

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

HINGRID ARIANE DA SILVA

Indução de haploidia e eficiência de técnicas aplicadas na obtenção de duplo-haploides
em milho

Maringá

2017

HINGRID ARIANE DA SILVA

Indução de haploidia e eficiência de técnicas aplicadas na obtenção de duplo-
haploides em milho

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Agronomia.

Área de concentração: Produção Vegetal

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Scapim.

Coorientador: Ronald José Barth Pinto.

Maringá

2017

ii

FOLHA DE APROVAÇÃO

HINGRID ARIANE DA SIVA

Indução de haploidia e eficiência de técnicas aplicadas na obtenção de duplo-haploides em milho

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Agronomia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

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

Prof^ª. Dr^ª. Andréa Beatriz Mendes Bonato
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Robson Marcelo Rossi
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Ronald José Barth Pinto
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Carlos Alberto Scapim
Universidade Estadual de Maringá

Local de defesa: Anfiteatro n^o1, Bloco J45 (térreo), *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela proteção e amparo nos momentos de esgotamento.

À minha família, meus pais Avelino e Luiza, pelo amor, educação e incentivo. Aos meus irmãos Rodrigo e Dayani.

À Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PGA), pela oportunidade concedida.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Scapim, pela orientação e confiança durante todo o desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Dr. Ronald José Barth Pinto, pela coorientação, incentivo e conhecimentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Albrecht E. Melchinger e aos demais membros do Instituto de Melhoramento de Plantas, Sementes e Genética de Populações, pela coorientação e oportunidade de aprendizado durante o período de Doutorado Sanduíche na Universidade de Hohenheim-Alemanha. E ainda ao Prof. Dr. Stefan Scholten pela orientação e acolhimento na Universidade de Hamburgo durante a realização do trabalho com o resgate de embriões.

À professora Káthia Socorro Mathias Mourão pela orientação na coleta de amostras e medidas das células-guarda e ao professor Robson Marcelo Rossi pelo aconselhamento e direcionamento durante a análise de dados.

Às professoras Lisete Chamma Davide e Leila Aparecida Salles Pio da Universidade Federal de Lavras, pelo treinamento e conhecimentos passados para a realização da citometria de fluxo.

Aos colegas do grupo de melhoramento de milho da Universidade Estadual de Maringá, especialmente à Alessandra Guedes Baleroni, pelo compartilhamento de tarefas e ideias durante a pesquisa.

Aos funcionários da secretaria do PGA, pela amizade e apoio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (CAPES), pelo fornecimento da bolsa de estudos no exterior durante o período de Doutorado Sanduíche na Alemanha.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela bolsa de estudos para o período regular de doutorado.

Indução de haploidia e eficiência de técnicas aplicadas na obtenção de duplo-haploides em milho

RESUMO

A obtenção de linhagens duplo-haploides em milho envolve as etapas de indução de haploidia *in vivo*, identificação de sementes haploides e a duplicação cromossômica de haploides selecionados. Diversos fatores ligados ao ambiente e ao *background* genético dos genótipos-fonte têm influência na taxa de indução. A fase seguinte à indução de haploidia é a seleção de haploides, que é feita baseada na pigmentação por antocianina, a qual é fortemente inibida por fatores de transcrição. Como consequência, um grande número de sementes diploides passa para a fase de duplicação, o que justifica a adoção de uma ferramenta auxiliar para classificação das plântulas. Na fase final, a duplicação cromossômica tem sido realizada basicamente com uso de colchicina em plântulas, sendo os resultados obtidos na duplicação em estágio de embrião pouco divulgados. Considerando a influência dos diversos fatores na taxa de indução, o efeito dos genótipos-fonte, do *pool genético*, da textura do endosperma, da base genética e das safras sobre a geração de haploides putativos em 41 cruzamentos de indução com o indutor KHI (*Krasnodar Haploid Inducer*) foi avaliado. Os fatores textura do endosperma, base genética e *pool genético* não interferiram na proporção de sementes classificadas como haploides através da expressão do marcador morfológico de *R-Navajo*. Por outro lado, os fatores safras e genótipos-fonte afetaram a proporção de haploides putativos produzidas, sendo a safra de verão a mais eficiente para esse fim. Com o propósito de separar haploides de diploides, o comprimento de células-guarda (CG) pode ser adotado, uma vez que medidas de CG de estômatos provenientes de diferentes estádios diferiram grandemente entre haploides e diploides provenientes de diferentes genótipos-fonte. A eficiência da classificação de diploides e haploides por CG foi mais ligada ao genótipo-fonte que ao estágio de desenvolvimento em que as impressões epidérmicas foram coletadas e o ponto de corte ideal de comprimento de CG para separar haploides de diploides foi variável em relação ao estágio da planta e genótipo-fonte. Baixas taxas de FDR (*False Discovery Rate*) e FNR (*False Negative Rate*) foram observadas para classificação por meio CG. Considerando o efeito dos agentes antimitóticos alternativos destinados à duplicação cromossômica, o efeito da

colchicina comparado às misturas dos herbicidas APM (amiprofos-methyl) e pronamida via resgate de embrião foi avaliado. A colchicina foi superior aos demais tratamentos para a duplicação cromossômica (48,94%), promovendo o dobro de plantas duplicadas quando comparada a maior concentração da mistura desses herbicidas (20,00%).

Palavras-chave: *R1-nj*. Células-guarda. Colchicina. APM. Pronamida.

Haploid induction and efficiency of techniques used to obtain doubled haploids in maize

ABSTRACT

Development of doubled haploids in maize includes the steps: *in vivo* haploid induction, haploid seeds selection and chromosome doubling of these haploids. Haploid induction rate is affected by a large number of factors related to the environmental and the germplasm source background. Following the haploid induction step, the haploid selection has been made via the visual score of the kernels based on anthocyanin expression, which one is greatly inhibited by transcription factors. As a consequence, a large number of diploid seeds follow to the doubling phase, which justifies the adoption of an auxiliary tool to classify seedlings. In the final step, chromosome doubling has been performed with the use of colchicine in seedlings, and the results obtained in at the embryo stage are not very well known. Considering the influence of the various factors on the induction rate, the effect of germplasm source, genetic background, endosperm texture, genetic base and the seasons on the production of putative haploids from 41 inductions crosses with KHI (*Krasnodar Haploid Inducer*) were evaluated. Endosperm texture, genetic base and genetic background did not affect the haploid putative proportion, sorting by embryo marker expression *R-Navajo*. On the other hand, seasons and source germplasm source displayed effect on putative haploid proportion, which summer season was the most effective on seed set of putative haploids. In order to separate haploids from diploids, cell-guard (CG) lengths are able to be adopted, once the stomata CG measure from different leaves had large differences between haploid and diploids. The efficiency of diploid and haploid classification by CG was more related to source germplasm than leave stage which the epidermal impression was collected. The cutoff point does CG to sorting haploids from diploids were variable within the leave stage and germplasm source. Low FDR (*False Discovery Rate*) e FNR (*False Negative Rate*) was observed for classification by CG. Considering the effect of the alternative antimitotic agents for chromosome doubling, the colchicine effect compared to mixtures of APM (amiprofos-methyl) and pronamide via embryo rescue was evaluated. Colchicine had better performance to chromosome doubling (48,94%) and had twice as many doubling plants when comparing the highest concentration of the herbicide mixture (20,00%).

Keywords: *R1-nj*. Cell guard. Colchicine. APM. Pronamide.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados dos genótipos-fonte utilizados nos cruzamentos de indução em duas safras: safra verão 2013-2014 e safrinha 2014.....	33
Tabela 2. Resumo da análise de modelos por AIC gerado pela análise de <i>deviance</i> e ANOVA tipo III.....	37
Tabela 3. Resumo da análise de <i>deviance</i> para taxa de haploides putativos identificados pelo marcador <i>RI-navajo</i> obtidos por meio do cruzamento de indução entre 41 híbridos e o indutor KHI, na safrinha 2013-2014 e verão 2014.	40
Tabela 4. Desdobramento de safras dentro do fator genótipo-fonte para taxa de haploides putativos.	42
Tabela 5. <i>Clusters</i> formados para taxa de haploides putativos dentro de cada safra.	45
Tabela 6. Parâmetros estimados, taxas e <i>odds ratio</i> para o efeito isolado de safra na taxa de haploides putativos.	47
Tabela 7. ANOVA tipo I para o fatorial de três fatores hierarquizados e dados balanceados.	65
Tabela 8. ANOVA tipo III para o fatorial de três fatores hierarquizados e dados desbalanceados.	65
Tabela 9. Comparação entre genótipos-fonte para o comprimento de células-guarda.....	66
Tabela 10. Comparação entre folhas dentro de cada genótipo-fonte para o comprimento de células-guarda.....	66
Tabela 11. Comparação entre fenótipos dentro dos fatores folhas e genótipo-fonte para o comprimento de células-guarda.....	67
Tabela 12. Frequências e probabilidades de se encontrar um diploide, baseado na faixa de comprimento da célula-guarda, englobando as plantas semeadas de todos os cruzamentos de indução em estudo.	70
Tabela 13. Taxa de haploides putativos pelo <i>RI-nj</i> e taxa de haploidia, inferida para cada cruzamento de indução com base no <i>gold standard</i> , e corrigida para o total de sementes obtidas por cruzamento.....	74
Tabela 14. Pontes de corte definidos pela ROC, por genótipo e estágio, e Área Abaixo da Curva (AUC) obtidos através do pacote “ROCR”.	78
Tabela 15. Taxas de FDR e FNR, MCC e teste de McNemar (corrigido para a continuidade) obtidos para a classificação de diploides e haploides como base nos pontos de cortes definidos para CGs por meio da ROC.....	80
Tabela 16. Prevalência de diploides e acurácia na classificação baseada nos pontos de cortes estabelecidos.....	82
Tabela 17. Tratamentos testados para a duplicação cromossômica, idade dos embriões coletados e número de embriões incubados.	96
Tabela 18. Nível de ploidia das plantas regeneradas após o tratamento para a duplicação. ...	103

Tabela 19. Análise de <i>deviance</i> para proporção de plantas duplicadas ((DH+T)/Total) após o tratamento para duplicação, regeneração e transplante em casa de vegetação.....	104
Tabela 20. Proporção de indivíduos com conjuntos cromossômicos duplicados após o período de regeneração.	104
Tabela 21. Embriões sobreviventes após o tratamento de duplicação e na fase final de regeneração em casa de vegetação.	107
Tabela 22. Análise de <i>deviance</i> para proporção de embriões incubados sobreviventes após o tratamento de duplicação e após o período de regeneração.....	108
Tabela 23. Proporção de indivíduos sobreviventes após o período final de regeneração.	109
Tabela 24. Análise de <i>deviance</i> para haploides putativos+duplo-haploides classificados conforme a expressão de antocianina após as primeiras 12 horas de exposição à luz e ao final do período de regeneração.....	110
Tabela 25. Proporção de indivíduos haploides putativos+duplo-haploides obtidas para os diversos agentes antimetabólicos, conforme a expressão de antocianina, após 12 horas de exposição à luz.....	111
Tabela 26. Proporção de indivíduos haploides putativos+duplo-haploides para os diferentes DAP dos embriões, conforme a expressão de antocianina, após 12 horas de exposição à luz.	112
Tabela 27. Proporção de indivíduos haploides putativos+duplo-haploides para os diferentes DAP dos embriões, conforme a expressão de antocianina, após o período final de regeneração.....	112
Tabela 28. Tabela de contingência gerada para comparação de classificação das plantas regeneradas por meio do marcador fenotípico e citometria.	113

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
1. REVISÃO DE LITERATURA	3
1.1 ORIGEM E BOTÂNICA DO MILHO	3
1.2 IMPORTÂNCIA SOCIAL E ECONÔMICA DA PRODUÇÃO DE MILHO NO BRASIL E NO MUNDO.....	5
1.3 MELHORAMENTO CONVENCIONAL DO MILHO	7
1.4 O SURGIMENTO DE DUPLO-HAPLOIDES EM MILHO	8
1.5 INDUÇÃO DE HAPLOIDIA	8
1.6 HIPÓTESES PARA GERAÇÃO DE HAPLOIDES GIMNOGENÉTICOS	10
1.7 DESENVOLVIMENTO DE INDUTORES DE HAPLOIDIA.....	11
1.8 OBTENÇÃO DOS DUPLO-HAPLOIDES EM MILHO	13
1.9 VANTAGENS E DESVANTAGENS DA OBTENÇÃO DE LINHAGENS POR DUPLO-HAPLOIDES	14
1.10 IDENTIFICAÇÃO DE HAPLOIDES	15
1.11 DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA EM MILHO	17
2. REFERÊNCIAS	19
CAPÍTULO 1	27
EFEITO DO GENÓTIPO E AMBIENTE NA PRODUÇÃO DE HAPLOIDES PUTATIVOS SELECIONADOS PELA EXPRESSÃO DO MARCADOR FENOTÍPICO <i>RI-NAVAJO</i>	27
1. INTRODUÇÃO.....	30
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
2.1 MATERIAL GENÉTICO E CRUZAMENTOS DE INDUÇÃO DE HAPLOIDIA.....	32
2.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
3.1 SELEÇÃO E AJUSTE DE MODELO	36
3.2 ANÁLISE DE <i>DEVIANCE</i> PARA A TAXA DE HAPLOIDES PUTATIVOS	40
4. CONCLUSÕES	50
5. REFERÊNCIAS	51
CAPÍTULO 2	54
EFEITO DO NÍVEL DE PLOIDIA NO COMPRIMENTO DE CÉLULAS-GUARDA E USO DE ESTÔMATOS NO DESCARTE DE DIPLOIDES EM MEIO A HAPLOIDES PUTATIVOS.....	54
1. INTRODUÇÃO.....	57
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	59
2.1 MATERIAL VEGETAL E COLETA DE AMOSTRAS.....	59
2.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA	60
3.1 EFEITO DO NÍVEL DE PLOIDIA, GENÓTIPO E ESTÁDIO NO COMPRIMENTO DE CÉLULAS-GUARDA	62
3.2 USO DO COMPRIMENTO DE CÉLULAS-GUARDA PARA SEPARAÇÃO DE DIPLOIDES EM MEIO A HAPLOIDES PUTATIVOS	69

4. CONCLUSÕES	85
5. REFERÊNCIAS	86
CAPÍTULO 3	90
RESGATE DE EMBRIÕES E TRATAMENTOS ALTERNATIVOS À COLCHICINA PARA A DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA EM MILHO	90
1. INTRODUÇÃO.....	93
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	95
2.1 PREPARO DO MEIO DE CULTIVO E SOLUÇÕES DE DUPLICAÇÃO.....	95
2.2 MATERIAL GENÉTICO E ISOLAMENTO DE EMBRIÕES.....	96
2.3 DUPLICAÇÃO E REGENERAÇÃO	97
2.4 CITOMETRIA DE FLUXO PARA IDENTIFICAÇÃO DE NÍVEL DE PLOIDIA.....	99
2.5 VARIÁVEIS COLETADAS E ANÁLISE ESTATÍSTICA	100
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	102
4. CONCLUSÕES	115
5. REFERÊNCIAS	116
APÊNDICE A1 - SAÍDA DO PACOTE “NBCLUST” PARA O NÚMERO IDEAL DE GRUPOS PARA A SAFRA 1.....	119
APÊNDICE A2 - SAÍDA DO PACOTE “NBCLUST” PARA O NÚMERO IDEAL DE GRUPOS OBTIDOS PARA A SAFRA 2.....	121
APÊNDICE B1 - COEFICIENTES DE JACCARD OBTIDOS POR <i>BOOSTRAP</i> PARA A ESTABILIDADE DOS <i>CLUSTERS</i> FORMADOS PARA TAXA DE INDUÇÃO NA SAFRA 1	123
APÊNDICE B2 - COEFICIENTES DE JACCARD OBTIDOS POR <i>BOOSTRAP</i> PARA ESTABILIDADE DOS <i>CLUSTERS</i> FORMADOS PARA TAXA DE INDUÇÃO NA SAFRA 2	124
APÊNDICE C1 - DESDOBRAMENTO DE GENÓTIPOS DENTRO DO FATOR SAFRA 1 PARA A TAXA DE HAPLOIDES PUTATIVOS.....	125
APÊNDICE C2 - DESDOBRAMENTO DE GENÓTIPOS DENTRO DO FATOR SAFRA 2 PARA A TAXA DE HAPLOIDES PUTATIVOS.....	126
APÊNDICE D1 - EXEMPLO DA DISPOSIÇÃO DOS DADOS NA TABELA DE CONTINGÊNCIA. TP= <i>TRUE POSITIVES</i> , TN= <i>TRUE NEGATIVES</i> , FP= <i>FALSE POSITIVES</i> E FN= <i>FALSE NEGATIVES</i>	127
APÊNDICE D2 - TABELAS DE CONTINGÊNCIA PARA O TESTE DIAGNÓSTICO COMPRIMENTO DE CÉLULAS-GUARDA NA CLASSIFICAÇÃO DE HAPLOIDES E DIPLOIDES	128

INTRODUÇÃO GERAL

A obtenção de linhagens duplo-haploides tem ganhado espaço no melhoramento de milho. Quando comparada à metodologia convencional para a obtenção de linhagens de milho, a técnica de duplo-haploides apresenta a vantagem de gerar genótipos cem por cento homozigotos em um tempo muito mais reduzido.

As etapas envolvidas na obtenção de duplo-haploides incluem a geração de haploides por meio de cruzamentos de indução, seguida da separação de haploides da descendência desse cruzamento. Na etapa que se segue, os haploides passam por um tratamento para promover a duplicação cromossômica, feita por meio do uso de substâncias antimitóticas, sendo a colchicina a mais utilizada.

Para obtenção de haploides em milho, a indução *in vivo* tem sido preferida. Para isso, os genótipos-fonte, o material genético do qual se pretende extrair as linhagens, é cruzado com um genótipo indutor. Devido a anomalias intrínsecas do material indutor, a descendência do cruzamento de indução apresenta uma pequena fração de sementes haploides, carregando somente o material genético dos genótipos-fonte. Essa fração, chamada de taxa de indução de haploidia varia de menos de 3% para os indutores antigos para até 12% para os indutores modernos. Um dos objetivos do melhoramento na área de duplo-haploides é o desenvolvimento de indutores com capacidade de indução superior a esses valores.

A taxa de indução de haploidia é, especialmente, efeito da capacidade do indutor e em menor magnitude da interação do genótipo-indutor como o genótipo-fonte e da interação desses fatores com a condição ambiental. Embora outros marcadores tenham sido descritos para a separação das sementes ou indivíduos haploides, na prática, a expressão do gene *RI-nj* tem sido a forma mais adotada para separar os indivíduos haploides que seguem para a fase de duplicação. No entanto, fatores como a textura do endosperma e o germoplasma de origem têm sido descritos por influenciar a expressão desse marcador fenotípico, sobretudo devido à possibilidade de fatores de transcrição no germoplasma fonte que inibia a produção ou acúmulo de antocianina.

Apesar da praticidade da seleção de sementes pela pigmentação por antocianina, esse marcador é pouco eficiente, resultando em várias sementes diploides em meio a haploides

selecionados. Por isso, tem sido recomendado o uso de metodologias combinadas para a seleção de haploides bem como do descarte de diploides, precedendo a etapa de duplicação.

Estima-se que cerca de 40% das plântulas submetidas ao tratamento por duplicação com colchicina 0,05% resultem em linhagens duplo-haploides. Estudos têm sido conduzidos no sentido de encontrar antimitóticos menos tóxicos ao ambiente, com desempenho similar à colchicina. As substâncias utilizadas nesses estudos são herbicidas do grupo dos inibidores do crescimento inicial, cujo mecanismo de ação conhecido é baseado na inibição da mitose. Por bloquear a mitose, tanto a colchicina, o antimitótico mais conhecido, quanto os herbicidas, são obtidas células com o conjunto cromossômico duplicado e partir de células haploides, uma vez que não há citocinese, restaurando assim a fertilidade desses indivíduos.

Além do método tradicional de duplicação em plântulas, com exposição de órgãos como as raízes e/ou parte aérea aos agentes antimitóticos, a duplicação cromossômica aplicada em embriões imaturos, provenientes de cruzamentos de indução, tem despertado atenção, uma vez que essa possibilidade vem ao encontro das metodologias de transformação gênica, permitindo que, após a duplicação, duas cópias do alelo transgene se fixem no genótipo homozigoto das linhagens obtidas por duplo-haploides.

Nesse contexto, será abordado nesse trabalho o efeito dos fatores ambientais e das características do germoplasma de origem na produção de haploides e expressão do gene *RI-nj* em sementes, bem como a eficiência do comprimento de células-guarda na classificação de haploides e diploides. Adicionalmente, serão avaliados tratamentos alternativos à duplicação padrão por colchicina em embriões imaturos, sendo estes constituídos de diferentes misturas dos herbicidas APM e pronamida.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Origem e botânica do milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma planta tipicamente diploide ($2n = 20$), mas ocorrem haploides naturais ($2n=10$) em baixa frequência (HALLAUER, CARENA e MIRANDA FILHO, 2010). É originário do teosinto, *Zea mays*, subespécie mexicana (*Zea mexicana* (Schrad.) Kuntze) (DE WET, HARLAN e GRANT, 1971), cujo centro de origem é o mesoamericano e América do Sul, que corresponde ao centro de maior diversidade genética para a espécie (VAVILOV, 1926).

Pertencente a Poaceae, antiga família Gramineae, o milho pode ser classificado quanto às suas estruturas reprodutivas como uma planta monoica, pois um único indivíduo da espécie apresenta, na mesma planta, estruturas reprodutivas masculinas e femininas. É dita uma espécie díclina, uma vez que apresentam tanto inflorescências masculinas quanto femininas, sendo cada inflorescência unissexuada (NIEH et al., 2014). Desta forma, os gametas masculinos e femininos se encontram setorizados, contidos em inflorescências, situados em regiões diferentes das plantas, favorecendo a polinização cruzada (BONAVIA et al., 2013).

A folha de milho tem morfologia típica à das gramíneas, consistindo de lâmina distal com bainha proximal. A bainha da folha envolve o caule, fornecendo suporte mecânico para a lâmina foliar ou limbo, que se projeta perpendicularmente ao caule, otimizando assim a captura de luz, necessária à fotossíntese. O limbo e a bainha são conectados por estruturas denominadas lígula e aurícula. A lígula é uma pequena aba membranosa que protege a gema axilar, enquanto que a aurícula atua como um prolongamento do limbo em direção ao caule (FOSTER e TIMMERMANS, 2008).

Concentrados majoritariamente nas folhas, mas também nos demais tecidos fotossinteticamente ativos, os estômatos encontrados em milho se localizam tanto na proporção abaxial quanto adaxial da folha, sendo encontrados em maior número na face abaxial. Os estômatos são poros presentes na epiderme de plantas, sendo compostos de ostíolo e células-guarda. Denomina-se de ostíolo a abertura do estômato, enquanto que se nomeiam de células-guarda (CG) as células especializadas que delimitam o ostíolo. As

células-guarda têm o papel de controlar a abertura do ostíolo através da pressão de turgescência (PILLITTERI e DONG, 2013; RAISSIG et al., 2016).

A morfologia dos estômatos de milho é típica de gramíneas. As células-guarda apresentam formato de halteres e são flanqueadas por células subsidiárias ou companheiras. As gramíneas são conhecidas pela maior eficiência fotossintética quando comparadas às plantas C₃, sendo esse sucesso atribuído tanto à presença de células da baixa do feixe vascular quanto pela conexão entre as células-guarda e as células subsidiárias, que minimizam a fotorrespiração (FRANKS et al., 2009; SAGE et al., 2012; RAISSIG et al., 2016).

A inflorescência masculina de milho é chamada popularmente de pendão. Ela é composta por flores estaminadas responsáveis pela produção de pólen e se situa no ápice da planta. O pendão reúne um número variável de longas ramificações que se desenvolvem da base de uma espigeta central. A espigeta é unidade básica das inflorescências em gramínea, sendo formada individualmente por dois floretes, uma fértil e outra estéril. Cada espigeta do pendão é protegida por duas glumas (uma externa e outra interna) que encerram dois floretes (superior e inferior), cada um consistindo de um lema, uma pálea, duas lodículas e três estames. Os estames são compostos por filetes, conectivos e anteras. Nos tecidos internos da antera ocorrem a microsporogênese, que dá origem aos grãos de pólen, os precursores dos gametas masculinos (VOLLBRECHT e SCHMIDT, 2009).

A inflorescência feminina do milho é comumente chamada de espiga, que se desenvolvem lateralmente na porção terminal de uma ramificação axilar. A espiga também é composta por um conjunto de espiguetas pareadas. Da mesma forma que as espiguetas do pendão, cada espigeta contém dois floretes, sendo um deles (o florete inferior) infértil devido à ocorrência de degeneração. O florete superior dá origem aos carpelos. Dois deles se fundem originando o estilo, que emerge das glumas circundantes de cada espigeta. O estilo corresponde a um longo tubo que conecta o estigma ao ovário. Na porção terminal de cada estilo se posiciona o estigma, que juntamente com os estilos correspondem à área receptiva ao pólen do pistilo. A lema, a pálea e as lodículas por sua vez, são rudimentares nas espiguetas femininas (VOLLBRECHT e SCHMIDT, 2008; BEDINGER e FOWLER, 2008; DRESSELHAUS, LAUSSER e MÁRTON, 2011).

A formação dos gametas femininos se dá a partir do nucelo, um tecido da parede interna do ovário, originando o saco embrionário, processo denominado megasporogênese. Dentro do saco embrionário encontram-se uma oosfera, que é o gameta feminino, três antípodas, duas sinérgidas e dois núcleos polares, resultantes das reduções meióticas da megagametogênese. Para a produção de sementes, após a fertilização, ocorre a dupla fecundação onde são originados embrião e endosperma. O embrião ($2n=20$) é o resultado da fusão de um dos núcleos gaméticos, carregados pelo grão de pólen com a oosfera, enquanto que o endosperma ($3n=30$) é o resultado da união do outro núcleo gamético do grão de pólen com os dois núcleos embrionários, presentes no saco embrionário (EVANS e GROSSNIKLAUS, 2008).

Uma particularidade ligada à botânica e fisiologia da espécie é a ocorrência de protrandria. Em milho, as estruturas reprodutivas masculinas atingem a maturidade mais precocemente quando comparada à inflorescência feminina. Dessa forma, há disponibilidade de pólen antes que o estilo seja exposto e os estigmas estejam receptivos, também favorecendo a ocorrência de alogamia (NIEH et al., 2014). Durante o florescimento, a liberação de pólen pelas anteras ocorre mais intensamente durante um período de 5 a 6 dias, podendo se estender até por 14 dias, se incluídos os períodos iniciais e finais da antese, onde a proporção de grãos de pólen observados é menor (WESTGATE et al, 2003).

As particularidades botânicas descritas para as estruturas reprodutivas do milho favorecem a polinização cruzada, pois a produção de sementes via autofecundação é dificultada pela protrandria e diclinia (PINTO, 2009; BONAVIA et al., 2013). Espécies alógamas como o milho são caracterizadas pela heterose, permitindo que a endogamia e o vigor híbrido sejam exploradas no melhoramento genético.

1.2 Importância social e econômica da produção de milho no Brasil e no mundo

O milho é cultivado em diversas partes do mundo, devido principalmente à sua grande adaptabilidade, sendo encontrado tanto em regiões de clima tropical e subtropical quanto em regiões de clima temperado. Os grãos de milho é uma excelente fonte de carboidratos. Por isso, a principal finalidade do cultivo de milho é a produção de grãos como matéria prima para a alimentação humana e animal, além do seu uso para a produção de

silagem de planta inteira, forragem para alimentação animal e para a produção de etanol e biogás (AMON et al., 2007; CHEN et al., 2013; MEYER-AURICH et al., 2016, TORRES, 2016).

O consumo mundial de milho para os anos 2015-2016 foi estimado em 965,96 milhões de toneladas pelo USDA (2016a). Os maiores consumidores da *commodity* são os EUA (301,50 milhões de toneladas), seguido por China (213,94 milhões de toneladas), Europa (76,00 milhões de toneladas) e Brasil (59,00 milhões de toneladas).

Entre os maiores produtores de milho estão os EUA (345,46 milhões de toneladas), China (224,56 milhões de toneladas) e Brasil (81,48 milhões de toneladas). Com excedente na produção, o Brasil se destacou como segundo maior exportador do grão para o período de 2015 a 2016, contribuindo com 27,3% do volume total mundialmente exportado, seguido pela Argentina (13,6%). Nesse painel, os EUA se destacaram não só como maior produtor, mas também como maior exportador (33,9%) mundial. Entre os maiores importadores estão a UE (12,5% do volume mundialmente comercializado) e Japão (11,5%) (USDA, 2016a).

Para a safra 2015-2016 foi observada, uma elevação na produção mundial de milho, com recorde de toneladas colhidas em função do aumento esperado da produção para Argentina, Índia e EUA, que compensaram até mesmo a redução de safra esperada para Canadá e União Europeia. Segundo as previsões, os EUA se consolidaram como principal produtor mundial da cultura, atingido produtividade recorde no período (USDA, 2016b). Ainda segundo o Departamento de Agricultura Americano, o comércio mundial do grão se expandiu estimulado principalmente por uma expectativa de aumento nas taxas exportadas pelo Brasil, Canadá, UE, México e EUA, mas também pelo incremento das importações pela Indonésia.

As exportações por parte de Argentina e EUA devem aumentar, mas diminuir por parte do Brasil e UE. A redução de exportações para o Brasil decorre da redução de produção e do incremento da demanda doméstica, tornando o Brasil menos competitivo frente aos EUA. Um leve incremento nos preços dos grãos nos países exportadores da América do Sul foi reportado, sobretudo após a constatação da redução da área cultivada de milho destinada à safrinha, ou segunda safra, e incremento da demanda interna no Brasil, bem como do atraso na colheita na Argentina, indicando uma expectativa de bons preços para o grão no período (USDA, 2016b).

1.3 Melhoramento convencional do milho

O melhoramento convencional de milho é destinado à obtenção de linhagens para a exploração da heterose proveniente do cruzamento de indivíduos endogâmicos. A heterose ou vigor híbrido é definida como o incremento no desempenho de uma progênie comparada aos seus parentais (HALLAUER, CARENA e MIRANDA FILHO, 2010).

A superioridade dos descendentes por hibridação quando comparados aos descendentes por autofecundação em milho foi descrita por Shull (1908) e East (1908). Em experimentos independentes, ambos estudaram os fenômenos da heterose e endogamia. East (1909) observou a depressão por endogamia em indivíduos provenientes de autofecundações, que corresponderia à redução de vigor e rendimento nos descendentes com o avanço das gerações de endogamia, e concluiu que a homozigose em indivíduos endogâmicos ocorreria devido à expressão de alelos deletérios recessivos, suprimidos nos heterozigotos, que ocasionam a perda de vigor em homozigotos.

Estudando a herança quantitativa do número de fileira por espiga em milho, Shull (1908) observou que as progênies provenientes de hibridação eram mais vigorosas do que as obtidas por autofecundação, considerando o mesmo genótipo-fonte. Mais tarde, o mesmo autor estabeleceu um esquema básico para produção de híbridos de milho, baseados em sucessivas gerações de autofecundações das plantas selecionadas, seguida de hibridação entre indivíduos homozigotos, promovendo assim heterose (SHULL, 1909).

A exploração prática da heterose em milho é realizada a partir da obtenção de híbridos com alto desempenho, originados do cruzamento entre linhagens elite. Essas linhagens podem ser desenvolvidas pelo método tradicional, que consiste na obtenção de uma população segregante, seguida pela seleção de indivíduos superiores para os caracteres de interesse, entre e dentro de progênies, com sucessivas autofecundações, até que seja alcançada a homozigose para a maioria dos locos, que ocorre entre 6 a 8 gerações de autofecundações (HALLAUER, CARENA e MIRANDA FILHO, 2010).

Como alternativa ao método tradicional, existe uma tecnologia mais recente que, aplicada à cultura do milho, vem se mostrando promissora para acelerar o processo de obtenção das linhagens. Essa tecnologia consiste na indução de indivíduos haploides, os quais, após um processo de duplicação cromossômica, originam linhagens completamente

homozigotas. Essas linhagens são também conhecidas como duplo-haploides ou di-haploides (CHASE, 1952).

1.4 O surgimento de duplo-haploides em milho

A produção de haploides em milho despertou particular interesse após os trabalhos de Chase (1949) e Coe (1959). Ambos destacaram a possibilidade de desenvolvimento de diploides homozigotos (linhagens) a partir de haploides, que até então tinham sido observados em baixíssima frequência.

Chase (1949) estudou a frequência de haploides gimnogenéticos originados do cruzamento de híbridos comerciais duplos e simples com linhagens “stocks”, indutoras de haploidia. Foi observada uma frequência média de haploides, para todos os cruzamentos, de cerca de 0,11%. A identificação dos haploides foi feita com base na expressão do marcador morfológico controlado pelo gene dominante *Pu*, presente nesses indutores, que promove a pigmentação púrpura nas plúmulas de plântulas diploides. Dessa forma, sementes com ausência de pigmentação foram consideradas como haploides putativos e tiveram então o nível de haploidia checado por meio de contagem cromossômica. Para o autor, a frequência de haploides seria dependente da interação da fonte com o indutor. Segundo Chase, esses haploides carregariam a variância genética diretamente apresentada nos gametas e caso fossem gerados em grande número e apresentasse suficiente taxa de duplicação, o uso em programas de melhoramento seria de grande valia (STADLER, não publicado, citado por Chase, 1949). No entanto, a proporção de haploides encontrada vinda de haploidia espontânea ou induzida, até então, se mostrava muito baixa para justificar comercialmente o uso de obtenção de linhagens de milho (RÖBER et al., 2005).

1.5 Indução de haploidia

Os processos para geração de haploides em milho visando à obtenção de linhagens duplo-haploides podem envolver metodologias *in vivo* ou *in vitro*. O processo *in vitro* é denominado androgênese. Neste caso, a obtenção de haploides neste caso parte de tecidos gaméticos como pólen imaturo, anteras ou cultura de miscrósoros. Particularmente em

milho, o processo androgenético de geração de embriões haploides tem se mostrado menos viável do que o processo *in vivo*, uma vez que o custo empregado no processo *in vitro* é maior e ainda com rendimento inferior ao processo *in vivo* (PRASANA, CHAIKAM e MAHUKU, 2012).

O processo *in vivo* também é o mais adotado quando o objetivo é gerar haploides em larga escala. De posse de material genético indutor, os cruzamentos controlados com as populações a serem utilizadas como fonte para novas linhagens apresentam uma taxa de haploidia que pode alcançar de 2% a 13% nos indutores antigos e modernos, respectivamente (PRIGGE et al., 2011; PRASANA, CHAIKAM e MAHUKU, 2012; BATISTELLI et al., 2013; COUTO et al., 2013a; COUTO et al., 2013b).

Os haploides podem ser tanto de origem materna como paterna. Na geração de haploides paternos, ou androgenéticos, o genótipo-fonte é utilizado como doador de pólen nos cruzamentos de indução. Os indutores de haploidia neste caso carregam o alelo mutante denominada gametófito indeterminado (*ig*), que promovem a produção de células-ovo sem núcleo. Assim, após a fecundação, apenas o material genético do pai faz parte das sementes haploides geradas (PRASANA, CHAIKAM e MAHUKU, 2012). O locus para *ig* é o braço longo do cromossomo 3,90 cM distante do *locus* do gene responsável pela presença de lígula (*lg2*) (KERMICLE, 1973; KERMICLE e DEMOPULOS-RODRIGUES, 1980). Nesse mecanismo de geração de haploides, durante a fecundação ocorre uma degeneração do núcleo do óvulo do genótipo-fonte e o núcleo espermático proveniente do pólen iniciaria um processo de divisão celular no citoplasma da célula-ovo, formando um embrião haploide. De acordo com Lin (1981), os sacos embrionários com oosferas degeneradas do indutor paterno favorecem o desenvolvimento de um dos núcleos reprodutivos de grão de pólen, dando origem a um embrião androgenético haploide.

Os haploides androgenéticos são gerados numa proporção inferior aos de origem materna. Haploides maternos, ou gimnogenéticos, carregam no embrião o material genético do genótipo-fonte. Neste caso o material indutor, que é utilizado como doador de pólen, é imperfeito na dupla fecundação, pois um dos núcleos reprodutivos carregados pelo grão de pólen não fecunda corretamente a oosfera, gerando um embrião haploide, mas de endosperma triploide (PIERRE et al., 2011).

Cruzamentos para indução de haploides podem ser realizados manualmente ou através de polinização aberta, com emasculação dos genótipos-fonte, para a produção de haploides gimnogenéticos. No entanto, maiores cuidados são exigidos nos casos de indução por polinização aberta, como isolamento espacial e temporal da área destinada aos cruzamentos de indução de demais campos de milho. Os genótipos-fonte não devem diferir em mais de 15 dias na duração do ciclo e o indutor utilizado precisa apresentar um tamanho que possibilite que pólen alcance as espigas dos genótipos-fonte em grande quantidade. Quando adotado o cruzamentos manual, os problemas listados anteriormente são mais facilmente controlados, sendo essa forma de indução a preferida nos berçários (PRASANA, CHAIKAM e MAHUKU, 2012).

Para o uso comercial, os indutores gimnogenéticos apresentam maiores vantagens, pois o sistema gimnogenético permite maiores taxas de indução. Outra vantagem do sistema gimnogenético decorre da natureza masculina do indutor. O uso do indutor como doador de pólen facilita o manejo dos indivíduos, no campo de indução, devido à possibilidade de indução de haploidia em diferentes materiais, simultaneamente (PRASANA, CHAIKAM e MAHUKU, 2012). Nesse sistema, quando adotados como fêmeas, os genótipos-fonte podem ser semeados em um único campo isolado, no qual se encontra o indutor, utilizado como macho. Antes do florescimento, as plantas utilizadas como fêmeas são emasculadas, ocorrendo naturalmente a polinização por plantas intactas do indutor (BORÉM e FRITSCHÉ-NETO, 2012).

Prasana, Chaikam e Mahuku (2012) defendem que o número de plantas polinizadas nos cruzamentos de indução por germoplasma-fonte deve ser estimado em função do número de linhagens DHs (duplo-haploides) pretendidas para cada fonte. Um número razoável seria 200 linhagens por material induzido. Para se estimar o número de espigas a serem polinizadas, devem ser considerados fatores como número de sementes por espiga, taxa de haploidia, bem como a taxa de sucesso na duplicação e autofecundação das plantas D_0 .

1.6 Hipóteses para geração de haploides gimnogenéticos

Existem duas hipóteses para a geração de haploides maternos. Uma delas defende que há uma falha na dupla fecundação. Conforme essa tese, 2 núcleos polares (n) presentes no

saco embrionário são fecundados por um dos núcleos reprodutivos (n) presente no grão de pólen, gerando o endosperma triploide. O outro núcleo reprodutivo presente no grão de pólen, por sua vez, por motivos ainda não elucidados, parece ser impedido a fecundar a oosfera (GEIGER e GORDILLO, 2009; PIERRE, et al., 2011). Desta forma, a oosfera (n) se desenvolve e se diferencia em um embrião que contém somente a metade do número de cromossomos (SARKAR e COE, 1966).

Em seus estudos, Bylich e Chalyk (1996) obtiveram 6,3% de grãos de pólen apresentando anomalias. Esses autores constaram que, avaliando o par de núcleos reprodutivos contido em cada grão de pólen, parte deles apresentavam os núcleos de tamanhos diferentes, e defenderam que essa diferença na morfologia dos núcleos seria a responsável pelos problemas na dupla fertilização.

A segunda hipótese para geração de haploides maternos defende que a dupla fecundação ocorre normalmente após a polinização, mas os cromossomos provenientes do material indutor sofreriam mais tarde um processo de degeneração, durante as divisões subsequentes do zigoto (ZHAO et al., 2013). Através de análises moleculares, Li et al. (2009) observaram uma evidência que deu suporte à teoria de introgressão de DNA paterno, sustentando assim a hipótese de eliminação cromossômica, pois fragmentos do DNA do genótipo-indutor foram encontrados compondo o DNA de indivíduos haploides descendentes dos cruzamentos de indução, majoritariamente composto de DNA materno.

1.7 Desenvolvimento de indutores de haploidia

Em 1959, Coe descreveu o desenvolvimento de uma linhagem indutora de haploidia que apresentava uma frequência média de 3,23% de haploides. Compunham o material genético do indutor os genes *A C R^s Pr b pl*, que codificam proteínas que atuam na via da antocianina. Os genes *A*, *R^s* e *C* promovem a pigmentação arroxeadada em sementes de demais tecidos (CHANDLER et al., 1989). Essa linhagem era dotada do gene *RI-nj*, responsável pela expressão do marcador fenotípico dominante *R-navajo*, descrito por Nanda e Chase (1966), o qual promove a pigmentação na camada de aleurona, embrião e escutelo de sementes diploides. Mais tarde, Kermicle (1969) descreveu uma nova linhagem indutora denominada Wisconsin-23 (W23), produtoras de genótipos androgenéticos.

Os indutores de haploidia obtidos mais recentemente são provenientes das linhagens Stock6 ou W23, ou ainda do cruzamento de ambas. Entre os genótipos indutores obtidos desses materiais base, Lashermes e Beckert (1988) desenvolveram a linhagem indutora WS14 a partir do cruzamento entre a linhagem W23 e a Stock 6, com uma taxa de indução de haploidia variando de 2 a 5%. Sarkar et al. (1994) relataram taxa de indução média de 5,2% nas linhagens por eles desenvolvidas com 75% de *background* genético proveniente da Stock 6. Duas outras linhagens indutoras também foram obtidas a partir da Stock 6, ZMS (*Zarodyshevy Marker Saratovsky*), com taxa de indução média variando de 1,7 a 3,4%, bem como KMS (*Korichnevy Marker Saratovsky*), com taxa de indução variando de 0,75 a 2,94% (CHALYK et al., 1994).

Do cruzamento entre estas duas últimas linhagens (ZMS e KMS) foi melhorada a linhagem indutora denominada MHI (*Moldovian Haploid Inducer*) com média de 6,5% de taxa de indução (EDER e CHALYK, 2002). Um sintético com boa capacidade de indução foi obtido por Shatskaya et al. (1994) do cruzamento da Stock 6 com germoplasma russo, originando um indutor denominado KEMS (*Krasnodar Embryo Marker*), com taxa de indução variando de 6 a 8%, da mesma forma para o indutor KHI (*Krasnodar Haploid Inducer*) com taxa de haploidia variando de 5 a 10% (DUNCAN et al., 2013). A linhagem indutora CAUHOI, foi originada do cruzamento da Stock 6 com uma população chinesa com alto teor de óleo que apresenta 2% de taxa de indução e 7, 8% de óleo (LI et al., 2009).

Um enorme progresso na taxa de indução foi alcançado com o desenvolvimento dos indutores para regiões de clima temperado pela Universidade de Hohenheim. A linhagem indutora RWS (*Russian inducer KEMS + WS14*), por exemplo, foi desenvolvida a partir do cruzamento entre WS14 e KMS, e tem uma taxa de indução estimada de 8 a 23% (RÖBER et al., 2005). Do sintético KEMS, também foi desenvolvida a linhagem UH400 com taxa de indução de 8 a 15%, bem como um híbrido entre essas duas linhagens. Outros indutores foram lançados desde então como UH402 (8 a 9% de haploides), além dos importantes indutores com alto teor de óleo UH600 e UH601 cuja taxa de indução varia de 6 a 10% (HOHENHEIM, 2016; MELCHINGER et al., 2014, 2015).

A primeira geração de indutores tropicais e subtropicais foi desenvolvida por meio de uma colaboração entre a Universidade de Hohenheim (Stuttgart, Alemanha) e o CIMMYT (Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo, México). Os indutores UH400,

RWS e o híbrido RWSxUH400 foram utilizados como fonte para o desenvolvimento de indutores tropicais no CIMMYT (PRIGGE et al., 2011). As linhagens indutoras TAIL 8 e TAIL 9 resultantes combinam uma apreciável taxa de indução de haploidia (maior que 8%) com alta produção de pólen e características agronômicas desejáveis às regiões tropicais (PRIGGE et al., 2011; PRASANA, CHAIKAM e MAHUKU, 2012; PRIGGE et al., 2012).

Investigando a base genética para capacidade de indução e tendo como objetivo identificar as regiões genômicas importantes para indução de haploidia, Hu et al. (2016), identificaram um segmento genômico denominado de *qhir12* ligado e relevante para taxa de indução, contendo três genes candidatos para indução de haploidia, que pode ser adotado para a seleção de indutores, fornecendo assim base para aplicação da seleção por marcadores no desenvolvimento de genótipos indutores de haploidia.

1.8 Obtenção dos duplo-haploides em milho

De posse das sementes haploides putativas, tem início a etapa de duplicação cromossômica das mesmas (CHALYK e ROTARENCO, 1999). O processo de duplicação cromossômica já foi considerado um sério obstáculo para a obtenção de linhagens duplo-haploides. Alguns protocolos foram desenvolvidos com a utilização da colchicina como agente responsável pela duplicação. Desde então, essa substância vem sendo utilizada com sucesso (EDER e CHALYK, 2002; BATTISTELLI et al., 2013; COUTO et al., 2015). Contudo, alguns pesquisadores apontam algumas desvantagens da utilização da colchicina (VAN TUYL, MEIJER e VAN DIEN, 1992), entre as quais pode ser destacada a necessidade de mão-de-obra especializada para trabalhar com colchicina, considerando os riscos envolvidos na manipulação deste perigoso agente mutagênico, bem como a falta de estrutura e protocolo adequado para o descarte dos resíduos pós-duplicação (MELCHINGER et al., 2016).

Além da colchicina, outras substâncias já foram testadas no processo artificial de duplicação cromossômica, como orizolina, ácido cafeico, 2,4-D, APM (amiprofos-methyl), trifluralina, ciclohexamida, 8-hidroxiquinoleína e dinitroanilina (YOUNIS, HWANG e LIM, 2014). No entanto, são necessários maiores estudos sobre essas substâncias, estágio ideal de tratamento das plântulas para duplicação, tempo de exposição, órgão exposto e concentração

dos químicos, bem como a avaliação de novos métodos que sejam seguros, rápidos e eficientes.

Alguns procedimentos alternativos vêm sendo avaliados em algumas espécies vegetais e animais (ERICKSON e MARKHART, 2002; WANG, LI e KANG, 2012; LU, ZHANG e KANG, 2013). Tais métodos podem envolver tratamentos físicos como altas ou baixas temperaturas, corrente elétrica, pressão ou gás nitroso, aplicados a diversos órgãos das plantas (KATO e GEIGER, 2002; HÄNTZSCHEL e WEBER, 2010; MELCHINGER et al., 2016). Neste caso, os métodos físicos podem ser tratados como ambientalmente mais seguros embora sejam em muitos casos menos eficientes.

1.9 Vantagens e desvantagens da obtenção de linhagens por duplo-haploides

A principal vantagem da utilização dos duplo-haploides na cultura do milho está na redução do tempo requerido à obtenção das linhagens (BATTISTELLI et al., 2013). Segundo Geiger e Gordillo (2009), com a utilização de linhagens duplo-haploides, um ciclo de seleção pode ser realizado em um ano, enquanto que, no método tradicional, são necessários de três a cinco anos, dependendo das condições climáticas onde estiver sendo conduzindo o programa de melhoramento, voltado à obtenção da linhagem. Por outro lado, se as condições permitirem a realização de três safras por ano, a obtenção de linhagens duplo-haploides pode não ser tão vantajosa, considerando o custo unitário por linhagem desenvolvida por duplo-haploides em comparação à obtida pelo método tradicional.

No melhoramento tradicional, as linhagens obtidas pelo método clássico, apresentam uma fração dos *loci* que continuam em heterozigose mesmo após sucessivas autofecundações, enquanto que no caso dos duplo-haploides (DHs), as plantas originadas são completamente homozigotas (BATTISTELLI et al., 2013). Além da maior rapidez na obtenção da linhagem e da completa homozigose obtida com duplo-haploides, a obtenção de DHs é vantajosa na realização da seleção, pois toda a variância genética explorada na seleção entre linhagens terá uma natureza aditiva. Com a neutralização dos efeitos de dominância, pela ausência de heterozigose, a seleção de características quantitativas pode ser facilitada (CHASE, 1952; BORDES et al., 2006).

Outra vantagem dos duplo-haploides refere-se à frequência de genótipos raros. Considerando apenas dois *loci* independentes segregando entre genitores com genótipos hipotéticos AAbb e aaBB, o genótipo duplo recessivo aabb ocorreria com uma frequência de 1/16 em uma população F₂ descendente de uma autofecundação em F₁. Todavia, com a obtenção de material homozigoto baseado na indução da haploidia e duplicação cromossômica, esse genótipo raro duplo recessivo se apresentaria numa frequência de ¼ na população. Esse aumento na proporção de homozigotos ocorre devido à ausência dos heterozigotos, uma vez que todo indivíduo apresentará os cromossomos homólogos de constituição genética idêntica devido a duplicação artificial, prevalecendo assim, nas linhagens duplo-haploides obtidas, exclusivamente os genótipos AABB, AAbb, aaBB e aabb, nesse caso hipotético (PIERRE et al., 2011).

1.10 Identificação de haploides

Um ponto chave para a aplicação da indução *in vivo* em escala comercial é a aplicação de um método eficiente que permita ao melhorista diferenciar grãos ou plântulas haploides, daqueles formados a partir da fertilização regular. Entre os métodos adotados para tal finalidade, pode ser mencionado o uso do marcador morfológico “*R-navajo*”, a contagem cromossômica, a citometria de fluxo, o teor de óleo nas sementes, a coloração da raiz (*red root marker*), a expressão de genes de ausência de lígula, a expressão de genes *glossy*, a resistência a herbicidas e ainda o comprimento de células-guarda de estômatos (PRASANA, CHAIKAM e MAHUKU, 2012; CHOE et al., 2012; MELCHINGER et al., 2013; CHAIKAM et al., 2016; MELCHINGER et al. 2016).

Para esse fim, o marcador morfológico “*R-navajo*” vem sendo mais utilizado pela praticidade de aplicação. Este marcador é responsável pela pigmentação arroxeadada nas sementes de milho, decorrente da expressão do alelo mutante dominante *R1-nj* (GEIGER e GORDILLO, 2009). Chase e Nanda (1965) foram os primeiros a descrever esse sistema de marcador fenotípico determinado pelo gene (*R1-nj*), no qual as plantas diploides apresentam uma pigmentação por antocianina, tanto no endosperma como também no embrião das sementes diploides. No caso dos haploides, a pigmentação ocorre somente no endosperma. Isso ocorre porque o endosperma é um tecido triploide (3n) formado por um número haploide

(n) de cromossomos do parental masculino e um número diploide (2n) do parental feminino, ao passo que o embrião é formado por um tecido diploide. Como o marcador *R-navajo* é dominante, a coloração roxa se expressa no endosperma, que é triploide. No embrião haploide, o marcador não é expresso, pois o embrião não herda o genoma da linhagem indutora que carrega o alelo marcador.

No sistema *R-Navajo*, para que ocorra uma seleção mais eficiente dos haploides, é importante que as sementes do genótipo-fonte apresentem coloração menos intensa de endosperma e que o indutor seja homozigoto para o alelo *RI-nj*, pois a expressão do marcador pode variar conforme a composição genética das fontes, sendo também afetada pelas condições ambientais (GEIGER e GORDILLO, 2009; KEBEDE et al., 2011). Em trabalho de Rotarenco et al. (2009), uma porção das sementes não expressou a coloração arroxada no endosperma, devido ao fato do genótipo-fonte ser homozigoto para o fator de transcrição *Cl-1*, um inibidor da via da antocianina.

O gene *RI-nj* apresenta expressividade variável e penetrância incompleta (BELICUAS et al., 2007; CHAIKAM et al., 2015). A grande variação fenotípica de expressão de antocianina em indivíduos com o mesmo genótipo pode ser entendida como expressividade variável. Já a penetrância incompleta refere-se ao fato de algumas plantas que carregam o gene para pigmentação não expressarem o fenótipo esperado.

Atualmente, a citometria de fluxo tem sido muito empregada na determinação do nível de ploidia em várias espécies vegetais. Em milho, ela tem sido utilizada para a identificação de haploides e avaliação de métodos de duplicação (GEIGER e SCHÖNLEBEN, 2011; DANG et al., 2012; BATTISTELLI et al., 2013).

A quantificação do nível de ploidia por citometria de fluxo é realizada por meio da intensidade de fluorescência emitida pelos núcleos corados com fluorocromos específicos para DNA. A estimativa do nível de ploidia é realizada comparando-se os resultados de uma dada amostra com os resultados de uma amostra padrão, com nível de ploidia conhecido (DOLEZEL, 1997). A quantificação de DNA por citometria de fluxo apresenta algumas vantagens como a rapidez de processamento da amostra aliado ao fato de se tratar de uma análise não destrutiva (BORÉM e FRITSCHÉ-NETO, 2012). No entanto, apresenta como desvantagem o elevado custo para aquisição e manutenção do equipamento, bem como a

necessidade de mão de obra treinada para a sua operação, resultando assim em um elevado custo das análises.

1.11 Duplicação cromossômica em milho

A duplicação espontânea em milho ocorre em baixa frequência (RÖBER, GORDILLO e GEIGER, 2005). Em haploides de milho originados de indução *in vivo*, a taxa da duplicação cromossômica espontânea para o indutor ZMK, por exemplo, foi descrita entre 3,3 e 3,6%. Dessa forma, a viabilidade econômica da utilização de duplo-haploides para a obtenção de linhagens depende do desenvolvimento de protocolos eficientes voltados à duplicação artificial do número de cromossomos.

Entre os métodos de duplicação cromossômicas, já estudados, vale destacar a utilização de altas ou baixas temperaturas, variações de pressão, emprego de agentes químicos como colchicina, óxido nitroso, cafeína e alguns herbicidas (YOUNIS, HWANG e LIM, 2014).

A colchicina é um dos bloqueadores mitóticos mais utilizados nos protocolos de duplicação cromossômica em milho (GEIGER e GORDILLO, 2009). Esse agente se liga à tubulina e inibe a polimerização do microtúbulos que compõem as fibras dos fusos, não havendo, assim, a migração dos cromossomos para os polos das células. Dessa forma, as células haploides passam a ter seu conjunto cromossômico duplicado, originando células diploides (BELICUAS et al., 2007).

Os protocolos de duplicação vêm sendo aprimorados pela pesquisa. Inicialmente, Gayen et al. (1994) cortaram o coleóptilo das plântulas haploides e as submeteram a uma solução de colchicina e dimetilsulfóxido (DMSO) por 12 horas a 18° C. Em outra proposta, a solução de colchicina foi injetada cerca de 3 a 5 mm acima do ápice radicular em plantas em estágio de 3-4 folhas (ZABIROVA et al., 1996). Deimling, Rober e Geiger (1997) divulgaram um método no qual as raízes das plântulas foram reduzidas para 20 a 30 mm e imersas em solução de duplicação no escuro.

Segundo Castilho et al. (2009), três fatores principais influenciam na duplicação cromossômica por meio de colchicina: tempo, concentração e genótipo. Utilizando haploides maternais de milho, Chalyk (2000) comparou a eficiência dos métodos citados, avaliando a

porcentagem de linhagens duplo-haploides com pendão fértil. Neste estudo, a proposta de Deimling, Rober e Geiger (1997) foi aprimorada, com variações de temperatura de incubação, tempo e concentração de colchicina. Após o tratamento, as porcentagens de haploides duplicados com pólen fértil variaram de 28,8% a 31,8% nas temperaturas de 18 °C e 26 °C, respectivamente. Couto (2015) avaliou dois protocolos distintos. No primeiro, as plântulas foram imersas em solução de colchicina 0,04% e DMSO 5% por 12 horas. No segundo, as raízes foram imersas em solução de colchicina 0,1%, DMSO 0,5% e Tween-20 0,1% por 6 horas. A avaliação foi realizada com marcadores moleculares e viabilidade polínica. O autor concluiu que o segundo protocolo foi mais eficiente que o primeiro, para a duplicação cromossômica.

Younis et al. (2014) comentaram sobre a possibilidade da utilização de fatores ambientais, como temperatura e pressão, para a indução de poliploidia em gametas. Alguns trabalhos relatam a utilização de altas temperaturas para a indução de poliploidia em células gaméticas (LI et al., 2008; PÉCRIX et al., 2011; LU, ZHANG e KANG, 2013). Wang, Li e Kang (2012) realizaram um estudo em *Populus* sp. para verificar a eficiência na indução de poliploidia por altas temperaturas. As inflorescências foram submetidas a temperaturas de 38°C, 41°C e 44°C por 3 e 5 horas. Os autores constataram uma eficiência de 66,7% na indução de triploides. Em *Rosa* sp. também foi observado sucesso na indução de gametas diploides pelo uso de altas temperaturas (PÉCRIX et al., 2011). Contudo, em milho, há poucos relatos sobre a utilização de altas temperaturas ou demais métodos físicos para a indução de poliploidia em plântulas.

Uma alternativa à duplicação em estágio de plântulas é a geração de duplo-haploides a partir do tratamento de embriões imaturos em meio de cultura, utilizando os mesmos agentes antimitóticos. Neste processo, embriões haploides putativos são coletados em até 15 dias após a fertilização e incubados em meio contendo colchicina, por exemplo, e então regenerado em câmara de crescimento (VANOUS, 2011). Esta metodologia tem sido amplamente utilizada aliada à transformação genética anterior a duplicação. Dessa forma, a planta transformada após a duplicação é homozigota para o gene inserido.

2. REFERÊNCIAS

- AMON, T., AMON, B., KRYVORUCHKO, V., ZOLLITSCH, W., MAYER, K., GRUBER, L. Biogás production from maize and dairy cattle manure - influence of nutrient composition on methane yield. **Agriculture Ecosystems e Environment**, v. 118, n. 1- 4, p. 173-182, 2007.
- BATTISTELLI, G. M., VON PINHO, R.G., JUSTUS, A., COUTO, E.G.O., BALESTRE, M. Production and identification of doubled haploids in tropical maize. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 4230-4242, 2013.
- BEDINGER, P. A., FOWLER, J. E. The maize male gametophyte. In: **Handbook of maize: its biology**. BENNETZEN, J. L., HAKE, S. C. (Eds.). Springer Science. New York: USA, 2009. p. 57-78.
- BELICUAS, P. R., PAIVA, L. V., GUIMARÃES, C. A. T., PAIVA, L. E. Androgenetic haploids and SSR markers as tools for the development of tropical maize hybrids. **Euphytica**, v. 156, n. 1-2, p. 95-102, 2007.
- BONAVIA, D. The maize problematic. p. 6-7. In: **Maize: origin, domestication, and its role in the development of culture**. Cambridge University Press, New York, USA, 601p., 2013.
- BORDES, J., DE VAULX, R. D., CHARMET, G., GALLAIS, A. Doubled haploid versus S1 family recurrent selection for testcross performance in a maize population. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 112, n. 6, p. 106-1072, 2006.
- BORÉM, A., FRITSCHÉ-NETO, R. **Biotechnologia aplicada ao melhoramento de plantas**. Viçosa-MG. 335p, 2012.
- BYLICH, V. G., CHALYK, C. T. Existence of pollen grains with a pair of morphologically different sperm nuclei in the ZMS line. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v. 70, p. 33, 1996.
- CASTILLO, A. M., VALLES, M. P., CISTUÉ, L., CASTÁN, M. S. Chromosome doubling in monocots. Advances in Haploid Production in Higher Plants. In: **Advances in haploid production in higher plants**. [s.l.] New York: Springer Science, p. 329-338, 2009.
- CHAIKAM, V., MARTINEZ, L., MELCHINGER, A. E., SCHIPPRACK, W., BODDUPALLI, P. Development and validation of red root marker-based haploid inducers in maize. **Crop Science**, v. 56, n. 4, p. 1678-1688, 2016.
- CHAIKAM, V., NAIR, S. K., BABU, R., MARTINEZ, L., TEJOMURTULA, J., BODDUPALLI, P. M. Analysis of effectiveness of *R1-nj* anthocyanin marker for in vivo

haploid identification in maize and molecular markers for predicting the inhibition of *R1-nj* expression. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 128, p. 159-171, 2015.

CHALYK, S. T. Obtaining fertile pollen in maize maternal haploids. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v. 74, n. 1, p. 17-18, 2000.

CHALYK, S. T., BYLICH, V. G., CHEBOTAR, O. D. Transgressive segregation in the progeny of a cross between two inducers of maize maternal haploids. **Kishinev, Moldova: Institute of Genetics**. Disponível em: <http://www.agron.missouri.edu/mnl/68/69chalyk.html>. Acesso em 23 de outubro de 2016, 1994.

CHALYK, S. T., ROTARENCO, V. A. Using maternal haploid plants in recurrent selection in maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v. 73, p. 56-57, 1999.

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**, v. 1, p. 1175-1183, 1989.

CHASE, S. S. Monoploid frequencies in a commercial double cross hybrid maize, and in its component single cross hybrids and inbred lines. **Genetics**, v. 34, p. 328-332, 1949.

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

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

CHEN, M. H., KAUR, P., DIEN, B., BELOW, F., VINCENT, M. L., SINGH, V. Use of tropical maize for bioethanol production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 1509-1515, 2013.

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

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

COUTO, E. G. O. **Indução de haploides e duplicação cromossômica em milho**. Universidade Federal de Lavras, 106p. 2013a.

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

- COUTO, E. G. O., VON PINHO, E. V. R., VON PINHO, R. G., VEIGA, A. D., BUSTAMANTE, F. O., DIAS, K. O. G. In vivo haploid induction and efficiency of two chromosome duplication protocols in tropical maize. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 39, n. 5, p. 435- 442, 2015.
- DANG, N. C., MUNSCH, M., AULINGER, I., RENLAI, W., STAMP, P. Inducer line generated double haploid seeds for combined waxy and opaque 2 grain quality in subtropical maize (*Zea mays* L.). **Euphytica**, v. 183, n. 2, p. 153-160, 2012.
- DE WET, J. M. J., HARLAN, J. R., GRANT, C. A. Origin and evolution of teosinte (*Zea mexicana* [Schrad.] Kuntze). **Euphytica**, v. 20, p. 255-265, 1971.
- DEIMLING, S., ROBER, F., GEIGER, H. H. Methodik und genetik der in-vivo-Haploideninduktion bei mais. **Vorträge für Pflanzenzüchtung**, v. 38, p. 203-224, 1997.
- DOLEZEL, J. Application of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, v. 38, n. 3, p. 285-302, 1997.
- DRESSELHAUS, T., LAUSSER, A., MÁRTON, M. L. Using maize as a model to study pollen tube growth and guidance, cross-incompatibility and sperm delivery in grasses. **Annals of Botany**, v. 108, p. 727-737, 2011.
- DUNCAN, D. R., ARMSTRONG, C. L., SIDOROV, V., Inventores; MONSANTO TECHNOLOGY LIC., DUNCAN, D. R., ARMSTRONG, C. L., SIDOROV, V., Depositante. **Method for agrobacterium transformation for dihaploid corn plants**. United States patent US CA2570626C, 6 de Agosto de 2013.
- EAST, E. M. The distinction between development and heredity in inbreeding. **The American Naturalist**, v. 43, p. 173-181, 1909.
- EAST, E. M. Inbreeding in corn. **Connecticut Agricultural Experimental Station Report**, 1908. p. 419-428.
- EDER, J., CHALYK, S. In vivo haploid induction in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, n. 4, p. 703-708, 2002.
- ERICKSON, A. N., MARKHART, A. H. Flower developmental stage and organ sensitivity of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) to elevated temperature. **Plant, Cell & Environment**, v. 25, n. 1, p. 123-130, 2002.
- EVANS, M. M. S., UELI, G. The maize megagametophyte. In: **Handbook of maize: its biology**. BENNETZEN, J. L., HAKE, S. C. (Eds.). Springer Science. New York: USA, 2009. p. 79-104.

FOSTER, T. M., TIMMERMANS, M. C. P. **Axial Patterning of the Maize Leaf**. In: Handbook of maize: its biology. BENNETZEN, J. L., HAKE, S. C. (Eds.). Springer Science. New York: USA, 2009. p. 161-178.

FRANKS, H. **The maize root system: morphology, anatomy, and genetics**. In: Handbook of maize: its biology. BENNETZEN, J. L., HAKE, S. C. (Eds.). Springer Science. New York: USA, 2009. p. 145-160.

GAYEN, P., MADAN, J. K., KUMAR, R., SARKAR, K. R. Chromosome doubling in haploids through colchicine. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v. 68, n. 1, p. 65, 1994.

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

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

HALLAUER, A. R., CARENA, M. J., MIRANDA FILHO, J. B. **Quantitative Genetics in Maize Breeding**. 3rd. ed. [s.l.] Iowa State University Press, 2010.

HÄNTZSCHEL, K. R., WEBER, G. Blockage of mitosis in maize root tips using colchicine-alternatives. **Protoplasma**, v. 241, n.1-4, p. 99-104, 2010.

HOHENHEIM. **Maize inbred lines**. Disponível em: <https://plant-breeding.unihoenheim.de/84531?&L=1>). Acesso em agosto de 2016.

HU, H., SCHRAG, T. A., PEIS, R., UNTERSEER, S., SCHIPPRACK, W., CHEN, S., LAI, J., YAN, J., PRASANNA, B. M., NAIR, S. K., CHAIKAM, V., ROTARENCO, V., SHATSKAYA, O. A., ZAVALISHINA, A., SCHOLTEN, S., SCHÖN, C. C., MELCHINGER, A. E. The genetic basis of haploid induction in maize identified with a novel genome-wide association method. **Genetics**, v. 204, n. 2, 2016.

KATO, A., GEIGER, H. H. Chromosome doubling of haploid maize seedlings using nitrous oxide gas at the flower primordial stage. **Plant Breeding**, v. 121, n. 5, p-270-377, 2002.

KEBEDE, A. Z., DHILLON, B. S., SCHIPPRACK, W., ARAUS, J. L., BÄNZIGER, M., SEMAGNSEMAGN, K., ALVARADO, G., MELCHINGER, A. E. Effect of source germplasm and season on the in vivo haploid induction rate in tropical maize. **Euphytica**, v. 180, n. 2, p. 219-226, 2011.

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

- KERMICLE, J. L. Androgenesis and the indeterminate gametophyte (*ig*) mutation: influence of pollen parent on androgenesis frequency. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, p. 207-208, 1973.
- KERMICLE, J. L., DEMOPULOS-RODRIGUEZ, J. Location of indeterminate gametophyte (*ig*) on chromosome 3. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v. 54, p. 84-85, 1980.
- LASHERMES, P., BECKERT, M. Genetic control of maternal haploidy in maize (*Zea mays* L.) and selection of haploid inducing lines. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 76, p. 404-410, 1988.
- LI, L., XU, X., JIN, W., CHEN, S. Morphological and molecular evidences for DNA introgression in haploid induction via a high oil inducer CAUHOI in maize. **Planta**, v. 230, n. 2, p. 367-376, 2009.
- LI, Y. H., KANG, X. Y., WANG, S. D., ZHANG, Z. H., CHEN, H. W. Triploid induction in *Populus alba* x *P. glandulosa* by chromosome doubling of female gametes. **Silvae Genetica**, v. 57, n. 1, p. 37-40, 2008.
- LIN, B. Y. Megagametogenetic alterations associated with the indeterminate gametophyte (*ig*) mutation in maize. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 41, p. 557-563, 1981.
- LU, M., ZHANG, P., KANG, X. Induction of 2n female gametes in *Populus adenopoda* Maxim by high temperature exposure during female gametophyte development. **Breeding science**, v. 63, n. 1, p. 96-103, 2013.
- MELCHINGER, A. E., MOLENAAR, W. S., MIRDITA, V., SCHIPPRACK, W. Colchicine alternatives for chromosome doubling in maize haploids for doubled haploid production. **Crop Science**, v. 56, p. 1-11, 2016.
- MELCHINGER, A. E., SCHIPPRACK, W., MI, X., MIRDITA, V. Oil content is superior to oil mass for identification of haploid seeds in maize produced with high-oil inducers. **Crop Science**, v. 55, p. 188-195, 2015.
- 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, p. 1127-1135, 2016.
- MELCHINGER, A. E., SCHIPPRACK, W., UTZ, H. F., MIRDITA, V. In vivo haploid induction in maize: Identification of haploid seeds by their oil content. **Crop Science**, v. 54, p. 1497-1504, 2014.
- MELCHINGER, A. E., SCHIPPRACK, W., WURSCHEM, T., CHEN, S., TECHNOW, F. Rapid and accurate identification of in vivo-induced haploid seeds based on oil content in maize. **Scientific Reports**, v.3, n. 2129, p.1-5, 2013.

- MEYER-AURICH, A., LOCHMANN, Y., KLAUSS, H., PROCHNOW, A. Comparative advantage of maize- and grass-silage based feedstock for biogas production with respect to greenhouse gas mitigation. **Sustainability**, v. 8, n. 7, p. 617, 2016.
- NANDA, D. K., CHASE, S. S. An embryo marker for detecting monoploids of maize (*Zea mays* L.). **Crop Science**, v. 6, p. 213 -215, 1966.
- NIEH, S. C., LIN, W. S., HSU, Y. H., SHIEH, G. J., KUO, B. J. The effect of flowering time and distance between pollen source and recipient on maize. **GM Crops & Food**, v. 5, n. 4, 2014.
- PÉCRIX, Y., RALLO, G., FOLZER, H., CIGNA, M., GUDIN, S., BRIS, M. L. Polyploidization mechanisms: Temperature environment can induce diploid gamete formation in *Rosa* sp. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 10, p. 3587-3597, 2011.
- PIERRE, P. M.O., DAVIDE, L. M. C., COUTO, E. G. O., SILVA, T. N., RAMALHO, M. A. P., SANTOS, J. B. Duplo-haploides: estratégias para obtenção e importância no melhoramento genético do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 10, n. 1, p. 1-16, 2011.
- PILLITTERI, L. J., DONG, J. Stomatal Development in Arabidopsis. **Arabidopsis Book**, v. 11, p.1-26, 2013.
- PINTO, R. J. **Introdução ao melhoramento genético de plantas**. 2a ed. Maringá: EDUEM, Universidade Estadual de Maringá-PR, 2009. 351p.
- PRASANNA, B. M., CHAIKAM, V, MAHUKU, G. **Doubled Haploid. Technology in Maize Breeding: Theory and Practice**, 50p., 2012.
- PRIGGE, V., XU, X., LI, L., BABU, R., CHEN, S., ATLIN, G. N., MELCHINGER, E. A. New insights into the genetics of in vivo induction of maternal haploids, the backbone of doubled haploid technology in maize. **Genetics**, v. 190, n. 2, p.781-793, 2011.
- PRIGGE, V., SCHIPPRACK, W., MAHUKU, G., ATLIN, G. N., MELCHINGER, A. E. Development of in vivo haploid inducers for tropical maize breeding programs. **Euphytica**, v. 185, n. 3, p. 481-490, 2012.
- RAISSIG, M., T., ABRASHA, E., BETTADAPURB, A., VOGELC, J. P., BERGMANN, D. C. Grasses use an alternatively wired bHLH transcription factor network to establish stomatal identity. **Pnas**, v. 113, n. 29, p.8326-8331, 2016.
- RÖBER, F. K., GORDILLO, G. A., GEIGER, H. H. In vivo haploid induction in maize - performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding. **Maydica**, v. 50, p. 275-283, 2005.

ROTARENCO, V. A., ADICU, G., SARMANIUC, M. Induction of maternal haploids in maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v. 83, n. 1, p. 12-13, 2009.

SAGE, R. F., SAGE, T. L., KOCACINAR, F. Photorespiration and the evolution of C4 photosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 63, p. 19-47, 2012.

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

SARKAR, K. R., PANDEY, A., GAYEN, P., MANDAN, J. K., KUMAR, R., SACHAN, J. K. S. Stabilisation of high haploid inducer lines. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v. 68, p. 64-65, 1994.

SHATSKAYA, O. A., ZABIROVA, SHCHERBAK, E. R., CHUMAK, V. S. Mass induction of maternal haploids. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v. 68, p. 51, 1994.

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

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

TORRES, A. F., SLEGERS, P. M., NOORDAM-BOOT, C. M. M., DOLSTRA, O., VLASWINKEL, L., BOXTEL, A. J. B. V., VISSER, R. G. F., TRINDADE, L. M. Maize feedstocks with improved digestibility reduce the costs and environmental impacts of biomass pretreatment and saccharification. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 63, p. 1-15, 2016.

USDA - United States Department of Agriculture. **World Agriculture Supply and Demand Estimate**. p.40, Outubro, 2016a.

USDA - United States Department of Agriculture. **Grain: World Markets and Trade**, Agosto de 2016b.

VAN TUYL, J. M., MEIJER, B., VAN DIEN, M. P. The use of oryzalin as an alternative for colchicine in in-vitro chromosome doubling of *Lilium* and *Nerine*. **Acta Horticulture**, v. 325, p. 625-630, 1992.

VANOUS, A. E. **Optimization of doubled haploid production in maize (*Zea mays* L.)**. Dissertação. Iowa State University, Ames, Iowa, 2011.

VAVILOV, N. I. **Studies on the origin of cultivated plants**. Leningrad: Institut de Botanique Appliquée et d'Amélioration des Plantes, 1926.

VOLLBRECHT, E., SCHMIDT, R. J. Development of the Inflorescence. In: **Handbook of maize: its biology**. BENNETZEN, J. L., HAKE, S. C. (Eds.). Springer Science. New York: USA, 2009. p. 13-40.

WANG, J., LI, D. L., KANG, X. Y. Induction of unreduced megaspores with high temperature during megasporogenesis in Populus. **Annals of Forest Science**, v. 69, n. 1, p. 59-67, 2012.

WESTGATE, M., LIZASO, J. I. BATCHELOR, W. Quantitative relationships between pollen shed density and grain yield in maize. **Crop Science**, v. 43, n. 3, 2003.

YOUNIS, A., HWANG, Y. J., LIM, K. B. Exploitation of induced 2n-gametes for plant breeding. **Plant Cell Reports**, v. 33, n. 2, p. 215-223, 2014.

ZABIROVA, E. R., CHUMAK, M. V., SHATSKAIA, O. A., SCHERBAK, V. S. Technology of the mass accelerated production of homozygous lines (in Russian). **Kukuruza i Sorgo**, v. 4, p. 17-19, 1996.

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

CAPÍTULO 1

Efeito do genótipo e ambiente na produção de haploides putativos selecionados pela expressão do marcador fenotípico *R1-navajo*

Efeito do genótipo e ambiente na produção de haploides putativos selecionados
pela expressão do marcador fenotípico *R1-navajo*

RESUMO

Considerando a importância da taxa de indução de haploidia bem como de haploides putativos na obtenção de duplo-haploides, muito tem sido citado sobre o efeito do ambiente, da textura do endosperma, da base genética, do *background* genético e do genótipo-fonte e ainda, da interação desses fatores. Com o objetivo de avaliar o efeito desses fatores na proporção de haploides putativos, as sementes descendentes de 41 genótipos-fonte do cruzamento de indução com o indutor KHI (*Krasnodar Haploid Inducer*), avaliados em duas safras (verão ou inverno) nas condições edafoclimáticas de Maringá, foram classificadas conforme a expressão do gene *R1-nj* em haploides ou diploides. Os fatores textura do endosperma, base genética e *background* genético, aqui representado como as diferentes empresas, não interferiram nas taxas de sementes classificadas como haploides pela expressão de *R-Navajo*. Por outro lado, os fatores safra e genótipo-fonte afetaram a taxa de haploides putativos produzidas, sendo a safra de verão a mais eficiente em gerar haploides putativos. Esses resultados indicam que, em regiões tropicais, a condução de cruzamentos de indução durante o período de verão deve ser preferida.

Palavras-chave: *R1-nj*. Indução de haploidia. Taxa de indução. KHI.

Effect of the germplasm source and environment on the putative haploid rate
selected by expression of the phenotypic marker *RI-Navajo*

ABSTRACT

Given the importance of the haploid induction rate as well as the putative haploid rate on the doubled haploid development, the effect of environmental, endosperm texture, genetic base, genetic background, germplasm source and also the interaction of these factors over the haploid production has been high lightened. Aimed to evaluate the effect of these several factors on the putative haploids proportion, kernels descendent of 41 source germplasm from haploid induction cross with KHI (*Krasnodar Haploid Inducer*) were measured in two seasons (summer and winter) in the environmental conditions of Maringá and sorting following *RI-nj* embryo marker expression on haploid or diploids. The factors endosperm texture, genetic base and genetic background did not affect the rate of the kernels sorted as haploids by *R-Navajo* expression. On the order hand, season and source and germplasm factor had an effect on the haploid putative rate and the summer had higher haploid putative rate then the estimated to the winter season. These results highlight that in tropical regions the induction crosses during the summer season should be preferred.

Keywords: *RI-nj*. Haploid induction. Haploid induction rate. KHI.

1. INTRODUÇÃO

A seleção de haploides para a duplicação cromossômica é uma etapa essencial para a produção de linhagens duplo-haploides (DH) em milho. De acordo com o potencial do indutor, a taxa de haploides reais produzidos por genótipo-fonte pode variar de 2 a 12% de haploides em relação ao total de sementes produzidas, sendo essa taxa conhecida como taxa de indução de haploidia (MELCHINGER et al., 2005; BELICUAS et al., 2007; PRIGGE e MELCHINGER, 2012; BATISTELLI et al., 2013).

Após a etapa de cruzamentos de indução, muitos programas de melhoramento têm adotado o marcador fenotípico resultante da expressão do gene *RI-nj* como critério para separação de sementes haploides. O gene *RI-nj*, presente na maioria dos genótipos indutores de haploidia, é dominante e promove a pigmentação por antocianina no endosperma e embrião em sementes diploides (2n) provenientes dos cruzamentos com genótipos-fonte (NANDA e CHASE, 1966; PRASANA, CHAIKAM e MAHUKU, 2012). Quando haploides (n) gimnogenéticos são gerados, os quais carregam somente cromossomos da mãe no embrião, apenas a pigmentação arroxeadada no endosperma que é triploide é esperada, sendo o embrião não pigmentado, pois os genótipos-fonte não carregam esse gene em sua constituição.

Haploides putativos separados por *RI-nj* estão relacionados com a taxa de indução real, sendo, para muitos autores tratados como sinônimo de taxa de indução de haploidia (PRIGGE et al., 2011; BATISTELLI et al., 2013; COUTO et al., 2015). Todavia, especialmente em germoplasmas tropicais de milho, nem sempre os demais genes complementares requeridos para promover a pigmentação por antocianina em sementes estão presentes. Dessa forma, o fenótipo *Navajo* pode ser completamente suprimido ou fracamente expresso, dependendo do germoplasma-fonte e das condições do ambiente, tornando ineficiente a identificação de haploides por esse marcador (COE, 1962; COE e SARKAR, 1964; COE, 1994; CHAIKAM et al., 2015).

A taxa de indução de haploidia é efeito da interação do genótipo-indutor com o genótipo-fonte, sendo mais importante a capacidade de indução do genótipo-indutor. A média geral da taxa de indução do indutor para vários locais em vários cruzamentos de indução é utilizada como medida para a caracterização do valor do indutor. Estudos têm

mostrado o importante efeito do ambiente na produção de haploides, especialmente a temperatura e umidade. Por isso, a taxa de haploides produzidos é variável para cada cruzamento de indução com a mudança do ambiente, sendo o ambiente representado por diferentes safras ou locais de indução (PRIGGE et al., 2011; KEBEDE et al., 2011).

Além do efeito de indutor, do genótipo-fonte e das safras, a taxa de produção de haploides reais ou putativos depende do efeito de fatores ligados ao ambiente do local de indução, textura do endosperma, geração de endogamia, ou base genética do material fonte (AMAN e SARKAR, 1978; SARKAR et al., 1994; EDER e CHALIK, et al., 2002; ROBER, GORDILLO e GEIGER, 2005; KEBEDE et al., 2011; PRIGGE et al., 2011; BATISTELLI et al., 2013; COUTO et al., 2015). No entanto, esses fatores geralmente são estudados em experimentos contendo duas ou três combinações desses fatores, ou até mesmo por meio da avaliação de apenas um desses fatores isoladamente, sem que muitas vezes fosse possível avaliar a interação ou a relação entre eles.

Nesse sentido, o presente trabalho teve por objetivo de verificar a ação dos fatores genótipo-fonte, época de indução (safra), textura de endosperma, *background* genético (representado por empresas), e ainda da base genética, sobre a produção de haploides putativos, selecionados por *RI-nj*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material genético e cruzamentos de indução de haploidia

Quarenta e um genótipos provenientes das empresas Dupont Pioneer, Coodetec, EMBRAPA, IAC, Syngenta, Dekalb, Agrocere e IAPAR, com diversas bases genéticas (híbridos simples, híbridos duplos, híbridos triplos, S₁'s e populações de polinização aberta) foram utilizadas como mães (genótipos-fonte) em cruzamentos de indução com o indutor de haploidia KHI (genótipo-indutor) em duas safras: safra verão 2013-2014 (Safra 1) e safrinha 2014 (Safra 2). Os materiais apresentam endosperma de textura variada: duro, semiduro, *flint*, *semiflint*, doce, branco e pipoca. As características dos materiais induzidos estão reunidas na Tabela 1.

Para os cruzamentos de indução, os genótipos-fonte foram semeados em campo de polinização composto por duas linhas de 8 m para cada material, com 0,9 m de espaçamento entre linhas e 0,20 m entre plantas, constituindo 5 plantas por metro. O indutor foi semeado em um campo adjacente, na proporção de 1,5 linhas de indutor para cada linha de genótipos-fonte. As linhas do genótipo-indutor foram semeadas em cinco épocas diferentes, distanciadas em uma semana umas das outras. A primeira semeadura ocorreu uma semana antes da semeadura dos genótipos-fonte e a última, 21 dias após a semeadura dos genótipos fontes. Vale ressaltar que o indutor KHI, utilizado aqui como doador de pólen, apresenta um ciclo super-precoce de 45 dias para o florescimento e é uma variedade de polinização aberta. Os cruzamentos de indução foram conduzidos na Fazenda Experimental de Iguatemi, pertencente à Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil, tanto na safra de verão quanto na safrinha.

Tabela 1. Dados dos genótipos-fonte utilizados nos cruzamentos de indução em duas safras: safra verão 2013-2014 e safrinha 2014.

Empresa	Base genética	Textura do endosperma	Genótipos-fonte
AGROCERES	HD	SEMIDURO	AG1051
AGROCERES	HS	DURO	AG8088
AGROCERES	HS	SEMIDENTADO	AG8021
AGROCERES	HS	SEMIDURO	AG7088
AGROCERES	HS	SEMIDURO	AG9040
COODETEC	HD	SEMIDURO	CD308
COODETEC	HS	SEMIDENTADO	CD321
COODETEC	HS	SEMIDURO	CD387
COODETEC	HT	SEMIDENTADO	CD382
COODETEC	HT	SEMIDURO	CD356
DEKALB	HS	SEMIDENTADO	DKB330Y
DEKALB	HS	SEMIDURO	DKB245
DEKALB	HS	SEMIDURO	DKB390VTPRO
DEKALB	HT	SEMIDURO	DKB370
DUPONT	HS	DURO	30B39H
DUPONT	HS	DURO	P4285
DUPONT	HS	SEMIDURO	30B30
DUPONT	HS	SEMIDURO	30F35
DUPONT	HS	SEMIDURO	30F53H
DUPONT	HS	SEMIDURO	P30F36
DUPONT	HS	SEMIDURO	P3431H
DUPONT	HS	SEMIDURO	SPEEDTL
DUPONT	S ₁	SEMIDURO	S130F53
DUPONT	S ₁	SEMIDURO	S1P2530
DUPONT	S ₁	SEMIDURO	S1P3989
EMBRAPA	HD	BRANCO	HD332
EMBRAPA	HT	BRANCO	HT932
EMBRAPA	POP	BRANCO	BR427
EMBRAPA	POP	DOCE	BRDOCE
EMBRAPA	POP	DOCE	DOCE2
EMBRAPA	S ₁	DOCE	S1BR427
IAC	HS	PIPOCA	IAC112
IAC	POP	DOCE	CUBANO
IAPAR	HD	BRANCO	IPR119
SYNGENTA	HD	DENTADO	STATUS
SYNGENTA	HD	DURO	30F80
SYNGENTA	HD	SEMIDURO	CARGO
SYNGENTA	HS	DURO	30K64Y
SYNGENTA	HS	DURO	FORMULA
SYNGENTA	S ₁	DURO	S1CARGO

*HS: híbrido simples; HD: híbrido duplo; HT: híbrido triplo; S₁: primeira geração de autofecundação; POP: população de polinização aberta.

As espigas dos genótipos-fonte foram protegidas antes da emergência dos estigmas. Durante o florescimento, o pólen foi coletado no campo de indutor em *bulk* utilizando sacos de papel e a polinização para indução de haploidia realizada manualmente. Na maturação, 10 espigas provenientes de cada cruzamento foram aleatoriamente escolhidas, debulhadas e secas. As sementes foram então selecionadas por meio da expressão do marcador fenotípico *R-navajo* em haploides putativos ou diploides.

2.2 Análise estatística

A variável resposta analisada foi a proporção de haploides putativos obtidos pelo marcador *RI-nj* em relação ao número de sementes diploides. As proporções foram avaliadas usando a função “glm” do pacote R (R CORE TEAM, 2015). Os dados apresentam distribuição binomial por se tratar de uma variável resposta dicotômica (exemplo: haploide putativo = 1 ou diploide = 0) e para tanto, a função de ligação *logit* foi adotada (DOBSON, 1990; MELCHINGER et al., 2016).

O modelo mais adequado para explicar o efeito dos fatores (genótipos-fonte, safras, empresas, textura de endosperma e base genética) sobre a taxa de haploides putativos foi obtido por meio de um procedimento de seleção de modelos no qual o valor AIC (Critério de informação Akaike) foi utilizado como principal critério (SNIPES e TAYLOR, 2014; PAULA, 2013). Neste procedimento, o melhor modelo é o que apresenta menor AIC. No caso de empate entre mais de um modelo de menor AIC, escolhe-se o modelo que inclui o menor número de parâmetros explicativos. A estimativa do AIC para um determinado modelo é dada por: $-2L+2k$ em que, L é a função da Verossimilhança do modelo com os parâmetros θ e k o número de parâmetros (DOBSON, 1990). Conjuntamente, também foram utilizados na tomada de decisão os dados de dispersão e o resultado da ANOVA (Análise de Variância) Tipo III, em que cada fator é analisado isoladamente e assim não dependendo da ordem em que foram especificados os termos no modelo.

De posse do modelo melhor ajustado aos dados, o mesmo foi submetido à análise de resíduos e aos demais critérios de qualidade do ajuste, onde uma superdispersão foi detectada. A superdispersão ocorre quando a variabilidade dos resíduos é maior do que aquela assumida pelo modelo. Essa variabilidade pode ser resultado da heterogeneidade entre

os indivíduos, não explicada pelas covariáveis, ou pelo fato de haver correlação entre as respostas (TURKMAN e SILVA, 2000). Neste caso, os valores de erro padrão, bem como diferenças significativas entre contrastes, não são adequadamente estimados, se afastando muito do valor real (HINDE e DEMÉTRIO, 1998; PAULA, 2013). Para tanto, os erros padrão foram corrigidos usando o modelo “quasibinomial”, no qual a variância é dada por $\phi\mu_i(1-\mu_i)$ em que μ é a média e ϕ é o parâmetro de dispersão, assim minimizando o efeito de superdispersão (PROVETE et al., 2011).

Uma análise de *deviance* foi procedida conforme o modelo selecionando e avaliados os fatores e as interações. Para classificar as diferenças entre as safras, representados apenas por dois níveis, o teste χ^2 aplicado na análise de *deviance* foi considerado suficiente. Para o desdobramento de safras dentro do fator genótipo, os parâmetros estimados dentro dos níveis de cada fator foram comparados pelo teste t, para cada contraste entre médias, onde o *p-valor* foi corrigido pela *FDR* (*false discovery rate*) (DEMETRIO, 2002; BRETZ et al., 2011).

Ainda para o desdobramento de genótipos dentro de safras, uma análise de agrupamento foi realizada entre os genótipos quanto às taxas de indução estimadas. Para isso, uma matriz de dissimilaridade a partir da distância euclidiana média foi gerada para os genótipos dentro de cada safra. Os grupos dentro de cada safra para os genótipos foram obtidos pelo método hierárquico de agrupamento de Ward e um dendrograma para cada safra foi gerado (SEIDEL, 2008). O número ideal de *clusters* (grupos) foi alcançado baseado no índice D e de Hubert (APÊNDICES A1 e A2), utilizando o pacote “NbClust” do R (CHARRAD et al., 2014) e a estabilidade dos *clusters* gerados avaliada por meio do método “*bootstrap*”, usando a função *clusterboot* do pacote “fpc” do R (R Core Team, 2015), onde o algoritmo adotado é baseado no coeficiente de Jaccard (APÊNDICES B1 e B2). O critério para estabilidade do grupo adotado foi um coeficiente de Jaccard maior que 0,60 (HSU, 2015).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Seleção e ajuste de modelo

A seleção de modelos pelo AIC relacionou o efeito dos fatores genótipos-fonte, safra, base genética e empresa na taxa de haploides putativos. Segundo o critério adotado, o modelo mais parcimonioso para explicar os fatores envolvidos na proporção de haploides putativos incluiu os fatores genótipos-fonte, as safras e a interação entre eles (Tabela 2).

Tabela 2. Resumo da análise de modelos por AIC gerado pela análise de *deviance* e ANOVA tipo III.

Modelo ¹	DF ²	Deviance	χ^2	AIC	Fatores não significativos pela ANOVA tipo III
1	560	1.567,4	1.693,7	3.562,6	B, T, E, S*E, S*T, S*B, B*E, B*G, B*T, E*T, E*G, *S*B*E*T
2	560	1.567,4	1.693,7	3.562,6	T, B, T*G, B*G, T*G, E*G, S*T, S*B, S*E
3	603	1.972,3	2.197,6	3.881,6	T, B, E
4	628	2.494,2	2.922,1	4.353,5	
5	603	1.972,3	2.197,6	3.881,6	B, E
6	603	1.972,3	2.197,6	3.881,6	B, T
7	604	1.975,2	2.198,9	3.882,5	E, T
8	603	1.972,3	2.197,6	3.881,6	B
9	604	1.975,2	2.198,9	3.882,5	
10	564	1.574,5	1.698,3	3.561,7	
11	604	2.062,4	2.271,3	3.969,7	B, E, T
12	564	1.574,5	1.698,3	3.561,7	T, T*G, S*T
13	564	1.574,5	1.698,3	3.561,7	E, G*E, S*E
14	560	1.567,4	1.567,4	3.562,6	B, G*B, S*B
15	601	2.059,1	2.267,7	3.972,3	B, G*B

G: Genótipos; S: Safras; E: Empresas; T: Texturas; B: Base genética.

¹1 Y=G+S+T+B+E+G*S+G*T+G*B+G*E+S*T+S*B+S*E+B*T+E*T+G*S*B*T*G

2 Y=G+S+T+B+E+G*S+G*T+G*B+G*E+S*T+S*B+S*E+B*T+E*T

3 Y=G+S+T+B+E

4 Y=S+T+B+E

5 Y=G+S+B+E

6 Y=G+S+T+B

7 Y=G+S+T+E

8 Y=G+S+B

9 Y=G+S

10 Y=G+S+G*S

11 Y=G+T+B+E

12 Y=G+S+T+G*S+G*T+S*T

13 Y=G+S+E+G*S+G*E+S*E

14 Y=G+S+B+G*S+G*B+S*B

15 Y=G+B+G*B

²Degress of freedom.

Diante do aplicado, os modelos 10, 12 e 13 (Tabela 2) se apresentam como mais próximos do real em relação aos demais testados. Esses três modelos incluem o efeito de genótipos-fonte e safras. O modelo mais simplificado (com menor número de parâmetros) inclui apenas os fatores genótipos-fonte e safra, bem como a interação entre eles. Os demais modelos incluem mais um fator: textura de endosperma para modelo 12 e empresa para modelo 13. No entanto, a ANOVA tipo III não aponta para a significância desses fatores extras, tampouco para a interação com eles. Assim, o modelo mais parcimonioso foi o

modelo 10 que incluiu então os efeitos aditivos de genótipos (l) e de safras (h), bem como a interação entre eles, como descrito a seguir:

$$Y_{ij} \sim \text{Binomial}(m_{ij}, \pi_{ij}) \quad (\text{Equação 1})$$

$$\log\left(\frac{\pi_{ij}}{1-\pi_{ij}}\right) = \mu + g_i + s_j + gs_{ij} + \mathcal{E}_{ij} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

Y_{ij} : É a proporção observada de haploides putativos para o genótipo i na safra j ;

π_{ij} : Probabilidade de ocorrência de haploides putativos;

m_{ij} : Número de casos sementes observadas;

μ : Intercepto;

g_i : Efeito fixo do genótipo-fonte;

s_j : Efeito fixo da safra;

gs_{ij} : Efeito fixo da interação entre o genótipo i com a safra j .

\mathcal{E}_{ij} : Erro associado, cuja distribuição é $N(0, \sigma^2)$.

Diversos autores citam o efeito do ambiente na taxa de indução bem como nos haploides putativos classificados via expressão do *RI-nj* (EDER e CHALIK, et al., 2002; KEBEDE et al., 2011; BATISTELLI et al., 2013; COUTO et al., 2015). Rober, Gordillo e Geiger (2005) apontaram efeito de locais e anos na taxa de indução, o que não foi anteriormente constatado por Aman e Sarkar (1978) em milho. O trabalho de Röber, Gordillo, Geiger (2005) aponta que o comportamento de dois indutores, em locais e condições ambientais diferentes (Alemanha, Chile e México), foi desigual nas diferentes condições para taxa de indução. Quanto à eficiência da seleção de haploides pelo marcador *RI-nj* nos diferentes ambientes, os erros de classificação foram razoáveis para fontes de endosperma dente, mas demasiados para endosperma *flint*. Assim, o tipo de endosperma pode mascarar a taxa de haploides reais inferidas e influenciar positiva ou negativamente a taxa de haploides putativos.

Prigge et al. (2011) não observaram a interação com o ambiente para geração de haploides putativos separados pela pigmentação de antocianina. Os autores detectaram efeito do material indutor, do genótipo-fonte, mas sem interação entre os fatores em três diferentes locais no México, bem como desempenho parecido dos indutores para taxa de indução baseada em *RI-navajo* para regiões tropicais e temperadas. No entanto, quando um marcador mais sensível como quando genótipos testadores *lglg* foram adotados para seleção de haploides, a interação genótipo por ambiente foi observada.

De acordo com Belicuas et al. (2007), as diferenças observadas para as proporções de haploides putativos estão ligadas a expressividade variável do gene *RI-nj*, promovendo erros na separação de haploides. Quando a inibição de expressão ocorre, devido à presença de inibidores dominantes como *CI-I* presentes no genótipo-fonte, não são possíveis identificar visualmente embriões haploides (CHAIKAM et al., 2015).

Eder e Chalik, et al. (2002) citam o efeito do genótipo-indutor, genótipo-fonte e do ambiente na produção de haploides, no entanto sem interferência da base genética ou geração bem como da textura do endosperma na classificação de haploides putativos ou taxa de indução de haploidia. O efeito da interação entre genótipo-fonte e indutor na taxa indução também foi encontrada pelos mesmos autores, indicando que embora o indutor tenha um comportamento médio na geração de haploides, em certos cruzamentos de indução, estas taxas podem se desviar da média.

Por meio de um dialelo, Kebede et al. (2011) avaliaram o efeito do ambiente nas taxas de indução. Estes autores não detectaram interação entre a capacidade geral e específica de combinação com as safras, indicando uma possível não relevância do efeito do ambiente. Concluem que a taxa de haploides putativos seria muito mais dependente da capacidade de indução do indutor, bem como sua interação com o germoplasma-fonte.

Em trabalho envolvendo dois indutores diferentes em cruzamentos de indução com 6 genótipos-fonte de duas gerações diferentes de endogamia (F_2 e F_3), em 2 locais, Batistelli et al. (2013) encontraram efeito do genótipo-fonte, locais, bem como interação entre estes fatores. No entanto, sem efeito da geração na taxa de haploides putativos. Couto et al. (2015) também detectaram efeito do genótipo-fonte sobre a taxa de haploides putativos, mas assim como Batistelli et al. (2013), nenhum efeito da geração foi observado.

Contrariamente aos resultados encontrados para o fator base genética, Chaikam et al. (2015) citam o efeito dessa variável na taxa de haploides putativos. Por outro lado, os autores também defendem que o efeito da textura do endosperma não exerceu consequência na classificação das sementes como haploides, segundo esse marcador fenotípico.

3.2 Análise de *deviance* para a taxa de haploides putativos

A análise de *deviance* para taxa de haploides putativos aponta para efeitos significativos do genótipo-fonte e safras, bem como interação significativa entre estes fatores, indicando que, para um mesmo genótipo em safras diferentes, desvios para a taxa de haploides putativos foram verificados tanto para análise de variância tipo I como tipo III (Tabela 3).

Tabela 3. Resumo da análise de *deviance* para taxa de haploides putativos identificados pelo marcador *R1-navajo* obtidos por meio do cruzamento de indução entre 41 híbridos e o indutor KHI, na safrinha 2013-2014 e verão 2014.

Fontes	<i>Deviance</i>	DF ¹	ANOVA Tipo I		ANOVA Tipo III	
			χ^2	<i>p</i> -valor	χ^2	<i>p</i> -valor
Intercepto	2.899,60	-	-	-	-	-
Genótipos	2.063,30	40	18,91	0,001	274,08	0,001
Safras	1.975,20	1	312,22	0,001	34,19	0,001
Genótipos*Safras	1.574,50	40	143,56	0,001	143,56	0,001

¹*Degrees of Freedom* (Graus de liberdade).

Como a interação entre os fatores foi significativa, cada um dos fatores foi estratificado dentro de cada nível do outro fator e as taxas médias comparadas por meio de contrastes entre os parâmetros estimados, que foram posteriormente convertidos em probabilidade, pela função inversa da função de ligação, e assim obtidos às taxas corrigidas.

Considerando o desdobramento das safras dentro dos genótipos, as diferenças entre taxas de sementes classificadas como haploides putativos entre as safras foram significativamente diferentes para 10 dos 41 dos genótipos-fonte. Para a maioria dos genótipos-fonte estudados, a taxa de haploides putativos obtidas em cada safra não diferiu significativamente entre si (Tabela 4). No entanto, para 10 dos 41 genótipos estudados, as

taxas obtidas entre as safras não foram estáveis e variaram significativamente entre as safras de verão e safrinha, sendo essa geralmente superior para a safra de verão, exceto para o genótipo DKB330Y. O cruzamento de indução com BRS427 apresentou a maior variação entre as safras, com 14,69% para o verão e 3,80% para a safrinha. A maior taxa média, considerando as duas safras, foi obtida para o genótipo-fonte IAC112. Em ambas as safras, maiores taxas foram obtidas para os cruzamentos de indução com o genótipo IAC112 (18,21% para o verão e 26,67% para a safrinha). Considerando as menores taxas, no verão essa foi observada em cruzamentos de indução com o genótipo AG7088 (0,91%) e na safrinha para o genótipo CD308 (0,86%).

Tabela 4. Desdobramento de safras dentro do fator genótipo-fonte para taxa de haploides putativos.

Genótipos-fonte	Safra 1	Safra 2
	Taxa observada (%)	
30B30	8,25a	2,20b
30B39H	7,18a	7,53a
30F35	5,56a	8,37a
30F53H	5,48a	4,05a
30F80	4,18a	5,21a
30K64Y	14,67a	4,73b
AG1051	13,23a	8,13a
AG7088	0,91a	1,79a
AG8021	5,80a	4,54a
AG8088	3,37a	3,16a
AG9040	6,75a	2,72a
BR427	14,69a	3,80b
BRDOCE	10,31a	9,18a
CARGO	6,52a	9,11a
CD308	3,72a	0,86a
CD321	3,09a	2,50a
CD356	3,63a	4,48a
CD382	4,86a	2,67a
CD387	3,60a	6,58a
CUBANO	3,22a	5,78a
DKB245	7,02a	4,77a
DKB330Y	7,27b	10,95a
DKB370	1,75a	4,06a
DKB390VTPRO	3,32a	3,94a
DOCE2	5,37a	1,54a
FORMULA	10,69a	1,45b
HD332	5,18a	2,65a
HT392	7,72a	5,69a
HT932	11,96a	14,77a
IAC112	18,21a	26,67a
IPR119	9,44a	3,91a
P30F36	5,17a	7,82a
P3431H	8,51a	1,28b
P4285	1,84a	1,88a
S130F53	5,42a	8,61a
S1BR427	10,35a	9,31a
S1CARGO	10,23a	5,40b
S1P2530	13,16a	3,08b
S1P3989	13,17a	3,97b
SPEEDTL	7,99a	2,89a
STATUS	9,61a	1,19b
Média	7,38	5,44

Taxas médias apresentando a mesma letra na mesma linha não diferem entre si pelo teste T (com *p*-valor corrigido por *fdr*) para o contraste entre os parâmetros.

Para o desdobramento de genótipos dentre cada nível de safra (Safra 1 e 2), grupos complexos e pouco conclusivos foram gerados pelos contrastes de Wald (APÊNDICES C1 e C2). Por isso, uma análise de agrupamento foi realizada para as taxas estimadas em cada safra (Figura 1 e 2) e os grupos formados resumidos em uma tabela (Tabela 5).

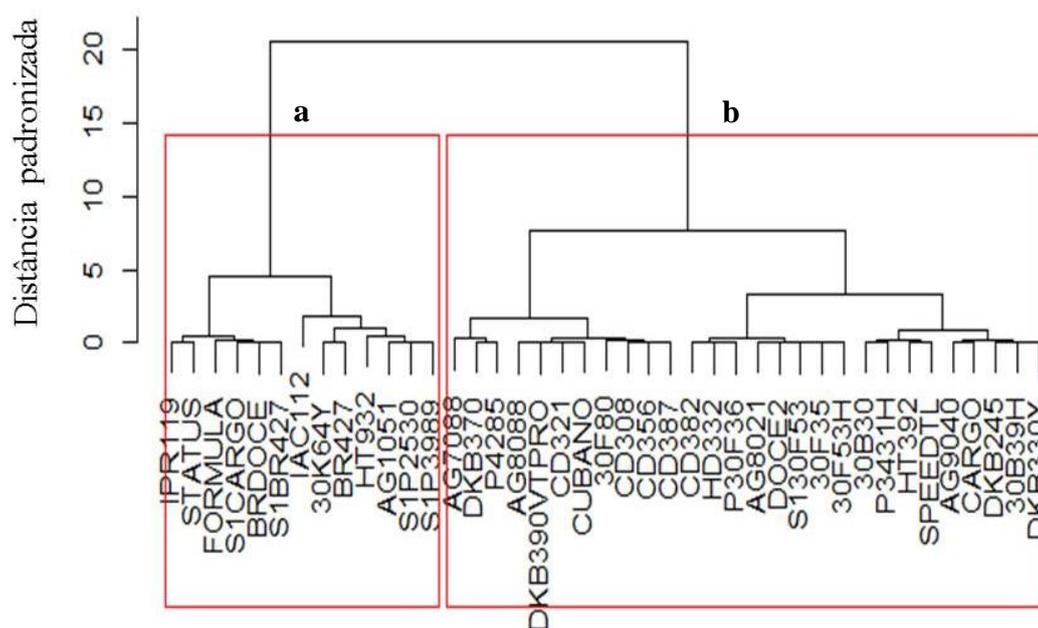


Figura 1. Dendrograma para taxa de haploides putativos obtidos para os genótipos-fonte na Safra 1 (safra de verão 2013-2014).

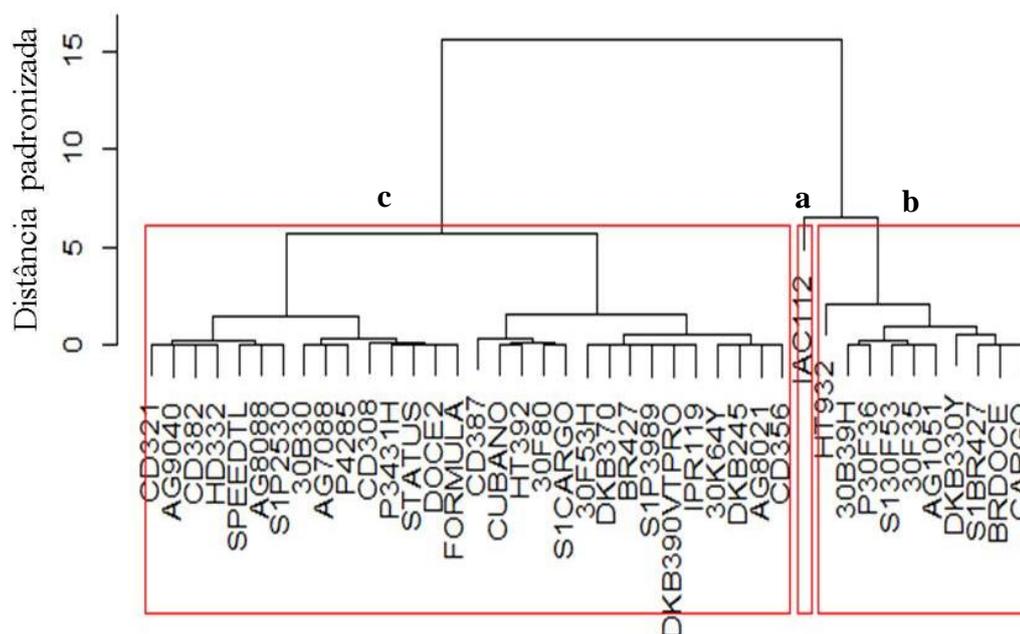


Figura 2. Dendrograma para taxa de haploides putativos obtidos para os genótipos-fonte na Safra 2 (safrinha).

Também foi verificado comportamento diferencial dos genótipos-fonte dentro de cada safra para taxa de haploides putativos. Na safra de verão as taxas foram mais variadas e 2 *clusters* foram formados. O grupo “a” incluiu os genótipos-fonte 30B30, 30B39H, 30F35, 30F53H, 30F80, AG7088, AG8021, AG8088, AG9040, CARGO, CD308, CD321, CD356, CD382, CD387, CUBANO, DKB245, DKB330Y, DKB370, DKB390VTPRO, DOCE2, HD332, HT392, P30F36, P3431H, P4285, S130F53 e SPEEDTL, cuja média de haploides putativos foi de 5,10%. Os demais genótipos compuseram o grupo “b”, com uma taxa de haploides putativos de 12,29% (Figura 1, Tabela 5).

Para safra 2 (Figura 2) foram formados 3 *clusters* com destaque para o cluster “a” com destaque para cruzamento com o genótipo-fonte IAC112 (grupo “a”), onde a taxa média estimada foi de 26,67% de haploides putativos, a maior taxa para o período. O grupo “b” foi formado pelos cruzamentos de indução com os genótipos 30B39H, 30F35, AG1051, BRDOCE, CARGO, DKB330Y, HT932, P30F36, S130F53 e S1BR427, com média de 9,38% de haploides putativos selecionados. Os demais genótipos formaram o grupo “c”, cuja média de haploides putativos foi de 3,42% (Tabela 5).

Tabela 5. *Clusters* formados para taxa de haploides putativos dentro de cada safra.

Genótipo-fonte	Safra 1*		Safra 2	
	Taxa (%)	Grupo	Taxa (%)	Grupo
30B30	8,25	b	2,20	c
30B39H	7,18	b	7,53	b
30F35	5,56	b	8,37	b
30F53H	5,48	b	4,05	c
30F80	4,18	b	5,21	c
AG7088	0,91	b	1,79	c
AG8021	5,8	b	4,54	c
AG8088	3,37	b	3,16	c
AG9040	6,75	b	2,72	c
CARGO	6,52	b	9,11	b
CD308	3,72	b	0,86	c
CD321	3,09	b	2,50	c
CD356	3,63	b	4,48	c
CD382	4,86	b	2,67	c
CD387	3,60	b	6,58	c
CUBANO	3,22	b	5,78	c
DKB245	7,02	b	4,77	c
DKB330Y	7,27	b	10,95	b
DKB370	1,75	b	4,06	c
DKB390VTPRO	3,32	b	3,94	c
DOCE2	5,37	b	1,54	c
HD332	5,18	b	2,65	c
HT392	7,72	b	5,69	c
P30F36	5,17	b	7,82	b
P3431H	8,51	b	1,28	c
P4285	1,84	b	1,88	c
S130F53	5,42	b	8,61	b
SPEEDTL	7,99	b	2,89	c
30K64Y	14,67	a	4,73	c
AG1051	13,23	a	8,13	b
BR427	14,69	a	3,80	c
BRDOCE	10,31	a	9,18	b
FORMULA	10,69	a	1,45	c
HT932	11,96	a	14,77	b
IAC112	18,21	a	26,67	a
IPR119	9,44	a	3,91	c
S1BR427	10,35	a	9,31	b
S1CARGO	10,23	a	5,40	c
S1P2530	13,16	a	3,08	c
S1P3989	13,17	a	3,97	c
STATUS	9,61	a	1,19	c

*Taxas médias seguidas pela mesma letra na coluna pertencem ao mesmo cluster baseados na distância de Euclidiana e agrupamento pelo método Ward.

Prigge et al. (2011) avaliaram as taxas de indução no México por vários anos em diferentes safras e locais, utilizando os indutores RWS, UH400 e RWSxUH400, e encontraram taxas de haploides selecionadas por $RI-nj$ variando de 0 a 11,33%, sendo estas semelhantes em regiões tropicais e temperadas. No trabalho de Batistelli et al. (2013), usando o mesmo marcador morfológico para dois diferentes indutores, foi observada uma taxa média de haploides putativos de 7,1% para o indutor androgenético KEMS, sendo que a taxa para o indutor W23 variou de 0 a 10%. Dessa forma, as taxas de haploides putativos tendem a variar de 0 a 20% na maioria dos cruzamentos de indução.

Embora o foco da análise tenha sido aplicado na interação dos genótipos-fonte com as safras, é importante a informação da melhor época para os cruzamentos de indução, para a maioria dos genótipos. Assim, avaliando o efeito isolado das safras na taxa de indução, a safra de verão (safra 1) apresentou uma taxa média de indução estimada maior que da safrinha (Figura 3).

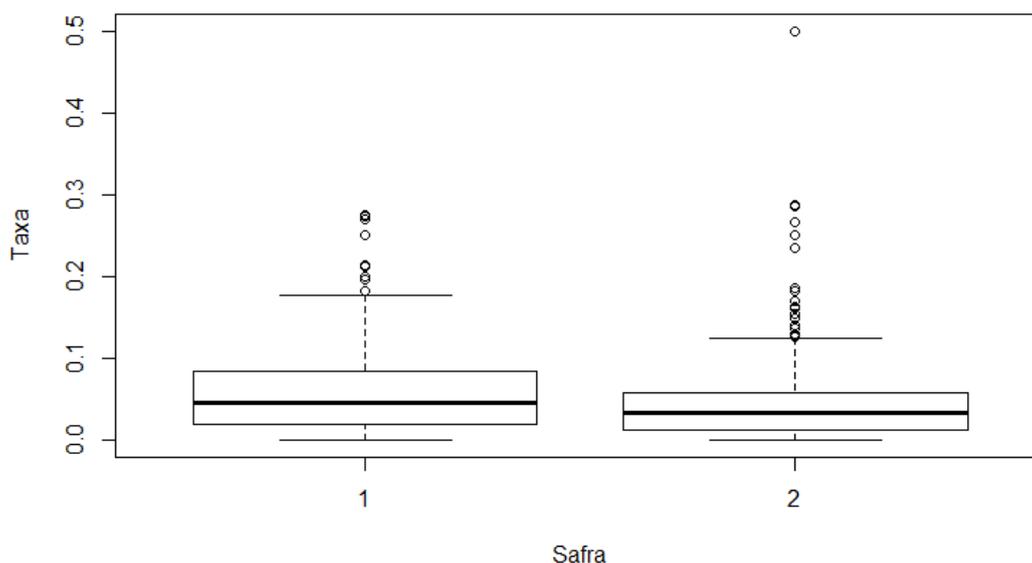


Figura 3. *Boxplot* para taxa de haploides putativos gerados para os 41 genótipos-fonte na safra 1 (verão) e 2 (safrinha).

A taxa média de haploides putativos gerados na primeira safra foi de 6,27%, sendo a taxa média para safrinha (safra 2) de 4,74%, pois $(1/(1+1/(exp(-2,77-0,23))))= 0,0474$, mostrando desempenho inferior da safra 2 (significativo pela análise de *deviance*) mas não muito distante em média. A safra de verão se mostrou mais vantajosa na produção de

haploides putativos. Conforme *odds ratio* estimada para os parâmetros, cruzamentos de indução conduzidos na safrinha são mais desvantajosos pois geram haploides putativos na proporção de 0,79: 1 em relação a safra de verão, ou seja, a cada 100 haploides gerados na safra de verão, 79 são gerados na safrinha (Tabela 6).

Tabela 6. Parâmetros estimados, taxas e *odds ratio* para o efeito isolado de safra na taxa de haploides putativos.

Coeficientes	Estimativas	Erro padrão	<i>t</i> -valor	Taxas (%)	OR ¹	Intervalo de confiança para OR (%)	
						2,50	97,50
Safra1	-2,77	0,05	55,14*	6,27a	0,06	0,06	0,07
Safra 2	-0,23	0,07	-3,12*	4,74b	0,79	0,68	0,92

*Significativos pelo teste t a 5% de probabilidade.

¹OR: *Odds ratio*.

Diferenças no comportamento dos indutores nos diferentes ambientes (locais ou safras), a interação entre os genótipos-fonte e indutor para taxa de indução de haploides, bem como haploides putativos, são citados por diversos autores (RÖBER, GEIGER e GORDILLO. 2005; PRIGGE et al. 2011, BATISTELLI et al. 2013; COUTO et al., 2015). O efeito do ambiente nas taxas de indução bem como de haploides putativos é quase consenso entre os trabalhos conduzidos com duplo-haploides. Entre as variáveis edafoclimáticas, a temperatura parece ser o fator de maior influência, em se tratando do efeito do ambiente. Pickering e Morgan (1985) relatam o efeito de temperaturas na eliminação cromossômica em cevada, e citam esse fenômeno como umas das possíveis contribuições ambientais para a formação de sementes haploides.

O efeito do ambiente, representados por safras, anos ou locais, na produção de haploides putativos, pode estar ligado às diferenças nas condições de temperatura e umidade no momento dos cruzamentos de indução. Maiores taxas de indução foram detectadas por Kebede et al. (2011) no inverno que no verão. No entanto, os maiores erros de classificação também foram encontrados no inverno, indicando que variáveis ambientais como a temperatura podem exercer efeito na pigmentação por antocianina ou ainda na geração de haploides, se essa favorecer a eliminação cromossômica, conforme descrito por (PICKERING e MORGAN, 1985).

Nesse sentido, trabalhos que avaliem a magnitude da inibição da pigmentação e eliminação cromossômica em relação a fatores ambientais como temperatura, umidade, radiação solar, por exemplo, teriam um papel importante no esclarecimento dessa interação. Da mesma forma, estudos buscando as condições ideais de ambiente para os cruzamentos de indução de haploidia parecem ser necessários, pois até mesmo as taxas de indução entre as espigas de um mesmo cruzamento de indução podem variar (GEIGER e GORDILLO, 2009). Uma avaliação de desempenho de indutores em diferentes locais e safras podem indicar quais as regiões ideais para instalação de berçários, o genótipo de indutor mais adaptado e ainda qual a melhor época para os cruzamentos de indução (ROBER, GORDILLO e GEIGER, 2005).

Várias ressalvas vêm sendo observadas sobre as conclusões ligadas aos valores de haploides putativos obtidos, indicando a baixa confiabilidade do *RI-nj* para classificação de haploides. Estudo recente de Melchinger et al. (2016) mostra que o marcador *RI-nj* apresentou diferenças grandes em relação às taxas obtidas pelo *gold standard* (condição real), exibindo grandes taxas de falsos positivos (diploides classificados como haploides), que variaram de 7,8 a 67,6%, bem como de falsos negativos (haploides classificados como diploides) que variaram de 16,3 a 28,6%. Nesse trabalho, a média geral de haploides putativos selecionados pelo marcador fenotípico variou de 7,5 a 22,8% em cruzamentos combinando três diferentes indutores com três genótipos-fonte.

Diante da forte presença de inibidores de genes da via de produção de antocianina em sementes de materiais genéticos tropicais, um número mais importante do que a proporção de haploides putativos entre as safras, seria a quantificação de acertos na classificação pelo marcador (MILANI et al., 2016), pois uma baixa taxa de haploides putativos pode tanto indicar uma menor eficiência na geração de haploides reais, quanto uma inibição da expressão de antocianina de maior magnitude, em decorrência do ambiente.

Alternativamente, o desenvolvimento de indutores com alto teor de óleo, conforme a proposta de Rotarenco et al. (2007) e Melchinger et al. (2013), oferece mais uma ferramenta na seleção de haploides putativos para materiais tropicais. No entanto, além da necessidade de um indutor com altos níveis de óleo, é necessário um grande investimento em equipamento e automação. Dessa forma, o marcador fenotípico é ainda, sem dúvida, a

ferramenta mais adotada e viável como forma não destrutiva de seleção de haploides para duplicação cromossômica.

4. CONCLUSÕES

- Fatores como a textura do endosperma, a base genética do genótipo-fonte, bem como o *background* genético do qual o genótipo-fonte faz parte (aqui representado pelas empresas) não interferem na taxa de sementes classificadas como haploides putativos pela expressão de antocianina em sementes;
- Em nossas condições ambientais, há interação do genótipo-fonte com o ambiente para a proporção de haploides putativos;
- A safra de verão é a mais efetiva em gerar haploides putativos em relação ao total de sementes obtidas, podendo esse efeito estar ligado a maior ocorrência de eliminação cromossômica em temperaturas maiores.

5. REFERÊNCIAS

- AMAN, M. A., SARKAR, K. R. Selection for haploidy inducing potential in maize. *Indian Journal of Genetics*, v. 38 p. 452-457, 1978.
- BATTISTELLI, G. M., VON PINHO, R. G., JUSTUS, A. COUTO, E. G. O. BALESTRE, M. Production and identification of doubled haploids in tropical maize. *Genetics and Molecular Research*, v. 12, n. 4, p. 4230-4242, 2013.
- BELICUAS, P. R., PAIVA, L. V., GUIMARÃES, C. A. T., PAIVA, L. E. Androgenetic haploids and SSR markers as tools for the development of tropical maize hybrids. *Euphytica*, v. 156, n. 1-2, p. 95-102, 2007.
- BRETZ, F., HOTHORN, T., WESTFALL, P. Multiple comparisons using R. Chapman & Hall/CRC Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA. 2011. 182p.
- CHAIKAM, V., NAIR, S. K., BABU, R., MARTINEZ, L., TEJOMURTULA, J., BODDUPALLI, P. M. Analysis of effectiveness of *R1-nj* anthocyanin marker for in vivo haploid identification in maize and molecular markers for predicting the inhibition of *R1-nj* expression. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 128, p. 159-171, 2015.
- CHARRAD, M., GHAZZALI, N., BOITEAU, V., NIKNAFS, A. NbClust: an R package for determining the relevant number of clusters in a data set. *Journal of Statistical Software*, v. 61, n. 6, p. 1-36, 2014.
- COE, E. H. JR. Spontaneous mutation of the aleurone color inhibitor in maize. *Genetics*, v. 47, p.779, 1962.
- COE, E. H., SARKAR, K. R. The detection of haploids in maize. *Journal of Heredity*, v. 55, p. 231- 233, 1964.
- COE, E. H. Anthocyanin genetics. In: FREELING, M., WALBOT, V. (eds) **The maize handbook**. Springer-Verlag, New York, pp. 279-281, 1994.
- COUTO, E. G. O., VON PINHO, E. V. R., VON PINHO, R. G., VEIGA, A. D., BUSTAMANTE, F. O., DIAS, K. O. G. In vivo haploid induction and efficiency of two chromosome duplication protocols in tropical maize. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 39, n. 5, p. 435- 442, 2015.
- DEMÉTRIO, C. G. B. **Modelos lineares generalizados em experimentação agrônômica**. Piracicaba: ESALQ/USP, 2002.
- DOBSON, A. J. **An Introduction to Generalized Linear Models**. London: Chapman and Hall, 1990.

- EDER, J., CHALYK, S. In vivo haploid induction in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, n. 4, p. 703-708, 2002.
- GEIGER, H. H., GORDILLO, G. A. Doubled haploids in hybrid maize breeding. **Maydica**, v. 54, p. 485- 499, 2009.
- HINDE, J., DEMÉTRIO, C. G. B. Overdispersion: model and estimation. **Computational Statistics and Data Analysis**, v. 27, p. 151-170, 1998.
- HSU, D. Comparison of integrated clustering methods for accurate and stable prediction of building energy consumption data. **Applied Energy**, v. 160, n. 15, p. 153-163, 2015.
- KEBEDE, A. Z., DHILLON, B. S., SCHIPPRACK, W., ARAUS, J. L., BÄNZIGER, M., SEMAGNSEMAGN, K., ALVARADO, G., MELCHINGER, A. E. Effect of source germplasm and season on the in vivo haploid induction rate in tropical maize. **Euphytica**, v. 180, n. 2, p. 219-226, 2011.
- MELCHINGER, A. E., LONGIN, C. F., UTZ, H. F., REIF, J. C. Hybrid maize breeding with doubled haploid lines: Quantitative genetic and selection theory for optimum allocation of resources. In: **Hybrid maize breeding with doubled haploid lines: Quantitative genetic and selection theory for optimum allocation of resources**. Proc. 41st annual Illinois corn breeders' school, Urbana-Champaign, Illinois, USA. 2005. p. 8-21, 2005.
- MELCHINGER, A. E., MOLENAAR, W. S., MIRDITA, V., SCHIPPRACK, W. Colchicine alternatives for chromosome doubling in maize haploids for doubled haploid production. **Crop Science**, v. 56, p. 559-569, 2016.
- 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. **Scientific Reports**, v. 3, n. 2129, p.1-5, 2013.
- MILANI, K. F., BALERONI, A. G., DA SILVA, H. A., MENDES-BONATO, A. B., PINTO, R. J. B., SCAPIM, C. A. Effectiveness of the *R1-navajo* embryo marker on sorting haploids. **Maydica**, v. 61, p.1-8, 2016.
- NANDA, D. K., CHASE, S. S. An embryo marker for detecting monoploids of maize (*Zea mays* L.). **Crop Science**, v. 6, p. 213- 215, 1966.
- PAULA, G. A. **Modelos de Regressão com apoio computacional**. Disponível em: https://www.ime.usp.br/~giapaula/texto_2013.pdf. Acesso em agosto de 2016, 2013.
- PICKERING, R. A., MORGAN, P. W. The influence of temperature on chromosome elimination during embryo development in crosses involving *Hordeum* spp., wheat (*Triticum aestivum* L.) and rye (*Secale cereale* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 70, p. 199-206, 1985.

PRASANNA, B. M., CHAIKAM, V., MAHUKU, G. **Doubled Haploid. Technology in Maize Breeding: Theory and Practice**, 50p. CYMMIT, 2012.

PRIGGE, V., MELCHINGER, A. E. **Methods in Molecular Biology**, v. 877, p. 161-172, 2012.

PRIGGE, V., XU, X., LI, L., BABU, R., CHEN, S., ATLIN, G. N., MELCHINGER, E. A. New insights into the genetics of in vivo induction of maternal haploids, the backbone of doubled haploid technology in maize. **Genetics**, v. 190, n. 2, p.781-793, 2011.

PROVETE, D. B., DA SILVA, F. R., SOUZA, T. G. **Estatística aplicada à ecologia usando o R**. São José do Rio Preto, SP, 211p., 2011.

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2015, url = {<https://www.R-project.org/>}.
Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2015, url = {<https://www.R-project.org/>}.

RÖBER, F. K., GORDILLO, G. A., GEIGER, H. H. in Vivo Haploid Induction in Maize - Performance of New Inducers and Significance of Doubled Haploid Lines in Hybrid Breeding. **Maydica**, v. 50, p. 275-283, 2005.

ROTARENCO, V. A., KIRTOCA, I. H., JACOTA, A. G. The possibility of identifying kernels with haploid embryos using oil content. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v. 8, p. 1-11, 2007.

SARKAR, K. R., PANDEY, A., GAYEN, P., MANDAN, J. K., KUMAR, R., SACHAN, J. K. S. Stabilisation of high haploid inducer lines. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v. 68, p. 64-65, 1994.

SEIDEL, E. J., MOREIRA JÚNIOR, F. J., ANSUI, A. P., NOAL, M. R. C. Comparação entre o método Ward e o método K-médias no agrupamento de produtores de leite. **Ciência e Natura**, v. 30, n. 1, p. 7-15, 2008.

SNIPES, M., TAYLOR, D. C. Model selection and Akaike Information Criteria: An example from wine ratings and prices. **Wine Economics and Policy**, v. 3, n. 1, p. 3-9, 2014.

TURKMAN AMARAL, M. A., SILVA, G. L. **Modelos Lineares Generalizados - da teoria à prática**. Sociedade Portuguesa de Estatística, Peniche, Portugal, 2000. 151p.

CAPÍTULO 2

Efeito do nível de ploidia no comprimento de células-guarda e uso de estômatos
no descarte de diploides em meio a haploides putativos

Efeito do nível de ploidia no comprimento de células-guarda e uso de estômatos no descarte de diploides em meio a haploides putativos

RESUMO

A obtenção de duplo-haploides em milho envolve as etapas de indução de haploidia, seguido da identificação e duplicação cromossômica de sementes ou indivíduos haploides. A separação de sementes haploides para duplicação tem sido realizada com base na expressão do gene *R1-nj* que apresenta uma baixa eficiência na seleção. Considerando a diferença descrita para o comprimento de células-guarda (CG) entre indivíduos haploides e diploides, o comportamento para essa variável em descendentes de três diferentes cruzamentos de indução com o indutor KHI, foi avaliado. Para tanto, impressões epidérmicas da face abaxial das folhas provenientes do segundo, terceiro e quarto nós, contados a partir da base, foram coletadas e mensuradas em microscópio ótico bem como o fenótipo individual de cada planta durante o florescimento. O comprimento de CG foi variável em relação ao genótipo-fonte, estágio da folha coletada e nível de ploidia. A média de comprimento de CG variou de 23,67 a 33,82 μm para haploides e de 36,01 a 41,25 μm para diploides. O comprimento de CG mensurado em qualquer um dos estádios avaliados (segunda, terceira e quarta folha) pode ser utilizado como ferramenta para classificar plantas de milho em diploide e haploide, sendo a eficiência da classificação mais ligada ao genótipo-fonte que ao estágio de crescimento. Comparando o comprimento de CG em relação ao fenótipo (haploide ou diploide), os limites de CG para classificação de plantas como diploides (pontes de corte), foram estimados e variaram de 29,74 a 34,49 μm , de acordo com o genótipo-fonte ou estágio, com taxas máximas de FDR (*False Discovery Rate*) de 2,93% e de FDN (*False Negative Rate*) de 15,06%, indicando que a classificação por meio de CG é confiável.

Palavras-chave: Curva ROC. Duplo-haploides. Impressão epidérmica.

Ploidy level effect on the guard cell length and use of the stomata on diploid discards in the putative haploids fraction

ABSTRACT

The doubled haploid development steps include the haploid induction, the haploids selection and the chromosome doubling of kernels or haploid individuals. Haploid kernels selection has been made based on *RI-nj* marker expression, which displays low reliability. Considering the described difference in the cell guard (CG) length between haploid e diploids plants, differences for this variable in the progeny from three different induction crosses with the KHI inducer were evaluated. For this purpose, the epidermal impression of the abaxial surface of a leaf taken from the second, third e fourth node, counting from the base to the apex, were collected and measured in an optical microscope as well their phenotyping during the flowering stage. CG length was variable in relation to germplasm source, leaf stage and ploidy level. Average of the CG ranged from 23,67 to 33,82 μm on the haploids and from 36,01 to 41,25 μm on the diploids. The length of CG, measured on any leave stage (second, third or fourth) was able to sort diploid and haploids maize plants. The efficiency of sorting was more linked to the germplasm-source than the leave stage. Comparing the length of CG in relation to the phenotype (haploid or diploid), the CG limits for classification as diploid plant (cutoff point), were estimated and ranged from 29.74 to 34.49 μm , according to the germplasm source or leaf stage, wherein the highest FDR (*False Discovery Rate*) were 2,93% and the FDN (*False Negative Rate*) were 15,06%, displaying that the classification based on CG is reliable.

Keywords: ROC curve. Doubled haploids. Epidermal impression.

1. INTRODUÇÃO

Para a obtenção de duplo-haploides em milho, após a indução de haploidia, feita comumente *in vivo*, é gerada uma fração de sementes haploides. As análises têm mostrado que a proporção de haploides obtidos varia de 8 a 10% para indutores modernos (PRASANA, CHAIKAM e MAHUKU, 2012), mas pode ser bem inferior (1 a 4%) em casos de indutores menos melhorados (CHASE, 1949; COE, 1959; SARKAR e COE, 1966).

Um dos passos importantes é a separação de sementes haploides de diploides F₁. Para essa separação, tem sido amplamente adotado um importante marcador observado em sementes, sendo esse resultado da expressão do gene *RI-nj*, presente no genoma dos indutores (CHASE, 1952). Esse gene é dominante e promove pigmentação de endosperma e embrião em sementes diploides. No caso de haploides gimnogenéticos, o DNA do indutor não é herdado pelo embrião. Dessa forma, as sementes haploides, resultantes do cruzamento de indução, apresentam endosperma roxo, mas sem pigmentação por antocianina no embrião, que permanece branco (NANDA e CHASE, 1966; PRIGGE et al., 2011).

Apesar da praticidade, o marcador *RI-Navajo* apresenta baixa confiabilidade, sobretudo em genótipos tropicais, onde é marcante a frequência de genes que causam inibição da via de produção de antocianina como o fator *CI-I*, *RI-nj* (CHASE, 1952a; RÖBER et al., 2005; KEBEDE et al., 2011; PRIGGE et al., 2011; CHAIKAM et al., 2015). Milani et al. (2016), mostram que a inibição da expressão de marcador em sementes pode chegar a 60%, gerando um grande número de sementes diploides em meio aos haploides putativos separados pelo marcador fenotípico. Dessa forma, muitas sementes diploides seguem para a etapa de duplicação, onerando e reduzindo o rendimento de obtenção de linhagens DHs (duplo-haploides). Nesse contexto, métodos não destrutivos que possibilitem a eliminação de diploides F₁, em meio haploides putativos, podem contribuir para maior eficiência na obtenção de DHs, bem como aperfeiçoam a alocação e logística dos recursos empregados na etapa de duplicação (CHOE et al., 2012).

Inúmeras técnicas podem ser adotadas para selecionar haploides de diploides como a contagem de cloroplastos por célula-guarda, razão comprimento por largura do estômato, densidade de estômatos e largura da folha (SARI et al., 1999; YUDANOVA et al., 2002; BECK et al., 2003; HO et al., 2006). Choe et al., (2012) estudaram a aplicação da análise de

células-guardas na separação de DHs. Inspirados pelo trabalho de Borrino e Powell (1988), bem como Limin e Fowler (1989) e Singh e Sethi (1995), os quais demonstraram que o comprimento de células-guardas em folhas é correlacionado com o conteúdo de DNA em aveia, trigo e centeio, os autores sugeriram que essa medida poderia ser adotada para separar plantas haploides, diploides e duplo-haploides.

O par de células-guarda de um estômato é resultado da divisão simétrica de uma célula-guarda mãe, que mais tarde formará o estômato maduro. A célula-guarda mãe é proveniente da protoderme, camada de célula mais superficial, presente no meristema apical, podendo esta se diferenciar em: epiderme, tricomas e células-guarda (BERGMANN et al., 2007; MAUSETH, 2008). Estômatos encontrados em gramíneas apresentam formato de halteres. As células guardas do milho são acompanhadas de células acessórias denominadas de células-subsidiárias. Para isso, uma segunda divisão assimétrica ocorre então nas células adjacentes às células-guarda mãe denominadas células-mãe subsidiárias (SACK, 1994; VATÉN e BERGMANN, 2012).

Considerando a relação do comprimento de células-guarda com o nível de ploidia em plantas, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o uso do comprimento de células-guardas de estômatos em milho como ferramenta para eliminar diploides em meio a haploides putativos previamente selecionados por *R1-nj*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e coleta de amostras

Para a avaliação do comprimento das células-guarda dos estômatos, foram utilizadas sementes classificadas como haploides putativos, conforme a expressão de *RI-nj*. Essas foram resultado do cruzamento de indução entre o indutor KHI e três híbridos simples como genótipos-fonte (IAC-125, P2530 e P3989). O IAC-125 é um genótipo de pipoca lançado pelo Instituto Agronômico de Campinas e os demais híbridos pertencem à companhia Dupont Pioneer® e possuem um endosperma semi-*flint*.

As sementes foram semeadas e conduzidas durante a safra de verão em vasos de 14L contendo solo, areia e substrato orgânico, na proporção 1:1:1, e adubados conforme a necessidade das plantas. Estas foram conduzidas até a maturidade. No florescimento, o fenótipo ou nível de haploidia foi analisado de acordo com o vigor e a presença dos órgãos reprodutivos das plantas. Do cruzamento de indução com IAC-125, 98 plantas viáveis foram conduzidas, bem como 88 plantas do cruzamento de indução com P2530 e 90 com P3989.

A impressão epidérmica para a realização das medidas das células-guardas (presentes em estômatos) foi obtida conforme metodologia descrita por Kim et al. (2010) e replicada por Choe et al. (2012). Lâminas contendo a impressão da face abaxial foram coletadas em duplicata na região mediana da folha, uma de cada lado da nervura, e foram obtidas e analisadas medidas de 4 estômatos em cada uma dessas duplicatas.

As amostras foram tomadas em folhas completamente expandidas do 2º, 3º e 4º nós, contados a partir da base, os quais foram denominados estádios 1, 2 e 3, respectivamente. As imagens foram capturadas em microscópio ótico modelo Leica DM500®, com câmera digital acoplada, usando a lente objetiva de 40x, e o comprimento das células-guarda foi mensurado com o auxílio do software ImagePro® plus.

2.2 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk, que confirmou a distribuição normal dos erros, em nível de 5% de significância. Inicialmente, foi realizada uma análise de variância para um modelo hierárquico incluindo os fatores: A: genótipos-fonte, B: folhas dentro de genótipos-fonte e C: haploidia dentro de folhas dentro de genótipo, conforme esquematizado no diagrama apresentado na Figura 4.

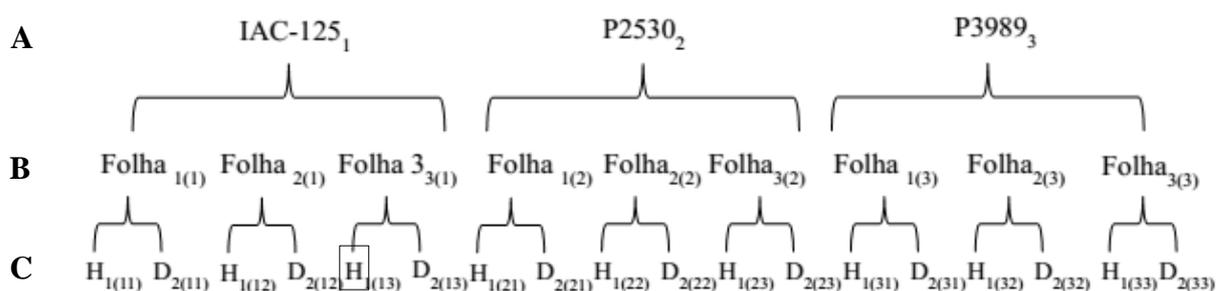


Figura 4. Diagrama para o modelo adotado para comparação de médias de comprimentos de células-guardas, coletados em plantas haploides e diploides, provenientes de 3 diferentes cruzamentos de indução, em 3 diferentes estádios de crescimento. O retângulo em preto identifica que nenhuma folha das plantas haploides, provenientes do cruzamento com IAC-125, foi coletada no estádio de folha 4.

Os níveis para o fator A foram os genótipos-fonte ou híbridos (IAC-125, P2530 e P3989). Os níveis para o fator B foram os estádios (folha 2, folha 3 e folha 4) e os níveis para o fator C foram: haploides e diploides. Como não foi detectada diferença significativa ($p > 0,05$) entre os estômatos provenientes dos diferentes lados da nervura das folhas, cada planta foi representada por uma amostra de 8 estômatos por estádio (2, 3 ou 4 folhas). Desta forma, o modelo pode ser descrito conforme apresentado a seguir:

$$Y_{ijkl} = \mu + a_i + \beta_{j(i)} + \lambda_{k(ij)} + \varepsilon_{ijkl} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

Y_{ijkl} : A l -ésima observação dentro do k -ésima nível do fator C, dentro do j -ésimo nível do fator B, dentro do i -ésimo nível do fator A;

μ : Média geral;

α_i : Efeito do i -ésimo nível do fator A;

$\beta_{j(i)}$: Efeito do j -ésimo nível do fator B dentro do i -ésimo nível do fator A;

$\lambda_{k(ij)}$: Efeito do k -ésimo nível do fator C dentro do j -ésimo nível do fator B dentro do i -ésimo nível do fator A;

ε_{ijkl} : Erro residual da observação Y_{ijkl} .

Todos os fatores do modelo (Equação 3) foram considerados de efeito fixo. Assim, conforme a proposta de Sanni e Ukaegbu (2012) para modelos com 3 fatores hierarquizados, os fatores foram testados por meio do teste F, sendo que a análise de variância foi realizada utilizando a *procedure* PROC GLM do programa SAS versão 9.3 (SAS INSTITUTE, 2012) e as comparações entre médias por meio do teste de Tukey em nível de 5% de significância.

Para averiguar o uso do comprimento de células-guarda como ferramenta na identificação de diploides em meio a plantas haploides putativos, o programa R foi utilizado (R CORE TEAM, 2015). O fenótipo da planta foi adotado como *gold standard* para o nível de ploidia. Assim, as plantas vigorosas e férteis no período de florescimento foram classificadas como diploides. No entanto, plantas inférteis, de porte baixo, aparentando baixo vigor e folhas finas, foram classificadas estão como haploides.

Considerando o modelo hierárquico, onde o fator folha está aninhado dentro do fator genótipo, cada desdobramento foi individualmente estudado utilizando o pacote “ROCR” e “Epi” do R. Para isso, cortes individuais (*threshold*) para cada desdobramento de folha dentro de genótipos-fonte foram obtidos a partir do qual, seja ele igual ou superior, o estômato foi classificado como pertencente a uma planta diploide. A partir daí, as taxas de falsas descobertas (*FDR*) e falsos negativos (*FNR*) foram calculadas.

A qualidade da classificação, segundo o *threshold* estabelecido, foi então avaliada por meio de medidas como a acurácia, a área abaixo da cuepirva (AUC) para a ROC obtida, bem como pela correlação de Matthew e pelo teste de McNemar. Adicionalmente, os dados de taxa de haploides classificados por *R1-nj* e o *gold standard* foram sumarizados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito do nível de ploidia, genótipo e estágio no comprimento de células-guarda

As impressões epidérmicas obtidas na face abaxial da região mediana das folhas, em três estádios de crescimento, para os três cruzamentos de indução, estão representadas nas Figuras 5, 6 e 7.

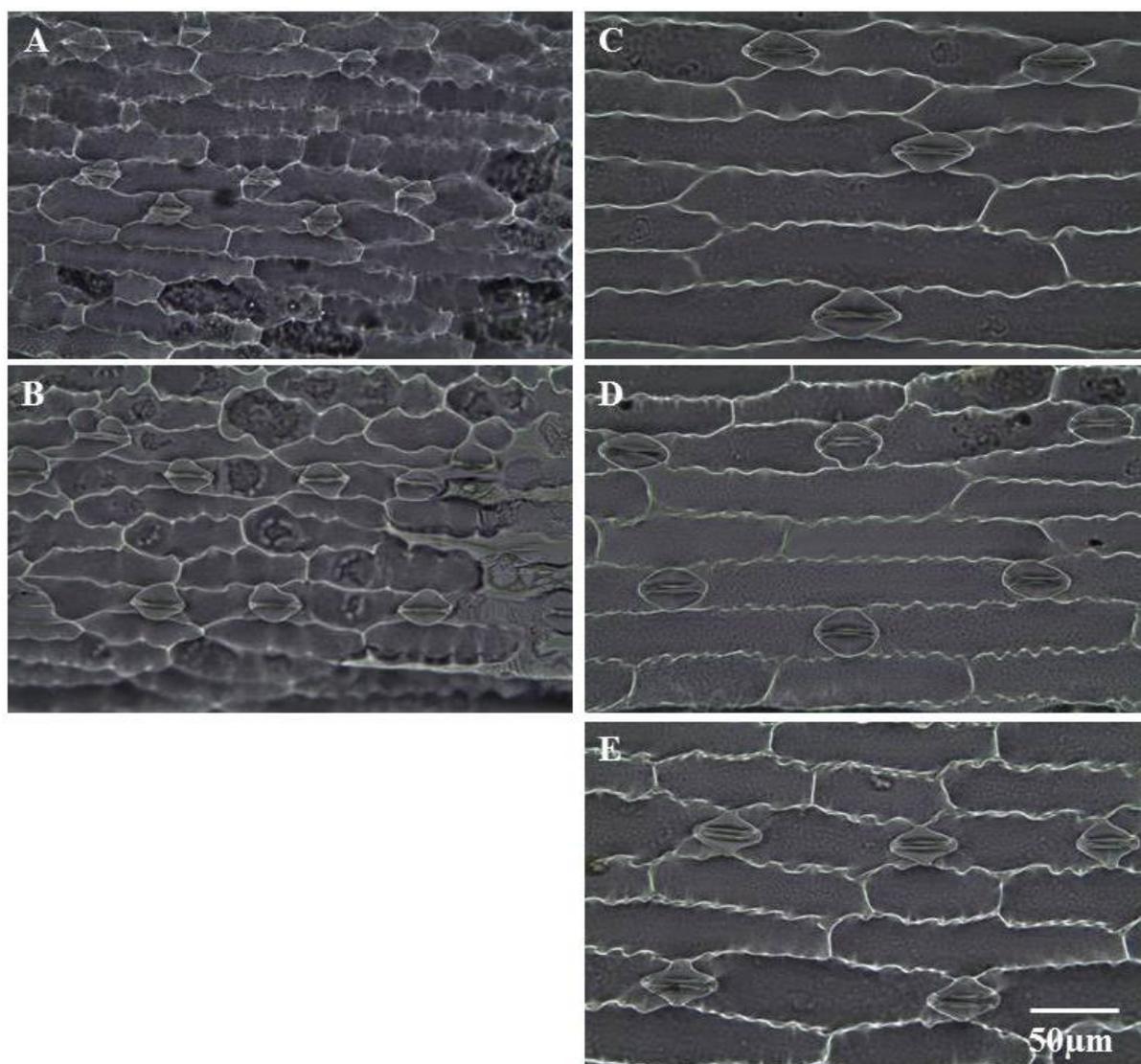


Figura 5. Impressões epidérmicas da face abaxial de folhas de estômatos coletadas em haploides (a esquerda) e diploides (a direita), classificadas pelo fenótipo, capturadas em objetiva de 40x, nos diferentes estádios, em plantas provenientes do cruzamento de indução entre IAC-125 e o indutor KHI. A e B: folha 2; C e D: folha 3; E: folha 4.

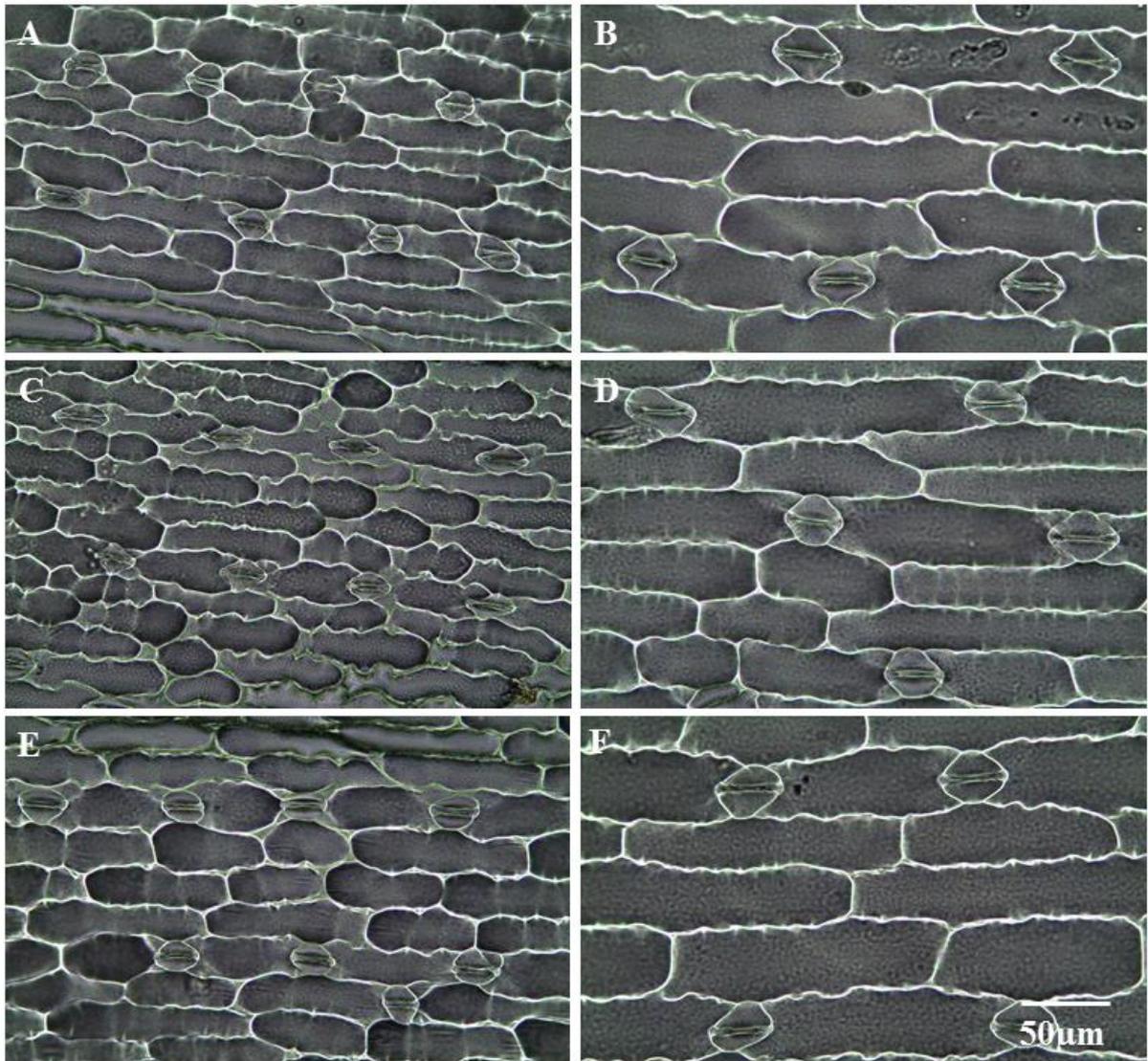


Figura 6. Impressões epidérmicas da face abaxial de folhas de estômatos coletadas em haploides (a esquerda) e diploides (a direita), classificados pelo fenótipo, capturados em objetiva de 40x, nos diferentes estádios, em plantas provenientes do cruzamento de indução entre P3989 e o indutor KHI. A e B: folha 2; C e D: folha 3; E e F: folha 4.

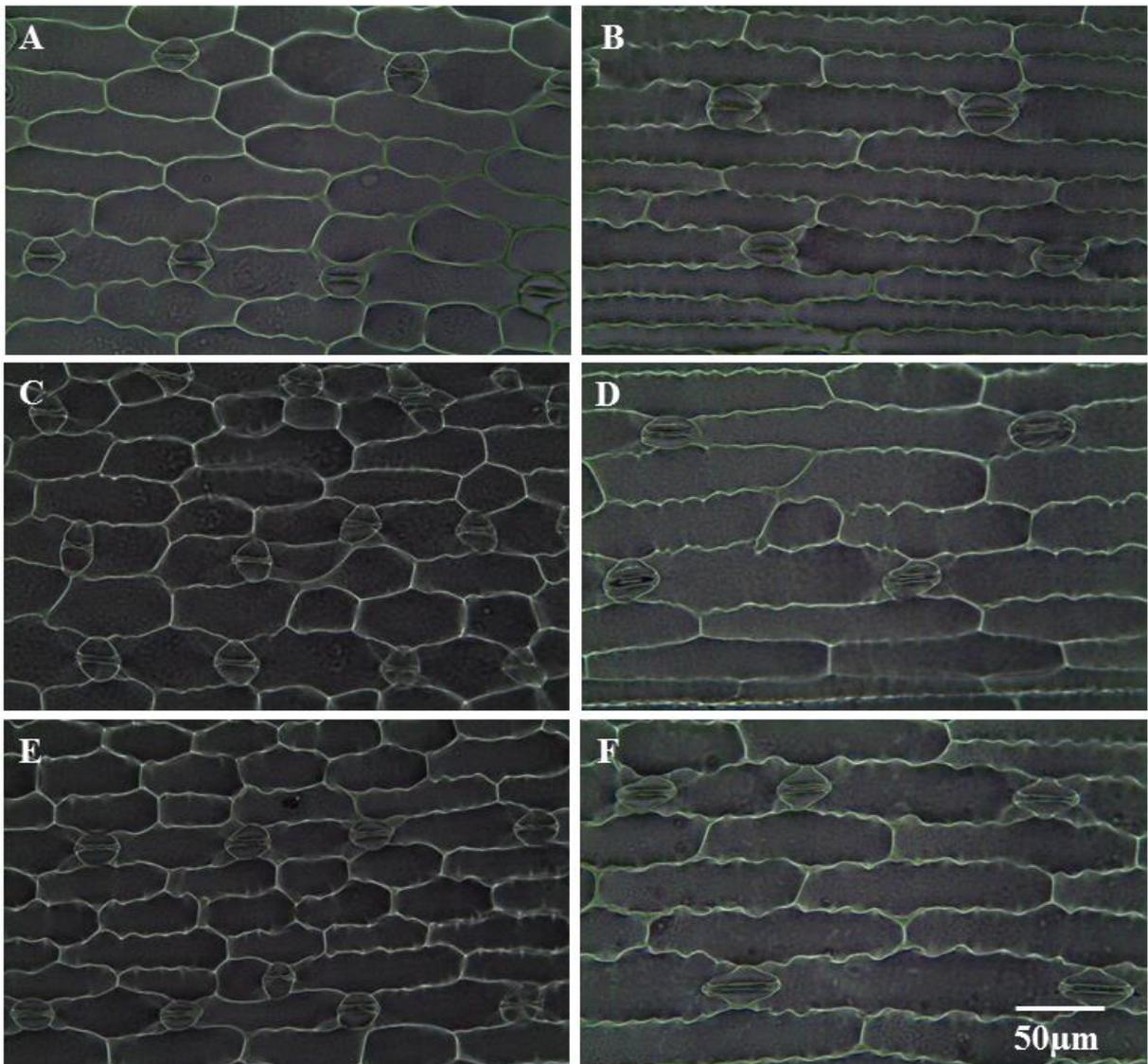


Figura 7. Impressões epidérmicas da face abaxial de folhas de estômatos coletadas em haploides (a esquerda) e diploides (a direita), classificadas pelo fenótipo, capturadas em objetiva de 40x, nos diferentes estádios, em plantas provenientes do cruzamento de indução entre P2530 e o indutor KHI. A e B: folha 2; C e D: folha 3; E e F: folha 4.

Após a medição do comprimento das células-guarda dos estômatos, a análise de variância para dados desbalanceados aponta significância para efeitos dos fatores híbridos, folhas/híbridos, bem como fenótipos/folhas/híbridos (Tabela 7 e 8).

Tabela 7. ANOVA tipo I para o fatorial de três fatores hierarquizados e dados balanceados.

Fonte	DF	SQ	QM	F
Tratamentos	(16*)	73.553,63	4.597,10	172,49**
Híbridos	2	9.890,85	4.945,43	185,55**
Folhas(Híbridos)	6	7.506,74	1.251,12	46,94**
Fenótipos(Folhas(Híbridos))	8	56.156,05	7.019,51	263,38**
Erro	5.249	139.896,81	26,65	
Total	5.265	213.450,45		

**Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

Tabela 8. ANOVA tipo III para o fatorial de três fatores hierarquizados e dados desbalanceados.

Fonte	DF	SQ	QM	F
Tratamentos	(16*)	64487,59	10.609,40	398,07**
Híbridos	2*	6603,90	3.301,95	123,89**
Folhas(Híbridos)	6*	1727,64	287,94	10,80**
Folhas/IAC125	2	915,67	457,84	17,18**
Folhas/P2530	2	801,35	400,68	15,03**
Folhas/P3989	2	10,61	5,30	0,20^{ns}
Fenótipos(Folhas (Híbridos))	8*	56156,05	7.019,51	263,38**
Fenótipos/Folha 2 /IAC125	1	277,14	277,14	10,40**
Fenótipos/Folha 3/IAC125	1	1.214,15	1.214,15	45,56**
Fenótipos/Folha 2 /P2530	1	9.469,95	9.469,95	355,32**
Fenótipos/Folha 3 /P2530	1	14.048,00	14.048,00	527,10**
Fenótipos/Folha 4 /P2530	1	13.846,00	13.846,00	519,50**
Fenótipos/Folha 2 /P3989	1	9.632,32	9.632,32	361,41**
Fenótipos/Folha 3 /P3989	1	3.554,02	3.554,02	133,35**
Fenótipos/Folha 4 /P3989	1	4.114,56	4.114,56	154,38**
Erro	5.249	139.896,81	26,65	
Total	5.265	204.384,40		

**Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

Foram encontradas diferenças significativas para o efeito isolado do genótipo-fonte sobre a média do comprimento de células-guarda, sendo os descendentes do cruzamento com o híbrido P3989 os que apresentaram maior média para o comprimento, independentemente do estágio e nível de haploidia, seguidos por IAC125 e P2530 (Tabela 9).

Tabela 9. Comparação entre genótipos-fonte para o comprimento de células-guarda.

Híbridos	Média Observada*
IAC125	36,96b
P2530	35,63c
P3989	38,73a

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey-HSD a 5% de significância.

Independentemente do nível de ploidia (haploide ou diploide), para os descendentes do híbrido IAC125, células-guardas medidas na segunda folha foram em médias maiores do que na terceira e na quarta. Os descendentes de cruzamentos de indução com P2530, também mostraram que a folha 2 apresenta estômatos maiores que os demais estádios, seguida da quarta folha e da terceira, respectivamente, para média de comprimento de células-guarda (CG). Para os descendentes de P3989, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os estádios, sendo eles, em média, iguais para os estádios de 2, 3 e 4 folhas, indicando um único valor de *threshold* poderia ser adotado para os descendentes desse cruzamento de indução (Tabela 10).

Tabela 10. Comparação entre folhas dentro de cada genótipo-fonte para o comprimento de células-guarda.

Híbridos	Folha 2	Folha 3	Folha 4
IAC125	38,99a*	37,39b	36,01b
P2530	37,18a	35,81c	36,59b
P3989	38,74a	39,08a	39,35a

*Médias seguidas pela mesma letra na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey-Kramer a 5% de significância.

Nenhum indício de incremento da média de comprimento de CG dos estômatos em relação ao estádio da folha foi encontrado. Avaliando estômatos de batata, Frandsen (1968) constatou que, da base para o ápice, no sentido de inserção de folhas, há um gradiente decrescente para número de plastídios e crescente para número de estômatos, mas sem nenhuma relação linear para comprimento de células-guarda em relação ao estádio vegetativo da planta.

Foi observado que, considerando a média das plantas haploides e diploides dentro de cada folha (estádio) e de cada híbrido, as plantas haploides apresentaram comprimento de

células-guarda sempre menor que as diploides, independente do genótipo-fonte ou estágio (Tabela 11). No entanto, avaliando a magnitude destas diferenças (Delta) entre os genótipos-fonte, o híbrido P2530 apresentou as maiores diferenças entre plantas haploides e diploides, independente do estágio. Dados publicados por Khokhlov (1976) demonstram que o tamanho das CGs haploides é em média 40% menor que as diploides em milho, uma vez que a quantidade de DNA influencia tanto o tamanho quanto o número de CGs (BUTTERFASS, 1973; LOMAX et al., 2009).

Tabela 11. Comparação entre fenótipos dentro dos fatores folhas e genótipo-fonte para o comprimento de células-guarda.

Híbrido	Estádio	Fenótipo		Delta ²
		Haploide	Diploide	
IAC125	Folha 2	33,82b	39,78a	5,96
IAC125	Folha 3	27,55b	36,39a	8,84
IAC125	Folha 4	-	36,01 ¹	-
P2530	Folha 2	26,02b	38,63a	12,61
P2530	Folha 3	24,63b	37,17a	12,54
P2530	Folha 4	23,67b	36,27a	12,60
P3989	Folha 2	28,90b	41,25a	12,35
P3989	Folha 3	30,83b	38,74a	7,91
P3989	Folha 4	30,86b	38,90a	8,04

*Médias seguidas pela mesma letra na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey-Kramer a 5% de significância.

¹Impressões epidermais de plantas haploides não foram amostradas neste estágio.

²Delta: Diferença entre médias.

Assim como o demonstrado por Choe et al. (2012), diferenças entre haploides e diploides foram encontradas mesmo em estádios mais precoces como o de duas folhas, o que permitiria então o uso da técnica para descartar diploides logo após a germinação, em pré-tratamento para duplicação realizado na raiz, por exemplo. A média de comprimento de células-guarda variou de 23,67 a 33,82 µm para haploides e de 36,01 a 41,25 µm para diploides, independente de estágio ou genótipo-fonte, com uma média geral de 28,29 µm para os haploides e 38,13 µm para diploides, ou seja, em média, o comprimento das células-guarda de diploides é 26% maior do que as presentes nas folhas de haploides.

Em importante trabalho, onde o teor de óleo, que também é uma variável quantitativa de distribuição contínua, foi adotado como ferramenta para classificação de haploides e diploides, Melchinger et al. (2013) defendem que esta discriminação tende a ser mais confiável se as diferenças entre as médias de haploides e diploides forem grandes e o desvio-padrão, dentro de cada grupo, pequeno. Nesse sentido, as diferenças encontradas aqui entre os grupos haploides e diploides parecem ser suficientes para uma classificação segura, para todos os genótipos e estádios coletados.

A variabilidade no comprimento e frequência de células-guarda, bem como do número de cloroplastos presente nas células-guarda estomáticas, coincide com a variabilidade presente nas células protodérmicas meristemáticas do ápice foliar (YUDANOVA et al., 2002). Portanto, as células epidérmicas herdam as propriedades das células maternas protodérmicas, como o tamanho e nível de ploidia. Assim, como os tecidos meristemáticos de um embrião haploide mantêm o nível de ploidia em seus meristemas, as células epidérmicas provenientes mantêm a condição haploide, caso não haja duplicação espontânea, refletindo assim em menor comprimento das células-guarda.

Avaliando o controle hereditário para comprimento de células-guarda, Lamari e Fayt (2015) citam que o controle genético para a característica seria baseado na dominância completa em *Triticum aestivum* L. Dois genes estariam envolvidos no controle genético dessa característica, onde a presença de alelos dominantes determinam comprimentos maiores e recessivos menores. Trabalhos anteriores citam dois genes de efeitos aditivos controlando a característica, sendo o F₁, de comprimento de células-guarda intermediário ao dos pais, em caso de parentais homozigotos (RUSSO et al., 2010). Em milho, no entanto, a informação sobre o controle genético é inexistente.

Na proposta de Melchinger et al. (2013) estabelecida para a seleção de haploides por meio do teor de óleo em sementes, sendo estes provenientes do cruzamento de indução com um indutor de alto teor de óleo, na ausência de efeitos não-aditivos (dominância e epistasia) bem como de efeito materno, a média esperada para o teor de óleo dos diploides seria a média dos pais, sendo em caso de haploides gimnogenéticos, igual média da mãe, caso o número de cópias por alelo envolvido não apresente influência. Consequentemente, a diferença (Delta) entre diploides e haploides seria igual à média do pai (indutor) menos a média da mãe, dividida por dois, conforme os autores. Segundo os mesmos autores, para teor

de óleo em sementes, o controle genético é do tipo aditivo. No entanto, os valores reais encontrados para os cruzamentos de indução apontam para média de haploides um pouco superior ao do germoplasma fonte (mãe), e de diploides, um pouco inferior ao do indutor. Melchinger et al. (2013) ainda detectaram que o desvio-padrão foi maior em haploides que diploides, sendo essa amplitude o efeito da expressão completa da variância genética aditiva, desprendida do genótipo-fonte.

Ignorar o efeito do nível de ploidia para o teor de óleo não parece uma pressuposição correta diante da possibilidade do efeito de dose de cada alelo envolvido na síntese de lipídeos e uma vez que o embrião concentra algo em torno de 80% do teor de lipídeos das sementes. Assim, para sementes haploides e sobre controle aditivo da característica, um valor de teor de óleo inferior ao da mãe seria o esperado. No entanto, os dados encontrados pelos autores não confirmam nenhuma dessas hipóteses. Dessa forma, outras interações alélicas (dominância e epistasia), bem como o efeito materno parecem influenciar a característica. O mesmo se aplicaria para o comprimento de células-guarda no caso de controle aditivo. Caso ocorra controle por dominância para o comprimento da célula-guarda, a média teórica para o diploide seria igual à média do maior pai, para parentais homocigotos, sendo a média do haploide um valor também relacionado à média da mãe, uma vez que os alelos dos pais não são herdados.

Neste sentido, são necessários estudos ligados ao controle genético para o comprimento de células-guarda em milho, envolvendo tanto os parentais dos cruzamentos de indução como seus descendentes. Caso a média das mães (genótipo-fonte) se assemelhe a dos haploides, a teoria da dominância para o controle genético em estômatos, poderia ser então confirmada.

3.2 Uso do comprimento de células-guarda para separação de diploides em meio a haploides putativos

Muitos falsos positivos (diploides selecionados como haploides) não são revelados com a seleção de haploides putativos por meio da expressão de *R1-nj*. Dessa forma, a avaliação dos estômatos em plântulas anteriormente ao tratamento por duplicação pode ajudar a eliminar plantas diploides em meio a plântulas haploides putativos, uma vez que o

comprimento de estômatos difere em relação do nível de ploidia para varias espécies (FRANSEN, 1968; KHOKHLOV, 1976; CHOE et al., 2012; LAMARI e FAYT, 2015).

Avaliando a relação entre comprimento de CGs de estômatos e o nível de haploidia, independentemente de estágio e híbrido, por meio da uma regressão logística, é possível observar que a probabilidade de encontrar um diploide real aumenta à medida que o comprimento de células-guarda cresce (Tabela 12 e Figura 8).

Tabela 12. Frequências e probabilidades de se encontrar um diploide, baseado na faixa de comprimento da célula-guarda, englobando as plantas semeadas de todos os cruzamentos de indução em estudo.

Comprimento (µm)	Haploide	Diploide	Totais	Probabilidade p(diploide)
10-19	44	2	46	0,04
20-29	392	110	502	0,22
30-39	148	2.528	2.676	0,94
40-49	21	1.918	1.939	0,99
50-59	0	139	139	1,00
60-69	0	2	2	1,00

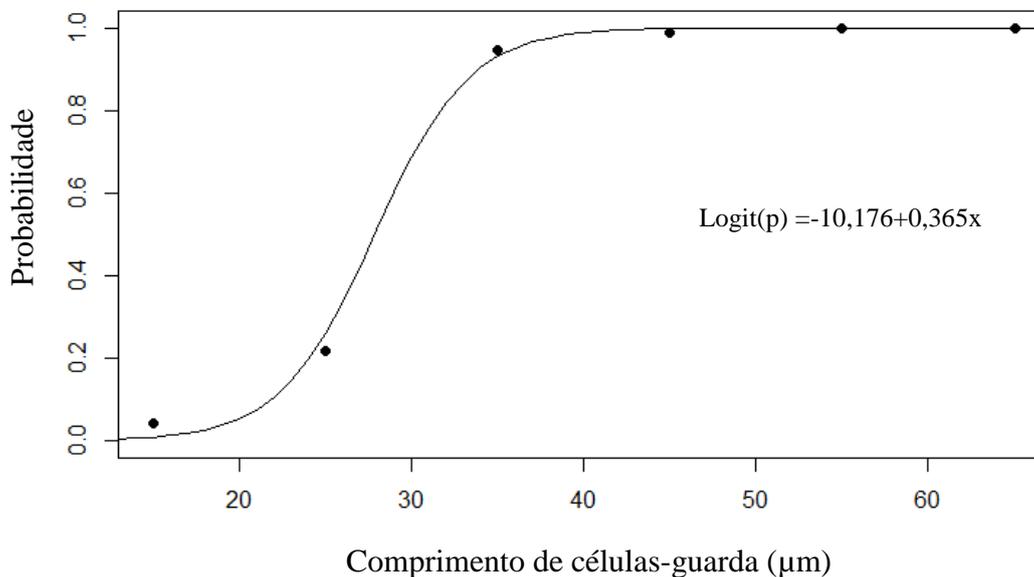


Figura 8. Regressão logística ajustada mostrando a relação dos dados coletados para o comprimento de células-guarda (µm) em função da proporção de plantas diploides de descendentes de três diferentes cruzamentos de indução, em três diferentes estágios de crescimento.

Para o uso do comprimento das CGs como ferramenta para classificação de haploides e diploides, é necessário definir um ponto de corte para o qual acima ou igual valor o estômato seja classificado como pertencente a uma planta diploide. Quando se tem uma variável contínua como o comprimento de CGs, e se pretende transformá-la numa variável dicotômica, com respostas do tipo diploide ou haploide, é necessário estabelecer um determinado valor na escala contínua que discrimine essas duas classes. A esse valor dá-se o nome de *cutoff point*, *threshold* ou simplesmente ponto de corte. Nesse sentido, o ponto de corte adequado pode ser averiguado através da Curva ROC (*Receiver Operating Characteristic Curve*).

A curva ROC é um gráfico que relaciona a sensibilidade e especificidade (1 – especificidade) para todos os possíveis pontos de corte de valores para a variável contínua entre 0 (haploide) e 1 (diploide). A sensibilidade (*Sens*) mede a habilidade do teste em classificar como diploide quando a planta é realmente diploide, enquanto que a especificidade mede a habilidade de o teste em classificar como haploide, quando essa é a condição real do indivíduo (AGRESTI, 2007). As curvas ROC descrevem a capacidade discriminativa de um teste diagnóstico (no caso, o comprimento de CG) para um determinado número de valores de corte e evidencia o ponto onde ocorre otimização da sensibilidade em função da especificidade, quando comparado a um teste padrão (*gold standard* ou padrão ouro), nesse caso, o fenótipo da planta. Assim, cada comprimento de CG medido foi comparado ao fenótipo da planta do qual este foi retirado. Esse ponto pode ser identificado na curva como aquele que se encontra mais próximo do canto superior esquerdo do diagrama, o qual indica uma probabilidade associada ao ponto de corte identificado pela ROC (Figura 9).

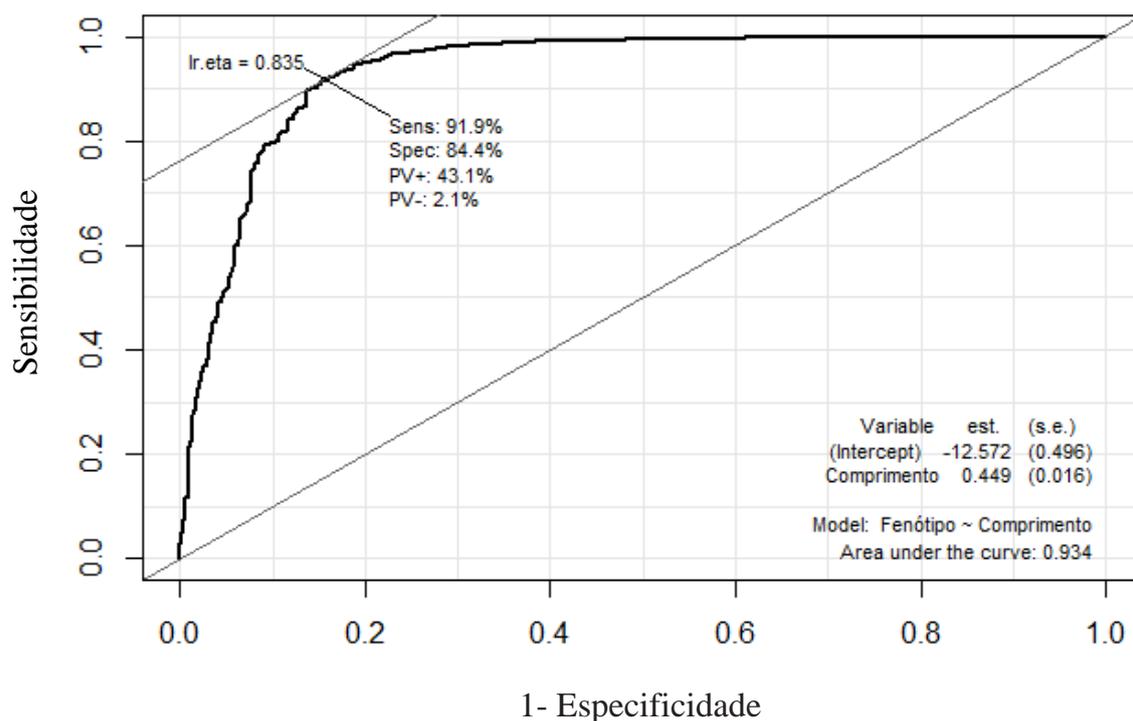


Figura 9. Curva ROC gerada a partir do conjunto completo de dados para o comprimento de células-guarda.

A Figura 9 apresenta a curva ROC obtida para o conjunto completo de CGs relacionado ao fenótipo (*gold standard*), independente do híbrido ou estágio dos quais as medidas foram obtidas. O valor de “*lr.eta*”, apresentado no canto superior da figura, apresenta uma probabilidade (0,835) associada ao ponto de corte estimado, que quando substituída na equação logística estimada, permite a obtenção do valor de comprimento de CGs de estômatos de 31,61 μm . Considerando o ponto de corte obtido, esse é o limite em que medidas iguais ou superiores de CGs, classificam a planta como diploides para o conjunto de dados em questão. Esse ponto de corte estimado minimiza falsas descobertas (haploides classificados como diploides) e maximiza as descobertas positivas (diploides classificados como diploides). Esse valor é calculado conforme a equação a seguir, considerando os parâmetros para regressão logística apresentada (Figura 9):

$$0,835 = \frac{1}{1 + e^{-(-12,572+0,449*\text{comprimento})}}$$

Ponto de corte = 31,61 μm

Embora satisfatórios valores para sensibilidade (91,9%) e especificidade (84,4%) tenham sido constatados para o ponto de corte, baixa proporção de PV^+ (valor da predição positiva) e PV^- (valor de predição negativa) foram observados (Figura 9). Índices como o valor da predição positiva e valor da predição negativa, que representam respectivamente, a probabilidade de uma planta ser realmente diploide quando o resultado do teste é diploide, e a probabilidade da planta ser haploide, quando o resultado do teste é também haploide, envolvem as probabilidades condicionais, tal qual o evento condicionante é a probabilidade de ocorrência de diploides na população (prevalência) (AGRESTI, 2007). O PV^+ tende ser alto e o PV^- decresce com alta prevalência de diploides. Os resultados de PV^+ e PV^- obtidos, 43,1 e 2,1%, respectivamente, refletem essa situação (HAJIAN-TILAKI, 2013).

As curvas ROC, além de auxiliarem na identificação do melhor ponto de corte, são muito utilizadas para comparar testes diagnósticos. Nesse caso, o poder discriminatório do teste, ou seja: a acurácia, pode ser mensurado através do cálculo da área sob a curva ROC (AUC= *Area Under Curve*). Assim, quanto maior para AUC, que varia de 0 a 1, melhor seria a qualidade do teste diagnóstico (AGRESTI, 2007). Considerando a AUC de 0,934 (Figura 9), pode-se considerar que o CG é um teste diagnóstico confiável para selecionar diploides e haploides.

Os dados da taxa de haploides putativos obtidos pela expressão de *R1-nj* bem como a indução de haploidia de cada cruzamento, baseado no *gold standard* (fenótipo) são diferentes entre os genótipos, refletindo proporções diferentes de diploides e haploides nos descendentes desses cruzamentos de indução (Tabela 13). Esses dados também evidenciam a baixa eficiência do marcador morfológico, demonstrados por Chaikam et al. (2015) e Milani et al. (2016), bem como a baixa taxa de indução de haploidia, independente do cruzamento de indução para esse indutor (MILANI et al., 2016).

Tabela 13. Taxa de haploides putativos pelo *RI-nj* e taxa de haploidia, inferida para cada cruzamento de indução com base no *gold standard*, e corrigida para o total de sementes obtidas por cruzamento.

Genótipo-fonte	Haploides putativos por <i>RI-nj</i> (%)	Taxa de indução de haploidia (%)*
IAC125	13,36	0,27
P2530	26,93	2,08
P3989	11,69	2,34

*Viesado, pois somente haploides provenientes na fração haploide putativos tiveram o fenótipo avaliado, a taxa então foi ajustada em relação ao total de sementes produzidas pelo cruzamento.

Como a eficiência na classificação é prejudicada caso um valor único de corte seja adotado para os três genótipos, devido as diferentes proporções de diploides (prevalência) nos diferentes cruzamentos de indução (Tabela 13) e ainda considerando os resultados anteriores do desdobramento da ANOVA (Tabela 11), em que o comprimento de CG diferiu entre genótipos-fonte e estádios de crescimento (folha), uma abordagem mais real pode ser feita se um corte individual for obtido por genótipos-fonte e por folha. Por isso, curvas ROC foram geradas para cada um desses desdobramentos utilizando o pacote “Epi”. Essas curvas ROC são apresentadas a seguir (Figuras 10, 11 e 12).

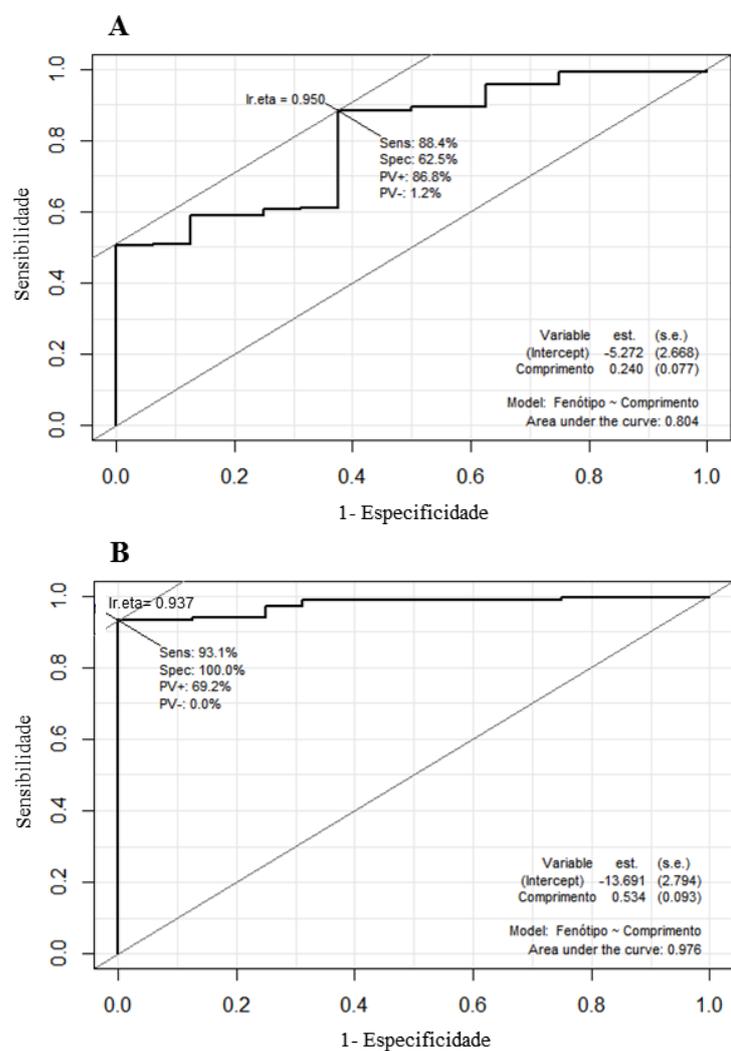


Figura 10. Curva ROC para os descendentes dos cruzamentos de indução entre o híbrido IAC-125 e o indutor KHI, para os estádios de duas (A) e três (B) folhas.

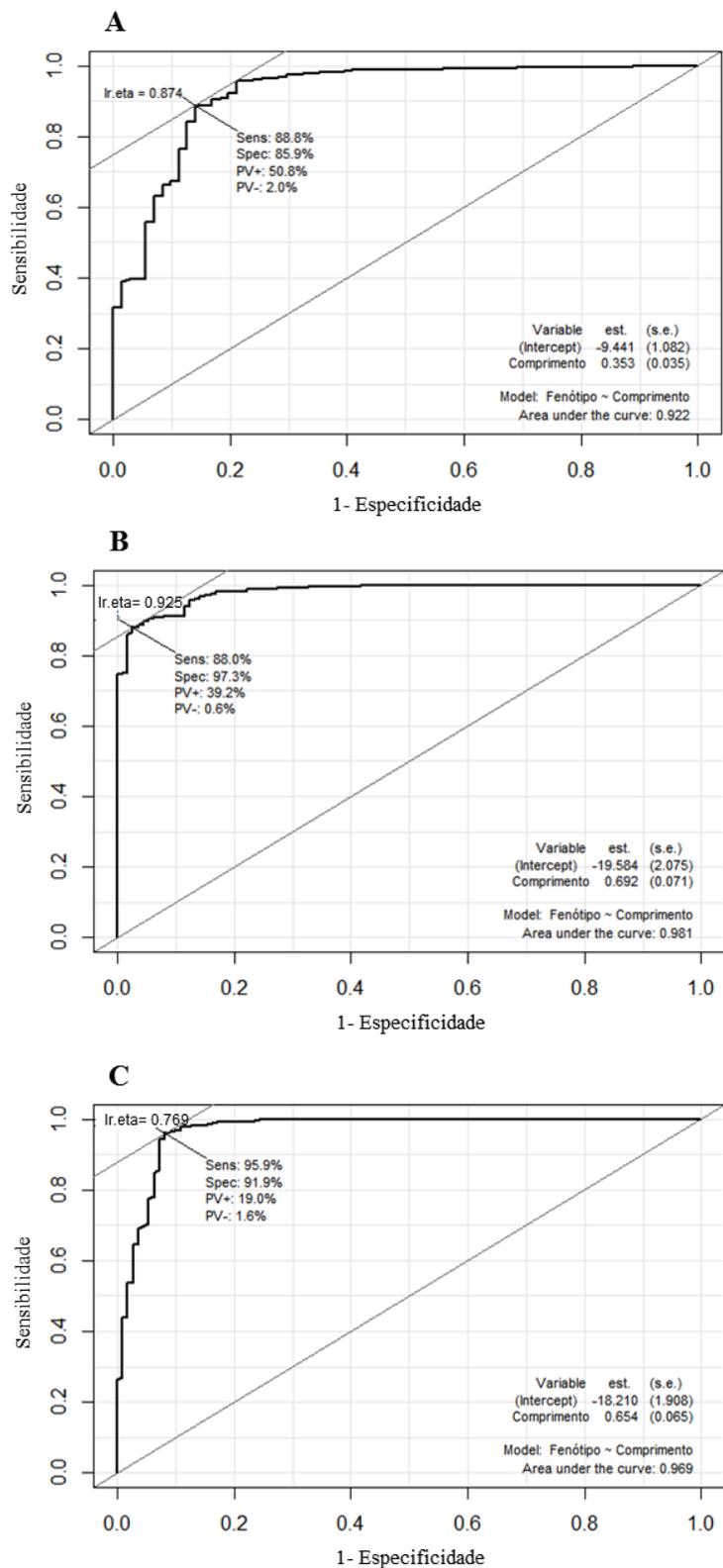


Figura 11. Curva ROC para os descendentes dos cruzamentos de indução entre o híbrido P2530 e o indutor KHI, para os estádios de duas (A), três (B) e quatro (C) folhas.

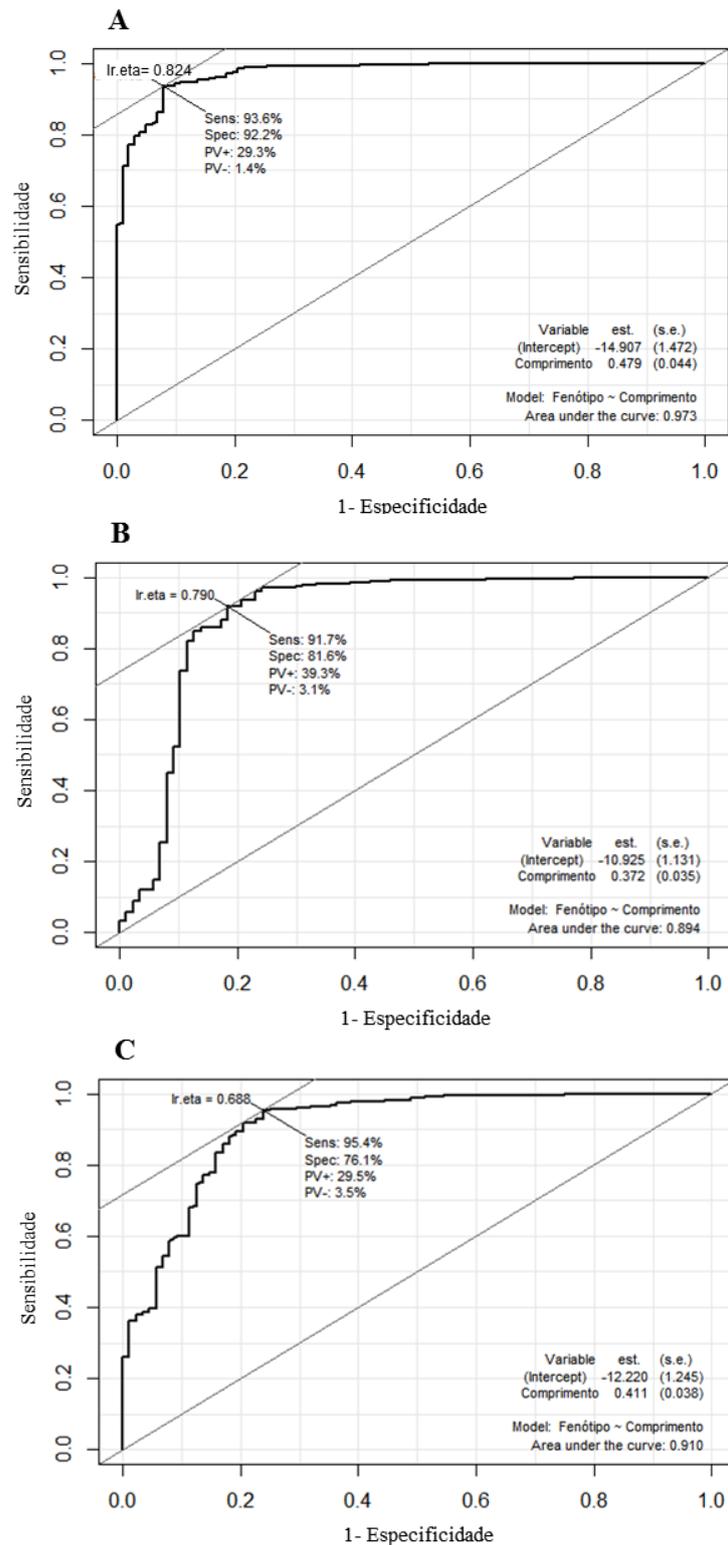


Figura 12. Curva ROC para os descendentes dos cruzamentos de indução entre o híbrido P2530 e o indutor KHI, para os estádios de duas (A), três (B) e quatro (C) folhas.

Os valores de corte ideal para cada ROC foram então obtidos pelo pacote “ROCR” do R, o qual também foi utilizado para obtenção da Área Abaixo da Curva (AUC) (Tabela 14). Os pontos de corte selecionados variaram de 29,74 a 34,49 μm , considerando todos os genótipos-fonte e estádios estudados. Para os descendentes do genótipo P3989, valores muito similares para os *cutoffs* foram estimados para os três estádios de crescimento (duas folhas: 34,49 μm , três folhas: 34,41 μm e quatro folhas: 34,22 μm). Corroborando com o demonstrado pela ANOVA (Tabela 10), que indicou que o comprimento de CG para esse híbrido não variou entre as folhas. Nesse caso, um ponto de corte único poderia ser adotado para selecionar os diploides desses descendentes do cruzamento de indução, sem que a acurácia da classificação fosse grandemente afetada. Para os demais genótipos-fonte, onde a ANOVA apontou diferença em CG relação ao estádio, cortes variados devem ser adotados.

Tabela 14. Pontos de corte definidos pela ROC, por genótipo e estádio, e Área Abaixo da Curva (AUC) obtidos através do pacote “ROCR”.

Genótipo-fonte	Estádio	Ponto de corte (μm)	AUC¹
IAC125	Folha 2	34,28	0,80
	Folha 3	30,76	0,98
	Folha 4	-	-
P2530	Folha 2	32,26	0,92
	Folha 3	31,64	0,98
	Folha 4	29,74	0,97
P3989	Folha 2	34,49	0,97
	Folha 3	34,41	0,89
	Folha 4	34,21	0,91

¹AUC(*Area Under Curve*): quanto mais próximo à 1, melhor o ajuste.

Para os descendentes de IAC125, um ponto de corte de 34,28 μm foi estabelecido para o estádio de duas folhas e quatro de 30,76 μm para o estádio 3, enquanto que para o P2530, os cortes estabelecidos foram 32,26, 31,64 e 29,74 μm para os estádio dois, três e quatro, respectivamente (Tabela 14).

Considerando a AUC, informação que remete ao poder do teste diagnóstico tanto quanto mais esse valor se aproxime de 1, os maiores valores foram encontradas para as ROCs do genótipo-fonte P2530, que variaram de 0,92 (folha dois) a 0,98 (folha três), com AUC

intermediária de 0,97 para folha quatro. As AUCs estimadas para os estádios de P3989 foram altas, mais inferiores às de P2530. Para o P3989, a maior AUC foi obtida para o estádio de duas folhas (0,97), seguida pelo estádio de quatro folhas (0,91) e duas folhas (0,89), respectivamente. As ROCs obtidas para o IAC125 apresentaram maior AUC para o estádio três (0,98) e menor para o estádio dois (0,80). No geral, valores satisfatórios de AUC foram observados para todos os genótipos-fonte e estádios, indicando o teste diagnóstico baseado em CG é válido para quaisquer desses casos.

Uma relação pode ser estabelecida entre os valores de AUC e o formato das curvas ROCs apresentadas nas Figuras 10, 11 e 12 (Tabela 14). Maiores valores de AUC são obtidos quando a curva se apresenta mais próxima ao eixo do canto esquerdo do gráfico. Por exemplo, a menor AUC foi observada para o estádio de folha dois provenientes do genótipo IAC125. A Figura 10. (A) apresenta uma ROC mais distante do eixo esquerdo, indicando que uma menor acurácia é esperada para essa classificação.

De posse dos pontos de cortes ideais (Tabela 14) para cada desdobramento, foram geradas tabelas de contingência contendo os valores de TP (*true positive*), TN (*true negative*), FP (*false positive*) e FN (*false negative*) (APÊNDICES D1 e D2). Os valores de TP e TN se referem às classificações corretas de diploides e haploides pelo teste diagnóstico, respectivamente, a partir do ponto de corte (*threshold*) definido. Enquanto que o valor de FP se refere, por sua vez, ao haploide identificado como diploide pelo comprimento de CG, sendo FN então referidos como os diploides classificados como haploide, em relação ao mesmo ponto de corte.

As taxas de falsas descobertas (FDR= *False discovery rate* e FNR= *False negative rate*) sumarizadas na Tabela 15 foram calculadas como segue:

- $FDR = FP / (FP + TP)$;
- $FNR = FN / (FN + TP)$.

Tabela 15. Taxas de FDR e FNR, MCC e teste de McNemar (corrigido para a continuidade) obtidos para a classificação de diploides e haploides como base nos pontos de cortes definidos para CGs por meio da ROC.

Genótipo-fonte	Estádio	Ponto de corte (μm)	FDR (%) ¹	FNR (%) ²	MCC ³	McNemar (p-valor)*
IAC125	Folha 2	34,28	1,18	11,62	0,25	0,00
	Folha 3	30,76	0	7,26	0,52	0,00
	Folha 4	-	-	-	-	-
P2530	Folha 2	32,26	1,96	4,39	0,76	0,04
	Folha 3	31,64	1,11	9,63	0,74	0,00
	Folha 4	29,74	1,39	2,74	0,87	0,15
P3989	Folha 2	34,49	1,37	6,35	0,77	0,00
	Folha 3	34,41	2,30	15,06	0,57	0,00
	Folha 4	34,22	2,93	12,11	0,57	0,00

¹(FDR= *False discovery rate*): Taxas de falsas descobertas;

²(FNR= *False negative rate*): Taxas de falsos negativos;

³MCC: (*Matthews correlation coefficient*);

*H0: Não há concordância entre os testes.

As taxas de FDR (proporção de falsos positivos em relação a tudo que foi separado como diploide, sendo essa condição real) foram baixas, e variaram de 0 a 2,93% para todos os cruzamentos de indução, independentemente do estágio. As taxas de FNR (proporção de falsos negativos em relação a tudo que foi classificado como diploide pelo comprimento de CG) foram maiores, variando de 2,74 a 15,06%, mais ainda satisfatórias, especialmente para os descendentes do cruzamento de indução com P2530 que variaram de 2,74% a 9,63% (Tabela 15).

As taxas mais balanceadas de FDR e FNR foram encontradas para os descendentes de cruzamentos de indução com P2530, com menor estimativa para a folha em estágio quatro. Descendentes de P3989 apresentaram, no geral, FNR mediana, enquanto que a menor FDR foi detectada para os descendentes de IAC125, com amostragem na folha três, no entanto, com grande FNR para todos os estágios. Segundo Beaulieu, et al. (2008) e Lomax, et al. (2009) o tamanho do genoma é fortemente correlacionado com o comprimento de células-guarda, sendo a densidade de estômatos geneticamente controlada e também afetada por variações do ambiente (ZHANG et al., 2012). Erros na classificação para o nível de ploidia

com base no comprimento de estômatos, representados por FDR e FNR, podem estar ligados à variação ambiental.

Os valores de FDR e FNR se relacionaram com a AUC, uma vez que menores valores das falsas e negativas descobertas foram observados no híbrido P2530, o qual apresentou os maiores valores de AUC, quando comparados aos demais genótipos (Tabela 14).

Considerando o coeficiente de correlação de Matthews, que é uma medida de qualidade de duas classificações binárias (*gold standard* e CG), onde um valor de coeficiente igual a 1 indica concordância perfeita, de 0 representa uma ausência de relação, e de -1 relação inversamente proporcional forte, uma boa correlação para a classificação entre o CG e fenótipo foi observada para alguns cruzamentos. Os coeficientes apresentados na Tabela 15 indicam melhores concordâncias para as classificações com base no ponto de corte estabelecido para o CG para genótipo-fonte P2530, onde os coeficientes calculados foram de 0,76, 0,74 e 0,87, para os estádios de duas, três e quatro folhas, respectivamente. Os descendentes do cruzamento de indução do genótipo-fonte P3989 apresentaram coeficientes de correlação de Matthews intermediários aos demais, sendo estes de 0,77 para o estádio dois e de 0,57 para os estádios três e quatro. Os menores valores foram encontrados para o IAC125, com coeficiente de 0,25 para a folha dois, que também apresentou menor AUC e maior FNR, e de 0,52 para folha três.

O teste de McNemar, utilizado para comparação de equivalências entre as classificações de testes pareados (CG e fenótipo), indicou que apenas a classificação baseada no ponto de corte estimado para os descendentes do cruzamento de indução com P2530 no estádio quatro apresentou classificação significativamente equivalente ao que foi observado para o fenótipo (Tabela 15). Esse teste tem sido amplamente adotado para comparar a classificação entre testes diagnósticos e a condição real, na pesquisa com duplo-haploides. Melchinger et al. (2016) comparou o resultado da classificação de testes diagnósticos baseados nos marcadores morfológicos *RI-nj*, *liguleless*, *glossy* e resistência ao herbicidas *Ultrafox* com o *gold standard* obtidos por citometria de fluxo e observou que, mesmo para sistemas confiáveis de classificação como o baseado na expressão da lígula, muitas vezes o teste não indica a concordância nas classificações.

A Tabela 16 reúne os valores de prevalência de diploides, considerando os valores do *gold standard* e para teste diagnóstico, bem como a acurácia de classificação pelo teste diagnóstico baseado no tamanho de células-guarda.

Tabela 16. Prevalência de diploides e acurácia na classificação baseada nos pontos de cortes estabelecidos.

Genótipo-Fonte	Estádio	Prevalência do teste¹	Prevalência - <i>Gold standard</i>²	Acurácia (%)³
IAC125	Folha 2	97,26	86,97	87,67
	Folha 3	97,03	89,98	92,95
	Folha 4	-	-	-
P2530	Folha 2	88,07	85,88	94,45
	Folha 3	83,97	76,74	91,06
	Folha 4	84,15	83,00	96,54
P3989	Folha 2	85,75	81,43	93,44
	Folha 3	86,36	75,08	85,27
	Folha 4	87,26	79,02	87,12

¹Baseada na classificação a partir do valor de CG estabelecido pela ROC.

²Baseada no vigor e fertilidade;

³Acurácia= (TP+TN)/TOTAL.

A acurácia é definida pela proporção de acertos, tanto de TP (verdadeiros diploides) quanto de TN (verdadeiros haploides), corretamente classificados por meio do ponto de corte definido para CG. No geral, altos valores de acurácia foram obtidos. O comprimento de CG foi mais acurado em classificar corretamente os descendentes do cruzamento de indução com o híbrido P2530, seguido do híbrido P3989 e IAC125, nessa ordem, confirmando assim o que foi obtido considerando para FDR, FDN e MCC (Tabela 15).

Os valores de prevalência complementam os resultados da Tabela 13, que indicavam uma grande proporção de diploides em meio à fração de haploides putativos separados pela expressão do *R1-nj*. As proporções reais de diploides presentes nessa fração variaram de 75,08 a 89,98%, independentemente do cruzamento de indução, e diferiram levemente para os valores obtidos por meio do CG. As maiores coincidências entre as prevalências real e classificada por CG ocorreu para os descendentes do híbrido P2530.

O efeito do nível de ploidia com o comprimento das células-guarda pode ser explicado pelo efeito de dose dos genes envolvidos no controle genético de desenvolvimento de estômatos. Três peptídeos sinais, conhecidos como EPFs (*epidermal patterning factors*) têm sido descritos como sinalizadores para o desenvolvimento de estômatos a partir de células protodérmicas (HUNT e GRAY, 2009).

Sobre o papel desses fatores na formação de estômatos, sabe-se que os fatores EPF1 e EPF2 agem controlando a formação de precursores da célula-guarda, enquanto que o fator EPF1 contribui para a orientação das divisões celulares bem como inibe a formação de estômatos em grupos ou pares. Plantas mutantes para o *locus* EPF1 exibem maior número de estômatos por área e ainda podem apresentar o desenvolvimento de estômatos ligados aos pares. Os mutantes para o fator EPF2, por sua vez, um fator que atua regulando a formação de meristemoides (um precursor das células-guardas mães) e também promovendo a formação de células epidérmicas comuns, apresentam um aumento da densidade estomática e ainda a formação de estômatos não desenvolvidos (*arrested*). Assim, um genótipo duplo recessivo para os fatores (*epf1epf2*) apresentaria plantas exibindo maior densidade estomática, bem como enfileiramento de estômatos, estômato não funcionais, e ainda menor tamanho, semelhante ao observado em haploides (LAMPARD et al., 2008; HUNT e GRAY, 2009; KONDO et al., 2010).

O comprimento de células-guarda se mostrou eficiente em separar diploides de haploides e assim poderia ser usado, por exemplo, para eliminar diploides que sobraram após seleção por *R1-nj*, em estágio de plântula, anteriormente ao tratamento para duplicação cromossômica, quando este é feito via raiz, reduzindo assim o gasto com espaço, material e mão-de-obra, em campo ou casa de vegetação, com a condução de diploides que só seriam descartados na maturidade.

Como o corte precisa ser individual, pelo menos para cada genótipo-fonte, assim como na proposta pelo uso do teor de óleo de Melchinger et al (2013), a *performance* da técnica é também dependente da proporção de diploides e haploides entre as plantas selecionadas previamente por *R1-nj*, da diferença entre as medias de haploide e diploide de cada genótipo-fonte bem como do desvio padrão da média de CG, e ainda do estágio de folha coletada.

Outras possibilidades para o uso dessa técnica são destacadas por Choe et al. (2012) como por exemplo, a separação de diploides de duplo-haploides após a duplicação, também contribuindo para a economia de recursos. A técnica é ainda infinitamente mais rápida e barata que as demais adotadas com mesma finalidade, como por exemplo, a citometria de fluxo. Segundo os mesmos autores, a identificação de haploides e diploides por meio de impressão epidermal de estômatos é três vezes mais rápida e 20 vezes mais barata que a citometria de fluxo, não exigindo grande investimento ou treinamento.

Outra vantagem entre a classificação de DH por meio do comprimento de células-guarda seria o fato de permitir a seleção de plantas parcialmente duplicadas devido à duplicação incompleta, gerando tecidos quiméricos (CHOE et al., 2012). Na citometria de fluxo, mixaploides tendem a apresentar picos de DNA provenientes de células haploides e diploides, dificultando assim, a confirmação da presença do haploide duplicado.

O uso de estômatos para separação de haploides e diploides mostra-se promissor no campo de obtenção de duplo-haploides, sobretudo em regiões tropicais, onde a frequência de diploides na fração haploides putativos não detectados via expressão do *RI-nj*, é grande (CHAIKAM, et al., 2015; CHAIKAM et al., 2016). Essa ferramenta pode ser adotada, por exemplo, em casa de vegetação, onde as plantas duplicadas são aclimatadas antes do transplante para o campo, possibilitando assim a eliminação de haploides não duplicados, e dessa forma reduzindo a área utilizada e o trabalho com tratos culturais.

4. CONCLUSÕES

- O comprimento de células-guarda é variável em relação ao genótipo-fonte, estágio da folha coletada e nível de haploidia;
- As impressões epidérmicas de folhas coletadas em estádios de duas a quatro folhas podem ser utilizados como ferramenta para classificar o nível de ploidia, sendo a eficiência da classificação mais ligada ao genótipo-fonte que ao estágio de crescimento da planta;
- O ponto de corte ideal para separar haploides de diploides é variável em relação ao estágio da planta (nó de inserção da folha) e genótipo-fonte (híbrido);
- Quando empregada para o descarte de diploides anterior ao tratamento para duplicação cromossômica, o teste diagnóstico por CG pode contribuir para economia de recursos, descartando diploides em meio haploides putativos separados por *R1-nj* com segurança.

5. REFERÊNCIAS

- AGRESTI, A. **An introduction to categorical data analysis**, 2^a.ed. New York: Wiley, 2007. 395p.
- BEAULIEU, J. M., LEITCH, I. J., PATEL, S., PENDHARKAR, A., KNIGHT, C. A. Genome size is a strong predictor of cell size and stomatal density in angiosperms. **New Phytologist**, v. 179, p. 975-986, 2008.
- BECK, S. L., DUNLOP, R., FOSSEY, A. Stomatal length and frequency as a measure of ploidy level in black wattle, *Acacia mearnsii* (de Wild). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 141, p. 177-181, 2003.
- BERGMANN, D. C., SACK, F. Stomatal development. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 58, p. 163-181, 2007.
- BORRINO, E. M., POWELL, W. Stomatal guard cell length as an indicator of ploidy in microspore-derived plants of barley. **Genome**, v.30, p. 158-160, 1988.
- BUTTERFASS, T. Control of plastid division by means of nuclear DNA amount. **Protoplasma**, v. 76, p.167-195, 1973.
- CHAIKAM, V., MARTINEZ, L., MELCHINGER, A. E., SCHIPPRACK, W., BODDUPALLI, P. Development and validation of red root marker-based haploid inducers in maize. **Crop Science**, v. 56, n. 4, p. 1678-1688, 2016.
- CHAIKAM, V., NAIR, S. K., BABU, R., MARTINEZ, L., TEJOMURTULA, J., BODDUPALLI, P. M. Analysis of effectiveness of *R1-nj* anthocyanin marker for in vivo haploid identification in maize and molecular markers for predicting the inhibition of *R1-nj* expression. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 128, p. 159-171, 2015.
- CHASE, S. S. Monoploid frequencies in a commercial double cross hybrid maize, and in its component single cross hybrids and inbred lines. **Genetics**, v. 34, p. 328-332, 1949.
- CHASE, S. S. Production of homozygous diploids of maize from monoploids. **Agronomy Journal**, v. 44, p. 263-267, 1952.
- CHOE, E., CARBONERO, C. H., MULVANEY, K., RAYBURN, A. L., MUMM, R. Improving in vivo maize doubled haploid production efficiency through early detection of false positives. **Plant Breeding**, v. 131, p. 399-401, 2012.
- COE, E. H. A line of maize with high haploid frequency. **American Naturalist**, v. 93, p. 381-382, 1959.

FRANSEN, N. O. Die Plastidenzahl als Merkmal bei der Kartoffel. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 38, p. 153-167, 1968.

HAIJAN-TILAKI, K. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis for medical diagnostic test evaluation. **Caspian Journal of Internal Medicine**, v. 4, n. 2, p.627-635, 2013.

HO, I., WAN, Y., WIDHOLM, J. M., RAYBURN, A. L. The Use of Stomatal Chloroplast Number for Rapid Determination of Ploidy Level in Maize. **Plant Breeding**, v. 105, n. 3, p. 203-210, 2006.

HUNT, L., GRAY, J. E. The signaling peptide EPF2 controls asymmetric cell divisions during stomatal development. **Current Biology**, v. 19, p. 864-869, 2009.

KEBEDE, A. Z., DHILLON, B. S., SCHIPPRACK, W., ARAUS, J. L., BÄNZIGER, M., SEMAGNSEMAGN, K., ALVARADO, G., MELCHINGER, A. E. Effect of source germplasm and season on the in vivo haploid induction rate in tropical maize. **Euphytica**, v. 180, n. 2, p. 219-226, 2011.

KHOKHLOV, S. S., TYRNOV, V. S., GRISHINA, E. V., et al. Gaploidiya i selektsiya (**Haploidy and Breeding**), Moscow: Nauka, 1976.

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

KONDO, T., KAJITA R., MIYAZAKI, A., HOKOYAMA, M., NAKAMURA-MIURA, T., MIZUNO, S., MASUDA, Y., IRIE, K., TANAKA, Y., TAKADA, S., KAKIMOTO, T., SAKAGAMI, Y. Stomatal density is controlled by a mesophyll-derived signaling molecule. **Plant & Cell Physiology**, v. 51, p. 1-8, 2010.

LAMARI, N., FAYT, V. Diallel Analysis of Stomatal Traits in *Triticum aestivum* L. **Cytology and Genetics**, v. 49, n. 5, p. 314-321, 2015.

LAMPARD, G. R., MACALISTER, C. A., BERGMANN, D. C. Arabidopsis stomatal initiation is controlled by MAPK-mediated regulation of the bHLH SPEECHLESS. **Science**, v. 322, p. 1113-1116, 2008.

LIMIN, A. E., FOWLER, D. B. The influence of cell size and chromosome dosage on cold-hardiness expression in the Triticeae. **Genome**, v. 32, n. 4, p. 667-671, 1989.

LOMAX, B. H., WOODWARD, F. I., LEITCH, I. J., KNIGHT, C. A., LAKE, J. A. Genome size as a predictor of guard cell length in *Arabidopsis thaliana* is independent of environmental conditions. **New Phytologist**, v. 181, p. 311-314, 2009.

MAUSETH. J. D. **Botany-an introduction to plant biology**, 4^a. ed. Jones and Bartlett Pub., Sudbury, 2008.

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, p. 1127- 1135, 2016.

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. **Scientific Reports**, v.3, n. 2129, p.1-5, 2013.

MILANI, K. F., BALERONI, A. G., DA SILVA, H. A., MENDES-BONATO, A. B., PINTO, R. J. B., SCAPIM, C. A. Effectiveness of the R1-navajo embryo marker on sorting haploids, **Maydica**, v. 61, p.1-8, 2016.

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

PRASANNA, B.M., CHAIKAM, V., MAHUKU, G. **Doubled Haploid. Technology in Maize Breeding: Theory and Practice**, 50p., 2012.

PRIGGE, V., XU, X., LI, L., BABU, R., CHEN, S., ATLIN, G. N., MELCHINGER, E. A. New insights into the genetics of in vivo induction of maternal haploids, the backbone of doubled haploid technology in maize. **Genetics**, v. 190, n. 2, p.781-793, 2011.

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2015, url = {<https://www.R-project.org/>}.
project.org/.

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

RUSSO, S. E., CANNON, W. L., ELOWSKY, C., TAN, S., DAVIES, S. J. Variation in leaf stomatal traits of 28 tree species in relation to gas exchange along an edaphic gradient in a Bornean rain forest. **American Journal of Botany**, v. 97, n. 7, p. 1109-1120, 2010.

SACK, F. D. Structure of the stomatal complex of the monocot *Flagellaria indica*. **American Journal of Botany**, v. 81, p. 339-344, 1994.

SANNI, S. S., UKAEGBU, E. C. On three-way unbalance nested analysis of variance. **Journal of Mathematics and Statistics**, v. 8, n. 1, p. 1-14, 2012.

SARI, N., ABAK, K., PITRAT, M. Comparison of ploidy level screening methods in waremelon: *Citrulus lanatus* (Thunb.). Matsum. & Nakai. **Scientia Horticulturae**, v. 82, p. 265-277, 1999.

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

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide: statistics,version 9.3.** Cary: SAS Institute, 2012.

SINGH, S., SETHI, G. S. Stomatal size, frequency and distribution in *Triticum aestivum*, secale cereale and their amphiploids. **Cereal Research Communications**, v. 23, p. 103-1081, 1995.

VATÉN, A., BERGMANN, D. C. Mechanisms of stomatal development: an evolutionary view. **Evodevo**, v. 3, n. 11., p.1-9, 2012.

YUDANOVA, S. S., MALETSKAYA, E. I., MALETSKII, S. I. Variability of chloroplast number in populations of stomatal guard cells in sugar beet *Beta vulgaris* L. **Russian Journal of Genetics**, v. 38, p.72-78, 2002.

CAPÍTULO 3

Resgate de embriões e tratamentos alternativos à colchicina para a duplicação cromossômica em milho

Resgate de embriões e tratamentos alternativos à colchicina para a duplicação cromossômica em milho

RESUMO

A obtenção de linhagens duplo-haploides em milho pode ser realizada por meio da técnica de resgate de embrião, quando o objetivo é a inserção de transgenes. Embriões imaturos provenientes de cruzamentos de indução entre os genótipos A188 e B73 e o indutor UH400 foram coletados em até 15 dias após a polinização e incubados em meio MS (Murashige e Skoog) contendo diferentes agentes antimitóticos (colchicina 0,05%, 50 μMol de APM + 10 μMol de pronamida, 10 μMol de APM + 2 μMol de pronamida, bem como controle com água) por 11 horas. Em seguida, os embriões foram transplantados e regenerados em meio MS, livre de antimitóticos, até a formação de parte aérea e raízes e então transplantadas para casa de vegetação. Foi avaliada a proporção de plantas duplicadas, proporção de embriões e plantas sobreviventes após o tratamento e ainda a expressão da antocianina em embriões e plântulas. Adicionalmente, a eficiência do marcador fenotípico, caracterizado pela pigmentação púrpura em embriões e caules em relação à citometria de fluxo. Foi identificado que a colchicina 0,05% foi mais eficiente para duplicar cromossomos por meio do resgate de embrião. A combinação APM (50 μMol) + pronamida (10 μMol) teve efeito inferior à colchicina, mas promissor quanto a capacidade de duplicação cromossômica. Os agentes antimitóticos não interferem na sobrevivência, sendo a mortalidade variável com o genótipo-fonte. A proporção de haploides putativos obtidas durante a fase de embrião e de plântula, segundo a expressão por antocianina, é maior quanto mais maduro é o embrião coletado. A classificação baseada na expressão por antocianina no caule revelou uma grande incoerência na proporção de diploides ou tetraploides classificados como haploides ou DHs quando comparados aos resultados da citometria de fluxo.

Palavras-chave: APM. Pronamida. Cultivo *in vitro*. Duplo-haploides.

Embryo rescue and colchicine alternatives for chromosome doubling in maize

ABSTRACT

Doubled haploid lines development in maize can be performed using the embryo rescue technique when the goal is the insertion of transgenes. Immature embryos from induction crosses between the sources between A188 and B73 with the haploid inducer UH400 were collected from ears until 15 days after pollination and incubated in MS (Murashige e Skoog) medium plus the antimetabolic agents (Colchicine 0.05%, 50µMol of APM plus 10 µMol of pronamide, 10 µMol of APM plus 2 µMol of pronamide, as well water as control) for 11 hours. Later, embryos were moved and regenerated in the same medium, free of antimetabolic agents, at least until shoot and roots were well developed. Then, the seedlings were transferred to the greenhouse. The variables evaluated were: the proportion of the doubled by the total of the survive plants (according to the flow cytometry), the survive proportion of embryos and plants after treatment, also the expression of anthocyanin in embryos and seedlings and the efficiency of these marker systems on sorting haploids e diploids were comparing to the flow cytometry results. Colchicine was the most effective agent on doubling chromosomes through embryo rescue. Mix of the APM (50 µMol) plus pronamide (10 µMol) had a lower effect than colchicine but could be considered sufficiently adequate for the purpose of chromosomal doubling. Antimetabolic agents did not affect the survive rate, showing the mortality in embryo rescue were genotype source dependent. Haploid or doubled haploid putative rate, sorted by the anthocyanin marker system, were higher as much as older were the embryo collected. Anthocyanin marker system showed large incoherence on the proportion of diploids and tetraploids sorting as haploids or DHs, based on flow cytometry results.

Keywords: APM. Pronamide. *In vitro* culture. Doubled-haploids.

1. INTRODUÇÃO

A obtenção de duplo-haploides pode ser feita por métodos *in vivo* ou *in vitro*. A geração de haploidia *in vivo* se dá com base em cruzamentos de indução a campo do material fonte com genótipos indutores da haploidia. Esses indutores podem ser da mesma espécie dos genótipos dos quais se deseja extrair as linhagens ou serem de uma espécie relacionada, conforme o realizado em cereais de inverno. Nesse último caso, onde o parental masculino é uma espécie relacionada, os cromossomos são eliminados mais tarde, após a fertilização (SHARKAR e COE, 1966, RÖBER, GORDILLO e GEIGER, 2005). Um exemplo clássico é a adoção de milho para polinizar diversas gramíneas (trigo, aveia, centeio e cevada) para obtenção de descendência monoploide dos cruzamentos (RIERA-LIZARAZU et al., 1996; PRATAP et al., 2005; GEIGER e GORDILLO, 2009; PRASANNA, CHAIKAM e MAHUKU, 2012).

No método *in vitro*, adotado em trigo, aveia, triticale, centeio, cevada, canola e hortaliças (RIERA-LIZARAZU et al., 1996; SINGH et al., 2004; PRATAP et al., 2005), tecidos haploides como os de anteras e ou do saco embrionários são utilizados para desenvolver embriões haploides partenogênicos, aptos a serem duplicados. O método *in vitro* para a produção de duplo-haploides pode se dar ainda por meio do resgate de embriões. Nesse caso, embriões imaturos, provenientes de cruzamentos de indução, são coletados e incubados em meio nutritivo, onde então o tratamento para duplicação é realizado (WEYMANN et al., 1993; BARTON et al., 2007).

Em milho a indução *in vivo* é amplamente adotada. No entanto, a possibilidade de uso de embriões haploides na transformação genética conforme o descrito por Weising et al. (1988), tem suscitado o interesse no aperfeiçoamento na produção de duplo-haploides por meio do resgate de embrião nessa cultura. Dessa forma, embriões haploides e imaturos, provenientes de um cruzamento de indução, são transformados geneticamente e em seguida duplicados por meio de agente antimitóticos, inseridos no meio de cultivo, regenerando assim uma planta diploide homocigota para todos os *loci*, inclusive para o transgene inserido (BARTON et al., 2007).

O método básico de duplicação *in vitro* ou de plântulas provenientes de cruzamento *in vivo* é baseado no uso de colchicina que é um inibidor de mitose. A colchicina atua como

inibidor da formação das fibras do fuso mitótico que por se ligarem à tubulina promovem a despolimerização dos microtúbulos, impedindo assim a segregação das cromátides irmãs para os polos opostos, bem como a ocorrência de citocinese, gerando uma célula duplo-haploide com $2x = 20$ cromossomos em milho (CASTILLO et al., 2009; PIERRE et al., 2011).

Outras substâncias, especialmente certos herbicidas que atuam por inibição ou desorganização da mitose têm sido testados na duplicação cromossômica, tais como o APM (AMIPROPHOS-METHYL), pronamida (PRONAMIDE), trifluralina, orizolina, flufenacet e chlorpropham (isopropyl (3-chlorophenyl) carbamato), em diferentes formas de tratamento: cultura de tecidos, tratamento após corte de coleóptilo em plântulas ou tratamento de raízes (BEAUMONT e WIDHOLM, 1993; MELCHINGER et al., 2016).

Resultados satisfatórios foram encontrados por Melchinger et al. (2016), com combinações de APM e pronamida combinados, no tratamento por embebição de plântulas de milho, quando comparados ao desempenho do tratamento com colchicina, nas mesmas condições. Esses dois herbicidas são classificados pelo HRAC - *Herbicide Resistance Action Committee* (2017) como do grupo dos inibidores do crescimento inicial, subgrupo dos inibidores da formação de microtúbulos. O APM pertence ao grupo químico fosforoamidato, enquanto que a pronamida pertence às benzamidas. Assim como a colchicina, esses dois herbicidas atuam induzindo a duplicação cromossômica por inibirem a mitose. Essas substâncias formam complexos com o dímero da α e β da tubulina, impedindo sua normal polimerização (HANSEN et al., 1998).

Apesar de promissores em plântulas, dados sobre a eficiência do tratamento com esses herbicidas na duplicação cromossômica de embriões resgatados são pouco conhecidos, ou até mesmo a comparação de seu desempenho com o da colchicina, quando utilizado para esse fim. Dessa forma, o seguinte trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de APM e PRONAMIDA combinados, sobre a duplicação cromossômica e sobrevivência de embriões resgatados, em comparação ao método tradicional com colchicina.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para duplicação por meio de resgate de embrião, embriões imaturos foram coletados em até 15 dias após o cruzamento de indução. Os embriões foram então esterilizados e incubados em meio nutritivo contendo agente antimitótico, em câmara de crescimento. Após 12 horas de tratamento os embriões foram movidos para um meio de cultivo contendo apenas meio nutritivo e vitaminas, onde ficaram incubados até que a raiz e a parte aérea se estabelecessem. As plântulas foram então transplantadas para a casa de vegetação em bandejas com substrato contendo húmus e solo.

2.1 Preparo do meio de cultivo e soluções de duplicação

O meio para incubação foi preparado diluindo sal de meio MS, contendo vitaminas (tiamina, asparagina), em água MiliQ, da Duchefa (MO222.0050), acrescido BAP (6-benzilaminopurina) e sacarose, com fitagel 0,03% como agente solidificante (MURASHIGE e SKOOG, 1962). O pH da solução foi ajustado para 5,8. O mesmo meio de incubação foi utilizado para o tratamento de duplicação, onde foi acrescentado o agente mitótico como para regeneração.

Para a preparação das soluções de agentes antimitóticos APM (amiprofos-methyl) e pronamida foram inicialmente diluídos em DMSO, para uma solução estoque concentrada e essas então adicionadas em volume proporcional a concentração final. A colchicina foi diluída diretamente no meio de cultivo. Os tratamentos avaliados quanto à eficiência de duplicação cromossômica foram: colchicina 0,05%, APM (50 uM) + pronamida (10 uM), APM (10 uM) + pronamida (2 uM), além do tratamento controle (sem agente antimitótico).

No momento da preparação das placas de Petri para duplicação, a solução de meio MS foi filtrada em filtro estéril descartável (20µm) no mesmo volume de fitogel aquecido. O agente antimitótico foi então adicionado no volume desejado e o meio então foi imediatamente vertido sobre as placas de Petri, onde os embriões foram incubados para duplicação.

2.2 Material genético e isolamento de embriões

Espigas provenientes do cruzamento de indução entre o indutor UH400 (indutor gimnogenético) e os genótipos-fonte: B73 (linhagem dentada de endosperma amarelo) e A188 (linhagem dentada de endosperma branco) foram coletadas aos 12, 13 e 15 dias após a polinização, que foi realizada em casa de vegetação pertencente à Universidade de Hamburgo.

As sementes imaturas dessas espigas foram recolhidas com o auxílio de um bisturi, separadas por genótipos-fonte e então desinfetadas em solução de hipoclorito 13% acrescida de Tween a 2%, um surfactante por 10 minutos. Em ambiente estéril, as sementes foram lavadas com água destilada e escurridas para que o hipoclorito fosse eliminado.

Dentro da câmara de fluxo os embriões foram excisados das sementes com auxílio de uma lupa. Os embriões foram então incubados com a face lisa voltada para baixo, inicialmente em placas de Petri contendo meio nutritivo e o agente antimetabólico. O número de embriões viáveis incubados por tratamento é apresentado na Tabela 17.

Tabela 17. Tratamentos testados para a duplicação cromossômica, idade dos embriões coletados e número de embriões incubados.

Agente antimetabólico	Genótipo-fonte	DAP*	Embriões incubados
Controle (água destilada)	A188	15	19
Controle (água destilada)	B73	13	8
Mix01(APM 10uM+Pronamida 2uM)+0,1% DMSO	B73	13	17
Mix01(APM 10uM+Pronamida 2uM)+0,1% DMSO	A188	15	15
Mix01(APM 10uM+Pronamida 2uM)+0,1% DMSO	A188	12	21
Mix02(APM 50uM+Pronamida 10uM)+0,1% DMSO	B73	13	15
Mix02(APM 50uM+Pronamida 10uM)+0,1% DMSO	A188	15	20
Mix02(APM 50uM+Pronamida 10uM)+0,1% DMSO	A188	12	21
Colchicina (0,05%)	B73	13	21
Colchicina (0,05%)	A188	15	15
Colchicina (0,05%)	A188	12	18

*DAP: Dias após a polinização.

2.3 Duplicação e regeneração

Após 12 horas de exposição ao tratamento de duplicação, os embriões foram então transferidos para placas de Petri contendo o mesmo meio de crescimento, livre de agente antimetabólico, onde teve início o processo de regeneração. Após esse período de tratamento em meio contendo os agentes antimetabólicos, os embriões foram transferidos para o meio na mesma composição, sem o agente antimetabólico, em câmara de crescimento a 26° C, 16/8 horas luz/escuro de fotoperíodo. Na câmara, cresceram até serem transplantados em casa de vegetação.

Um dia após a incubação para regeneração e exposição à luz, haploides putativos e diploides foram classificados com base na expressão do marcador embrionário *R-navajo*, resultado da expressão do gene *RI-nj*, que promove a pigmentação púrpura nos embriões imaturos (Figura 13).



Figura 13. Expressão do gene *RI-nj* resulta na pigmentação gradual de embriões diploides após a exposição à luz. A esfera vermelha indica um embrião diploide expressando pigmentação por antocianina, 24 horas após o isolamento.

Uma semana após a transferência do meio de tratamento para o meio de regeneração, foi observada a protrusão da radícula (Figura 14. A e B). Nesse estágio, os embriões foram movidos para recipientes maiores, contendo solução de cultivo de mesma composição (Figura 15. A, B, C, D).

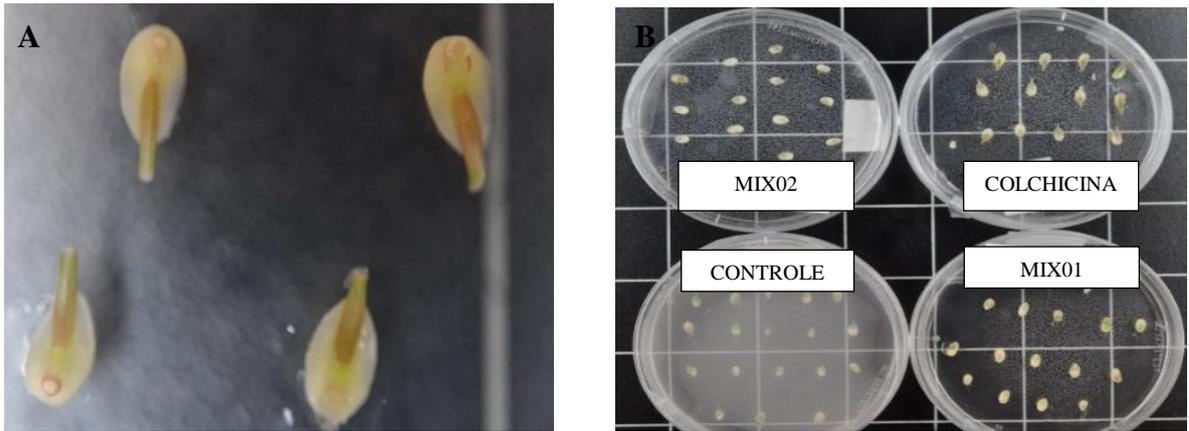


Figura 14. (A e B). Embriões com uma semana se incubação, em meio para regeneração, expressando antocianina.





Figura 15. Parte das plantas regeneradas após duas semanas de regeneração. (A) Controle, (B) Mix01(APM 10 μ M + Pronamida 2 μ M), (C) Mix02 (APM 50 μ M + Pronamida 10 μ M) e (D) Colchicina (0,05%).

Após quatro semanas de incubação, as plantas regeneradas foram transferidas para casa de vegetação, na Universidade de Hohenheim. Para isso, as mesmas foram acondicionadas em bandejas contendo solo estéril e húmus (1:2). O ambiente da casa de vegetação foi mantido a 26° C na luz, com duração de 16 horas e 20° C durante o período de escuro, com 8 horas de duração.

2.4 Citometria de fluxo para identificação de nível de ploidia

Quando a maioria das plantas atingiu o estágio três folhas expandidas em casa de vegetação, as mesmas foram individualmente avaliadas quanto ao nível de ploidia, na Universidade de Hohenheim. Para tanto, 50 mg de tecido fresco da folha mais jovem de cada planta foi fragmentada com o auxílio de uma lâmina em 0,4 ml de tampão gelado de Galbraith para lise celular (Galbraith et al., 1983), e assim uma suspensão nuclear foi obtida.

A solução obtida de cada folha foi então filtrada em malha de 20 μ m e vertida em um tubo de ensaio. A cada tubo foi adicionado 1,6 ml de DAPI, que se liga especificamente e estequiometricamente ao DNA nuclear, para que o mesmo fosse corado. Após 2 minutos, a suspensão foi avaliada no CyFlow® Ploidy Analyzer, com velocidade de injeção de 6 μ l segundos⁻¹ ml⁻¹. A fluorescência emitida por cada núcleo da amostra analisada foi transformada em um ponto, acumulada e reunida instantaneamente em um histograma em escala logarítmica. Os histogramas obtidos foram avaliados com o auxílio de software FloMax e os resultados para o conteúdo de DNA para o pico G1 de cada amostra (60% do

DNA das células) comparados com o pico G1 do padrão de referência (DOLEZEL, 1997; LOUREIRO et al., 2006; BATTISTELLI et al., 2013).

2.5 Variáveis coletadas e análise estatística

A proporção de plantas duplicadas (duplo-haploides+tetraploides) pelo total de plantas analisadas, identificadas através da citometria de fluxo, foi analisada utilizando o pacote “glm” do R, considerando o modelo binomial com a *logit* como função de ligação. As diferenças entre as proporções em relação aos fatores agentes antimutagênicos, DAP (dias após a polinização) e genótipo-fonte, foram comparados pelo teste de Wald, através do contraste entre os parâmetros estimados (R CORE TEAM, 2015). Ainda, a proporção de embriões sobreviventes após o tratamento de duplicação e após o transplante para casa de vegetação e da proporção de embriões haploides putativos+duplo-haploides, selecionados devido à expressão de *RI-nj*, logo, após o tratamento para duplicação e em comparação com o período final de regeneração, também foram avaliados conforme o modelo binomial.

Adicionalmente, a correspondência na classificação entre o fenótipo da planta regenerada e a análise de citometria foi analisada. Plantas F1's (diploides) provenientes do cruzamento de indução com indutores de haploidia como o UH400 carregam genes que também codificam a pigmentação púrpura em caule de plantas jovens. Este seria um marcador morfológico codominante cuja expressão é dependente de luz, que pode ser adotado, por exemplo, para eliminação de falsos positivos selecionados pelo marcador *RI-nj*, após o tratamento para duplicação (NANDA e CHASE, 1966; CHASE, 1969; RÖBER, GORDILLO e GEIGER, 2005).

Nesse sentido, o teste de McNemar foi adotado para classificar as correspondências na classificação entre os testes (coloração do caule e citometria de fluxo), onde a distribuição χ^2 foi corrigida para continuidade, por se tratar de dados binomiais, sendo as hipóteses:

- H0: Não existe diferença de classificação entre o marcador fenotípico e a citometria de fluxo;
- H1: Os testes diagnósticos não se equivalem.

Ainda, as taxas de FDR (*False Discovery Rate*) e FNR (*False Negative Rate*) calculadas para o marcador fenotípico, onde o resultado da citometria de fluxo foi utilizado

como *gold standard*. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa R (R CORE TEAM, 2015).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os histogramas obtidos para plantas haploides, diploides, duplo-haploides e tetraploides, em escala logarítmica são apresentados a seguir (Figura 16). O eixo vertical representa o número de núcleos lidos. O eixo horizontal do gráfico representa a quantidade de DNA e os pontos 2, 3 e 4 representam os canais onde as leituras das quantidades de DNA de cada núcleo se posicionaram. Esses valores apenas representam uma escala e não uma medida da quantidade de DNA.

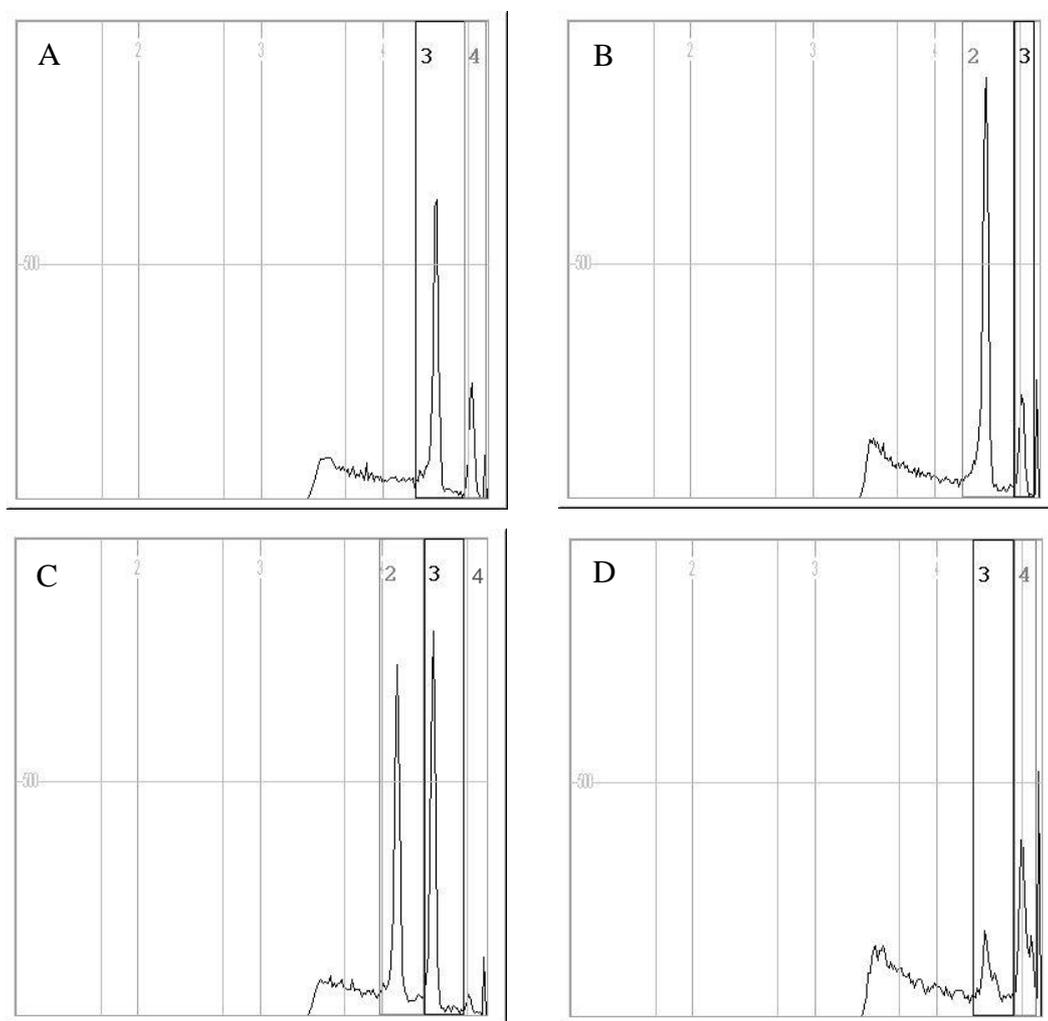


Figura 16. Histogramas obtidos por meio de citometria de fluxo após o tratamento de duplicação, regeneração e transplante para o conteúdo de DNA. A: Planta diploide. B: Planta haploide. C: Duplo-haploide. D: Tetraploide.

Note que em núcleos obtidos de plantas diploides, o ponto G1 para quantidade de DNA (2C) posicionou-se no ponto (canal) 3, identificado no histograma, sendo que o ponto (canal) 4, refere-se ao DNA em G2+M do ciclo celular. Para o indivíduo haploide, a quantidade de DNA de G1 se posiciona no ponto 2, refletindo metade do conteúdo de uma planta diploide (2C) desses núcleos e G2+M posicionado no ponto 3. Por outro lado, no duplo-haploide, a quantidade de DNA de G1 se posiciona no ponto 2 e 3, pois a duplicação não é completa, existindo assim uma pequena porção de células haploides mesmo após a duplicação. Os núcleos G2+M, se acumulam nos pontos 3 e 4, pelas mesmas razões. No tetraploide, obtidos quando diploides são duplicados, os núcleos G1, se acumulam nos pontos 3 e 4, da mesma forma, pois também não há duplicação completa dos núcleos 2C. Os núcleos G2+M, provenientes das células 2C não duplicadas também se acumulam no ponto 4.

Com base nos resultados da citometria de fluxo, as plantas regeneradas a partir dos embriões foram classificadas em haploides (não duplicados), diploides (não duplicados), duplo-haploides (embriões haploides que sofreram duplicação cromossômica em algum grau) e tetraploides (embriões diploides que apresentaram duplicação). Os dados obtidos foram sumarizados na Tabela 18.

Tabela 18. Nível de ploidia das plantas regeneradas após o tratamento para a duplicação.

Agente antimitótico	Genótipo-fonte	DAP*	Haploides	Diploides	Duplo-haploides	Tetraploides
Controle	B73	13	2	2	0	0
Controle	A188	15	7	10	1	0
Mix01	B73	13	2	4	0	2
Mix01	A188	15	4	6	1	1
Mix01	A188	12	5	5	0	1
Mix02	B73	13	2	0	2	0
Mix02	A188	15	4	3	1	2
Mix02	A188	12	5	10	1	0
Colchicina	B73	13	4	5	3	5
Colchicina	A188	15	7	3	2	0
Colchicina	A188	12	2	3	5	8

*DAP: Dias após a polinização.

O efeito dos antimitóticos na proporção de plântulas duplicadas (duplo-haploides+tetraploides) foi identificado com base na análise de *deviance* (Tabela 19), no entanto, sem efeito do genótipo-fonte ou da idade dos embriões coletados.

Tabela 19. Análise de *deviance* para proporção de plantas duplicadas ((DH+T)/Total) após o tratamento para duplicação, regeneração e transplante em casa de vegetação.

Fontes	DF¹	Deviance
Agente	3	12,21*
Genótipo-fonte	1	0,28 ^{ns}
DAP	2	0,29 ^{ns}

*Diferenças baseadas no teste de χ^2 a 5% de probabilidade.

¹DF: *Degree of freedom*.

A comparação das proporções de plantas duplicadas obtidas em relação aos diferentes agentes antimitóticos revela a superioridade da ação da colchicina para a duplicação cromossômica. O tratamento composto por colchicina a 0,05% por 12 horas proporcionou a duplicação de 48,94% dos embriões incubados (haploides+diploides) sobreviventes ao processo de regeneração (Tabela 20), seguidos pelos tratamentos mix02 (APM 50 uM + pronamida 10 uM) e mix01 (APM 10 uM + pronamida 2 uM), com uma proporção de duplicados de 16,13 e 20,00%, respectivamente. Entretanto, apesar de apresentarem efeito na duplicação, o desempenho da mistura desses herbicidas foi muito inferior (duas vezes menor) ao obtido para colchicina. A menor proporção de plântulas duplicadas foi observada, como esperado, para o tratamento controle, onde uma baixa proporção de duplicação foi observada, devido à duplicação espontânea (4,54%).

Tabela 20. Proporção de indivíduos com conjuntos cromossômicos duplicados após o período de regeneração.

Agente antimitótico	Indivíduos duplicados (DH+T)* (%)
Controle	4,54d ¹
Colchicina	48,94a
Mix01	16,13c
Mix02	20,00b

*DH: Duplo-haploides; T: tetraploides;

¹Média seguidas pela mesma letra não diferem entre para teste de Wald, para comparação entre os parâmetros estimados, a 5% de significância.

O tratamento com colchicina (0,05%) também se mostrou o mais efetivo ou eficiente na duplicação cromossômica em estudos realizados por diversos autores em milho (EDER e CHALYK, 2002; BATISTELLI et al., 2013; COUTO et al., 2015). Com relação à concentração adotada no Mix02, a maior concentração entre as misturas, essa se equivale a 15,21 mg L⁻¹ de APM e 2,56 mg L⁻¹ de pronamida, similares, portanto, as doses adotadas no trabalho de Melchinger et al. (2016) para duplicação em plântulas de milho. Estudando a duplicação cromossômica ocasionada por combinações variadas de APM e pronamida comparados à colchicina em plântulas, Melchinger et al. (2016) encontraram resultados similares ao tratamento com colchicina na concentração de 20 mg L⁻¹ de APM somada a 4 mg L⁻¹ de pronamida. Os autores identificaram menor sobrevivência de plântulas tratadas com a mistura de herbicidas, bem como menor proporção de plantas duplicadas que apresentaram os órgãos reprodutivos viáveis, quando comparados ao tratamento padrão com colchicina. No entanto, considerando a proporção de plantas duplicadas que produziram sementes, as proporções obtidas foram semelhantes, indicando que do ponto de vista de rendimento, os tratamentos APM + pronamida e colchicina se equivaleram.

Apesar de não superar o tratamento padrão com colchicina, o tratamento para a duplicação baseado na mistura de APM e pronamida pode ainda ser considerado promissor, principalmente, pelas características ligadas à toxicidade desses herbicidas. Ambos apresentam uma DL₅₀ dermal e oral muito inferior ao da colchicina. Considerada um agente mutagênico e prejudicial ao meio ambiente, o uso de colchicina carece de um adequado protocolo de descarte e neutralização, processos considerados caros para ser implementados em países em desenvolvimento (MELCHINGER et al., 2016). Como solução para esse problema, tem se estudado não só a busca por compostos menos tóxicos que possam ser adotados durante a fase de duplicação, bem como a seleção de genótipos-fonte com elevada porcentagem de duplicação espontânea, eliminando assim a dependência de um agente antimetabólico (SUGIHARA et al., 2013).

No presente trabalho, analisando a proporção de indivíduos duplicados (duplo-haploides e tetraploides), o mesmo tratamento considerado o mais eficiente em duplicar haploides, a colchicina, foi também o mais eficiente em duplicar os diploides. Melchinger et al. (2016) defendem que doses consideradas suficientes para duplicar diploides não são consideradas adequadas para duplicar haploides, por esses serem menos vigorosos. O

trabalho de Kato e Geiger (2002) e Kato e Birchler (2006) mostraram que, no entanto, o gás óxido nitroso foi adotado com sucesso tanto para duplicar diploides, gerando assim tetraploides, bem como gerar duplo-haploides a partir de haploides. Indicando que é possível considerar que os protocolos adotados na duplicação de diploides podem sim ser adotados como metodologia base para duplicação de haploides.

Os agentes antimitóticos são também tóxicos e prejudiciais ao ambiente celular e podem acarretar danos que comprometam o desenvolvimento e crescimento das plantas, seja por inibir o crescimento, por induzir mutações somáticas ou acarretar em morte celular (HANSEN et al., 1998). O fenótipo das plantas regeneradas sobreviventes pode ser observado nas Figuras 17 e 18.

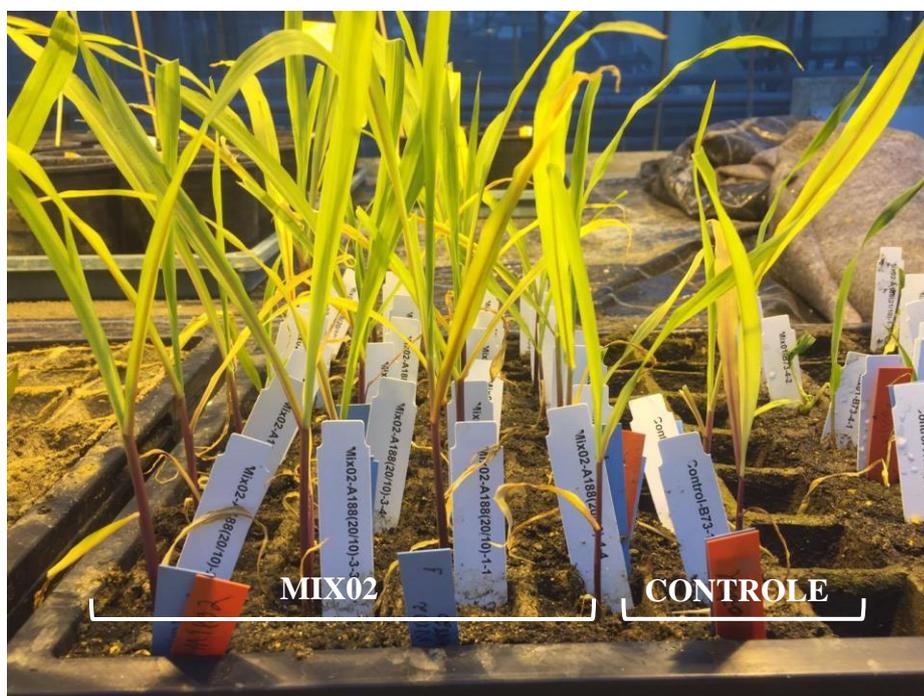


Figura 17. Plantas regeneradas em casa de vegetação após a duplicação em embrião, duas semanas após o transplante em solo. Da esquerda para direita, limitadas pelo sinal gráfico: mix02 (APM 50 μ M + Pronamida 10 μ M) e controle.

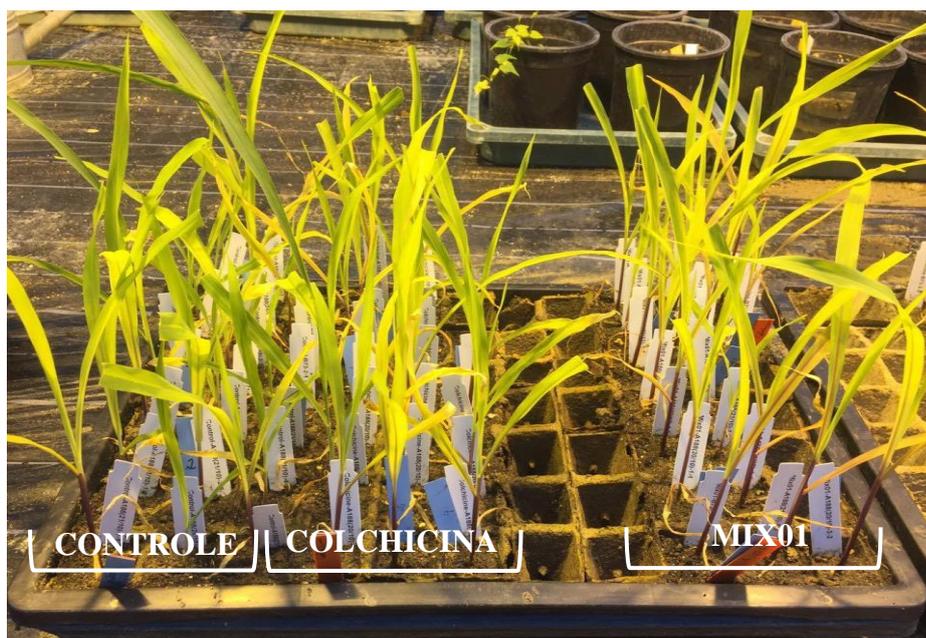


Figura 18. Plantas regeneradas em casa de vegetação após a duplicação em embrião, duas semanas após o transplante em solo. Da esquerda para direita, limitadas pelo sinal gráfico: controle, colchicina (0,05%) e mix01 (APM 10 uM + pronamida 2 uM).

O número de embriões sobreviventes após o tratamento de duplicação e o número de plantas regeneradas em casa de vegetação foi reunido na Tabela 21.

Tabela 21. Embriões sobreviventes após o tratamento de duplicação e na fase final de regeneração em casa de vegetação.

Agente antimitótico	Genótipo-fonte	DAP*	Embriões Incubados	Sobreviventes após a duplicação	Sobrevivência após o transplante
Controle	A188	15	19	18	18
Controle	B73	13	8	6	4
Colchicina	A188	12	18	18	18
Colchicina	A188	15	15	12	12
Colchicina	B73	13	21	20	13
Mix01	A188	12	15	10	11
Mix01	A188	15	17	12	12
Mix01	B73	13	21	20	9
Mix02	A188	12	21	21	11
Mix02	A188	15	15	13	10
Mix02	B73	13	20	19	4

*DAP: Dias após a polinização.

A mortalidade inicial de embriões, medida imediatamente após o tratamento de duplicação, foi avaliada. Segundo a análise de *deviance* para essa variável, nenhuma diferença para a proporção de sobreviventes em relação ao agente antimitótico adotado, idade do embrião no momento da coleta ou do genótipo-fonte influenciou a mortalidade de embriões recém-duplicados. No entanto, foi observado um efeito do genótipo-fonte na proporção final de sobreviventes após o período de regeneração (Tabela 22).

Tabela 22. Análise de *deviance* para proporção de embriões incubados sobreviventes após o tratamento de duplicação e após o período de regeneração.

Após o tratamento de duplicação			Após a fase de regeneração		
Fontes	DF ¹	<i>Deviance</i>	Fontes	DF ¹	<i>Deviance</i>
Agente	3	0,46 ^{ns}	Agente	3	4,23 ^{ns}
Genótipo-fonte	1	0,12 ^{ns}	Genótipo-fonte	1	5,40*
DAP	2	0,08 ^{ns}	DAP	2	0,01 ^{ns}

*Diferenças baseadas no teste de χ^2 a 5% de probabilidade.

¹DF: *Degree of freedom*.

A sobrevivência de embriões provenientes do genótipo A188 foi de 76,67% após o período final de tratamento, regeneração e transplante para casa de vegetação, sendo a sobrevivência para embriões coletados de B73 significativamente menor (42,86%) (Tabela 23). O sucesso da regeneração de plantas por cultura de tecidos é genótipo-dependente. Os genótipos A188 e B73 são comumente adotados em pesquisas envolvendo cultura de tecidos como a cultura de anteras ou resgate de embrião (KATO e BIRCHLER, 2006). O genótipo A188 apresenta pouco valor agrônômico, no entanto, é muito superior a outras linhagens de milho em sua capacidade para regenerar plantas a partir de calos embriogênicos, por exemplo. Apesar de apresentar uma proporção de plantas sobreviventes inferiores ao genótipo-fonte A188, os valores obtidos para o genótipo B73 podem também ser considerados satisfatórios para o resgate de embrião, uma vez que quase 50% dos embriões coletados e tratados chegaram ao estágio de plântula.

Tabela 23. Proporção de indivíduos sobreviventes após o período final de regeneração.

Genótipo-fonte	Indivíduos sobreviventes (%)
A188	76,67a ¹
B73	42,86b

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pela análise de *deviance* a 5% de significância.

Após a exposição à luz, embriões e plântulas regeneradas tendem a expressar pigmentação arroxeadada devido à presença de um sistema de marcador fenotípico, dependente de luz. A presença de genes *R* complementados pelos genes *B* e *PI* dominantes, presentes nos genótipos indutores, promovem a pigmentação em demais tecidos, como caule e coleóptilo em diploides provenientes do cruzamento entre o indutor e o genótipo-fonte (CHANDLER et al., 1989).

Da mesma forma que *RI-nj*, o qual codifica pigmentação por antocianina em sementes diploides, em embriões F1's provenientes de um cruzamento de indução, apresentam acúmulo gradual de antocianina no eixo embrionário bem como no caule de plântulas regeneradas. Assim, analogamente ao adotado em sementes, esse marcador fenotípico pode ser adotado para eliminação de diploides e/ou tetraploides, tanto em meio para embriões resgatados quanto mais tardiamente, na fase de crescimento de plântulas em estufa (Figura 19).



Figura 19. Expressão do marcador no caule em plantas regeneradas após o tratamento de duplicação. A: Planta diploide ou tetraploide. B: Planta haploide ou duplo-haploide.

A proporção de haploides putativos+duplo-haploides observados após a exposição dos embriões à luz, por 12 horas, bem como após o transplante das mesmas para estufa foram mensuradas. A análise de *deviance* para essas variáveis é apresentada na Tabela 24. Nos estádios iniciais de incubação, tanto o agente antimetabólico adotado como a idade dos embriões coletados (DAP), interferiram nas proporções de haploides putativos+duplo-haploides encontrados, enquanto que na fase final de regeneração, apenas o fator DAP influenciou na proporção de indivíduos pigmentados.

Tabela 24. Análise de *deviance* para haploides putativos+duplo-haploides classificados conforme a expressão de antocianina após as primeiras 12 horas de exposição à luz e ao final do período de regeneração.

Após o tratamento de duplicação			Após a fase de regeneração		
Fontes	DF ¹	<i>Deviance</i>	Fontes	DF ¹	<i>Deviance</i>
Agente	3	11,28*	Agente	3	5,66 ^{ns}
Genótipos-fonte	1	0,10 ^{ns}	Genótipos-fonte	1	0,21 ^{ns}
DAP	2	9,57*	DAP	2	6,91*

*Diferenças baseadas no teste de χ^2 a 10% de probabilidade.

¹DF: *Degree of freedom*.

A proporção de haploides putativos e duplo-haploides na fase inicial de incubação foram superiores para os tratamentos mix02 (80,35%), controle (62,96%) e mix01 (39,62%) e inferior para a colchicina (27,78%) (Tabela 25). As maiores taxas obtidas, não indicam, no entanto, que a maior proporção de haploides foi incubada para esses tratamentos, mas sim que o estresse provocado pelas altas concentrações dos herbicidas, possa ter promovido a inibição da pigmentação de antocianina nos estágios iniciais de incubação, por exemplo.

Tabela 25. Proporção de indivíduos haploides putativos+duplo-haploides obtidas para os diversos agentes antimetabólicos, conforme a expressão de antocianina, após 12 horas de exposição à luz.

Agente antimetabólico	Proporção de DH+H* (%)
Controle	62,96a ¹
Colchicina	27,78b
Mix01	39,62a
Mix02	80,35a

*DH: Duplo-haploides; H: haploides;

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre para teste de Wald, para comparação entre os parâmetros estimados, a 5% de significância.

Embriões com maior DAP tenderam a apresentar maior proporção de haploides putativos e/ou haploides duplicados (DH) tanto na fase recente de incubação quanto nas fases finais de regeneração (Tabelas 26 e 27). Considerando que as taxas de indução são similares, uma maior proporção para essa variável indica a redução de pigmentação, sendo essa inibida por fatores do meio, especialmente afetada pela idade dos embriões. Assim, maiores taxas de falsos positivos (diploides ou tetraploides) devem ser observados em embriões coletados com maior DAP uma vez que a idade do embrião no momento da coleta influenciou na proporção de plantas não pigmentadas.

Tabela 26. Proporção de indivíduos haploides putativos+duplo-haploides para os diferentes DAP dos embriões, conforme a expressão de antocianina, após 12 horas de exposição à luz.

DAP*	Proporção de DH+H ² (%)
12	29,63b ¹
13	48,57a
15	72,72a

*DAP: Dias após a polinização;

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre para teste de Wald, para comparação entre os parâmetros estimados, a 5% de significância.

²DH: duplo-haploides; H: haploides.

Maiores proporções de indivíduos pigmentados foram encontradas para a classificação precoce em embriões (Tabela 26) do que pela classificação tardia na estufa (Tabela 27), refletindo tanto a mortalidade que é maior na fase de regeneração, quanto à facilidade de observação da expressão de antocianina, que é mais bem visualizada no estágio de plântula quando comparado ao de embrião. Em média, maiores proporções para essa variável foram observadas para os embriões coletados aos 15 (72,72%) e 13 (48,57%) DAP, seguido da proporção obtida para 12 DAP (29,63%) (Tabela 26). Nas fases finais de regeneração, o mesmo comportamento para pigmentação por antocianina que na fase inicial de incubação foi observado. As maiores proporções foram também encontradas para 15 (46,86%) e 13 (34,37%) DAP, seguida da proporção de 16,90% para 12 DAP (Tabela 27).

Tabela 27. Proporção de indivíduos haploides putativos+duplo-haploides para os diferentes DAP dos embriões, conforme a expressão de antocianina, após o período final de regeneração.

DAP*	Proporção de DH+H ² (%)
12	16,90b ¹
13	34,37a
15	46,86a

*DAP: Dias após a polinização;

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre para teste de Wald para comparação entre os parâmetros estimados a 5% de significância.

²DH: duplo-haploides; H: haploides.

O uso do marcador fenotípico tem papel importante para eliminação de plantas diploides em estádios iniciais de incubação bem como em fase de pré-transplante de plantas

duplicadas regeneradas para o campo. No entanto a expressão de antocianina em tecidos assim como em sementes, tem penetrância incompleta e expressividade variável, indicando que a presença de fatores de transcrições presentes no genótipo-fonte podem inibir a pigmentação em diploides ou ainda ocorrer expressão em tons variados na pigmentação (BELICUAS et al., 2007; CHAIKAM et al, 2016). Chandler et al. (1989) cita que a presença do gene *PI* não é condição essencial para pigmentação em tecidos se os genes *B* ou *R* estão presentes. Nesse caso, o gene *PI* atuaria como um intensificador da cor, reduzindo a dependência de luz para expressão, conferindo uma matiz variada de tons de antocianina dependente tanto da condição genética do indivíduo quanto da interação genótipo-ambiente.

Nesse sentido, a eficiência desse marcador em selecionar diploides e tetraploides em meio a plantas regeneradas foi avaliada quanto à eficiência, quando comparado ao resultado de citometria de fluxo como referência.

Os dados obtidos para classificação pelo marcador fenotípico expresso no caule em comparação com a citometria de fluxo foram reunidos na Tabela 28. Uma taxa de FNR ($FNR = FN / (FN + TP)$) igual a 70,69% e uma FDR ($FDR = FP / (FP + TP)$) de 22,73% foi observada para esse marcador. A FDR mede a proporção de diploides ou tetraploides classificados como haploides ou DHs em relação ao total de plantas classificadas como haploides+duplo-haploides pela expressão do marcador fenotípico no caule. A FNR, por sua vez, diz respeito às plantas haploides+duplo-haploides reais (pelo *gold standard*) classificadas como diploides ou tetraploides pelo marcador fenotípico, em relação ao total de haploides+duplo-haploides pelo *gold standard*.

Tabela 28. Tabela de contingência gerada para comparação de classificação das plantas regeneradas por meio do marcador fenotípico e citometria.

		Citometria (<i>gold</i>)	
		<i>H+DH</i>	<i>D+T</i>
Pigmentação do caule	<i>H+DH</i>	17 = <i>TP*</i>	5 = <i>FP</i>
	<i>D+T</i>	41 = <i>FN</i>	64 = <i>TN</i>

**TP*= True positive; *TN*= True negative; *FP*= False positive; *FN*= False negative.

Uma baixa FDR foi observada para o marcador fenotípico, indicando que a proporção de Falsos Positivos (diploides ou tetraploides erroneamente classificados como haploides ou duplo-haploides) é mais corretamente discriminada. A grande FNR detectada nesse caso indica que a classificação de Falsos Negativos (haploides ou duplo-haploides erroneamente classificados como diploides ou tetraploides) nesse sistema é grande, ou seja, apenas 22,73% das plantas selecionadas como haploides ou DHs são de fato haploides ou duplo-haploides, conforme a ausência de pigmentação roxa no caule foi corretamente classificada. Dessa forma, é possível concluir que esse marcador morfológico não é seguro para evitar que haploides ou duplo-haploides sejam eliminados após a duplicação.

O teste χ^2 de McNemar (1947), corrigido para continuidade, foi realizada com o objetivo de avaliar se as classificações entre a citometria de fluxo e o marcador fenotípico no caule se equivalem de forma geral. Com valor de 26,63 de χ^2 calculado (*p-valor* de $2,463 \times 10^{-7}$) e portanto superior ao χ^2 tabelado de 3,84, para 1 grau de liberdade a 5% de significância, a hipótese H0 foi rejeitada. Assim, foi possível concluir que, avaliando o comportamento geral, esses testes diagnósticos não se equivalem, indicando que a coloração do caule por antocianina não é um bom marcador para separar haploides e duplo-haploides de diploides e tetraploides, quando comparado aos resultados obtidos por citometria de fluxo.

4. CONCLUSÕES

- O tratamento com colchicina 0,05% foi considerado o mais eficiente para duplicar cromossomos por meio do resgate de embrião, no entanto, a combinação APM (50 μ Mol) + pronamida (10 μ Mol) também foi promissor;
- Os agentes antimitóticos não interferem na sobrevivência de embriões incubados, sendo a mortalidade relacionada ao genótipo-fonte do qual os embriões são coletados;
- A proporção de haploides putativos obtidos durante a fase de embrião e de plântula, segundo a expressão por antocianina, é maior quanto mais maduro é o embrião coletado;
- Os marcadores morfológicos não é seguro para evitar que haploides ou duplo-haploides sejam eliminados após a duplicação.

5. REFERÊNCIAS

- BARTON, J. E., MADDOCK, S. E., WU, X. E., ZHAO, Z. Y., WILLIAMS, M. E., HUSSAIN, T., GORDON-KAMM, W. J., inventores; Pioneer Hi-Bred International, Inc., E. I. Du Pont De Nemours And Company., requerentes. **Doubling of chromosomes in haploid embryos**. United States patent US WO2007038075 A1, 2007.
- BATTISTELLI, G. M. VON PINHO, R.G., JUSTUS, A. COUTO, E.G.O. BALESTRE, M. Production and identification of doubled haploids in tropical maize. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 4230-4242, 2013.
- BEAUMONT, V. H., WIDHOLM, J. M. Ploidy variation of pronamide-treated maize calli during long term culture. **Plant Cell Reports**, v. 12, n. 11, p. 648-651, 1993.
- BELICUAS, P. R., PAIVA, L. V., GUIMARÃES, C. A. T., PAIVA, L. E. Androgenetic haploids and SSR markers as tools for the development of tropical maize hybrids. **Euphytica**, v. 156, n. 1-2, p. 95-102, 2007.
- CASTILLO, A. M., VALLES, M. P., CISTUÉ, L., CASTÁN, M. S. Chromosome doubling in monocots. Advances in Haploid Production in Higher Plants. In: **Advances in haploid production in higher plants**. [s.l.] New York: Springer Science, p. 329-338, 2009.
- CHAIKAM, V., MARTINEZ, L., MELCHINGER, A. E., SCHIPPRACK, W., BODDUPALLI, P. Development and validation of red root marker-based haploid inducers in maize. **Crop Science**, v. 56, n. 4, p. 1678-1688, 2016.
- 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 utilizingR genomic sequences. **Plant Cell**, v. 1, p. 1175-1183, 1989.
- CHASE, S. S. Monoploids and monoploid-derivatives in maize (*Zea mays* L.). **The Botanical Reviews**, v. 35, p. 117-167, 1969.
- COUTO, E. G. O., VON PINHO, E. V. R., VON PINHO, R. G., VEIGA, A. D., BUSTAMANTE, F. O., DIAS, K. O. G. In vivo haploid induction and efficiency of two chromosome duplication protocols in tropical maize. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 39, n. 5, p. 435-442, 2015.
- DOLEZEL, J. Application of flow cytometry for the study os plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, v. 38, n. 3, p. 285-302, 1997.
- EDER, J., CHALYK, S. In vivo haploid induction in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, n. 4, p. 703-708, 2002.

GALBRAITH, D. W., HARKINS, K. R., MADDOX, J. M., AYRES, N. M., SHARMA, D. P., FIROOZABADY, E. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. **Science**, v. 220, p. 1049-1051, 1983.

HANSEN, A. L., GERTZ, A., JOERSBO, B., ANDESRSEN, S. B. Antimicrotubule herbicide for in vitro chromosome doubling in *Beta vulgaris* L. ovule culture. **Euphytica**, v. 101, p. 231-237, 1998.

HRAC - **Herbicide Resistance Action Committee**. Herbicide mode of action table. Disponível em: <http://www.hracglobal.com/Education/ClassificationofHerbicideSiteofAction.aspx>. Acesso em: 14/03/2017.

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

KATO, A., BIRCIJLER, J. A. Induction of tetraploid derivatives of maize inbred lines by nitrous oxide gas treatment. **Journal of Heredity**, v. 97, n. 1, p. 39-44, 2006.

KATO, A., GEIGER, H. H. Chromosome doubling of haploid maize seedlings using nitrous oxide gas at the flower primordial stage. **Plant Breeding**, v. 121, n. 5, p-270-377, 2002.

LOUREIRO, J., RODRIGUEZ, E., DOLEŽEL, J., SANTOS, C. Flow cytometric and microscopic analysis of the effect of tannic acid on plant nuclei and estimation of DNA content. **Annals of Botany**, v. 98, p. 515-527, 2006.

MCNEMAR, Q. Note on the sampling error of the difference between correlated proportions or percentages. **Psychometrika**, v. 12, n. 2, p. 153-157, 1947.

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

MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, 1962.

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

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

PRASANNA, B.M., CHAIKAM, V., MAHUKU, G. **Doubled Haploid. Technology in Maize Breeding: Theory and Practice**, 50p. CYMMIT, 2012.

PRATAP, A., SETHI, G. S., CHAUDHARY, H. K. Relative efficiency of different Gramineae genera for haploid induction in triticale and triticale × wheat hybrids through chromosome elimination technique. **Plant Breeding**, v. 124, p.147-153, 2005.

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2015, url = {<https://www.R-project.org/>}.

RIERA-LIZARAZU, O., RINES, H. W., PHILLIPS, R. L. Cytological and molecular characterization of oat x maize partial hybrids. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 93, p. 123-135, 1996.

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

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

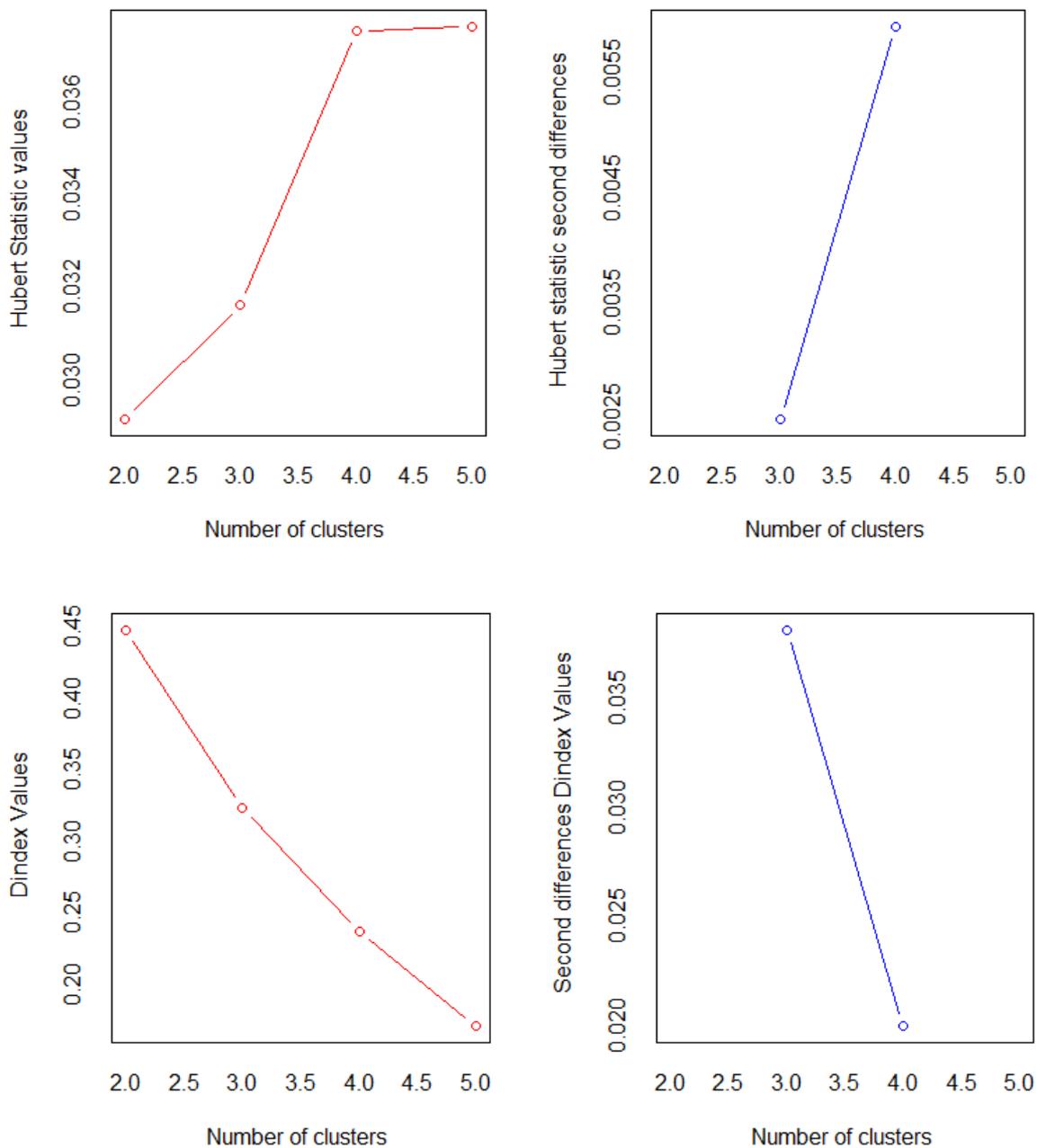
SINGH, S., SETHI, G.S., CHAUDHARY, H. K. Differential responsiveness of winter and spring wheat genotypes to maize-mediated production of haploids. **Cereal Research Communications**, v. 32, p. 201-207, 2004.

SUGIHARA, N., HIGASHIGAWA, T., ARAMOTO, D., KATO, A. Haploid plants carrying a sodium azide-induced mutation (*fdr1*) produce fertile pollen grains due to first division restitution (FDR) in maize (*Zea mays* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 126, n. 2, p. 2931-2941, 2013.

WEISING, K., SCHELL, J., KAHL, G. Foreign genes in plants: transfer, structure, expression, and applications. **Annual Review of Genetics**, v. 22, p. 421-477, 1988.

WEYMANN, K., URBAN, A., ELLIS, D. M., NOVITZKY, R., DUNDER, E., JAYNE, S., PACE, G. Isolation of transgenic progeny of maize by embryo rescue under selective conditions. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 29, n. 1, p. 33-37, 1993.

APÊNDICE A1 - Saída do pacote “Nbclust” para o número ideal de grupos para a safra 1



Testes diagnósticos para número de *clusters* ideais para genótipos-fonte dentro de Safra 1, através do índice de Hubert e índice D.

***: The Hubert index is a graphical method of determining the number of clusters. In the plot of Hubert index, we seek a significant knee that corresponds to a significant increase of the value of the measure i.e the significant peak in Hubert index second differences plot.

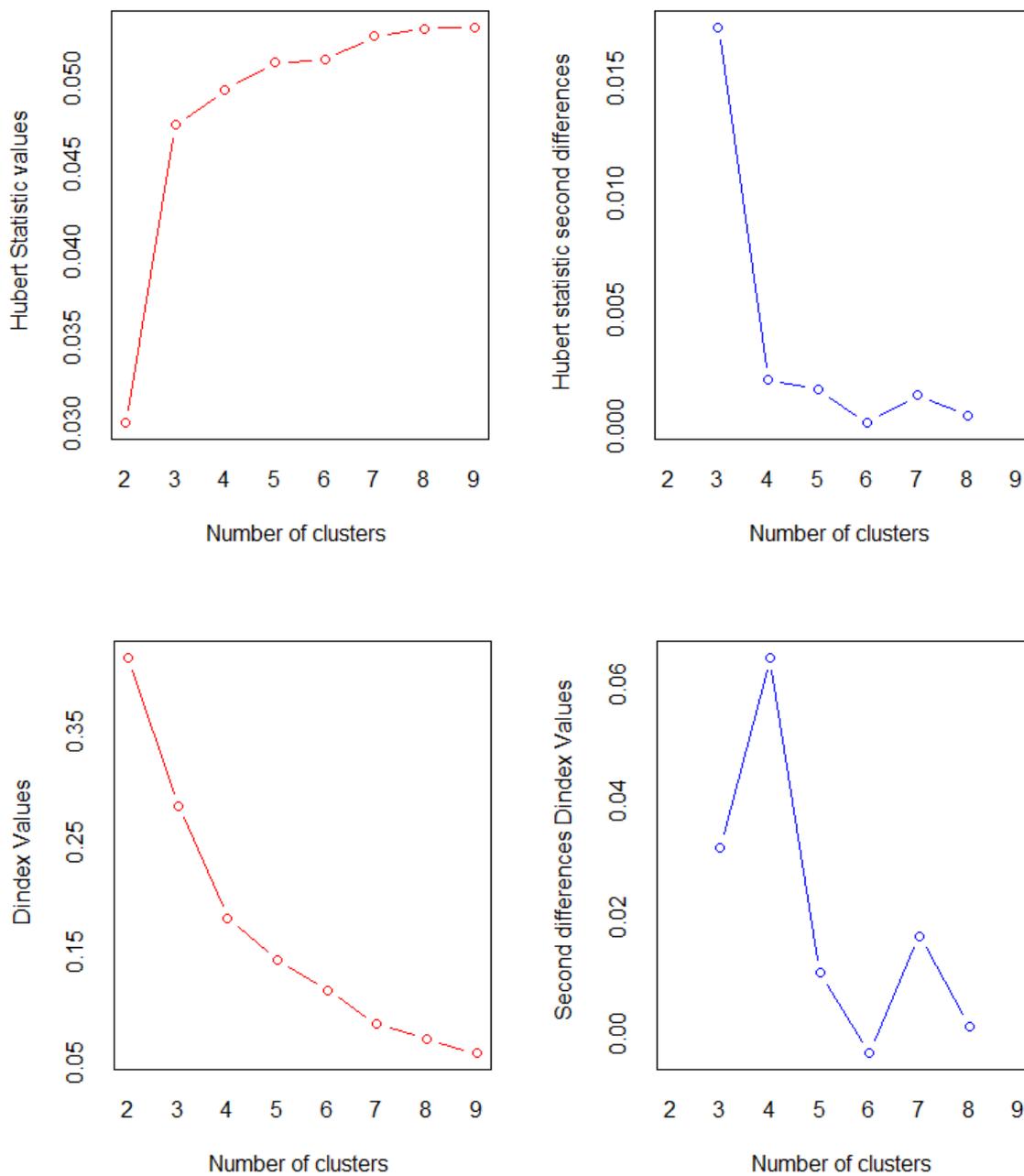
***: The D index is a graphical method of determining the number of clusters. In the plot of D index, we seek a significant knee (the significant peak in Dindex second differences plot) that corresponds to a significant increase of the value of the measure.

- * Among all indices:
- * 2 proposed 2 as the best number of clusters
- * 2 proposed 4 as the best number of clusters
- * 2 proposed 5 as the best number of clusters

***** Conclusion *****

* According to the majority rule, the best number of clusters is 2.

APÊNDICE A2 - Saída do pacote “Nbclust” para o número ideal de grupos obtidos para a safra 2



Testes diagnósticos para número de *clusters* ideais para genótipos-fonte dentro de Safra 2, através do índice de Hubert e índice D.

***: The Hubert index is a graphical method of determining the number of clusters. In the plot of Hubert index, we seek a significant knee that corresponds to a significant increase of the value of the measure i.e the significant peak in Hubert index second differences plot.

***: The D index is a graphical method of determining the number of clusters. In the plot of D index, we seek a significant knee (the significant peak in Dindex second differences plot) that corresponds to a significant increase of the value of the measure.

- * Among all indices:
- * 3 proposed 3 as the best number of clusters
- * 1 proposed 5 as the best number of clusters
- * 2 proposed 8 as the best number of clusters

***** Conclusion *****

- * According to the majority rule, the best number of clusters is 3.

APÊNDICE B1 - Coeficientes de Jaccard obtidos por *bootstrap* para a estabilidade dos *clusters* formados para taxa de indução na Safra 1

Grupos	
1	2
0,86*	0,81*

*Valores de coeficiente de Jaccard acima de 0,60 indicam estabilidade dos *clusters*.

APÊNDICE B2 - Coeficientes de Jaccard obtidos por *bootstrap* para estabilidade dos *clusters* formados para taxa de indução na Safra 2

Grupos		
1	2	3
0,81*	0,91*	0,67*

*Valores de coeficiente de Jaccard acima de 0,60 indicam estabilidade dos *clusters*.

APÊNDICE C1 - Desdobramento de genótipos dentro do fator Safra 1 para a taxa de haploides putativos

Safra 1			
Genótipos-fonte	Parâmetros estimados	Taxas médias observadas (%)	Agrupamentos por contrastes
30B30	-2,42	8,25	blp
30B39H	-2,55	7,18	lop
30F35	-2,80	5,56	knop
30F53H	-2,21	5,48	ilp
30F80	-2,52	4,18	ablop
30K64Y	-2,13	14,67	cil
AG1051	-1,86	13,23	i
AG7088	-4,24	0,91	d
AG8021	-3,00	5,80	jkmno
AG8088	-3,62	3,37	dgj
AG9040	-2,77	6,75	cknop
BR427	-0,82	14,69	h
BRDOCE	-2,30	10,31	ilop
CARGO	-2,71	6,52	lmop
CD308	-3,09	3,72	fgmno
CD321	-3,39	3,09	dfgkmn
CD356	-3,58	3,63	dfj
CD382	-3,30	4,86	dfgkm
CD387	-3,21	3,60	adfgkmn
CUBANO	-3,78	3,22	dfgk
DKB245	-2,69	7,02	aop
DKB330Y	-2,88	7,27	gnop
DKB370	-3,96	1,75	de
DKB390VTPRO	-3,21	3,32	fgmn
DOCE2	-2,93	5,37	efgklmnop
FORMULA	-2,93	10,69	jkmnop
HD332	-2,76	5,18	glnop
HT392	-2,58	7,72	lnp
HT932	-2,36	11,96	blp
IAC112	-1,92	18,21	hijklmnop
IPR119	-2,85	9,44	gnop
P30F36	-2,72	5,17	cmop
P3431H	-2,74	8,51	mop
P4285	-3,89	1,84	df
S130F53	-2,57	5,42	lop
S1BR427	-2,02	10,35	il
S1CARGO	-1,63	10,23	bhi
S1P2530	-1,73	13,16	i
S1P3989	-1,70	13,17	i
SPEEDTL	-2,73	7,99	mop
STATUS	-2,32	9,61	ilp
Média		7,38	

Taxas médias apresentando a mesma letra na mesma linha não diferem entre si pelo teste T (com *p-valor* corrigido por *fdr*) para o contraste entre os parâmetros.

APÊNDICE C2 - Desdobramento de genótipos dentro do fator safra 2 para a
taxa de haploides putativos

Safra 2			
Genótipos-fonte	Parâmetros estimados	Taxas médias observadas (%)	Agrupamentos por contrastes
30B30	-3,60	2,20	ijklm
30B39H	-2,42	7,53	gh
30F35	-3,08	8,37	kl
30F53H	-2,70	4,05	abhl
30F80	-2,81	5,21	abhlm
30K64Y	-3,06	4,73	kl
AG1051	-2,09	8,13	ag
AG7088	-4,10	1,79	ij
AG8021	-2,91	4,54	bhlm
AG8088	-3,46	3,16	ijklm
AG9040	-3,57	2,72	ijklm
BR427	-3,11	3,80	ehlm
BRDOCE	-2,34	9,18	bg
CARGO	-2,38	9,11	gh
CD308	-4,50	0,86	di
CD321	-3,18	2,50	elm
CD356	-3,24	4,48	djklm
CD382	-3,46	2,67	cijklm
CD387	-2,83	6,58	bhlm
CUBANO	-2,95	5,78	ghijklm
DKB245	-2,93	4,77	bhklm
DKB330Y	-2,08	10,95	g
DKB370	-3,43	4,06	ijklm
DKB390VTPRO	-3,41	3,94	ijklm
DOCE2	-4,00	1,54	fijklm
FORMULA	-4,24	1,45	i
HD332	-3,42	2,65	ijklm
HT392	-3,45	5,69	ijklm
HT932	-2,92	14,77	ghijklm
IAC112	-1,87	26,67	ghijklm
IPR119	-3,40	3,91	ijklm
P30F36	-2,48	7,82	fgl
P3431H	-4,32	1,28	eij
P4285	-3,80	1,88	eik
S130F53	-2,37	8,61	gh
S1BR427	-3,44	9,31	ghijklm
S1CARGO	-2,81	5,40	bchl
S1P2530	-3,19	3,08	dhijklm
S1P3989	-2,90	3,97	bhlm
SPEEDTL	-3,34	2,89	ijklm
STATUS	-4,14	1,19	eij
Média		5,44	

Taxas médias apresentando a mesma letra na mesma linha não diferem entre si pelo teste T (com *p*-valor corrigido por *fdr*) para o contraste entre os parâmetros.

APÊNDICE D1 - Exemplo da disposição dos dados na tabela de contingência. TP= *True positives*, TN= *True negatives*, FP= *False positives* e FN= *False negatives*

		Gold	
		<i>D</i>	<i>H</i>
Estômatos	<i>D</i>	TP	FP
	<i>H</i>	FN	TN

APÊNDICE D2 - Tabelas de contingência para o teste diagnóstico comprimento de células-guarda na classificação de haploides e diploides

Folha 2				Folha 3				Folha 4			
<i>Gold</i>				<i>Gold</i>				<i>Gold</i>			
Estômatos		D	H	Estômatos		D	H	Estômatos		D	H
	D		251		3	D			485	0	D
H		33	5	H		38	16	H		-	-

<i>Gold</i>				<i>Gold</i>				<i>Gold</i>			
Estômatos		D	H	Estômatos		D	H	Estômatos		D	H
	D		501		10	D			535	6	D
H		23	61	H		57	107	H		16	102

<i>Gold</i>				<i>Gold</i>				<i>Gold</i>			
Estômatos		D	H	Estômatos		D	H	Estômatos		D	H
	D		575		8	D			468	11	D
H		39	94	H		83	76	H		73	72