

## Efeito do Avanço de Gerações na Indução de Haploidia em Populações-Fonte de Milho



OBJETIVOS DE  
DESENVOLVIMENTO  
SUSTENTÁVEL

2 FOME ZERO  
E AGRICULTURA  
SUSTENTÁVEL



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Milho e Sorgo  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

**BOLETIM DE PESQUISA  
E DESENVOLVIMENTO  
193**

**Efeito do Avanço de Gerações na Indução de  
Haploidia em Populações-Fonte de Milho**

Roberto dos Santos Trindade  
Lauro José Moreira Guimarães  
Isabel Regina Prazeres de Souza  
Paulo Evaristo de Oliveira Guimarães  
Ana Carolina Aparecida da Silva  
Bruna Lopes Mariz  
Mariana Rodrigues Ribeiro

*Embrapa Milho e Sorgo  
Sete Lagoas, MG  
2019*

**Esta publicação está disponível no endereço:**  
<https://www.embrapa.br/milho-e-sorgo/publicacoes>

**Embrapa Milho e Sorgo**  
Rod. MG 424 Km 45  
Caixa Postal 151  
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG  
Fone: (31) 3027-1100  
Fax: (31) 3027-1188  
[www.embrapa.br/fale-conosco/sac](http://www.embrapa.br/fale-conosco/sac)

Comitê Local de Publicações  
da Unidade Responsável

Presidente  
*Maria Marta Pastina*

Secretário-Executivo  
*Elena Charlotte Landau*

Membros  
*Antonio Claudio da Silva Barros, Cynthia  
Maria Borges Damasceno, Maria Lúcia  
Ferreira Simeone, Roberto dos Santos  
Trindade e Rosângela Lacerda de Castro*

Revisão de texto  
*Antonio Claudio da Silva Barros*

Normalização bibliográfica  
*Rosângela Lacerda de Castro (CRB 6/2749)*

Tratamento das ilustrações  
*Tânia Mara Assunção Barbosa*

Projeto gráfico da coleção  
*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Editoração eletrônica  
*Tânia Mara Assunção Barbosa*

Foto da capa  
*Roberto dos Santos Trindade*

**1ª edição**  
*Publicação digitalizada (2019)*

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,  
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Nome da unidade catalogadora

---

Efeito do avanço de gerações na indução de haploidia em populações-fonte de  
milho / Roberto dos Santos Trindade... [et al.]. – Sete Lagoas : Embrapa Milho  
e Sorgo, 2019.

22 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo,  
ISSN 1679-0154; 193).

1. *Zea mays*. 2. Melhoramento vegetal. 3. Linhagem. 4. Genética. I. Trindade,  
Roberto dos Santos. II. Guimarães, Lauro José Moreira. III. Souza, Isabel Regina  
Prazeres de. IV. Guimarães, Paulo Evaristo de Oliveira. V. Silva, Ana Carolina  
Aparecida da. VI. Mariz, Bruna Lopes. VII. Ribeiro, Mariana Rodrigues. VIII. Série.

CDD 633.15 (21. ed.)

## Sumário

---

Resumo .....	04
Abstract .....	06
Introdução.....	07
Material e Métodos .....	09
Resultados e Discussão .....	11
Conclusões.....	19
Agradecimentos.....	19
Referências .....	19

## Efeito do Avanço de Gerações na Indução de Haploidia em Populações-Fonte de Milho

Roberto dos Santos Trindade<sup>1\*</sup>

Lauro José Moreira Guimarães<sup>2</sup>

Isabel Regina Prazeres de Souza<sup>3</sup>

Paulo Evaristo de Oliveira Guimarães<sup>4</sup>

Ana Carolina Aparecida da Silva<sup>5</sup>

Bruna Lopes Mariz<sup>6</sup>

Mariana Rodrigues Ribeiro<sup>7</sup>

**Resumo** – O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do avanço de gerações na obtenção de haploides de milho em populações-fonte de diferentes grupos heteróticos. Os genótipos avaliados foram originados de um campo de indução de haploidia implantado na Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, Minas Gerais, em setembro de 2015. Para as avaliações, foram utilizadas 10 populações-fonte, sendo quatro do grupo heterótico Flint e seis do grupo Dent, nas gerações  $F_1$  e  $F_2$ . Para indução, utilizou-se o indutor materno obtido do cruzamento entre plantas do híbrido TAIL P1 x TAIL P2. Para cada população-fonte, foram tomadas sete espigas polinizadas manualmente para avaliação. Foram determinados o número médio de grãos por espiga, o número de sementes haploides, as taxas de indução de haploidia e a expressão do gene R1-navajo, dentre outros caracteres. Para comparação dos dados obtidos entre gerações e grupos heteróticos, utilizou-se o teste de Wilcoxon. Identificou-se um maior número de haploides em genótipos do grupo Dent, em comparação com genótipos Flint, mas não foi

---

<sup>1\*</sup> Eng.-Agrôn., DSc. Em Genética e Melhoramento de Plantas, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo. Autor correspondente.

<sup>2</sup> Eng.-Agrôn., PhD. em Plant Science, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo.

<sup>3</sup> Eng.-Agrôn., DSc. em Genética e Melhoramento de Plantas, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo.

<sup>4</sup> Eng.-Agrôn., DSc. em Genética e Melhoramento de Plantas, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo.

<sup>5</sup> Eng.-Agrôn., Bacharel em Biosistemas, Estagiária da Embrapa Milho e Sorgo.

<sup>6</sup> Eng.-Agrôn., Bacharel em Biosistemas, Estagiária da Embrapa Milho e Sorgo.

<sup>7</sup> Eng.-Agrôn., Doutoranda em Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa.

possível determinar um padrão de redução ou aumento das taxas de indução de haploides em função do avanço de gerações de endogamia.

**Termos para indexação:** Linhagens duplo-haploides; marcador R1-navajo; indução de haploidia.

## Generations Advance Effects in Haploid Induction on Maize Donor Populations

**Abstract** – The objective of this work was to evaluate the effect of the advance of generations on the identification of haploids in maize in source populations of different heterotic groups. The genotypes evaluated were originated from a haploid induction nursery implanted at Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Minas Gerais, in September 2015. For the evaluations, 10 source populations were used, four of the Flint heterotic group and six of the Dent group, in the F1 and F2 generations. For induction, the maternal inductor obtained from the cross between plants of the TAIL hybrid P1 x TAIL P2 was used. For each source population, seven ears were pollinated manually for evaluation. The mean number of grains per ear, number of haploid seeds, haploid induction rates and R1-Navajo gene expression, among others, were determined. The Wilcoxon test was used to compare the data obtained between generations and heterotic groups. A greater number of haploids were identified in genotypes of the Dent group compared to Flint individuals, but it was not possible to determine a pattern of reduction or increase of haploid induction rates as a function of the advancement of generations of inbreeding.

**Index terms:** doubled haploid lines; R1-navajo marker; haploid induction.

## Introdução

---

A tecnologia de duplo-haploides (DHs) é utilizada em programas de melhoramento de milho para reduzir o tempo em desenvolvimento de novas cultivares. Essa metodologia permite a obtenção de linhagens homozigotas em até três gerações, propiciando rapidez e eficiência na utilização de recursos nos programas de melhoramento (Trindade et al., 2017).

A produção de linhagens duplo-haploides em milho passa por quatro etapas (Prigge; Melchinger, 2012): i) indução de haploidia, utilizando genótipos de milho com potencial genético para esta finalidade; ii) identificação de possíveis haploides nas populações-fonte, com base em marcadores fenotípicos ou outros métodos; iii) duplicação cromossômica, por meio do uso de antimitóticos para restauração da fertilidade em haploides; e iv) a autofecundação das linhagens obtidas para incremento da quantidade de sementes.

A etapa de identificação de haploides visa otimizar o processo de obtenção de DHs, já que a duplicação cromossômica demanda uso de reagentes de alto custo e elevada toxicidade, sendo importante levar para esta etapa apenas haploides putativos. Cada linha conduzida representa um custo adicional dentro de um programa de melhoramento, e erros na seleção de haploides levam à condução de fileiras que terão que ser descartadas posteriormente, resultando em demanda adicional de mão de obra para este fim.

A identificação de haploides de milho é feita com base na coloração de sementes das populações-fonte com antocianina, característica controlada pelo gene *R1-navajo* (R1-nj). Neste sistema de identificação, são consideradas haploides as sementes com ausência de pigmentação púrpura em seu embrião e presença de pigmentação púrpura no endosperma, o que indica que houve a formação de um embrião, mas que não ocorreu troca de informação genética entre os parentais envolvidos no cruzamento (Coe; Sarkar, 1964; Nanda; Chase, 1966). Esta metodologia apresenta as vantagens de fácil aplicação e baixo custo, demandando apenas que o gene R1-nj esteja introgridido no indutor.

Entretanto, a pigmentação da semente por antocianina pode variar em extensão e intensidade em função da constituição genética da planta. Além da presença do gene R1-nj em sua forma dominante, a expressão dos genes

A1, A2, Bz1, Bz2, C1 e C2, ligados à síntese de antocianina, contribui para intensificar a pigmentação de sementes com coloração púrpura (Coe, 1994; Geiger, 2009). Por outro lado, a presença dos genes C1-l, C2-ldf e in-1D, todos envolvidos na rota metabólica da antocianina, é relatada como inibidora da biossíntese desse composto no endosperma e no embrião das sementes (Coe et al., 1988; Stinard; Sachs, 2002; Milani et al., 2016).

Diversos autores ressaltam que, quando a indução de haploidia é realizada utilizando-se populações-fonte de origem tropical, em alguns casos, observa-se redução ou ausência da marcação de sementes com antocianina, denotando que a constituição genética do germoplasma tropical pode interferir com maior frequência na expressão desse caráter, dificultando ou impedindo a identificação de haploides (Belicuas et al., 2007; Chaikam; Prassanna, 2012; Chaikam et al., 2015). Esse fato torna importante a avaliação das populações-fonte quanto à expressão do fenótipo R1-nj, visando a obtenção de linhagens DH a partir de germoplasma tropical.

A tecnologia de linhagens duplo-haplóides está alinhada com o objetivo de desenvolvimento sustentável 2 (Fome Zero e Agricultura Sustentável) por ser uma metodologia para acelerar o desenvolvimento de linhagens homocigotas de milho. A linhagem é o principal insumo para o melhoramento de cultivares e veículo para fixação e introgressão de genes superiores na cultura do milho, podendo ser utilizada para a obtenção de híbridos e variedades. Desta forma, o uso de linhagens melhoradas e da tecnologia de linhagens duplo-haplóides é uma estratégia para garantir a segurança alimentar e a disponibilidade de novas cultivares de milho para plantio.

Para a produção de duplo-haplóides, tendo em vista que a indução de haploidia em milho pode ser efetuada a partir de qualquer tipo de população, torna-se mais prático e rápido se obter DHs a partir de híbridos  $F_1$ , em que os parentais são devidamente selecionados de acordo com os interesses do programa de melhoramento. Contudo, o avanço de gerações de  $F_1$  para  $F_2$  possibilita a recombinação e segregação de genes ligados a características de interesse agrônomo, mas pode também afetar a expressão do gene R1-nj e causar variação na identificação de sementes haploides. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do avanço de gerações na seleção de haploides em milho em populações-fonte de grupos heteróticos distintos.

## Material e Métodos

---

O experimento foi conduzido em campo de indução de haploidia, na área experimental da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, Minas Gerais, em setembro de 2015. Como indutor de haploidia foi utilizada uma população derivada do híbrido indutor de haploidia TAIL P1 x TAIL P2, com coloração de grão branca e introgressão de genes para pigmentação de sementes com antocianina (marcador R1-nj). A sigla TAIL faz referência ao termo *Tropically Adapted Inducer Lines* (linhagens indutoras de haploidia tropicalizadas), tratando-se de indutores de haploidia gimnogenéticos adaptados ao clima tropical, desenvolvidos pelo Centro Internacional Melhoramento de Milho e Trigo (CIMMYT).

As populações-fonte utilizadas foram 10 genótipos obtidos a partir do cruzamento de linhagens-elite de milho do programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo, nas gerações  $F_1$  e  $F_2$ , a saber: i) quatro populações, derivadas do cruzamento entre linhagens do grupo heterótico Flint; ii) seis populações derivadas do cruzamento entre linhagens do grupo heterótico Dent. Ambas as populações  $F_1$  foram autofecundadas para obtenção da geração  $F_2$ .

Cada população-fonte foi semeada em sete linhas de 4,2 m, com espaçamento entre linhas de 0,8 m e com cinco sementes por metro linear. O indutor de haploidia foi semeado entre as linhas das populações-fonte, como genitor masculino, na proporção 1:1, em três épocas distintas: 0, 10 e 20 dias após o plantio das populações-fonte, visando sincronizar o florescimento das fontes com o dos indutores. Após o último plantio, houve um isolamento temporal de 20 dias de outros plantios, para evitar a contaminação do campo com pólen exógeno. A condução do plantio seguiu todos os tratamentos culturais recomendados para a cultura do milho (Cruz et al., 2006).

Para indução de haploides, foram removidos os pendões das populações-fonte que receberam o pólen do genótipo indutor. Para estimativa do potencial máximo de indução e garantia da obtenção de haploides em todas as linhas, realizaram-se duas polinizações manuais em três espigas de cada fileira das populações-fonte. A colheita do campo foi efetuada manualmente, com identificação de espigas conforme a linha onde foi colhida e população-fonte

de origem, sendo posteriormente separadas as induzidas por polinização manual de espigas cruzadas de forma natural com o indutor.

Para avaliação da eficiência de indução de haploidia nas populações, de cada uma das sete linhas semeadas foi selecionada aleatoriamente uma espiga induzida por polinização manual, tendo-se assim sete repetições para cada genótipo. Estas espigas foram separadas por população-fonte, grupo heterótico e geração de endogamia, sendo identificadas as sementes haploides, diploides e com inibição da expressão do gene R1-nj.

A eficiência da indução de haploidia foi avaliada com base nos seguintes parâmetros: i) total de sementes obtidas por espiga (TSE), definido como o número de sementes obtidas por espiga de cada material; ii) número de sementes haploides (NSH), referente ao número de sementes haploides por espiga, identificadas por presença de antocianina no endosperma e ausência de pigmentação no embrião; iii) número de sementes diploides (NSD), referente ao número de sementes haploides por espiga, identificadas pela presença de antocianina no endosperma e no embrião; iv) número de sementes com inibição da expressão do gene R1-nj (NSI), referente ao número de sementes com ausência de pigmentação com antocianina em toda a semente; v) taxa de indução de haploidia, em porcentagem (TIH), definida pela fórmula  $TIH = (\text{n}^\circ \text{ de sementes haploides} / \text{n}^\circ \text{ total de sementes}) \times 100$ ; e vi) expressão do gene R1-nj, dada pela razão entre o número de sementes com presença de antocianina e o número total de sementes.

Para análise dos dados obtidos, utilizaram-se estatística descritiva e estatística não paramétrica. Foram estimadas medidas de posição (média, mediana), frequência (moda) e de dispersão (desvio padrão da média), para cada grupo heterótico, e geração de endogamia.

A comparação entre as gerações  $F_1$  e  $F_2$  dos haploides derivados das diferentes populações-fonte dos grupos Flint e Dent para as características avaliadas no experimento foi realizada por meio do teste de Wilcoxon. O teste de Wilcoxon é o equivalente não paramétrico ao teste t para duas amostras, podendo ser utilizado para dados ordinais, e considera a existência de relação entre as amostras. Foi estimada também a correlação entre as características avaliadas nas progênies em cada grupo heterótico e geração de endogamia utilizando-se o método de Spearman. Todas as análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software SAS (SAS Institute, 2000).

## Resultados e Discussão

---

Para as populações-fonte do grupo heterótico Flint, o avanço de gerações ocasionou aumento dos valores de média geral para todas as características avaliadas (Tabela 1), com exceção da taxa de indução de haploidia (TIH). Para populações-fonte do grupo heterótico Dent, houve aumento dos valores da média geral com o avanço entre gerações para todas as características avaliadas. Comparando-se as populações-fonte dos dois grupos heteróticos em termos de valores absolutos, verificam-se valores mais elevados da média geral para todos os caracteres no grupo Dent, com exceção da TIH na geração  $F_1$ , e da expressão do gene  $R1-nj$  ( $R1-nj$ ) em  $F_1$  e  $F_2$ , que foram maiores para populações-fonte do grupo heterótico Flint.

Com o avanço de gerações, a média geral da TIH se reduziu de 6,46 para 5,60 nas populações-fonte do grupo Flint, e se elevou de 6,38 para 10,11 nas populações-fonte Dent (Tabela 1). Chaikam e Prassanna (2012) indicam o valor de 6% como a taxa mínima de rendimento na indução de haploidia para implantação de um programa de desenvolvimento de linhagens duplo-haploides. Assim, verifica-se que os valores de TIH obtidos para as populações-fonte avaliadas estão de acordo com o indicado por estes autores. Porém, os valores do limite superior de TIH obtidos neste trabalho (Tabela 1) indicam que condições que favoreçam a polinização por parte dos indutores e um melhor manejo das populações-fonte podem elevar a obtenção de haploides

**Tabela 1.** Estimativas de média, mediana, moda, limites superior e inferior e desvio padrão para número total de sementes (TSE), número de sementes haploides (NSH), número de sementes diploides (NSD), número de sementes com inibição da expressão do gene *R1-nj* (NSI), taxa de indução de haploidia (TIH) e relação entre expressão e inibição do gene *R1-nj* (*R1-nj*), de quatro populações-fonte do grupo Flint e seis populações-fonte do grupo Dent, nas gerações  $F_1$  e  $F_2$ , cruzadas com indutores de haploidia tropicalizados, em Sete Lagoas, novembro de 2015.

Características	FLINT											
	Média Geral		Mediana		Moda		Limite superior		Limite inferior		Desvio padrão	
	F1	F2	F1	F2	F1	F2	F1	F2	F1	F2	F1	F2
TSE	73,57	155,00	62	134	Amodal	Amodal	318,00	329,00	18,00	41,00	61,21	78,11
NSH	4,95	7,19	3	4	1	0	32,00	20,00	0,00	0,00	7,26	6,66
NSD	30,86	69,95	28	57	4	0	134,00	205,00	0,00	0,00	30,86	54,27
NSI	37,76	77,81	26	43	16	Amodal	152,00	256,00	6,00	3,00	36,32	65,94
TIH	6,46	5,60	4	5	0	0	21,43	18,35	0,00	0,00	6,02	5,30
<i>R1-nj</i>	48,17	52,56	48,61	60,71	Amodal	0	89,25	97,00	0,00	0,00	28,67	31,36
Características	DENT											
	Média Geral		Mediana		Moda		Limite superior		Limite inferior		Desvio padrão	
	F1	F2	F1	F2	F1	F2	F1	F2	F1	F2	F1	F2
TSE	190,53	213,95	124	185	99	287	556,00	585,00	20,00	25,00	152,75	138,92
NSH	9,79	18,87	7	16	2	2	41,00	107,00	0,00	2,00	10,46	18,28
NSD	65,74	82,85	37	67	21	Amodal	227,00	252,00	1,00	0,00	68,91	61,89
NSI	115,00	112,23	76	95	18	23	457,00	447,00	5,00	6,00	124,69	98,64
TIH	6,38	10,11	4	8	10	Amodal	51,25	32,33	0,00	0,98	8,26	7,61
<i>R1-nj</i>	42,99	50,38	43	47	50	66	97,38	96,55	1,00	4,26	27,86	22,99

Observou-se nos dois grupos heteróticos e nas duas gerações um percentual acima de 50% de inibição da expressão do gene *R1-nj*. Embora a diferença absoluta entre os valores de mediana e média para as características número de sementes haploides (NSH) e taxa de indução de haploidia (TIH) nos grupos Flint e Dent (Tabela 1) não seja elevada, os valores obtidos entre estes dois parâmetros ressaltam a heterogeneidade dos dados alcançados.

A avaliação da moda para NSH, NSD, TIH e *R1-nj* em haploides do grupo Flint derivados de populações-fonte em  $F_2$  resultou em alta frequência de valores iguais a zero (Tabela 1), demonstrando alto percentual de sementes com inibição do gene *R1-nj*, além de ressaltar a dificuldade para obtenção e seleção de haploides utilizando-se germoplasma tropical do tipo Flint. Chaikam et al. (2015), comparando a expressão do gene *R1-nj* em genótipos de milho Flint e Dent de diferentes origens, observaram maior inibição deste gene em genótipos tropicais em comparação com germoplasma temperado, e menor intensidade de coloração por antocianina em grãos do tipo Flint.

Considerando-se os valores de desvio padrão para todas as características avaliadas, observa-se uma variação entre 5,30 e 152,75 (Tabela 1), indicando grande variabilidade fenotípica no conjunto de genótipos avaliado. Embora esta variabilidade também reflita efeitos de natureza ambiental, a existência de variação para as populações-fonte utilizadas denota a possibilidade de seleção com foco em uma maior expressão do gene *R1-nj*. A avaliação das populações-fonte em função dos grupos heteróticos indica que os maiores valores de desvio padrão ocorrem para as características TSE, NDS, NSI e *R1-nj*, com aumento do valor de desvio padrão no grupo heterótico Flint com o avanço de gerações de  $F_1$  para  $F_2$ , e redução do valor do desvio padrão no grupo Dent com o avanço de gerações. Esse resultado é corroborado pela magnitude da diferença entre os limites inferior e superior para TSE, NDS, NSI e *R1-nj*, uma vez que elas apresentaram maior distância entre o limite superior e inferior, em termos absolutos (Tabela 1).

A correlação de Spearman para as características avaliadas (Tabela 2) indica correlações positivas e significativas entre TSE, NSD e NSI no grupo heterótico Flint, tanto na geração  $F_1$  quanto em  $F_2$ . Para o grupo heterótico Dent, observaram-se correlações positivas e significativas entre TSE e NSH, NSD e NSI, em ambas as gerações. Os baixos valores de correlação entre TSE e NSH (0,250 em  $F_1$  e -0,082 em  $F_2$ ) mostram um efeito maior de

genes para inibição do gene R1-nj nesse grupo heterótico, o que reduziria a identificação de sementes haploides neste grupo. Em contraste, a correlação entre TSE e NSH foi significativa no grupo Dent (0,553 em  $F_1$  e 0,486 em  $F_2$ ), confirmando uma maior facilidade para seleção de haploides neste grupo heterótico.

Os valores de correlação de TSE com TIH foram negativos para as populações-fonte avaliadas, independentemente do grupo heterótico e da geração em que foram obtidos os haploides, indicando uma relação inversamente proporcional entre essas características (Tabela 2). Essas correlações negativas podem estar relacionadas à forma de estimativa desta característica (NSH/TSE), entretanto, também há um efeito de pressão de seleção sobre a formação de haploides em milho. Prigge et al. (2012), estudando QTLs relacionados à indução de haploidia em progênies derivadas do cruzamento entre os indutores UH400 e CAUHOI, observaram uma distribuição de frequências destoando da distribuição normal, que se aproximaria mais de uma característica quantitativa. Este fato levou os autores à conclusão de que a indução de haploidia em milho seria um caráter poligênico, mas com expressão dicotômica (haploidia versus diploidia), sendo que a seleção natural desfavoreceria genes para indução de haploidia em razão das desvantagens adaptativas conferidas por este caráter (fertilidade reduzida e baixo desempenho agrônomico), o que explicaria distorções das taxas de segregação mendeliana na indução de haploidia observadas por outros autores (Lashermes; Beckert, 1988; Barret et al., 2008) e a baixa correlação encontrada entre TSE e TIH no presente trabalho.

Foram observados valores baixos de correlação entre TIH e NSD em todas as populações-fonte avaliadas, independentemente do grupo heterótico e da geração de avaliação (Tabela 2). Este resultado era esperado, uma vez que quanto maior a taxa de indução de haploidia tende a ser maior o número de sementes haploides identificadas e, conseqüentemente, menor o número de sementes diploides em uma mesma espiga. Houve correlações negativas e significativas também entre NSI e R1-nj, destacando a correlação inversa que existe entre a expressão e a inibição do gene R1-nj.

**Tabela 2.** Coeficientes de correlação de Spearman entre os caracteres número total de sementes (TSE), número total de sementes haploides (NSH), número total de sementes diploides (NSD), número total de sementes com inibição da expressão do gene *R1-nj* (NSI), taxa de indução de haploidia (TIH) e relação entre expressão e inibição do gene *R1-nj* (*R1-nj*) avaliados em sementes de populações-fonte dos grupos Flint e Dent nas gerações  $F_1$  e  $F_2$ .

Geração F1 Grupo Flint						
Características	TSE	NSH	NSD	NSI	TIH	R1-nj
TSE	1,000					
NSH	0,250	1,000				
NSD	0,533*	0,650**	1,000			
NSI	0,600**	-0,168	-0,168	1,000		
TIH	-0,072	0,908**	0,375	-0,378	1,000	
R1-nj	0,030	0,582**	0,776**	-0,695	0,513	1,00
Geração F2 Grupo Flint						
Características	TSE	NSH	NSD	NSI	TIH	R1-nj
TSE	1,000					
NSH	-0,082	1,000				
NSD	0,502*	0,595**	1,000			
NSI	0,710**	-0,572**	-0,171	1,000		
TIH	-0,416	0,900**	0,366	-0,782**	1,000	
R1-nj	-0,316	0,677**	0,579**	-0,846**	0,783**	1,00
Geração F1 Grupo Dent						
Características	TSE	NSH	NSD	NSI	TIH	R1-nj
TSE	1,000					
NSH	0,553**	1,000				
NSD	0,593**	0,744**	1,000			
NSI	0,707**	0,080	0,018	1,000		
TIH	-0,206	0,635**	0,312	-0,512*	1,000	
R1-nj	-0,121	0,439*	0,611**	-0,703**	0,581**	1,00
Geração F2 Grupo Dent						
Características	TSE	NSH	NSD	NSI	TIH	R1-nj
TSE	1,000					
NSH	0,486*	1,000				
NSD	0,760**	0,418*	1,000			
NSI	0,824**	0,179	0,332	1,000		
TIH	-0,252	0,677**	-0,135	-0,451*	1,000	
R1-nj	-0,234	0,198	0,394*	-0,670**	0,442*	1,00

\*, \*\* Significativo em 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente, pelo teste t.

A comparação entre médias dos genótipos avaliados pelo teste de Wilcoxon (Tabela 3) indicou aumento significativo no total de sementes obtidas com o avanço de gerações de  $F_1$  para  $F_2$  para as populações-fonte 91500211, 91500212 e 91500213, do grupo Flint e para o população-fonte 91500216, no grupo Dent. O NSH aumentou significativamente com o avanço de gerações de  $F_1$  para  $F_2$  somente para os genótipos 91500212 e 91500213 no grupo Flint e 91500216 e 91500219 no grupo Dent (Tabela 3).

Para NSD, foram observadas diferenças significativas entre gerações nos genótipos 91500211, 91500212 e 91500213 no grupo Flint e 91500219 no grupo Dent. Cabe destacar que os genótipos 91500212 e 91500213 também apresentaram aumento significativo no total de sementes por espiga com o avanço de gerações, corroborando assim os resultados de correlação entre TSE x NSD (Tabela 2). O NSI apresentou diferenças significativas para os genótipos 91500211, 91500216 e 91500219, havendo destacada redução da inibição do gene R1-nj no caso deste último genótipo com o avanço de gerações de  $F_1$  para  $F_2$ .

O principal parâmetro para avaliação do potencial de um indutor na obtenção de haploides de milho é a taxa de indução de haploidia. A TIH variou entre 0,50 e 9,57 em  $F_1$  e entre 0,00 e 9,40 em  $F_2$ , para o grupo Flint (Tabela 3), e entre 2,14 e 10,43 em  $F_1$ ; e entre 3,33 e 15,29, em  $F_2$ , no grupo Dent. Os genótipos 91500205 (Flint) e 91500215 (Dent) apresentaram redução significativa da TIH entre  $F_1$  e  $F_2$ , e o genótipo 91500219 (Dent) apresentou aumento significativo na taxa de indução de haploidia com o avanço de gerações de  $F_1$  para  $F_2$ .

Os valores de TIH observados neste experimento são compatíveis com as taxas de indução de haploidia observadas em outros estudos envolvendo a avaliação de haploides em milho (Couto et al., 2013; Batistelli et al., 2013; Milani et al., 2016). Entretanto, considerando os genótipos avaliados neste trabalho, não foi possível determinar com segurança uma tendência de aumento ou redução da taxa de indução de haploidia em função do avanço de gerações ou do grupo heterótico em questão. Estes resultados indicam que o efeito de avanço de endogamia na indução de haploides em milho dependerá muito mais da constituição genética da população-fonte em questão do que do grupo heterótico ou da geração de endogamia em que a haploidia é induzida.

**Tabela 3.** Comparação entre médias pelo teste de Wilcoxon para seis características avaliadas em sementes de quatro populações-fonte do grupo heterótico Flint e seis populações-fonte do grupo heterótico Dent nas gerações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>, cruzadas com indutores de haploidia tropicalizados. Sete Lagoas, 2015.

Populações-fonte	GH	TSE			NSH			NSI			TIH			NSD		
		Média na geração F <sub>1</sub>	Média na geração F <sub>2</sub>	Valor de Z e significância do contraste	Média na geração F <sub>1</sub>	Média na geração F <sub>2</sub>	Valor de Z e significância do contraste	Média na geração F <sub>1</sub>	Média na geração F <sub>2</sub>	Valor de Z e significância do contraste	Média na geração F <sub>1</sub>	Média na geração F <sub>2</sub>	Valor de Z e significância do contraste	Média na geração F <sub>1</sub>	Média na geração F <sub>2</sub>	Valor de Z e significância do contraste
91500205	Flint	101,20	208,80	-1,46	8,60	4,00	0,00	39,60	76,40	0,00	76,40	-1,46	39,60	76,40	0,00	-1,46
91500211	Flint	77,50	141,75	-2,17**	0,25	0,00	0,75	3,50	0,00	0,75	1,83*	1,83*	3,50	0,00	1,83*	1,83*
91500212	Flint	54,00	111,60	-2,29**	3,00	10,60	-2,11**	37,40	79,00	-2,11**	79,00	-2,09**	37,40	79,00	-2,09**	-2,09**
91500213	Flint	65,57	155,00	-1,92*	6,43	11,14	-1,61*	35,57	98,86	-1,61*	98,86	-2,11**	35,57	98,86	-2,11**	-2,11**
91500215	Dent	320,83	451,00	-1,04	19,00	14,50	0,40	90,67	161,00	0,40	161,00	-1,28	90,67	161,00	-1,28	-1,28
91500216	Dent	135,00	226,29	-1,86*	7,57	33,14	-2,11**	65,29	70,57	-2,11**	70,57	-0,25	65,29	70,57	-0,25	-0,25
91500219	Dent	129,29	113,57	0,00	1,71	15,00	-2,76**	7,57	67,00	-2,76**	67,00	-2,96**	7,57	67,00	-2,96**	-2,96**
91500221	Dent	170,67	171,17	-0,88	5,50	8,50	-0,58	69,67	52,50	-0,58	52,50	-0,88	69,67	52,50	-0,88	-0,88
91500222	Dent	179,83	195,83	0,00	16,00	23,67	-1,04	149,67	130,33	-1,04	130,33	0,56	149,67	130,33	0,56	0,56
91500223	Dent	221,86	151,00	0,64	10,51	17,00	-0,96	27,71	29,29	-0,96	29,29	-0,12	27,71	29,29	-0,12	-0,12
Populações-fonte	GH	NSI			TIH			NSD			R1-nj					
Populações-fonte	GH	Média na geração F <sub>1</sub>	Média na geração F <sub>2</sub>	Valor de Z e significância do contraste	Média na geração F <sub>1</sub>	Média na geração F <sub>2</sub>	Valor de Z e significância do contraste	Média na geração F <sub>1</sub>	Média na geração F <sub>2</sub>	Valor de Z e significância do contraste	Média na geração F <sub>1</sub>	Média na geração F <sub>2</sub>	Valor de Z e significância do contraste			
91500205	Flint	53,00	128,40	-1,46	8,40	3,00	1,89*	36,60	40,80	1,89*	36,60	40,80	-0,21			
91500211	Flint	73,50	141,75	-2,17**	0,50	0,00	0,75	4,75	0,00	0,75	4,75	0,00	1,82*			
91500212	Flint	13,60	22,00	-0,73	5,00	9,40	-1,47	72,40	78,80	-1,47	72,40	78,80	-0,10			
91500213	Flint	23,57	45,00	-1,27	9,57	8,14	0,00	64,00	72,43	0,00	64,00	72,43	-1,03			
91500215	Dent	211,17	275,50	-0,72	6,00	3,33	1,97*	31,33	39,83	1,97*	31,33	39,83	-1,28			
91500216	Dent	62,14	122,57	-2,43**	6,00	12,71	-1,47	52,42	39,43	-1,47	52,42	39,43	1,48			
91500219	Dent	120,00	31,57	1,60*	2,14	15,29	-2,69**	17,14	70,71	-2,69**	17,14	70,71	-3,07**			
91500221	Dent	95,50	110,17	-0,72	5,33	4,50	0,33	42,17	39,33	0,33	42,17	39,33	0,72			
91500222	Dent	14,17	41,33	-1,29	8,83	12,00	-0,89	92,17	79,67	-0,89	92,17	79,67	1,45			
91500223	Dent	183,57	104,71	0,77	10,43	11,29	-1,59	28,29	34,29	-1,59	28,29	34,29	-0,58			

\*, \*\* diferença significativa pelo teste de Wilcoxon para duas médias aos níveis de 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, considerando uma distribuição unilateral. GH = Grupo heterótico. TSE=Número total de sementes; NSH=número total de sementes haploides, NSI=número total de sementes diploides, NSD=número total de sementes com inibição da expressão do gene R1-nj. TIH=taxa de indução de haploidia; R1-nj= relação entre expressão e inibição do gene R1-nj.

A ausência de efeito de grupo heterótico ou geração em que o população-fonte foi induzido na geração de haploide reforça a variabilidade intrínseca à resposta à indução de haploidia *in vivo* em milho. Prigge et al. (2012), avaliando a resposta à indução de haploidia em diferentes populações-fonte de origem tropical, incluindo variedades de polinização aberta, híbridos simples e raças locais, verificaram maiores taxas de indução em híbridos simples, que teriam uma base genética mais estreita, mas que combinariam germoplasma de diferentes grupos heteróticos. Por sua vez, Milani et al. (2016) não detectaram diferenças entre híbrido comercial de milho comum e de milho-pipoca quanto às taxas de indução. Röber et al. (2005), avaliando a eficiência de sete indutores de haploidia para obtenção de haploides em milho utilizando populações-fonte dos grupos heteróticos Flint e Dent, obtiveram uma frequência de identificação de haploides de 48% em genótipos do tipo Flint e de 89,6% em genótipos do tipo Dent, sendo que a diferença entre grupos heteróticos foi atribuída pelos autores a efeitos de inibição do gene *R1-nj* em populações Flint e a efeitos ambientais.

Para além dos efeitos inerentes à constituição genética da população-fonte, outro fator que deve ser considerado na indução de haploidia são os efeitos ambientais que podem incidir sobre este caráter. Em um trabalho avaliando o efeito da época de plantio e do população-fonte na indução de haploidia *in vivo* em genótipos tropicais, Kebede et al. (2011) observaram variações das taxas de indução de haploidia entre 2,90 e 9,66% entre estações, mas com maiores médias de obtenção de haploides em plantios conduzidos nas estações outono e inverno.

A indução de haploides pelo método *in vivo* é influenciada por fatores como as características agronômicas do indutor, o tipo de população-fonte em uso, a sincronia de florescimento do indutor com as populações-fonte, a forma com que é feita a polinização (manual ou livre), as condições climáticas e de manejo do campo e outros fatores (Trindade et al., 2017). Tendo em vista que a indução de haploidia em milho pode ser efetuada em qualquer tipo de população, a prática mais utilizada em programas de melhoramento tem sido a obtenção de linhagens a partir de híbridos F1, em que os parentais são devidamente selecionados de acordo com os interesses do programa. Contudo, alguns trabalhos (Bernardo, 2009; Sleper; Bernardo, 2016) têm apontado que, em gerações segregantes, como F2 e S1, as possibilidades de recombinação de genes seriam maiores, o que compensaria o investimento

de recursos em avanço de populações por gerações adicionais pela chance de se obter indivíduos com combinações superiores de genes.

Para as populações-fonte em estudo neste trabalho, não foi possível verificar um padrão de aumento ou diminuição da frequência de identificação em função do avanço de gerações, indicando que é necessário ampliar este estudo para mais populações e locais de amostragem, a fim de se definir com segurança o efeito do avanço de gerações na identificação de indivíduos haploides em milho.

## Conclusões

---

Observaram-se maiores taxas de identificação de haploides em genótipos do grupo heterótico Dent.

Houve diferenças significativas para taxa de indução de haploidia (TIH) entre gerações no grupo Flint para a população-fonte 91500205, com redução na TIH, e, no grupo Dent, para as populações-fonte 91500215, com redução da TIH, e 91500219 com aumento da TIH.

Com exceção das populações-fonte 91500205, 91500215 e 91500219, não houve alteração na TIH em função do avanço de gerações para os dois grupos heteróticos estudados.

## Agradecimentos

---

À Embrapa Milho e Sorgo, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Processo 445607/2014-9), e à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (Fapemig), pelo apoio técnico e financeiro a este trabalho.

## Referências

---

BARRET, P.; BRINKMANN, M.; BECKERT, M. A major locus expressed in the male gametophyte with incomplete penetrance is responsible for in situ gynogenesis in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 117, n. 4, p. 581-594, 2008.

BATISTELLI, 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.; GUIMARÃES, C. T.; PAIVA, L. V.; DUARTE, J. M.; MALUF, W. R.; PAIVA, 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.

BERNARDO, R. Should maize doubled haploids be induced among F1 or F2 plants? **Theoretical and Applied Genetics**, v. 119, n. 2, p. 255-262, 2009.

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, n. 1, p. 159-171, 2015.

CHAIKAM, V.; PRASSANNA, B. M. Maternal haploid detection using anthocyanin markers. In: PRASSANA, B. M.; CHAIKAM, V.; MAHUKU, G. (Ed.). **Doubled haploid technology in maize breeding: theory and practice**. Mexico: CIMMYT, 2012. p. 20-24.

COE, E. H. Anthocyanin genetics. In: FREELING, M.; WALBOT, V. (Ed.). **The maize handbook**. New York: Springer-Verlag, 1994. p. 279-281.

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

COE, E. H.; NUEFFER, M. G.; HOISINGTON, D. A. The genics of corn. In: SPRAGUE, G. F.; DUDLEY, J. W. (Ed.). **Corn and corn improvement**. 3<sup>rd</sup> ed. Madison: American Society Agronomy, 1988. p. 81-258.

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

CRUZ, J. C.; PEREIRA FILHO, I. A.; ALVARENGA, R. C.; GONTIJO NETO, M. M.; VIANA, J. H. M.; OLIVEIRA, M. F. de; SANTANA, D. P. **Manejo da cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. 12 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 87).

GEIGER, H. H. Doubled haploids. In: BENNETZEN, J. L.; HAKE, S. (Ed.). **Maize handbook: genetics and genomics**. New York: Springer-Verlag, 2009. v. 2, p. 641-659.

KEBEDE, A. Z.; DHILLON, B. S.; SCHIPPRACK, W.; ARAUS, J. L.; BANZIGER, M.; SEMAGN, K.; ALVARADO, G.; MELCHIGER, 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.

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.

MILANI, K. F.; BALERONI, A. G.; SILVA, H. A.; MENDES-BONATO, A. B.; PINTO, R. J. B.; SCAPIM, C. A. Effectiveness of the R1-navajo embryo marker on sorting haploids in tropical maize germplasm. **Maydica**, v. 61, n. 4, 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, n. 2, p. 213-215, 1966.

PRIGGE, V.; MELCHINGER, A. E. Production of haploids and doubled haploids in maize. **Plant cell culture protocols**. 3<sup>rd</sup> ed. Totowa: Humana Press, 2012.

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

RÖBER, F. K.; GORDILLO, G. A.; GEIGER, H. H. In vivo haploid induction in maize: performance of new inducers and significance for doubled haploid lines in hybrid breeding. **Maydica**, v. 50, n. 3, p. 275-283, 2005.

SAS INSTITUTE. **SAS STAT: user's guide**. Cary, 2000. 1028 p.

SLEPER, J. A.; BERNARDO, R. Recombination and genetic variance among maize doubled haploids induced from F1 and F2 plants. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 129, n. 12, p. 2429-2436, 2016.

STINARD, P. S.; SACHS M. M. The identification and a characterization of two dominant r1 haplotype-specific inhibitors of aleurone color in *Zea mays*. **Journal of Heredity**, v. 93, n. 6, p. 421-428, 2002.

TRINDADE, R. dos S.; GUIMARÃES, L. J. M.; NETTO, D. A. M.; SOUZA, I. R. P. de; GUIMARÃES, P. E. de O.; SILVA, A. C. A. da; GUIMARÃES, S. A.; MARIZ, B. L. **Características agronômicas de indutores de haploidia adaptados ao ambiente tropical**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2017. 36 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 161). Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1086290>>. Acesso em: 20 maio 2019.

**Embrapa**

---

**Milho e Sorgo**



MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO

