

JEAN PAULO APARECIDO DA SILVA

**HAPLOIDES DE MILHO-PIPOCA IDENTIFICADOS PELO FENÓTIPO NAVAJO E
PELA CITOMETRIA DE FLUXO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: José Marcelo Soriano Viana

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S586h
2022
Silva, Jean Paulo Aparecido da, 1996-
Haploides de milho-pipoca identificados pelo fenótipo
navajo e pela citometria de fluxo / Jean Paulo Aparecido da
Silva. – Viçosa, MG, 2022.
1 dissertação eletrônica (37 f.): il.

Orientador: José Marcelo Soriano Viana.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Geral, 2022.
Referências bibliográficas: f. 34-37.
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.696>
Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Zea mays* L. var. *everta*. 2. Milho pipoca -
Melhoramento genético. 3. Citometria de fluxo. 4. Penetrância.
I. Viana, José Marcelo Soriano, 1963-. II. Universidade Federal
de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de
Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. III. Título.

CDD 22. ed. 633.152

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto Pires CRB-6/2523

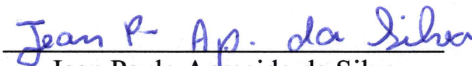
JEAN PAULO APARECIDO DA SILVA

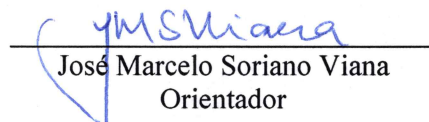
**HAPLOIDES DE MILHO-PIPOCA IDENTIFICADOS PELO FENÓTIPO NAVAJO E
PELA CITOMETRIA DE FLUXO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 25 de agosto de 2022.

Assentimento:


Jean Paulo Aparecido da Silva
Autor


José Marcelo Soriano Viana
Orientador

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Sebastião e Heli por serem meu amparo e apoiarem a conseguir essa conquista, com todo amor.

Ao meu orientador professor José Marcelo Soriano Viana pelos grandes ensinamentos, apoio e suporte.

Ao professor Wellington Ronildo Clarindo, por todo auxílio, suporte, disponibilidade, pelos grandes ensinamentos, pelas oportunidades e descontração.

Ao professor Kaio Olímpio Das Graças Dias Plínio, pelos ensinamentos, suporte e oportunidades a mim dadas.

Aos grandes, membros do Laboratório de Pesquisa em Citogenética e Citometria da UFV, pelo acolhimento, companheirismo, ensinamentos e momentos de descontração e alegria, especialmente a Jéssica.

Aos grandes amigos, membros do programa de Melhoramento de milho-pipoca da UFV, pela união, companheirismo, ensinamentos e momentos de descontração e alegria e a todos os amigos e familiares que de alguma forma fazem parte da minha história.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Melhoramento de Plantas pela oportunidade de cursar o mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

SILVA, Jean Paulo Aparecido, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2022.
Haploides de milho-pipoca identificados pelo fenótipo Navajo e pela citometria de fluxo.
Orientador: José Marcelo Soriano Viana.

Na produção de linhagens duplo-haploides (DH) inicialmente é necessário obter indivíduos haploides e que se tenha disponíveis ferramentas capazes de identifica-los. Em milho-pipoca a obtenção e identificação de haploides ainda são desafios. Visto isso, o objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência e magnitude de indução *in vivo* de haploides maternos em milho-pipoca (*Zea mays L. var. everta*), a expressão do marcador *RI-nj* e sua eficiência isoladamente e associada a avaliação do vigor de plântulas em germoplasma de origem tropical e temperado de diferentes bases genéticas. O experimento foi conduzido na safra 2021/2022, em Viçosa, Estado de Minas Gerais, em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Para a indução de haploides foi utilizado à população temperada KHI (Krasnodar Haploid Inducer), em cruzamentos com 20 fontes de germoplasma de milho-pipoca e cinco testemunhas de milho. Os cruzamentos de indução ocorreram de forma natural, em campo isolado. As variáveis analisadas foram: penetrância do *RI-nj*, taxa de indução de haploidia (HIR), e as taxas de falsas descobertas (FDR) e de falsos negativos (FNR) utilizando como “padão ouro” citometria de fluxo. As variáveis HIR e penetrância foram analisadas através de um modelo linear generalizado (GLM), com função de ligação logit. Através da análise de deviance, foram encontrados efeitos significativos para as fontes de germoplasma ($p < 0,01$) e não significativas para repetições ($p > 0,05$), para a variável HIR. Para penetrância, os efeitos foram significativos tanto para fontes de germoplasma quanto para repetições ($p < 0,01$). O coeficiente de correlação de Matthews (MCC) foi utilizado para estimar a correlação entre o nível de ploidia determinado pelo fenótipo Navajo e os níveis de ploidia determinados pelo “padrão ouro”. Haploides foram identificados através de indução *in vivo* em todas as fontes de germoplasma e confirmados por CF. A penetrância do marcador *RI-nj* é variável em função da origem e base genética do germoplasma-fonte. A seleção de haploides pelo fenótipo Navajo associada à avaliação do vigor de plântulas reduz as taxas de erro de classificação.

Palavras-Chave: *Zea mays L. var. everta*. Indução de haploides. Citometria de fluxo. Penetrância

ABSTRACT

SILVA, Jean Paulo Aparecido da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2022. **Haploids identified in popcorn by phenotype Navajo and flow cytometry.** José Marcelo Soriano Viana.

In the production of double-haploid (DH) strains, it is initially necessary to obtain haploid individuals and to have available tools capable of identifying them. In popcorn, obtaining and identifying haploids are still challenges. Therefore, the objective of this work was to verify the occurrence and magnitude of in vivo induction of maternal haploids in popcorn (*Zea mays* L. var. *everta*), the expression of *R1-nj* marker and its efficiency alone and associated with the evaluation of seedling vigor in germplasm of tropical and temperate origin of different genetic bases. The experiment was carried out in the 2021/2022 harvest, in Viçosa, State of Minas Gerais, in a completely randomized design, with three replications. For the induction of haploids, the temperate population KHI (Krasnodar Haploid Inducer) was used in crosses with 20 sources of popcorn germplasm and five corn controls. The induction crosses occurred naturally, in an isolated field. The variables analyzed were: *R1-nj* penetrance, haploidy induction rate (HIR), and false discovery (FDR) and false negative (FNR) rates using flow cytometry as the “gold standard”. The variables HIR and penetrance were analyzed using a generalized linear model (GLM), with logit linkage function. Through the deviance analysis, significant effects were found for the sources of germplasm ($p < 0.01$) and non-significant effects for repetitions ($p > 0.05$), for the variable HIR. For penetrance, the effects were significant for both germplasm sources and replicates ($p < 0.01$). The Matthews correlation coefficient (MCC) was used to estimate the correlation between the ploidy level determined by the Navajo phenotype and the ploidy levels determined by the “gold standard”. Haploids were identified by in vivo induction in all germplasm sources and confirmed by CF. The penetration of the *R1-nj* marker is variable depending on the origin and genetic basis of the source germplasm. The selection of haploids by the Navajo phenotype associated with the evaluation of seedling vigor reduces the classification error rates.

Keywords: *Zea mays* L. var. *everta*. Haploid induction. Flow cytometry. Penetrance;

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	OBJETIVOS.....	9
2.1	Objetivo geral	9
2.2	Objetivos específicos	9
3	REFERENCIAL TEÓRICO	10
3.1	Milho-pipoca	10
3.2	Indução de haploidia.....	11
3.3	Identificação de haploideS	14
3.3.1	Marcadores morfológicos	14
3.3.2	Citometria de fluxo.....	16
3.4	Duplicação cromossômica artificial	16
4	MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1	Local	18
4.2	Material genético	19
4.3	Cruzamentos de indução.....	20
4.4	Identificação de haploides	20
4.4.1	Fenótipo navajo	20
4.4.2	Vigor de plântulas.....	21
4.4.3	Citometria de fluxo.....	22
4.5	Análise estatística dos dados	22
5	RESULTADOS	24
5.1	Penetrância do marcador <i>R1-nj</i>	24
5.2	Erro de classificação haploide/diploide utilizando o fenótipo navajo	25
5.3	Taxa de indução do indutor KHI	27
6	DISCUSSÃO.....	30
7	CONCLUSÕES.....	33
	REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

O milho pipoca é um tipo especial de milho, apresentando algumas características que o diferem do milho comum, por exemplo, grãos menores, maior prolificidade, menor vigor e maior suscetibilidade a doenças. No entanto, a maior diferença é sua capacidade de expandir (LARISH; BREWBAKER, 1999). Essas diferenças consequentemente refletem nos objetivos e nas estratégias utilizadas em um programa visando o melhoramento genético deste tipo especial de milho, principalmente porque além de produtividade a qualidade da pipoca se torna extremamente importante para a comercialização dos grãos. No entanto, em ambos os casos os programas de melhoramento são focados na síntese de híbridos. Para isso é necessário à obtenção de linhagens. Durante o século XX, o desenvolvimento de linhagens em milho baseou-se quase exclusivamente em seis a oito gerações de autofecundação recorrentes e seleção para atingir o nível desejado de homozigotidade (CARENA; HALLAUER; MIRANDA FILHO, 2010), sendo a etapa mais demorada e de custo mais elevado (PATERNIANI; CAMPOS, 2005).

Uma alternativa que permite a obtenção de linhagens de forma rápida, aumento nos ganhos genéticos e precisão de seleção, além de reduzir custos e aumentar a eficiência na produção de híbridos é uso linhagens duplo-haploides (DH). Sementes haploides podem ocorrer naturalmente no milho, em diferentes taxas e podem ser induzidas por meio de diferentes métodos. Os indivíduos haploides derivados dessas sementes, após terem os seus genomas duplicados darão origem as linhagens DH. De forma simplificada, o desenvolvimento dessas linhagens em milho envolve indução de sementes com embrião haploide, identificação destas sementes por meio de marcador morfológico, duplicação do genoma, e semeadura em campo para multiplicação das sementes das linhagens duplicadas (linhagens DH₀) (PRIGGE; MELCHINGER, 2012).

A duplicação cromossômica pode ser espontânea ou por indução com diferentes tratamentos envolvendo bloqueadores do ciclo celular. Para que os indivíduos haploides recuperem sua fertilidade, os cromossomos de células que levam à formação de órgãos reprodutivos devem ser duplicados. Este processo de duplicação produz um diploide, 100% homozigoto, portanto, resulta em linhagens com 100% dos locos em homozigose, desconsiderando a ocorrência de mutação. Após a duplicação do genoma, a divisão redutora é possível e a meiose leva à formação de pólen fértil e oosfera. No entanto, algumas populações de milho usadas para extração de linhagens DH, dobram seus cromossomos em baixas taxas (<1%), mesmo após passar por um tratamento de duplicação, levando a redução da variação

selecionável em programas de melhoramento quando aplicado a tecnologia DH (MOLENAAR et al., 2019). Isso ocorre mais comumente em milho-pipoca, em contraste a maior parte dos tratamentos de duplicação foram desenvolvidos para milho comum, o que pode justificar o estudo de protocolos específicos para este tipo especial de milho.

Diferentes métodos são usados para indução, sendo a indução *in vivo* através de indutores gimnogenéticos, em que o indutor é utilizado como doador de pólen, prevalecente. A identificação de haploides pode ser realizada por marcadores morfológicos, contagem de cromossomos, citometria de fluxo, marcadores moleculares e dentre outras abordagens.

Distinguir sementes haploides daquelas oriundas de fertilização regular é um ponto chave na produção de linhagens DH (RIBEIRO et al., 2018). Essa diferenciação é feita principalmente com base no marcador de embrião roxo, que é codificado pelo fator de transcrição *R1-nj* (GEIGER; GORDILLO). No entanto, a incapacidade de identificar haploides devido à inibição completa ou parcial deste marcador e sua expressividade variada, é uma limitação crítica para produção de linhagens DH em muitas fontes de germoplasma (CHAIKAM et al., 2015). A inibição do marcador *R1-nj* pode limitar o uso da tecnologia DH em programas de melhoramento de milho com os indutores haploides atualmente disponíveis que não possuem sistemas de marcadores alternativos ou complementares para a seleção de haploides (CHAIKAM et al., 2015). Além da inibição de cor, a expressividade variada do marcador *R1-nj*, tanto para área marcada, quanto para a intensidade da cor da antocianina no endosperma e embrião afetam a eficiência da identificação de haploides. Em alguns genótipos, toda a área do endosperma expressa o fenótipo Navajo, enquanto em outros genótipos apenas a região de fixação do estilo-estigma é marcada, baixa expressividade da área marcada e intensidade de coloração de antocianina, no endosperma ou embrião, normalmente estão associadas a altas taxas de classificação incorreta (PRIGGE et al. 2011). Em milho-pipoca há poucas informações a respeito da expressão deste marcador e a sua correlação com o real nível de ploidia das sementes avaliadas.

A taxa de indução é estimada pela proporção de sementes com embriões haploides detectados em relação ao número total de sementes colhidas do germoplasma fonte, polinizado com pólen indutor, sendo uma característica sob controle genético quantitativo (PRIGGE et al., 2011). Indutores de milho moderno têm taxa de indução que variam entre 8 a 10%, em média (ROBER et al., 2005; ZHANG et al., 2008; GEIGER 2009; ROTARENCO et al., 2010). Outro aspecto importante é avaliar a variação genotípica no germoplasma fonte quanto sua resposta à indução, isso porque, ambos os pais afetam a taxa de indução (CHASE 1952, 1969; COE 1959; LASHERMES; BECKERT 1988; EDER; CHALYK, 2002). Os

indutores normalmente carregam o gene *R1-nj*, marcador de ação dominante que causa a coloração roxa do escutelo e da camada de aleurona (NANDA; CHASE 1966). A coloração do escutelo e da camada de aleurona pode ser usada como marcador do embrião e do endosperma, respectivamente, para identificar sementes haploides (PRIGGE; MELCHINGER, 2012).

Embora a tecnologia de DH possa potencialmente acelerar o melhoramento milho, em milho-pipoca encontra-se poucas informações a respeito de passos básicos já estabelecido em milho como indução *in vivo*, identificação de haploides e duplicação cromossômica. Visto isso, este estudo teve como objetivo principal avaliar a indução *in vivo* de haploides em milho-pipoca. Também avaliar a eficiência do marcador *R1-nj* e avaliação do vigor na seleção de haploides utilizando citometria de fluxo como “padrão ouro”.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar a indução *in vivo* de haploides maternos em germoplasma de milho-pipoca, proveniente do programa de melhoramento da UFV.

2.2 Objetivos específicos

- a.** Caracterizar a indução *in vivo* de haploides quanto à taxa de indução em germoplasma temperado e tropical de diferentes bases genéticas, do programa de melhoramento de milho-pipoca da UFV.
- b.** Determinar a penetrância do marcador *R1-nj* no germoplasma de milho-pipoca da UFV.
- c.** Avaliar a eficiência da seleção de haploides pelo fenótipo Navajo no germoplasma de milho-pipoca da UFV

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Milho-Pipoca

O milho-pipoca (*Zea mays* L. var. *everta*) possui características particulares quando comparado ao milho comum, apresentando em geral grãos menores, maior prolificidade, menor vigor, maior suscetibilidade a doenças e grãos de maior dureza, geralmente com formatos arredondados e com a capacidade de expansão, ou seja, estouram quando submetido à pressão formada dentro do grão. Isso ocorre devido à umidade presa dentro dos pequenos espaços deixados por grânulos de amido poligonais densamente compactados que aumentam a pressão quando vaporizados pelo calor. O vapor de água é inicialmente contido pelo pericarpo espesso até atingir certa pressão de vapor crítica, ponto em que causa o rompimento do pericarpo. À medida que o vapor é liberado do grão, os grânulos de amido gelatinizam e se expandem em um formato tridimensional dando origem a pipoca (HOSENEY; ZELEZNAK; ABDELRAHMAN, 1983; SILVA et al., 2013).

No Brasil, o plantio comercial de milho-pipoca era considerado modesto, durante a década de 90, sendo necessária grande quantidade de importações, principalmente de países como Estados Unidos e Argentina (GALVÃO et al., 2000). Todavia, este cenário vem mudando, por exemplo, o Estado de Mato Grosso Sul coleciona recordes de produção de milho pipoca, no ano de 2017 aumentou em 266% a produção em relação ao ano de 2016, chegando a colher aproximadamente 303,722 mil toneladas, no ano anterior foram 82,975 mil toneladas, conforme o Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA), do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2017).

O milho híbrido, utilizado desde a década de 30 para o melhoramento do milho pipoca, foi responsável pelo grande progresso obtido nessa cultura nos Estados Unidos da América, para produtividade e qualidade da pipoca (ZIEGLER-HEITBROCK et al., 1994). No Brasil, o melhoramento do milho-pipoca teve impulso a partir de 1990, embora o primeiro programa de milho híbrido tenha-se iniciado em 1932, no Instituto Agrônomo de Campinas (KRUG et al., 1943). O mercado brasileiro de milho-pipoca tem crescido nos últimos anos, contudo, o material genético utilizado é na maioria das vezes importado, sendo principalmente híbridos norte-americanos, os quais são importados e registrados por empresas brasileiras (SCAPIM et al., 2006). A tecnologia de duplo-haploides tem grande potencial para aumentar a eficiência dos programas de melhoramento de milho-pipoca no Brasil e reduzir a dependência de sementes importadas.

3.2 Indução de haploidia

O primeiro relato de indivíduos haploides em milho foi feito simultaneamente por L. F. Randolph e L. J. Stadler na reunião de 1929 da Associação Americana para o Avanço da Ciência (RANDOLPH, 1932). Chase (1947) foi primeiro a relatar a ocorrência natural de destes indivíduos em linhagens comerciais de milho em frequências inferiores a 0,1%. Apesar disso, os mecanismos moleculares da indução de haploides em milho ainda não são totalmente compreendidos (SILVA et al., 2009).

Diferentes estratégias estão disponíveis para produção de haploides, com taxas variadas de eficácia, como por exemplo, indução espontânea, cultura de tecidos e uso indutores (LIU et al., 2014). Estas estratégias podem ser agrupadas em métodos *in vitro* ou *vivo*. O método *in vitro* consiste na cultura de tecidos de anteras imaturas ou pólen para produzir calos e posteriormente regenerar plantas haploides. O método *in vivo*, baseia-se na utilização de indutores de haploidia em cruzamento com um genótipo doador. Estes indutores podem ser utilizados como doadores de pólen, gerando haploides gimnogenéticos ou como receptores de pólen, gerando haploides androgenéticos (COE; SARKAR, 1964; PIERRE et al., 2011). Ambos os métodos *in vitro* e *in vivo* podem ser usados para obter haploides de milho, no entanto, os métodos *in vitro* mostraram-se pouco promissores na produção em escala comercial de indivíduos haploides, exigidos para produção de linhagens DH, pelos programas de melhoramento de milho (CHAIKAM, 2012; LIU et al. 2016). Como resultado, a indução de haploides tem sido realizada predominante pelo método *in vivo*.

Geralmente o sistema androgenético não é utilizado em programas de obtenção de linhagens DH, devido a suas baixas taxas de indução em relação ao sistema gimnogenético (POLLACSEK, 1992; KERMICLE, 1994) e pela constituição citoplasmática dos haploides resultantes serem diferentes do germoplasma de origem. Os haploides androgenéticos, podem ser gerados por influência de uma mutação espontânea em razão da presença do alelo recessivo, gametófito indeterminado (*ig*) (KERMICLE, 1973). Este alelo *ig* causa algumas alterações no desenvolvimento do saco embrionário (LASHERMES; BECKERT, 1988). Quando ocorre uma megasporogênese normal, ocorrem três mitoses sucessivas resultando em um saco embrionário com oito núcleos. Sob a ação do gene *ig*, algumas megasporogêneses sofrem quatro ou mais mitoses, resultando em um saco embrionário com uma quantidade anormal de núcleos, com 16 núcleos ou mais. Por essas divisões mitóticas adicionais, o indivíduo mutante que apresenta o alelo *ig1* exibe uma heterofertilização. Segundo Lin (1981), provavelmente, os sacos embrionários com oosfera degenerada favorecem o

desenvolvimento de um núcleo reprodutivo de grão de pólen, sem que tenha ocorrido a fertilização, dando origem a um embrião haploide.

Como comentado, o sistema androgético não é empregado, devido às baixas taxas de indução e a origem citoplasmática dos haploides. Além disso, quando se utiliza indutores gimnogenéticos, a produção das sementes haploides pode ser feita de forma análoga a produção de sementes híbridas, ou seja, a polinização ocorre de forma natural em locais isolados (FRITSCHÉ-NETO et al., 2012), tendo-se o cuidado de despendoar as fêmeas e garantir sincronismo de florescimento e quantidades de pólen suficiente. Assim, o sistema gimnogenético concilia maiores taxas de indução dos indutores modernos a maior a maior praticidade na produção de sementes (RIBEIRO et al., 2018).

Há duas hipóteses conflitantes propostas para explicar a indução haploide materna e evidências experimentais estão disponíveis para apoiar ambas. As duas hipóteses propõem fecundação simples ao invés de dupla fecundação e dupla fecundação seguida de eliminação de cromossomos paternos após fecundação. A análise de grãos de pólen do indutor Stock 6 revelou que todos eles são normais com três núcleos, descartando assim a possibilidade de monospermia como causa de indução haploide (SARKAR; COE, 1966). Além disso, o endosperma em sementes haploides foi determinado como triploide em vez de tetraploide, descartando a possibilidade de que os dois núcleos espermáticos ou uma única célula diploide fertilize a célula central (COE; SARKAR, 1964). É possível que o desenvolvimento assíncrono dos núcleos espermáticos resulte em somente um dos núcleos atingindo o estágio de fertilização. A existência de somente um núcleo espermático normal em um grão de pólen pode ser a razão para a quebra da fertilização dupla e o desenvolvimento de sementes com embriões haploides (BYLICH; CHALYK, 1996). A alta frequência de heterofertilização e aborto de endosperma/embrião ao usar pólen indutor é um forte indício de fecundação simples. A análise microscópica da embriogênese após a polinização com pólen indutor haploide revelou óvulos com fecundação simples (DONG et al., 2013; TIAN et al., 2018), fornecendo mais evidências para esta hipótese. Juntas, essas observações indicam que a indução de haploides maternos resulta de fertilização anômala onde um núcleo espermático fertiliza a célula central, mas o outro não se funde a oosfera. No entanto, a oosfera é estimulada a se desenvolver em um embrião haploide por divisão da célula central ou de um núcleo espermático atenuado. Há também evidências de dupla fecundação em polinização com indutor gimnogenético. Vários estudos revelaram a presença de segmentos cromossômicos do indutor em haploides maternos e nos duplo-haploides derivados deles (FISCHER 2004; ZHANG et al. 2008; LI et al. 2009; ZHAO et al. 2013; QIU et al. 2014),

indicando a ocorrência de dupla fertilização e posterior eliminação de cromossomos do indutor no embrião em desenvolvimento. Em um cruzamento entre um indutor com endosperma normal e uma linhagem de milho doce com endosperma enrugado, foram observados grãos F1 com endosperma mosaico constituído por endosperma normal e endosperma enrugado, indicando a perda de cromossomos dos indutores (ZHANG et al., 2008). Também foi constatado que os cromossomos indutores são eliminados em células embrionárias haploides durante a primeira semana após a polinização (ZHAO et al., 2013). Aparentemente, com todas essas evidências aqui apresentadas, tanto a fertilização simples quanto a eliminação cromossômica após a fertilização dupla estão relacionadas há indução materna de haploides no milho.

A principal característica que descreve a eficiência de indutores de haploidia é taxa de indução, estimada pela razão entre o número de sementes haploides e o número total de sementes produzidas em um cruzamento de indução, essa característica é afetada tanto pelo indutor quanto pelo germosplasma utilizado como fonte. Atualmente, as taxas de indução variam em média de 8-10% (ROBER et al., 2005; ZHANG et al., 2008; GEIGER 2009; ROTARENCO et al., 2010). Estudos em populações segregantes (LASHERMES; BECKERT, 1988) e análises de QTLs (RÖBER, 1999), demonstraram que a indução de haploides in vivo é uma característica quantitativa controlada por um grande número de locos desconhecidos. Vários estudos de mapeamento de QTL apontam para uma região dentro ou próxima dos intervalos físicos de *qhir1*, como obrigatória para condicionar a indução haploide (BARRET et al. 2008; DEIMLING et al. 1997; PRIGGE et al. 2012; DONG et al. 2013).. Um estudo de associação genômica ampla (GWAS), usando 53 indutores e 1482 não indutores subdividiu essa região em *qhir11* e *qhir12* (HU et al., 2016). No entanto, a avaliação da taxa de indução de genótipos contendo as sub-regiões *qhir11* e *qhir12* revelou que apenas *qhir11* teve um efeito significativo na taxa de indução (NAIR et al., 2017). Dentro dessa região, um gene codificador de fosfolipase A foi identificado como responsável pela indução haploide denominado MATRILINEAL (*MTL*) (KELLIHER et al., 2017). A validação do efeito do alelo mutante deste gene por diferentes abordagens revelou diferentes taxas de indução (0,5–12,5%) condicionadas pelo alelo mutante. Essa variação pode ser atribuída à natureza quantitativa da indução e aos efeitos de outros genes no background genético.

Os maiores esforços no desenvolvimento de indutores foram direcionados para atender as necessidades de programas de desenvolvimento de linhagens DH em ambientes temperados. Apesar dos indutores temperados mostrarem taxas semelhantes de indução em clima tropical, estes apresentam vários sintomas de inadaptação quando são submetidos a este

ambiente como falta de sincronia entre o florescimento dos indutores e do germoplasma tropical utilizado como fonte de linhagens, suscetibilidade às doenças foliares, particularmente a queima das folhas causada por *Excoelohilum turcicum*, fraca produção de pólen e vigor da planta exigindo polinização manual para cruzamentos de indução e baixa produção de sementes após autopolinização para multiplicação dos indutores. Assim fica evidente a necessidade de desenvolver indutores melhor adaptados para simplificar o manejo e consequentemente melhorar eficiência da indução de haploidia em programas de melhoramento de milho tropical (PRIGGE et al., 2011).

Visto isso, desde 2007, o programa de milho do CIMMYT tem trabalhado com o desenvolvimento da tecnologia DH, especialmente, para ambientes tropicais e subtropicais, em parceria com a Universidade de Hohenheim, na Alemanha (PRASANNA, 2012). Linhagens tropicais com taxas que variam de 8 a 10% de indução de haploidia já foram desenvolvidas com essa parceria (PRIGGE et al., 2011). Isso mostra que é possível a obtenção de indutores topicalizados com boa taxa de indução, viabilizando a utilização em grande escala dessa tecnologia em programas de melhoramento de milho em ambientes tropicais. Nesta mesma linha, o programa de Melhoramento de milho- pipoca da UFV tem iniciado um trabalho de melhoramento e tropicalização do indutor KHI com o intuito de desenvolver indutores tropicalizados e com boa taxa de indução.

3.3 Identificação de haploides

3.3.1 Marcadores morfológicos

Distinguir sementes haploides daquelas oriundas de fertilização regular é um ponto chave na produção de linhagens DH (RIBEIRO et al., 2018). Essa diferenciação é feita principalmente com base no marcador de embrião roxo, que é codificado pelo fator de transcrição *R1-nj* (GEIGER; GORDILLO, 2009). A utilização de linhagens DH, em escala comercial, só é possível por essa marcação morfológica nas sementes de milho (FRITSCHENETO et al., 2012).

Nanda e Chase (1966) foram os primeiros a utilizar e descrever este gene na discriminação entre sementes contendo embriões haploides e diploides. A pigmentação do endosperma e do embrião nas sementes diploides e a pigmentação somente do endosperma nas haploides permite esta diferenciação. Isso ocorre porque como o marcador é dominante, a expressão ocorre somente em tecidos diploides ou triploides regulares, mas não em embriões

haploides. No entanto, a expressão de *R1-nj* é afetada por vários fatores, como condições ambientais e base genética do doador (CHAIKAM et al., 2015; KEBEDE et al., 2011; PRIGGE et al., 2011).

A morfologia da semente também afeta a eficiência do marcador, isso pode ser especialmente importante em milho-pipoca, que possuem sementes pequenas e com formatos que não favorecem a visualização da pigmentação do escutelo. O escutelo de sementes achatadas, encontrado principalmente no meio das espigas em milho comum, é muito mais visível do que a de sementes redondas, frequentemente encontradas no topo e na parte inferior das espigas e o formato predominante em milho-pipoca. Além disso, as mutações em genes que influenciam a biossíntese de antocianinas afetam negativamente a expressão do *R1-nj*. Segundo Chalyk, 1994, três genes (*C2* ou *Whp1*, *A1* e *A2*) são necessários para a produção de antocianina, genótipos homozigotos recessivos para qualquer um desses genes não a sintetizam, pois a ausência do alelo dominante interrompe a via de produção de antocianina na camada de aleurona (FORD, 2000). Chaikam et al., (2016), analisando 897 linhagens tropicais observou completa inibição do marcador *R1-nj*, em 30% das linhagens em consequência do inibidor da coloração *C1-I*. Além disso, Rabel (2008) cita que o marcador *R1-nj* não apresenta boa precisão na indicação das sementes haploides por ter penetrância incompleta e expressividade variada, isso significa que a expressão da antocianina pode variar significativamente dentro e entre germoplasma (CHAIKAM et al., 2015; CHASE 1952; KEBEDE et al. 2011; PRIGGE et al., 2011; ROBER et al; 2005). Ainda de acordo com Chaikam et al., (2015), em um cruzamento de indução de haploidia, dependendo da homozigosidade e da heterozigosidade dos alelos inibidores na população, o marcador *R1-nj* pode ser completamente inibido ou a expressão da coloração pode segregar nos grãos de milho.

Em termos práticos, a grande vantagem do *R1-nj* é a possibilidade de identificar os indivíduos haploides antes mesmo da germinação, no entanto, como já apresentado acima, existem muitos fatores que afetam a eficiência deste marcador, por isso, outros marcadores fenotípicos podem ser usados pensando em fornecer um mecanismo adicional para discriminar haploides e diploides que foram classificados incorretamente. Por exemplo, o marcador *P11*, que causa a produção de antocianina independente da luz nas raízes das mudas. No entanto, as raízes das mudas de alguns genótipos podem ficar vermelhas quando expostas à luz, tornando assim a classificação baseada no *P11* propensa a erros. Outro método bastante utilizado é a identificação pelo vigor das plantas, linhagens que demonstram maior vigor, já são eliminadas (BATTISTELLI et al., 2013). Essa característica é de fácil utilização e pode

ter alta eficiência uma vez que plantas haploides, geralmente, apresentam menor vigor (RIBEIRO et al., 2018).

3.3.2 Citometria de fluxo

O marcador *R1-nj* possui limitações relativas à precisão na indicação das sementes haploides, como discutido no item anterior. Portanto, quando se deseja identificar ou confirmar a ploidia dessas sementes com maior nível de precisão, é necessário o emprego de métodos adicionais (COUTO et al., 2013).

A contagem de cromossomos após a coloração de células mitóticas com uma solução a 1% de orceína é o método mais confiável para seleção de haploides, uma vez que é possível visualizar a quantidade de cromossomos do indivíduo em estudo (MILANI et al., 2016). Contudo, em um programa de obtenção de linhagens (DH), é importante que se disponha de métodos de identificação de haploides putativo aplicáveis em larga escala, o que limita a utilização desta técnica em escala comercial.

A quantificação do conteúdo de DNA por citometria de fluxo (CF) pode atender a esses requisitos, por ser um método rápido, de fácil preparação das amostras, não necessitar de divisão celular, ser não destrutivo e capaz de detectar mixoploidia (DOLEZEL, 1997; LOUREIRO; SANTOS, 2004). Essa técnica é fundamentada na análise de propriedades ópticas, como dispersão da luz e fluorescência de partículas coradas com fluorocromos específicos que fluem em uma suspensão líquida. As partículas em suspensão movem-se emergidas num fluido, tampão de extração, no interior de um capilar, dentro de um aparelho denominado citômetro de fluxo. Essas partículas interceptam, uma a uma, um feixe de iluminação, ocorrendo um processo de dispersão da luz e ou emissão de fluorescência (CORTE-REAL et al., 2002). O nível de ploidia é determinado comparando-se os picos G1 do histograma de uma amostra com o pico de uma planta padrão com ploidia conhecida (DOLEŽEL, 1997).

3.4 Duplicação cromossômica artificial

Após a obtenção dos haploides, é necessário duplicar o genoma para formar uma linhagem (DH) e essa poder ser utilizada no melhoramento. Tradicionalmente, a duplicação cromossômica depende principalmente da duplicação química utilizando bloqueadores mitóticos, como colchicina (FERRIE; CASWELL, 2011; HANSEN; ANDERSEN, 1996;

REN et al., 2017). Na presença deste composto químico, a replicação cromossômica ocorre normalmente, durante a interfase. Mas, durante a metáfase, a colchicina se liga à tubulina e inibe a polimerização dos microtúbulos que compõem as fibras dos fusos, não havendo, assim, a migração dos cromossomos para os polos das células. Dessa forma, as células que anteriormente eram x (haploides) passam a ser $2x$ (diploides).

A duplicação cromossômica artificial representa um dos maiores desafios na produção de linhagens DH, isso porque geralmente envolve produtos químicos tóxicos e caros e tem maior efeito no custo total de produção das linhagens, em comparação com as outras etapas de produção (MELCHINGER et al., 2016). Além disso, a aplicação de bloqueadores mitóticos em plântulas apresenta algumas desvantagens, uma vez que é necessário utilizar altas concentrações e volume do agente antimitótico, sendo comum a mortalidade de plântulas em taxas elevadas e a produção de plantas mixoplóides e quiméricas (RÖBER et al., 2005).

Atualmente, tem havido um aumento do interesse na duplicação espontânea de cromossomos de plantas haploides de milho. A duplicação espontânea de cromossomos pode ser compreendida como a capacidade dos órgãos reprodutores masculino e feminino produzem gametas férteis sem aplicação de protocolos de duplicação (CHAIKAM et al., 2019). A exploração da fertilidade natural dos haploides pode eliminar a etapa de duplicação cromossômica artificial e aumentar a eficiência na produção de linhagens DH com redução significativa nos custos envolvidos na germinação, cuidados com as mudas, duplicação cromossômica e transplântio (CHAIKAM et al., 2019). No entanto a frequência de duplicação cromossômica espontânea tem sido baixa e extremamente incerta Wan et al., (1991), sendo em média 20 vezes menor do que a taxa de duplicação artificial, além de produzirem menos sementes do que as plantas haploides duplicadas artificialmente (KLEIBER et al., 2012)

A impossibilidade de ocorrência de divisões meióticas e consequentemente a não formação de gametas explicam a infertilidade em plantas haploides (CHAIKAM; MAHUKU, 2012). Alguns estudos demonstraram que a fertilidade haploide feminina não é uma limitação para a produção de linhagens DH. O mesmo não ocorre quando se trata de fertilidade haploide masculina, isso porque a maioria das plantas haploides, quando não passam por protocolos de duplicação são incapazes de produzir pólen viável, ou seja, são macho-estéril (CHALYK, 1994; GEIGER et al., 2006).

Fica evidente que a fertilidade haploide masculina é um limitante quando se pensa na possibilidade de excluir protocolos de duplicação na obtenção de linhagens DH, sendo assim, a duplicação cromossômica artificial ainda é necessária para que as plantas haploides apresentem fertilidade, de maneira que elas possam ser úteis aos programas de melhoramento.

Um importante avanço no protocolo de duplicação foi realizado por Deimling et al., (1997) e Gayen (1994), que reduziram o comprimento das raízes das plântulas haploides e deixaram-nas submersas em solução contendo colchicina e dimetilsulfóxido (DMSO).

Outro método utilizado para duplicação foi proposto por Zabirowa et al., (1996), em que se injetou na planta a solução de colchicina, a cerca de 3 a 5 mm do ápice da planta. Battistelli et al., (2013) e Chalyk (2000), utilizando haploides maternos de milho, compararam a eficiência dos métodos citados e avaliaram, também, a porcentagem de linhagens DH com pendão fértil, para verificar se a fertilidade das plantas é alterada, após a exposição das plantas ao agente químico de duplicação. Ambos os estudos concluíram que o método proposto por Deimling et al., (1997) permitiu uma maior obtenção de linhagens DH em ambos os estudos. Battistelli et al., (2013) e Chalyk (2000) observaram uma taxa de duplicação de 29% a 32% e 59% a 80%, respectivamente. Couto et al., (2015) testaram dois protocolos de duplicação. Um deles foi o sugerido por Chaikam e Mahuku (2012), em que se sugere a utilização de uma solução com 0,04% de colchicina e 0,5% de DMSO, para mergulhar as plantas por 12 horas, no escuro a 20°C. No segundo protocolo, somente as raízes são submersas, em uma solução contendo 0,1% de colchicina, 0,1% de DMSO e 0,1% de Tween 20, por um período de 6 horas, na presença de luz, em temperatura média de 22°C. Couto et al., (2015) observaram uma maior taxa de plantas duplicadas, para o segundo protocolo, de 69,33%, quando comparado ao protocolo 1, de 51,32%.

Todos esses trabalhos foram feitos em haploides de milho comum, poucas são as referências sobre a eficiência dos mesmos na duplicação cromossômica haploides de milho-pipoca. No entanto, observações feitas pela Iowa State University, ao longo de várias safras mostram que mesmo com o uso de tratamento com colchicina, mão de obra qualificada, e instalações apropriadas, algumas populações de milho usadas para extração de linhagens DH dobram seus genomas em taxas inferiores a 1%, levando a redução da variação selecionável em programas de melhoramento quando se utiliza a tecnologia de DH (MOLENAAR et al., 2019).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local

O estudo foi conduzido na safra 2021/2022 na área experimental e em casa de vegetação do Setor de Genética da Universidade Federal de Viçosa (UFV), no município de

Viçosa (20°50'30"S, 42° 48'30"W, altitude de 720 m).

4.2 Material genético

Para a indução de haploides foi utilizado como indutor gimnogenético à população temperada KHI (Krasnodar haploid inducer) (MILANI et al., 2016). Como fêmeas foram utilizadas três populações tropicais, Viçosa C4 e Beija-Flor C4, obtidas das populações Viçosa e Beija-Flor após quatro ciclos de seleção de meios-irmãos, e o Sintético-UFV, derivado por sorteio cruzando 20 linhagens de Viçosa e 20 linhagens de populações Beija-Flor. E cinco populações de origem temperada, UFV-MP1, UFV-MP2, UFV-MP3, UFV-MP4 e UFV-MP5, que são derivadas respectivamente dos híbridos norte-americanos P622, P625, P802, AP2501 e AP4502 desenvolvidos pela Agricultural Alumni Seed Improvement Association, Romney, IN, USA. Também foram utilizadas cinco linhagens derivadas das populações UFV-MP1, UFV-MP2, UFV-MP3, UFV-MP5 e Sintético-UFV. Sete híbridos interpopulacionais (Viçosa C4 x Beija Flor C4), (Viçosa C4 x UFV MP2), (Viçosa C4 x UFV MP4), (Viçosa C4 x UFV MP5), (Beija-Flor C4 x Sintético UFV), (Sintético UFV x UFV MP1) e (UFV MP2 x UFV MP5). Três Híbridos Simples de milho, MG580-PW, 2B710-PW, ES481 PW, um híbrido duplo e uma população, Feroz e AGS Lavrador OP respectivamente, totalizando 25 tratamentos (Tabela 1).

Tabela 1 - Fontes de germoplasma utilizados em cruzamentos de indução de haploidia com a população KHI.

(continua)

Germoplasma	Base Genética	Origem	Tipo
1	Linhagem	Tropical	Pipoca
2	Linhagem	Temperado	Pipoca
3	Linhagem	Temperado	Pipoca
4	Linhagem	Temperado	Pipoca
5	Linhagem	Temperado	Pipoca
6	População	Temperado	Pipoca
7	População	Temperado	Pipoca
8	População	Temperado	Pipoca
9	População	Temperado	Pipoca
10	População	Temperado	Pipoca
11	População	Tropical	Pipoca
12	População	Tropical	Pipoca
13	População	Tropical	Pipoca
14	HI	Tropical	Pipoca
15	HI	Tr x T	Pipoca
16	HI	Temperado	Pipoca

Tabela 2 - Fontes de germoplasma utilizados em cruzamentos de indução de haploidia com a população KHI.

(conclusão)			
Base Genética	Origem	Tipo	
17	HI	Tr x T	Pipoca
18	HI	Tr x T	Pipoca
19	HI	Tr x T	Pipoca
20	HI	Tr x T	Pipoca
21	HS	Tropical	Comum
22	HS	Tropical	Comum
23	HS	Tropical	Comum
24	HD	Tropical	Comum
25	População	Tropical	Comum

^{HS} Híbrido Simples

^{HD} Híbrido Duplo

^{HI} Híbrido Interpopulacional

^{Tr x T} Tropical x Temperado

4.3 Cruzamentos de Indução

Os cruzamentos de indução ocorreram de forma natural, em campo isolado. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 25 tratamentos e três repetições. Cada parcela de polinização foi constituída de duas linhas de cinco metros, das fêmeas a serem induzidas. As mesmas foram despendoadas antes da deiscência das anteras. Entre cada parcela foi plantado quatro linhas do indutor, em quatro épocas distintas. O primeiro plantio foi realizado uma semana após a semeadura das fêmeas. Os demais foram feitos em intervalos de cinco dias após o primeiro plantio de indutor. Também foi semeada uma bordadura externa com duas linhas de indutor. As fêmeas e os indutores foram plantados em espaçamento de 20 cm entre plantas e 70 cm entre linhas, cada cova foi plantada com três sementes, para garantir o stand planejado. Foi feito o desbaste no estagio v3, eliminado a plantas menos desenvolvidas de modo que sobrasse apenas uma planta por cova, ou seja, cinco plantas por metro. Os tratos culturais foram os mesmos recomendados para o milho na região.

4.4 Identificação de haploides

4.4.1 Fenótipo Navajo

As sementes resultantes dos cruzamentos, em cada repetição, foram separadas, visualmente, de acordo com a presença da coloração roxa do endosperma e do embrião

(fenótipo Navajo) conforme metodologia descrita por Chase e Nanda (1965), sendo classificadas em:

Haploides: sementes com endosperma roxo e embrião branco;

Diploides: sementes com endosperma roxo e embrião roxo;

Amarelas: sementes sem expressão de antocianina no embrião e no endosperma;

Além das classes propostas por Chase e Nanda (1965), também foi considerado a classe de sementes roxas como medida de penetrância do marcador *RI-nj*, esta sendo definida pela soma das classes haploides e diploides.

A partir desta classificação, foram obtidas as seguintes estimativas.

Taxa de indução de haploides com base no marcador *RI-nj*:

$$HIR = \frac{HAP}{Total} \times 100$$

Em que:

HIR: taxa de indução de haploides;

HAP: número de sementes haploides;

Total: número total de sementes avaliadas.

Penetrância:

$$PE = \frac{Roxos}{Total} \times 100$$

4.4.2 Vigor de plântulas

Para avaliação do vigor, as sementes haploides putativas obtidas em cada parcela de polinização foram germinadas em bandejas, contendo duas folhas de papel germitest e preenchidas com areia. O número de sementes haploides obtidas em cada parcela foi variável, logo o número de plântulas avaliadas em cada repetição e tratamento foi diferente. Além das sementes haploides também foram germinadas 10 sementes diploides putativas e 10 sementes do germoplasma que a originou. Todas as sementes antes serem plantadas foram tratadas com o fungicida (MAXIM ADVANCED®). O vigor relativo das plântulas foi avaliado 10 dias após a semeadura. A avaliação foi feita utilizando os diploides putativos como referência. As

plântulas que apresentaram, visualmente, alturas e folhas maiores, colmos de maior diâmetro e de coloração roxa foram classificados como diploides.

4.4.3 Citometria de fluxo

Após avaliação do vigor, as plântulas haploides provenientes de 14 das 25 fêmeas induzidas, inclusive aquelas classificadas como falsos positivos pelo vigor foram submetidas à citometria de fluxo (CF), para confirmação do nível de ploidia. Para cada tratamento, uma amostra de um indivíduo diploide e uma amostra da fonte de germoplasma foram utilizadas como padrão externo. Para extração nuclear, fragmentos de folhas jovens dos indivíduos avaliados e do padrão externo foram picotadas em placas de Petri e o procedimento de chopping das folhas, contendo 500 µL de tampão de lise OTTO-I (OTTO, 1990) suplementado com 2,0 mM de dithiothreitol (Sigma®). Após 3 min, foram adicionados 500 µL do mesmo tampão, o homogenato foi filtrado em malha de nylon de 30 µm (Partec®) e centrifugado a $100 \times g$ por 5 min. O sobrenadante foi descartado, e o pellet ressuspensionado e encubado por 10 min em 100 µL do tampão OTTO-I. As suspensões nucleares foram coradas em 500 µL de tampão OTTO-I:OTTO-II (1:2) suplementado com 2,0 mM de dithiothreitol (Sigma®) e 75 µM de iodeto de propídio (Sigma®) em temperatura ambiente por 30 min no escuro, filtradas em malha de nylon de 20 µm (Partec®) e analisadas em citômetro de fluxo BD Accuri C6 (Accuri cytometers) (PRAÇA-FONTES et al., 2011).

Os histogramas obtidos a partir das suspensões nucleares das possíveis plântulas haploides foram comparados àqueles fornecidos pelos padrões externos para a determinação da ploidia relativa de cada amostra.

4.5 Análise estatística dos dados

Haploides putativos e diploides putativos que foram confirmados como verdadeiros, pela validação do vigor e CF, foram categorizados como verdadeiros positivos (TP) e verdadeiros negativos (TN), respectivamente. Diploides verdadeiros na fração de haploides putativos e haploides verdadeiros na fração de diploide putativos foram categorizados como falsos positivos (FP) e falsos negativos (FN), respectivamente, também pela avaliação do vigor e citometria. Os números de TP, TN, FP e FN foram ajustados em cada população com base no número total de haploides e diploides putativos identificados na população com base no marcador *RI-nj*. Os dados resultantes da classificação pela citometria foram usados para

calcular as estatísticas de taxa de falsa descoberta (FDR), taxa de falso negativo (FNR) e coeficiente de correlação de Matthews (MCC) (MATTHEWS, 1975; ALTMAN; BLAND, 1994; MELCHINGER et al., 2013) de acordo com as seguintes equações:

$$FDR = \frac{FP}{TP + FP}$$

$$FNR = \frac{FN}{TP + FP}$$

$$MCC = \frac{(TP \times TN) - (FP \times FN)}{\sqrt{(TP + FP)(TP + FN)(TN + FP)(TN + FN)}}$$

Onde FDR é a proporção de diploides na fração de sementes classificada como haploides putativos, FNR é a proporção de haploides verdadeiros classificados erroneamente como sementes diploides e MCC indica a correlação entre o nível de ploidia real e previsto com base no marcador *R1-nj*. A MCC tem sido sugerida como uma medida equilibrada da qualidade das classificações binárias, especialmente quando as classes binárias são de tamanhos muito diferentes (MATTHEWS, 1975). O coeficiente de correlação de Matthews (MCC) foi desenvolvido por Brian W. Matthews e tornou-se essencial para medir o desempenho de modelos de classificação binária. Esse coeficiente flutua no intervalo (-1, 1), e quanto maior seu valor, melhor a habilidade de predição do classificador. Por outro lado, quando o valor assumido é 0, não há nenhuma correlação entre as duas variáveis, ou seja, o modelo está realizando suas predições de forma aleatória.

Para todas as características assumimos:

$$Y_{ij} \sim \text{binomial}(m_{ij}, \pi_{ij})$$

Onde Y_{ij} é o número total de sementes do i -ésimo genótipo no bloco j , m_{ij} é o número de sementes haploides putativas e π_{ij} a probabilidade de sucesso (probabilidade de sementes haploides putativas).

Ajustamos um modelo linear generalizado (GLM) com uma função de link logit descrita pelo seguinte preditor linear.

$$\text{Logit}\left(\frac{\pi_{ij}}{1 - \pi_{ij}}\right) = \mu + g_i + b_j$$

Para avaliar a qualidade de ajuste do modelo, usamos inspeção visual usando gráficos semi-normais com envelope simulado (DEMÉTRIO et al., 2014), empregando o pacote hnp (MORAL et al., 2017). Para comparar os genótipos avaliados, utilizamos intervalos de confiança assintóticos obtidos pelo pacote emmeans (LENTH, 2020). Todas as análises estatísticas foram realizadas no ambiente R (R CORE TEAM, 2022).

5 RESULTADOS

5.1 Penetrância do marcador *R1-nj*

Pela análise binomial da penetrância (PE) do marcador *R1-nj* foram encontrados efeitos significativos para fontes de germoplasma ($p < 0,01$) e repetições ($p < 0,01$) (Tabela 2). A média geral de PE entre as fontes de germoplasma avaliadas foi de 71,90% (Tabela 3), foram encontradas 61212 sementes inibidas entre as 260399 sementes avaliadas (dados não apresentados).

Tabela 3 - Resumo da análise de DEVIANCE, para PE do marcador *R1-nj*, em sementes geradas a partir dos cruzamentos de 20 fontes de germoplasma de milho-pipoca e cinco testemunhas de milho comum com o indutor KHI.

FV	GL	Deviance
Germoplasma	25	440*
Repetições	2	427,2*

*Diferenças significativas baseadas no teste de χ^2 a 0,01 de probabilidade.

A média de PE em milho-pipoca (69,93%) foi inferior em relação às médias das testemunhas de milho (79,75%). 70% dos materiais de milho-pipoca avaliados apresentaram $PE < 65\%$, 40% apresentaram valores entre 65 e 80% e 30% apresentaram $PE > 80\%$. O valor médio de PE do marcador *R1-nj* em germoplasma de origem tropical (52,50%), foi inferior ao encontrado em germoplasma de origem (tropical x temperado) (71,63%) e temperado (77,80%). A linhagem 12 apresentou o menor valor de PE (30,78%), enquanto a linhagem 2 apresentou o maior valor (98,58%) (Tabela 3).

Tabela 4 - Médias e intervalos de confiança (IC) a 95% de probabilidades associados a (PE), do marcador *R1-nj*, em 20 fontes de germoplasma de milho-pipoca e cinco testemunhas de milho comum, cruzadas com o indutor KHI.

Germoplasma	Tipo	PEN, %	IC	
			LI ¹	LS ²
1	Pipoca	40,25	38,38	42,15
2	Pipoca	98,58	97,29	99,26
3	Pipoca	93,74	92,86	94,51
4	Pipoca	86,21	84,18	88,02
5	Pipoca	85,6	83,47	87,5
6	Pipoca	81,77	79,11	84,15
7	Pipoca	59,79	57,88	61,68
8	Pipoca	93,28	91,14	94,93
9	Pipoca	75,16	66,99	81,86
10	Pipoca	34,7	31,21	38,37
11	Pipoca	50,9	49,43	52,37
12	Pipoca	30,78	27,63	34,12
13	Pipoca	65,37	64,66	66,07
14	Pipoca	75,21	73,64	76,71
15	Pipoca	59,44	55,98	62,81
16	Pipoca	69,16	66,77	71,45
17	Pipoca	79,51	77,84	81,09
18	Pipoca	75,7	74,69	76,69
19	Pipoca	76,83	75,63	77,98
20	Pipoca	66,69	65,41	67,95
21	Comum	83,87	83,57	84,16
22	Comum	83,35	83,04	83,65
23	Comum	59,53	59,08	59,98
24	Comum	77,73	77,01	78,43
25	Comum	94,26	93,95	94,56
Média		71,90	-	-

¹Limite inferior

²Limite superior

5.2 Erro de classificação haploide/diploide utilizando o fenótipo Navajo

A FDR utilizando a avaliação do vigor de plântulas como “padrão ouro” variou de 0 a 65,4%, com média de 27,14% (Tabela 4). Entre as fêmeas de milho-pipoca avaliadas, 65% apresentaram valores de FDR>20%. O valor de MCC variou de 0,32 a 1 e média de 0,77 (Tabela 4). As médias de FDR encontradas nas linhagens (28,67%) e híbridos interpopulacionais (27,83%), foram superiores ao valor médio encontrado para as populações (25,57%). O valor médio da FDR encontrado em germoplasma de origem temperada (19,54%) foi cerca de 50% inferior ao encontrado em germoplasma de origem tropical (39,31%). No germoplasma (tropical x temperado) o valor médio de FDR foi de 29,26%, ou seja, 25% inferior ao valor encontrado em germoplasma tropical. Entre os haploides putativos gerados a partir das linhagens 2, 14, 6 e 15 não foram identificados FP, apresentando valores

de FDR e MCC de 0 e 1, respetivamente (Tabela 4). A linhagem 1 apresentou o maior valor de FDR (65,74%), também foram encontradas estimativas elevadas para as fêmeas de 12 e 20 (FDR>50%) (Tabela 4). As médias de FDR encontradas nas testemunhas e em milho-pipoca foram próximas, 26,04 e 27,41%, respetivamente. Não houve variação para a FNR, uma vez que não foram identificados falsos negativos, no entanto é importante comentar que a amostra de diploides putativos avaliada pode ter sido não representativa.

Tabela 4 - Estatísticas associadas à classificação pelo vigor para confirmação do nível ploidia de haploides e diploides putativos identificados pelo fenótipo Navajo em cruzamentos de indução gerados com a população indutora KHI.

Fêmeas	Tipo	FDR ¹ , %	MCC ²
1	Pipoca	65,74	0,32
2	Pipoca	0,00	1,00
3	Pipoca	30,16	0,65
4	Pipoca	23,33	0,78
5	Pipoca	24,14	0,78
6	Pipoca	0,00	1,00
7	Pipoca	33,33	0,75
8	Pipoca	20,00	0,85
9	Pipoca	0,00	1,00
10	Pipoca	20,00	0,86
11	Pipoca	40,74	0,58
12	Pipoca	57,14	0,56
13	Pipoca	38,89	0,6
14	Pipoca	0,00	1,00
15	Pipoca	0,00	1,00
16	Pipoca	44,44	0,60
17	Pipoca	33,33	0,76
18	Pipoca	33,33	0,73
19	Pipoca	25,00	0,82
20	Pipoca	58,70	0,46
21	Comum	20,34	0,75
22	Comum	18,52	0,78
23	Comum	35,00	0,72
24	Comum	36,36	0,70
25	Comum	20,00	0,86
Média		27,14	0,76

¹FDR = Taxa de falsa descoberta

²MCC = Coeficiente de correlação de Matthews

A FDR, considerando a CF como “padrão ouro”, variou de 0 a 100% entre as 14 fontes de germoplasma avaliadas, considerando os resultados obtidos pela classificação pelo fenótipo Navajo (i) e (ii) classificação pelo fenótipo Navajo associada com posterior eliminação de FP identificados pelo vigor. As médias de FDR de (i) e (ii) encontradas foram 74,36 e 68,73%, respetivamente (Tabela 5). As linhagens apresentaram a menor média de FDR (60,7%) em relação às populações (83,41%) e aos híbridos interpopulacionais (84,65%).

A maioria das fêmeas estudadas apresentaram valores de FDR de elevada magnitude ($FDR > 50\%$), tanto para (i) quanto para (ii). A eliminação de FP pela avaliação do vigor reduziu as estimativas de FDR para maioria das fêmeas avaliadas, com exceção das fêmeas de 1, 2, 6, 12 e 20 (Tabela 5). Os valores médios de MCC foram de baixa magnitude, 0,35 para (i) e 0,41 para (ii) (Tabela 5). Não houve variação para a FNR, uma vez que não foram identificados falsos negativos.

Tabela 5 - Estatísticas associadas à classificação pela citometria de fluxo (CF) para confirmação do verdadeiro nível de ploidia de haploides e diploides putativos identificados pelo fenótipo Navajo (i) e o pelo fenótipo Navajo com posterior eliminação de falsos positivos (FP) identificados pela avaliação do vigor de plântulas (ii) em cruzamentos de indução gerados com a população indutora KHI.

Fêmeas	TIPO	(i)		(ii)	
		FDR1, %	MCC2	FDR1 %	MCC2
1	Pipoca	100	0,00	100	0,00
2	Pipoca	11,11	0,93	11,11	0,93
3	Pipoca	90,48	0,18	86,36	0,25
4	Pipoca	50,00	0,58	34,78	0,72
5	Pipoca	51,72	0,57	36,36	0,71
6	Pipoca	50,00	0,68	50,00	0,68
10	Pipoca	80,00	0,42	75,00	0,48
11	Pipoca	94,44	0,14	90,63	0,22
12	Pipoca	100	0,00	100,00	0,00
13	Pipoca	92,59	0,17	87,88	0,25
17	Pipoca	77,78	0,42	66,67	0,54
18	Pipoca	76,19	0,39	64,29	0,52
20	Pipoca	100	0,00	100,00	0,00
22	Comum	66,67	0,39	59,09	0,47
Média		74,36	0,35	68,73	0,41

¹FDR = Taxa de falso positivo

²MCC = Coeficiente de correlação de Matthews

5.3 Taxa de indução do indutor KHI

Pela análise binomial das taxas de indução (HIR), ajustadas após a eliminação de falsos positivos identificados através da avaliação do vigor, foi encontrado efeito significativo para fontes de germoplasma ($p < 0,01$) e não significativas para repetições ($p > 0,05$) (Tabela 6).

Tabela 6 - Resumo da análise de DEVIANCE, para taxa de indução de haploides (HIR), identificados pelo marcador *RI-nj* e ajustadas após a eliminação de FP identificados pela avaliação do vigor, em 25 germoplasma cruzados com o indutor KHI.

FV	GL	Deviance
Germoplasma Fonte	25	24*
Repetições	2	22,2

*Diferenças significativas baseadas no teste de χ^2 a 0,01 de probabilidade.

A média geral de HIR para o indutor KHI, nas 25 fontes de germoplasma avaliadas foi 0,708% (Tabela 7). Das 681 plântulas haploides putativas, 429 foram confirmadas como haploides verdadeiros (126 de milho e 303 de milho-pipoca) (dados não apresentados). A média geral da HIR do indutor KHI em milho-pipoca foi de 0,87%, enquanto que nas testemunhas de milho, o valor foi ainda mais baixo (0,068%). A HIR em germoplasma tropical de milho-pipoca foi 2,28 vezes menor comparado ao germoplasma temperado, com médias de 1,135 e 0,5%, respectivamente. A média de indução entre as linhagens foi de 1,57%, enquanto a média de indução nas populações foi de 0,84%, para os híbridos interpopulacionais foi encontrada a menor média de indução (0,39%). A população 9 apresentou a maior média de indução, no entanto, o IC foi amplo, com limite inferior e superior entre 0,76 e 7,07% (Tabela 7).

Tabela 7 - Médias e intervalos de confiança (IC) a 95% de probabilidades associadas às taxas de indução haploide (HIR), ajustadas através da FDR obtida pela avaliação do vigor, em 20 fontes de germoplasma de milho-pipoca e cinco testemunhas de milho comum, cruzadas com o indutor KHI.

Germoplasma	Tipo	HIR, %	IC	
			LI ¹	LS ²
1	Pipoca	1,41	1,03	1,95
2	Pipoca	1,41	0,74	2,69
3	Pipoca	1,32	0,98	1,77
4	Pipoca	1,86	1,24	2,78
5	Pipoca	1,86	1,23	2,81
6	Pipoca	0,44	0,17	1,18
7	Pipoca	0,31	0,15	0,62
8	Pipoca	1,76	1,00	3,07
9	Pipoca	2,36	0,76	7,07
10	Pipoca	0,60	0,22	1,58
11	Pipoca	0,72	0,51	1,01
12	Pipoca	0,37	0,12	1,15
13	Pipoca	0,19	0,13	0,27
14	Pipoca	0,10	0,03	0,30
15	Pipoca	0,50	0,19	1,33
16	Pipoca	1,29	0,82	2,0
17	Pipoca	0,25	0,11	0,55
18	Pipoca	0,20	0,12	0,33
19	Pipoca	0,06	0,02	0,19
20	Pipoca	0,35	0,22	0,55
21	Comum	0,08	0,06	0,11
22	Comum	0,08	0,06	0,1
23	Comum	0,03	0,02	0,05
24	Comum	0,11	0,06	0,18
25	Comum	0,04	0,02	0,07
Média		0,708	-	-

¹Limite inferior

²Limite superior

Pela análise binomial da HIR, ajustadas após a eliminação de falsos positivos identificados através de citometria de fluxo (CF), foi encontrado efeito significativo para fontes de germoplasma ($p < 0,01$) e não significativo para repetições ($p > 0,05$) (Tabela 8).

Tabela 8 - Resumo da análise de DEVIANCE, para taxa de indução de haploides identificados pelo marcador *R1-nj* em 14 materiais cruzados com o indutor KHI.

FV	GL	Deviance	
Germoplasma Fonte	25	17*	
Repetições	2	15,975	

*Diferenças significativas baseadas no teste de χ^2 a 0,01 de probabilidade.

A média geral de HIR para o indutor KHI, nas 14 fontes de germoplasma avaliadas foi 0,32% (Tabela 9). De 681 plântulas haploides putativas avaliadas, apenas 75 foram confirmadas como haploides verdadeiros pela CF (15 de milho e 60 de milho-pipoca) (dados não apresentados).

Após o ajuste das médias pela FDR estimada através dos falsos positivos identificados pela CF, a média de HIR do indutor KHI em milho pipoca foi de 0,34%. A HIR encontrada para as linhagens, população e híbridos interpopulacionais foram de 0,76, 0,09 e 0,09%, respectivamente. Apenas as linhagens 2, 4 e 5 apresentaram $HIR > 1\%$, nas demais fontes de germoplasma avaliados os valores de HIR foram inferiores a 0,25%.

Tabela 9 - Médias e intervalos de confiança (IC) a 95% de probabilidades associadas às taxas de indução haploide (HIR), ajustadas através da FDR obtida pela CF, em 20 fontes de germoplasma de milho-pipoca e cinco testemunhas de milho comum, cruzadas com o indutor KHI.

Germoplasma	Tipo	HIR, %	IC	
			LI ¹	LS ²
1	Pipoca	0,00	0,00	100
2	Pipoca	1,24	0,62	2,46
3	Pipoca	0,18	0,08	0,41
4	Pipoca	1,21	0,73	2,00
5	Pipoca	1,17	0,69	1,98
6	Pipoca	0,22	0,06	0,89
10	Pipoca	0,14	0,02	1,01
11	Pipoca	0,07	0,02	0,21
12	Pipoca	0,00	0,00	100
13	Pipoca	0,02	0,01	0,06
17	Pipoca	0,08	0,02	0,32
18	Pipoca	0,07	0,03	0,16
20	Pipoca	0,00	0,00	100
22	comum	0,03	0,02	0,05
Média		0,32	-	-

¹Limite inferior

²Limite superior

6 DISCUSSÃO

A inibição do marcador *R1-nj* pode limitar o uso da tecnologia DH em programas de melhoramento de milho com indutores que não possuem sistemas de marcadores alternativos ou complementares para a seleção de haploides (CHAIKAM et al., 2015). Além da inibição de cor, a expressividade variada do marcador *R1-nj*, tanto para área marcada, quanto para a intensidade da cor da antocianina no endosperma e embrião afetam a eficiência na identificação de haploides. Em algumas fontes de germoplasma, toda a área do endosperma expressa o fenótipo Navajo, enquanto em outras apenas a região de fixação do estilo-estigma é marcada, baixa expressividade da área marcada e intensidade de coloração de antocianina, no endosperma ou embrião, normalmente está associada a altas taxas de classificação incorreta (PRIGGE et al. 2011). Em milho-pipoca há poucas informações a respeito da expressão deste marcador, neste estudo consideramos a proporção entre sementes com endosperma roxo e o total de sementes induzidas como medida de penetrância (PE).

Entre os materiais de milho-pipoca estudados, 70%, exibiram PE<65%, com média 69,93%. As testemunhas de milho apresentaram 79,75% de média para a PE. Valores baixos de PE afetam negativamente a eficiência na seleção de haploides, considerando uma PE de 70%, 30% das sementes colhidas seriam descartadas, pois não seria possível identificar haploides através do marcador *R1-nj*. Há variação considerável na expressão do fenótipo Navajo entre as origens do germoplasma utilizado como fonte. Os valores baixos das estimativas de PE em germoplasma (tropical x temperado) e tropical indicam uma maior frequência de inibidores nestes germoplasma, como o *C1-I*, *C2-Idf* e *in-1D*. O sistema marcador de cor *R1-nj* pode, portanto, ser ineficiente para derivar linhagens DH em germoplasma tropical de milho-pipoca. Chaikam et al., (2015), propõem que seja feita uma seleção cuidadosa dos genitores que serão utilizados na síntese do germoplasma-fonte, quanto à ausência de inibidores de antocianina. A menor estimativa de PE do marcador *R1-nj* em germoplasma de milho-pipoca tropical, indica a necessidade de utilizar indutores equipados com outros sistemas de classificação haploide/diploide que possam complementar o *R1-nj* para identificar haploides com maior eficiência.

Rotarenc et al. (2010) desenvolveram linhagens indutoras combinando o sistema marcador *R1-nj* com outros genes de antocianina *B1* e *P1I*, que permitem o acúmulo de antocianina em tecidos de plântulas como raízes, para facilitar a identificação de haploides no estágio de plântula quando a expressão de *R1-nj* é inibida. Indutores com alto teor de óleo foram desenvolvidos como uma alternativa para automatizar e aumentar a precisão de seleção

de haploides, principalmente quando existe inibição do *RI-nj* (MELCHINGER et al., 2013).

As linhagens apresentaram valores mais altos de PE, comparado às populações e híbridos interpopulacionais, sendo que das cinco linhagens estudadas três apresentaram PE>90% e duas apresentaram PE>85%, apenas a linhagem tropical 5 apresentou PE abaixo de 50% (Tabela 3). Como a estratégia mais utilizada para a produção de linhagens DH, é a extração de haploides de cruzamentos biparentais entre linhagens elite (MELCHINGER et al., 2016; PRIGGE et al., 2012), é relevante saber que a média de PE foi >80% (Tabela 3). Juntos, esses resultados indicam variação na expressão do fenótipo Navajo em diferentes origens de germoplasma e bases genéticas de milho-pipoca, quando cruzados com um indutor haploide baseado em *RI-nj* que pode afetar a eficiência na seleção de sementes haploides.

A identificação correta da fração haploide no grupo de sementes geradas pelos cruzamentos de indução é umas das etapas mais importante e trabalhosa em programas de produção de linhagens DH (RIBEIRO et al., 2018). Normalmente, isso é feito utilizando o marcador *RI-nj*. No entanto, uma fração das sementes classificadas como haploides putativos, não são de fato haploides, quando se utiliza este marcador.

As estimativas de HIR baseado no *RI-nj* são superestimadas, isso se deve em grande parte à alta proporção de sementes diploides classificadas erroneamente como sementes haploides, conforme indicado pela média alta de FDR (26,04%) comparado ao FNR (0%) (Tabela 4), encontrado em germoplasma de milho-pipoca, utilizando como classificação “padrão ouro” o vigor relativo de plântulas. A alta FDR média associada ao marcador *RI-nj*, pode ser atribuída à presença de genes inibidores, expressividade variada e penetrância incompleta deste marcador (BELICUAS et al., 2007). Fatores ambientais, como o teor de umidade das sementes Rotareno et al., (2010) e bolsas de ar sob o pericarpo Prigge et al., (2011), também podem afetar a intensidade da cor e consequentemente levar a uma classificação errônea do nível de ploidia das classes avaliadas. No caso de milho-pipoca esperava-se valores mais elevados de FDR, devido o tamanho menor e o formato arredondado das sementes que dificulta a visualização do embrião o que pode aumentar a taxa de erro humano na classificação haploide/diploide. Porém o valor médio de FDR encontrado em milho-pipoca foi inferior ao encontrado nas testemunhas de milho. Os valores de FDR encontrados em germoplasma de origem tropical e (tropical x temperado) foram superiores ao encontrado germoplasma de origem temperada. A expressão do fenótipo Navarro pode ser totalmente inibida ou segregar se o germoplasma-fonte envolvido carregar algum dos três genes (*C1-I*, *C2-Idf* e *In1-D*) que inibem a síntese de antocianinas (EDER; CHALYK, 2002). Esses genes inibidores foram relatados como presentes principalmente em germoplasma

tropical (EDER ;CHALYK 2002, RÖBER et al. 2005). A FDR média, encontrada nas linhagens (28,67%) e híbridos interpopulacionais (27,83%), foram superiores ao valor médio encontrado para as populações (25,57%). Entre os haploides putativos gerados a partir das linhagens 2, 14, 6 e 15 não foram identificados FP, apresentando valores de FDR e MCC de 0 e 1, respetivamente. A linhagem 1 apresentou o maior valor de FDR (65,74%) (Tabela 4), também foram encontradas estimativas elevadas para as fêmeas 12 e 20 (FDR>50%). Embora classificação com o marcador *R1-nj* leve a FDR de elevada magnitude, excedendo o nível aceitável para fins de classificação, os valores médios de FNR foram baixos, isso é importante especialmente para o caso de indutores com baixa HIR, como é o caso do indutor KHI (HIR<1%) (Tabela 7), pois mesmo com aumento do tamanho das populações de plantas nos campos de indução, como recomendado por Melchinger et al., (2013), há um número limitado de haploides disponíveis, o que pode impedir que o número linhagens DH planejado pelo melhorista, seja atingido.

Neste trabalho a eficiência do marcador *R1-nj* na seleção de haploides (i) e do vigor relativo de plântulas em identificar FP (ii), erroneamente classificados por este marcador, foi avaliada utilizando como “padrão ouro” a CF, um método confiável para determinar o nível de ploidia (DELAAT et al. 1987). Para isso, foram estimadas as estatísticas FDR, FNR e MCC, com e sem eliminação de FP. A eliminação de FP pela avaliação do vigor reduziu as estimativas de FDR para maioria das fêmeas avaliadas, com exceção das fêmeas 1, 12 e 20 onde não foram identificados haploides pela CF e as fêmeas de 2 e 6 em que o vigor não foi capaz de identificar FP. No entanto, os valores médios de MCC mantiveram-se de baixa magnitude, indicando baixa correlação entre a ploidia determinada pelo *R1-nj* e o verdadeiro nível de ploidia das plântulas avaliadas. Melchinger et al. (2013) também encontraram altas taxas de falsos positivos, variando de 7,8 a 67,6%, utilizando o marcador *R1-nj*. A eliminação de FP através da avaliação do vigor relativo de plântulas pode ser útil, pois é um método fácil e de baixa tecnologia e que permite eliminar uma fração dos FP, de forma confiável, pois nenhum dos 252 FP identificados foi classificado como haploide verdadeiro pela CF. Eliminar falsos positivos antes da duplicação cromossômica é uma estratégia importante para reduzir custo com reagentes, desperdício de espaço e insumos nas estufas e/ou campo de multiplicação de sementes DH₀ e recursos com mão de obra. (CHAIKAM et al., 2015, 2016; CHOE et al., 2012). O indutor de haploidia KHI apresentou média de HIR de 0,87%, em milho-pipoca após o ajuste pela FDR do vigor (Tabela 7) e de 0,34% se ajustada pela FDR da CF (Tabela 9). Essas taxas são muito baixas, considerando que atualmente estão disponíveis indutores com HIR>10%, como nos RWS e UH400 (CHAIKAM et al., 2016). Indutores com

baixa HIR estão mais propensos a erros na classificação haploide/diploide pelo fenótipo Navarro (COUTO et al., 2019; XU et al., 2013).

7 CONCLUSÕES

Há indução *in vivo* de haploides maternos em milho-pipoca.

A penetrância do marcador *RI-nj* é variável em função da origem e base genética do germoplasma-fonte.

A seleção de haploides putativos pelo fenótipo Navajo deve ser associada a outros métodos de confirmação do nível de ploidia de maior precisão.

A avaliação do vigor de plântulas pode ser utilizada no sistema de classificação haploides/diploide associada ao marcador *RI-nj* reduzindo o número de falsos positivos.

REFERÊNCIAS

- BATTISTELLI, G. M. et al. Production and identification of doubled haploids in tropical maize. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 4230–4242, 2013.
- BYLICH, V. G.; CHALYK, S. T. Existence of pollen grains with a pair of morphologically different sperm nuclei as a possible cause of the haploidinducing capacity in ZMS line. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 70, p. 33, 1996.
- CHAIKAM, V.; MAHUKU, G. Chromosome doubling of maternal haploids. In: **Doubled haploid technology in maize breeding theory and practice**. Mexico: CIMMYT, 2012. p. 24-29.
- CHALYK, S. T. Obtaining fertile pollen in maize maternal haploids. **Maize Genetics Cooperation**, Urbana, v. 74, n. 1, p. 17-18, 2000.
- CHASE, S. S. Production of momozygous diploids of maize from monoploids. **Agronomy Journal**, Madison, v. 44, p. 263-267, 1952.
- CHASE, S. S. Production of monozygous diploids of maize from monoploids. *Agronomy Journal*, Madison, v. 44, p. 263-267, 1951. CHASE, S. S. Techniques for isolating monoploid maize plants. **Journal of Botany**, London, v. 34, p. 582, 1947.
- CHASE, S. S.; NANDA, D. K. Comparison of variability in inbred lines and monoploid-derived lines of maize (*Zea mays* L.). **Crop Science**, Madison, v. 5, p. 275-276, 1965.
- CHAIKAM, V. et al. Analysis of effectiveness of R1-nj anthocyanin marker for in vivo haploid identification in maize and molecular markers for predicting the inhibition of R1-nj expression. **TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik**, v. 128, n. 1, p. 159–171, 2015.
- CHAIKAM, V. et al. Development and validation of red root marker-based haploid inducers in maize. **Crop Science**, v. 56, n. 4, p. 1678–1688, 2016.
- CHAIKAM, V. et al. Doubled haploid technology for line development in maize: technical advances and prospects. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 132, n. 12, p. 3227–3243, 2019.
- CHALYK, S. T. Properties of maternal haploid maize plants and potential application to maize breeding. **Euphytica**, v. 79, n. 1–2, p. 13–18, 1994.
- COE, E. H.; SARKAR, K. R. The detection of haploids in maize. **Journal of Heredity**, v. 55, n. 5, p. 231–233, 1964.
- COUTO, E. G. DE O. et al. In vivo haploid induction and efficiency of two chromosome duplication protocols in tropical maize. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 39, n. 5, p. 435–442, 2015.
- DA SILVA, G. J. et al. Produção de haplóides. **Sete Lagoas, MG**, v. 81, n. Produção de haplóides androgenéticos em milho, p. 1–17, 2009.
- DEIMLING, S.; ROBER, F.; GEIGER, H. H. Methodik und genetic der in-vivoHaploideinduktion bei mais. **Vortrage fur Pflanzenzuchtung, Quedlinburg**, v. 38, p. 203-224, 1997.
- DOLEZEL, J. Application of flow cytometry for the study os plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, Olomouc, v. 38, p. 285-302, 1997.

DONG, X. et al. Fine mapping of qhirl influencing in vivo haploid induction in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 126, n. 7, p. 1713–1720, 2013.

EDER, J.; CHALYK, S. T. In vivo haploid induction in maize. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 104, n. 20, p. 703-708, Aug. 2002.

FERRIE, A. M. R.; CASWELL, K. L. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 104, n. 3, p. 301–309, 2011.

FRITSCHÉ-NETO, R.; GARBUGLIO, D. D.; BORÉM, A. Duplo-haploides. In: BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. (Ed.). **Biotecnologia aplicado ao melhoramento de plantas**. Viçosa, MG: UFV, 2012. p. 267-301.

FORD, R. H. Inheritance of kernel color in corn: Explanations & investigations. **American Biology Teacher**, v. 62, n. 3, p. 181–188, 2000.

GALVÃO JCC, SAWAZAKI E, MIRANDA GV (2000) Behavior of popcorn hybrids in Coimbra. **Revista Ceres** 47:231–237.

GAYEN, P. et al. Chromosome doubling in haploids through colchicine. **Maize Genetics Cooperation News Letter**, Columbia, v. 68, n. 1, p. 65, 1994.

GEIGER, H. H.; GORDILLO, G. A. Doubled haploids in hybrid maize breeding. **Maydica**, Bergamo, v. 54, n. 1, p. 485-499, Jan. 2009.

HOSENEY, R. C.; ZELEZNAK, K.; ABDELRAHMAN, A. Mechanism of popcorn popping. **Journal of Cereal Science**, v. 1, n. 1, p. 43–52, jan. 1983.

HU, H. et al. The genetic basis of haploid induction in maize identified with a novel genome-wide association method. **Genetics**, v. 202, n. 4, p. 1267–1276, 2016.

KEBEDE, A. Z. et al. 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.

KELLIHER, T. et al. MATRILINEAL, a sperm-specific phospholipase, triggers maize haploid induction. **Nature**, v. 542, n. 7639, p. 105–109, 2017.

KLEIBER, D. et al. Haploid fertility in temperate and tropical maize germplasm. **Crop Science**, v. 52, n. 2, p. 623–630, 2012.

KRUG, C. A.; CONAGIN, A.; JUNQUEIRA, A. A. B. Cultura e adubação do
LASHERMES, P.; BECKERT, M. A genetic control of maternal haploidy in maize (*Zea mays* L.) and selection of haploid inducing lines. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 76, p. 405-410, 1988.

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

LOUREIRO, J.; SANTOS, C. Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal. **Boletim de Biotecnologia**, São Paulo, v. 77, n. 1, p. 18-29, jan. 2004. milho. São Paulo: **Instituto de Potassa**, 1996. p. 96-98.

LASHERMES, P.; BECKERT, M. Genetic control of maternal haploidy in maize (*Zea mays* L.) and

- selection of haploid inducing lines. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 76, n. 3, p. 405–410, 1988.
- LIU, S. et al. Molecular markers linked to important genes in hard winter wheat. **Crop Science**, v. 54, n. 4, p. 1304–1321, 2014.
- MELCHINGER, A. E. et al. In vivo haploid induction in maize: Comparison of different testing regimes for measuring haploid induction rates. **Crop Science**, v. 56, n. 3, p. 1127–1135, 2016.
- MILANI, K. F. et al. Effectiveness of the R1-navajo embryo marker on sorting haploids in tropical maize germplasm. **Maydica**, v. 61, n. 4, 2016.
- MOLENAAR, W. S. et al. Haploid male fertility and spontaneous chromosome doubling evaluated in a diallel and recurrent selection experiment in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 132, n. 8, p. 2273–2284, 2019.
- NANDA, D. K.; CHASE, S. S. An embryo marker for detecting monoploids of maize (*Zea mays* L.). **Crop Science**, Madison, v. 6, p. 213–215, 1966.
- NAIR, S. K. et al. Dissection of a major QTL *qhir1* conferring maternal haploid induction ability in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 130, n. 6, p. 1113–1122, 18 jun. 2017.
- PIERRE, P. M. O. et al. Doubled haploids: importance in the genetic breeding of maize. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 10, n. 1, p. 1–16, 2011.
- PRASANNA B. M.; VIJAY, C.; GEORGE, M. Doubled Haploid Technology in Maize Breeding: Theory and Practice. **Cimmyt**, p. 1–56, 2012.
- PRIGGE, V. et al. Doubled haploids in tropical maize: I. effects of inducers and source germplasm on in vivo haploid induction rates. **Crop Science**, v. 51, n. 4, p. 1498–1506, 2011.
- RIBEIRO, C. B. et al. Haploid identification using tropicalized haploid inducer progenies in maize. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 16–23, 2018.
- RANDOLPH, L. F. Some effects of high temperature on polyploidy and other variations in maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 18, n. 1, p. 222–229, Jan. 1932.
- REN, J. et al. Novel technologies in doubled haploid line development. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, n. 11, p. 1361–1370, 2017.
- ROBER, F. K.; GORDILLO, G. A.; GEIGER, H. H. In vivo haploid induction in maize-performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding. **Maydica**, Bergamo, v. 50, n. 2, p. 275–283, Feb. 2005.
- ROTARENCO, V. A. et al. New inducers of maternal haploids in maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 84, n. 1, p. 1–7, Jan. 2010.
- SCAPIM, C. A. et al. Componentes genéticos de médias e depressão por endogamia em populações de milho-pipoca. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 1, p. 36–41, 2006.
- WAN, Y. et al. The use of antimicrotubule herbicides for the production of doubled haploid plants from anther-derived maize callus. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 81, n. 2, p. 205–211, 1991.
- SARKAR, K. R.; COE, E. H. A genetic analysis of the origin of maternal haploids in maize. **Genetics**, v. 54, n. 2, p. 453–64, 1966.

SCAPIM, C. A. et al. Componentes genéticos de médias e depressão por endogamia em populações de milho-pipoca. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 36–41, 2006.

SILVA, T. R. DA C. et al. Desempenho agrônômico de genótipos de milho pipoca no Norte e Noroeste do Estado do Rio de Janeiro. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 35, n. 1, p. 57–63, 2013.

TIAN, X. et al. Hetero-fertilization together with failed egg–sperm cell fusion supports single fertilization involved in in vivo haploid induction in maize. **Journal of Experimental Botany**, v. 69, n. 20, p. 4689–4701, 2018.

ZABIROVA, E. R. et al. Technology of the mass accelerated production of homozygous lines: in Russian. **Kukuruza I Sorgo**, Moskva, v. 4, n. 1, p. 17-19, 1996.

ZHANG, Z. et al. Chromosome elimination and in vivo haploid production induced by Stock 6-derived inducer line in maize (*Zea mays* L.). **Plant Cell Reports**, v. 27, n. 12, p. 1851–1860, 2008.

ZHAO, X. et al. Fertilization and uniparental chromosome elimination during crosses with maize haploid inducers. **Plant Physiology**, v. 163, n. 2, p. 721–731, 2013.

ZIEGLER-HEITBROCK, H. W. L. et al. CD14 is expressed and functional in human B cells. **European Journal of Immunology**, v. 24, n. 8, p. 1937–1940, ago. 1994.

RANDOLPH, L. F. Some effects of high temperature on polyploidy and other variations in maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 18, n. 1, p. 222–229, Jan. 1932.

REN, J. et al. Novel technologies in doubled haploid line development. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, n. 11, p. 1361–1370, 2017.

ROBER, F. K.; GORDILLO, G. A.; GEIGER, H. H. In vivo haploid induction in maize–performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding. **Maydica**, Bergamo, v. 50, n. 2, p. 275-283, Feb. 2005

ROTARENCO, V. A. et al. New inducers of maternal haploids in maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 84, n. 1, p. 1-7, Jan. 2010.

SCAPIM, C. A. et al. Componentes genéticos de médias e depressão por endogamia em populações de milho-pipoca. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 1, p. 36-41, 2006.

WAN, Y. et al. The use of antimicrotubule herbicides for the production of doubled haploid plants from anther-derived maize callus. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 81, n. 2, p. 205–211, 1991.