVANS, M.M.S. The indeterminate gametophyte1 gene of maize encodes a LOB domain protein required for embryo sac and leaf development. **Plant Cell** 19(1), pp.46–62, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1105/2Ftpc.106.047506>

FLINT-GARCIA, S.A.; MCMULLEN, M.D.; DARRAH, L.L. Genetic Relationship of Stalk Strength and Ear Height in Maize. **Crop Science**. 43: 23-31, 2003. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci2003.2300a>

FORD, R. (2009). Inheritance of Kernel Color in Corn: Explanations & Investigations. **The American Biology Teacher**. 62. 181-188. DOI: [http://dx.doi.org/10.1662/0002-7685\(2000\)062\[0181:IOKCIC\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1662/0002-7685(2000)062[0181:IOKCIC]2.0.CO;2)

FRITSCHÉ-NETO, R.; GARBUGLIO, D. D.; BORÉM, A. Cap. 8 – Duplo-haploides. In: BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. **Biotechnologia aplicada ao melhoramento de plantas**. Universidade Federal de Viçosa, pp.267-301, 2013.

GAYEN, P.; MADAN, J.K.; KUMAR, R.; SARKAR, K.R. Chromosome doubling in haploids through colchicine. **Maize Genet Coop News**, pp. 68-65, 1994.

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

GILLES, J.M.; KHALED, A.; LAFFAIRE, J.B.; CHAIGNON, S.; GENDROT, G.; LAPLAIGE, J.; BERGÈS, H.; BEYDON, G.; BAYLE, V.; BARRET, P.; COMADRAN, J. MARTINANT, J.P.; ROGOWSKY, P.M.; WIDIEZ, T. Loss of pollen-specific

KATO, A.; GEIGER, H.H. Chromosome doubling of haploid maize seedlings using nitrous oxide gas at the flower primordial stage. **Plant Breeding**, v.121, pp. 370-377, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2002.743321.x>

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**, 23(1), 219, pp 1-9, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04228-5>

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**, 180, pp.219–226, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10681-011-0376-3>

KELLIHER, T.; STARR, D.; RICHBOURG, 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: pp.105–109, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature20827>

KERMICLE, J.L. Androgenesis conditioned by a mutation in maize. **Science**, v.166, pp. 1422–1424, 1969. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.166.3911.1422>.

KERMICLE, J.L. Pleiotropic effects on seed development of the indeterminate gametophyte gene in maize. **American Journal of Botany**, v.58, pp.1–7, 1971. DOI: <https://doi.org/10.2307/2441299>

KERMICLE, J.L. Androgenesis and the indeterminate gametophyte mutation: source of the cytoplasm. **Maize Genet Coop Newsl**, v.47, pp. 208–209, 1973.

KERMICLE, J.L. Indeterminate gametophyte (*ig*): biology and use. In: The maize handbook. **Springer**, pp. 388–393, 1994. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4612-2694-9_58

KHAMMONA, K.; DERMAIL, A.; SURIHARN, K.; LÜBBERSTEDT, T.; WANCHANA, S.; THUNNOM, B.; PONCHEEWIN, W.; TOOJINDA, T.; RUANJAICHON, V.; ARIKIT, S. Accelerating haploid induction rate and haploid validation through marker-assisted

selection for *qhir1* and *qhir8* in maize. **Frontiers in Plant Science**. Mar 5; 15:1337463, 2024. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2024.1337463>

KINDIGER, B.; HAMANN, S. Generation of Haploids in Maize: A Modification of the Indeterminate Gametophyte (*ig*) System. **Crop Science**, v.33, pp. 342–344, 1993. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci1993.0011183X003300020027x>

KLEIBER, D.; PRIGGE, V.; MELCHINGER, A.E.; BURKARD, F.; SAN VICENTE, F.; PALOMINO, G.; GORDILLO, G.A. Haploid fertility in temperate and tropical maize germplasm. **Crop Science**. v.52, pp.623–630, 2012. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci2011.07.0395>

KORKUT, K. & CENGIZ, R. Development of doubled haploid maize lines by using *in vivo* haploid technique. **Biotech Studies** 29(1), 1-7, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.38042/biost.2020.29.01.01>

KRCHOV, L. M.; BERNARDO, R. Relative efficiency of genomewide selection for testcross performance of doubled haploid lines in a maize breeding program. **Crop Science**, v.55, pp. 2091-2099, 2015. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci2015.01.0064>

KWIATKOWSKI, A.; CLEMENTE, E. Características do milho doce (*Zea mays* L.) para industrialização. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v.1, pp. 93-103, 2007. DOI: <https://doi.org/10.3895/S1981-36862007000200010>

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. 6, pp.405–410, 1988. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00265341>

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. **Plant**. v. 230, pp. 367–376, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00425-009-0943-1>

LI, Y.; LIN, Z.; YUE, Y.; ZHAO, H.; FEI, X.; LIZHU, E.; et al. Loss-of-function alleles of *ZmPLD3* cause haploid induction in maize. **Nature Plants**. v7, pp.1579–1588, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41477-021-01037-2>

LIU, X., HUANG, M., FAN, B., BUCKLER, E. S., AND ZHANG, Z. Iterative usage of fixed and random effect models for powerful and efficient genome-wide association studies. **PloS Genet.** 12 (3), 2016. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005767>

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** 6;10(3), pp.520–522, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.01.011>

LONGIN, C. F. H.; UTZ, H.; REIF, J. C.; SCHIPPRACK, W.; MELCHINGER, A. E. Hybrid maize breeding with doubled haploid: I. One-stage versus two-stage selection for testcross performance. **Theoretical and Applied Genetics**, v.112, pp. 903-912, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00122-005-0192-z>

LONGIN, C. F. H.; UTZ, H.; REIF, J. C.; WEGENAST, T. W.; SCHIPPRACK, W.; MELCHINGER, A. E. (b) Hybrid maize breeding with doubled haploid: III. Efficiency of early testing prior to double haploid production in two-stage selection for testcross performance. **Theoretical and Applied Genetics**, v.115, pp. 519-527, 2007a. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00122-007-0585-2>

LONGIN, C. F. H.; UTZ, H. F.; MELCHINGER, A. E.; REIF, J. C. (a) Hybrid maize breeding with doubled haploids: II. Optimum type and number of testers in two-stage selection for general combining ability. **Theoretical and Applied Genetics**, v.114, pp. 393-402, 2007b. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0422-z>

LUBBERSTEDT, T.; FREI, U. K. Application of doubled haploids for target gene fixation in backcross programmes of maize. **Plant Breeding**, v.131, pp. 449-452, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2011.01948.x>

LUZ, J. M., CAMILO, J. S., BARBIERI, V. H., RANGEL, R. M., & OLIVEIRA, R. C. Produtividade de genótipos de milho doce e milho verde em função de intervalos de colheita. **Horticultura Brasileira**, 32, 163-167, 2014.

MA, H.; LI, G.; WÜRSCHUM, T.; ZHANG, Y.; ZHENG, D.; YANG, X.; LI, J.; LIU, W.; YAN, J.; CHEN, S. Genome-wide Association Study of Haploid Male Fertility in Maize

(*Zea mays* L.). **Frontiers Plant Science**. v9, 974, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00974>

MAHUKU, G. Putative DH seedlings: From the Lab to the Field. In **Doubled Haploid Technology in Maize Breeding: Theory and Practice**; Prasanna, B., Chaikam, V., Mahuku, G., Eds.; CIMMYT: El Batan, Mexico, pp. 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. DOI: <https://doi.org/10.1002/csc2.20261>

MELCHINGER, A.E.; SCHIPPRACK, W.; WURSCHUM, T.; CHEN, S.; TECHNOW, F. Rapid and accurate identification of *in vivo* induced haploid seeds based on oil content in maize. **Nature**, v.3, pp. 2129, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep02129>

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, pp. 1-8, 2014. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci2013.12.0851>

MELCHINGER, A.; MOLENAAR, W.; MIRDITA, V.; SCHIPPRACK, W. Colchicine alternatives for chromosome doubling in maize haploids for doubled haploid production. **Crop Science**, v. 56, pp. 1–11, 2016a. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci2015.06.0383>

MELCHINGER, A.E.; BRAUNER, P.C.; BÖHM, J.; SCHIPPRACK, W. *In vivo* haploid induction in maize: comparison of different testing regimes for measuring haploid induction rates. **Crop Science**, v.56, pp. 1127–1135, 2016b. DOI: <https://doi.org/10.2135/CROPSCI2015.11.0668>

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, pp.670–678, 2018. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci2017.07.0429>

MOLENAAR, W.S.; SCHIPPRACK, W.; MELCHINGER, A.E. Nitrous Oxide-Induced Chromosome Doubling of Maize Haploids. **Crop Science**, v58, pp.650–659, 2018.

DOI: <https://doi.org/10.2135/CROPSCI2017.07.0412>

MOLENAAR, W.S.; MELCHINGER, A.E. (2019) Production of doubled haploid lines for hybrid breeding in maize. In: Ordon Frank, Friedt Wolfgang (eds) **Advances in breeding techniques for cereal crops**. Burleigh Dodds Science Publishing Company, Cambridge. DOI: <https://doi.org/10.1201/9780429275463>

NANDA, D.K.; CHASE, S.S. An embryo marker for detecting monoploids of maize (*Zea mays* L.). **Crop Science**, v6, pp. 213–215, 1966. DOI: <https://doi.org/10.2135/CROPSCI1966.0011183X000600020036X>

OLIVEIRA JUNIOR, L.F.G.; DELIZA, R.; BRESSAN-SMITH, R.; PEREIRA, M.G.; CHIQUIERE, T.B. Seleção de genótipos de milho mais promissoras para o consumo in natura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.1, pp. 159-165, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612006000100026>

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

PAZ-ARES, J.; GHOSAL, D.; SAEDLER, H. Molecular analysis of the *C1-l* allele from *Zea mays*: a dominant mutant of the regulatory *C1 locus*. **EMBO Journal**. Feb;9(2), pp.315-321, 1990. DOI: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb08113.x>

PEREIRA FILHO, I.A. **O cultivo do milho-verde**. 1ed. Brasília: Embrapa, p. 204, 2003.

PEREIRA FILHO. I. A., CRUZ. J. C., **Milhos especiais**. Alternativas para agregar valor. DBO Agrotecnologia. pp. 20-22, 2009.

PEREIRA FILHO, I.A.; BORGUI, E. **Cultivares de milho para safra 2022/2023**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, p.24, 2022.

PETOLINO, J. F.; THOMPSON, S. A. Genetic analysis of anther culture response in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v.74, p. 284-286, 1987. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00289982>

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

melhoramento genético do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.10, p. 1-16, 2011. DOI: <https://doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v10n1p1-16>

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de Estatística Experimental**. 12. ed. Piracicaba: Livraria Nobel, 1987. 467p.

POLLACSEK, M. Management of the *ig* gene for haploid induction in maize. **Agronomie**, v12, pp. 247–251, 1992. DOI: <https://doi.org/10.1051/AGRO%3A19920304>

PRASANNA, B. N. Cap.1 - Doubled Haploid (DH) technology in maize breeding: an overview. In: PRASANNA, B. M.; CHAIKAM, V.; MAHUKU, G. **CIMMYT – Doubled Haploid Technology in Maize Breeding: Theory and Practice**, Mexico, pp. 1-8, 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, pp. 1498-1506, 2011. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci2010.10.0568>

PRIGGE, V.; MELCHINGER, A.E. Production of haploids and doubled haploids in maize. In: Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N (eds) **Plant cell culture protocols**. Springer, Berlin, pp 161–172, 2012. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-61779-818-4_13

PRIGGE, V.; BABU, R.; DAS, B.; RODRIGUEZ, M. H.; ATLIN, G. N.; MELCHINGER, A. E. Doubled haploids in tropical maize: II. Quantitative genetic parameters for testcross performance. **Euphytica**, v.185, pp. 453-463, 2012a. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10681-012-0626-z>

PRIGGE, V.; XU, X.; LI, L.; BABU, R.; CHEN, S.; ATLIN, G. N.; MELCHINGER, A. E. New insights into the genetics of *in vivo* induction of maternal haploids, the backbone of doubled haploid technology in maize. **Genetics**, v.190, pp. 781-793, 2012b. DOI: <https://doi.org/10.1534/genetics.111.133066>

QIU, F.; LIANG, Y.; LI, Y.; LIU, Y.; WANG, L.; ZHENG, Y. Morphological, cellular and molecular evidences of chromosome random elimination *in vivo* upon haploid

induction in maize. **Current Plant Biology**. v1, pp.83–90, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2014.04.001>

RANDOLPH L.F. Some Effects of High Temperature on Polyploidy and Other Variations in Maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**. 18(3), pp.222-229, 1932. DOI: [https://DOI: 10.1073/pnas.18.3.222](https://doi.org/10.1073/pnas.18.3.222)

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, pp. 903-908, 2018, DOI: <https://doi.org/10.9755/ejfa.2018.v30.i10.1828>.

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, pp. 275-283, 2005. <http://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=17583781>

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

ROTARENCO, V.; DICU, G.; MIHAILOV, M.; STATE, D. Selection and breeding experiments at the haploid level in maize (*Zea mays* L.). **Journal of Plant Breeding and Crop Science**, 4(5), pp.72–79, 2012. DOI: <https://doi.org/10.5897/jpbcs11.089>

SANTOS, E. K.; ZANETTINI, M. H. B. Androgênese: uma rota alternativa no desenvolvimento do pólen. **Ciência Rural**, v.32, n.1, pp. 165-173, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782002000100028>

SARKAR, K. R.; COE, E. H. A genetic analysis of the origin of maternal haploids in maize. **Genetics**, v.54, pp.453-464, 1966. DOI: <https://doi.org/10.1093/genetics/54.2.453>

SAS Institute. **SAS language and procedures: usage**. Version 9.1. [CD-ROM]. Cary: SAS Institute; 2004.

SEITZ, G. **The use of doubled haploids in corn breeding**. In: Proc. 41st Annual Illinois Corn Breeders' School. Urbana-Champaign, Illinois, pp 1–7, 2005.

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. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s1678-3921.pab2020.v55.00968>

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

SHATSKAYA, O.A. Haploinductors isolation in maize: three cycles of selection on high frequency of induction of matroclinal haploids. **Agricultural Biology**. n5, pp.79–86, 2010.

SHULL, G.H. The composition of a field of maize **Journal of Heredity**, v.4, pp. 296-301, 1908. DOI: <https://doi.org/10.1093/jhered/os-4.1.296>

SHULL, G.H. A pure-line method in corn breeding. **Journal of Heredity**, v.5, pp.51-59, 1909. DOI: <https://doi.org/10.1093/jhered/os-5.1.51>

SILVA, G. J.; GUIMARÃES, C. T.; PARENTONI, S. N.; RABEL, M.; LANA, U. G. P.; PAIVA, E. **Produção de haploides androgenéticos em milho**. EMBRAPA Milho e Sorgo. ISSN 1518-4277, Sete Lagoas, Minas Gerais, 2009.

SOUSA, S.M.; PAES, M.C.D.; TEIXEIRA, F.F. **Milho doce**: origem das mutações naturais. EMBRAPA Milho e Sorgo, ISSN 1518-4277, Sete Lagoas, Minas Gerais, 2012.

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. DOI: <https://doi.org/10.1590/1984-70332024v24n1a04>

SPITKÓ, T.; SÁGI, L.; PINTÉR, J.; MARTON, L. C.; BARNABÁS, B. Haploid regeneration aptitude of maize (*Zea mays* L.) lines of various origin and of their hybrids. **Maydica**, v.51, pp. 537-542, 2006.

SPITKÓ, T. et al. General and specific combining ability of in vitro doubled haploid maize lines in the field. **Acta Agronomica Hungarica**, v. 58, pp. 167–177, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/AAgr.58.2010.2.8>

STRIGENS, A.; SCHIPPRACK, W.; REIF, J. C.; MELCHINGER, A. E. Unlocking the

genetic diversity of maize landraces with doubled haploid opens origin new avenues for breeding. **PLoS One**, v.8, pp. 1-11, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057234>

SUNDERLAND, N. Another culture as a means of haploid induction. In: KASHA, K.J. **Haploids in higher plants: advance and potential** Guelph: University of Guelph, pp.91-122, 1974.

SWAPNA, G.; JADESHA, G.; MAHADEVU, P. Sweet Corn – A Future Healthy Human Nutrition Food. **International Journal Current Microbiology and Applied Science**, v.9, n.7, p. 3859-3865, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2020.907.452>

TEIXEIRA, F. F.; MIRANDA, R. A. de; PAES, M. C. D.; SOUSA, S. M. de; GAMA, E. E. G. e. **Melhoramento do milho-doce**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, p. 32, 2013. (Embrapa Milho e Sorgo. Documentos, 154). Disponível em: Acesso em: 05 ago. 2024

TRACY, W.F. Sweet Corn. In: **Specialty Corns**, 2a ed. CRC Press, pp. 162-204, 2001.

TRENTIN, H.U.; FREI, U.K.; LÜBBERSTEDT, T. Breeding maize maternal haploid inducers. **Plants**, v.9, 614; 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants9050614>

TRINDADE, R. dos S.; GUIMARAES, L. J. M.; NETTO, D. A. M.; SOUZA, I. R. P. de; GUIMARAES, P. E. de O.; SILVA, A. C. A. da; GUIMARÃES, S. A.; MARIZ, B. L. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 161. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2017.

VANOUS, A. E. **Optimization of doubled haploid production in maize (*Zea mays* L.)**. Master' Degree of Science Thesis. Iowa State University. Ames, Iowa, 2011. DOI: <https://doi.org/10.31274/etd-180810-335>

VEDOVA, C.; LORBIECKE, R.; KIRSCH, H.; SCHULTE, M.; SCHEETS, K.; BORCHERT, L.; SCHEFFLER, B.; WIENAND, U.; CONE, K.; BIRCHLER, J. The Dominant Inhibitory Chalcone Synthase Allele *C2-Idf* (Inhibitor diffuse) From *Zea mays* (L.) Acts via an Endogenous RNA Silencing Mechanism. **Genetics**. 170,

pp.1989-2002, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1534/genetics.105.043406>

WANG, H.; LIU, J.; XU, X.; HUANG, Q.; CHEN, S.; YANG, P.; CHEN, S.; SONG, Y. Fully-automated high-throughput NMR system for screening of haploid kernels of maize (corn) by measurement of oil content. **PLoS ONE**, pp. 1-14, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159444>

WU, P.; REN, J.; TIAN, X. et al. New Insights into the genetics of haploid male fertility in Maize. **Crop Science**, v.57, pp. 637–647, 2017. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci2016.01.0017>

XU, X.; LI, L.; DONG, X.; Jin W, Melchinger, A.E.; Chen, S. Gametophytic and zygotic selection leads to segregation distortion through *in vivo* induction of a maternal haploid in maize. **Journal of Experimental Botany**. 64(4), pp.1083-1096, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/ers393>

~~KADROVETS, E. G. et al. (2014). In vivo induction of haploids in maize (Zea mays L.) using a novel method. *Journal of Applied Genetics*, 55(1), 1-8.~~
 KADROVETS, E. G. et al. (1996). Technology of the mass accelerated production of homozygous lines. **Kukuruza Sorgo**, Moskova, v4, p.17–19, 1996.

ZARARSIZ, D.; ÖZTÜRK, L.; YANIKOĞLU, S.; TURGUT, İ.; KIZIK, S.; BILGIN, B. Production of Double Haploid Plants Using *In Vivo* Haploid Techniques in Corn. **Tarım Bilimleri Dergisi**. 25, p62-69, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.15832/ankutbd.539000>

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, pp. 721–731, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.113.223982>

ZHONG, Y.; LIU, C.; QI, X.; JIAO, Y.; WANG, D.; WANG, Y.; LIU, Z.; CHEN, C.; CHEN, B.; TIAN, X.; et al. Mutation of *ZmDMP* enhances haploid induction in maize. **Nature Plants**, v.5, pp. 575–580, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0443-7>