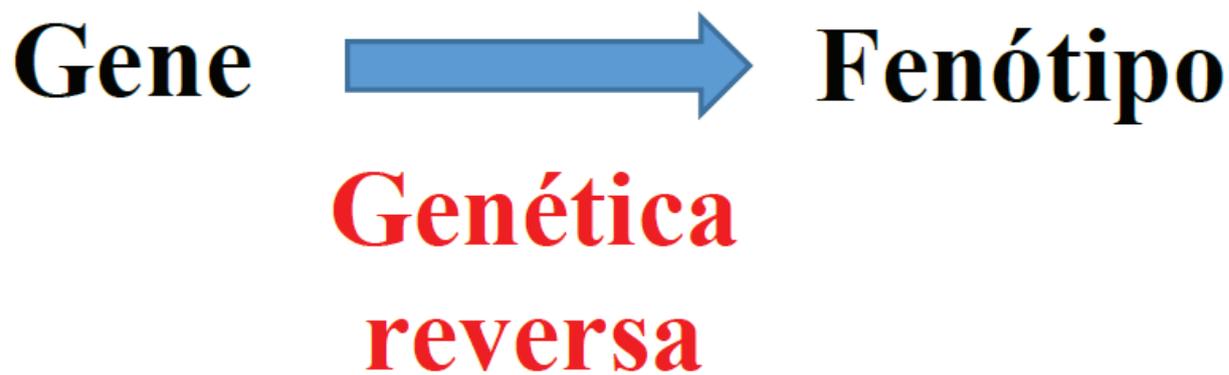


Melhoramento Reverso:  
Princípios e Aplicações



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

**DOCUMENTOS 239**

**Melhoramento Reverso: Princípios e Aplicações**

**Maria José Vilaça de Vasconcelos  
Isabel Regina Prazeres de Sousa  
José Edson Fontes Figueiredo**

**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*

Desenho da capa  
*Maria José Vilaça de Vasconcelos*

**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)**

Embrapa Milho e Sorgo

---

Vasconcelos, Maria José Vilaça de.

Melhoramento reverso: princípios e aplicações / Maria José Vilaça de  
Vasconcelos, Isabel Regina Prazeres de Sousa, José Edson Fontes  
Figueiredo. -- Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2019.  
21 p. : il. -- (Documentos / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1518-4277; 239).

1. Melhoramento vegetal. 2. Genética reversa. 3. Expressão gênica.  
4. Linhagem. I. Sousa, Isabel Regina Prazeres de. II. Figueiredo, José Edson  
Fontes. III. Título. IV. Série.

CDD 631.5233 (21. ed.)

## Autores

**Maria José Vilaça de Vasconcelos**

Farmacêutica/Bioquímica, PhD, Pesquisadora Embrapa Milho e Sorgo.

**Isabel Regina Prazeres de Sousa**

Eng.-Agrôn., PhD, Pesquisador Embrapa Milho e Sorgo.

**José Edson Fontes Figueiredo**

Biólogo/Bioquímico, PhD, Pesquisador Embrapa Milho e Sorgo.

## Apresentação

Grande parte das funções gênicas tem sido definidas através do uso da genética direta, onde um fenótipo é identificado e usado para clonar o gene responsável. No entanto, na maioria dos casos, os genes de sequência conhecida não são associados a um fenótipo. Isto é particularmente verdadeiro em espécies não modelo, onde a genética avançada pode ser mais desafiadora devido à redundância genética. A genética reversa é uma ferramenta poderosa que pode ser usada para identificar o fenótipo resultante do bloqueio de um gene seqüenciado específico, mesmo sem o conhecimento prévio de sua função. Dessa forma, estabelecendo uma ligação direta entre a função de um produto gênico e sua função in vivo. Essa riqueza de novos dados de sequências obtidos por meio do sequenciamento de genomas facilita extensas análises funcionais baseadas em genética reversa.

*Frederico Ozanan Machado Durães*

Chefe-geral

## Sumário

Introdução .....	06
Aplicações do Melhoramento Reverso.....	08
Princípios do Método de Melhoramento Reverso .....	12
Descrição da Técnica de Melhoramento Reverso .....	13
Estratégias para Suprimir a Recombinação Meiótica .....	14
Limitações da Técnica .....	15
Limitações para o Emprego do Melhoramento Reverso em Milho .....	16
MARB: Melhoramento Reverso assistido por marcadores moleculares .....	16
Tamanho Mínimo Ideal para Seleção do Genótipo de Interesse .....	17
Considerações Finais .....	17
Referências .....	18

## Introdução

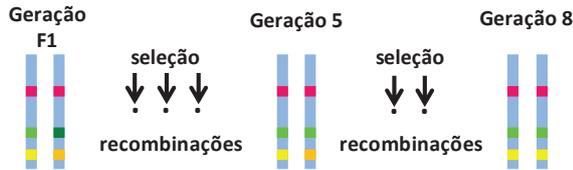
Na área vegetal, além do melhoramento tradicional, novos métodos de manipulação gênica e análise de genomas progrediram consideravelmente nesses últimos anos. Várias técnicas de engenharia genômica apresentam grande precisão e têm por objetivos alterar ou introduzir novos caracteres nas plantas para estudos de função gênica ou produção de variedades com novas características (Lusser et al., 2011). No melhoramento de plantas, um dos aspectos mais importantes está relacionado com a manipulação da expressão gênica para obtenção de linhagens apresentando alto grau de homozigose (Jankowicz-Cieslak; Till, 2016). Entre os métodos utilizados para produção de linhagens homozigotas, podemos destacar: 1) o melhoramento clássico, em que linhagens são obtidas por autofecundações sucessivas que demandam entre seis e oito gerações de cruzamentos e seleção para que aproximadamente 99% de homozigose seja alcançada; e 2) o uso da técnica da cultura de gametófitos (anteras, pólen e/ou óvulos) que, em várias espécies, permite a produção de linhagens homozigotas (duplos-haploides = DH) em apenas uma geração de cultura, abreviando o tempo para seu emprego na produção de híbridos (Figura 1).

Recentemente, a aplicação do conceito de genética reversa ao melhoramento vegetal originou um ramo da pesquisa que foi designado “Melhoramento Reverso” (do inglês: Reverse Breeding, RB, ou MR em português). Nesse procedimento, os genes responsáveis pelo pareamento e/ou recombinação dos cromossomos durante a meiose I são silenciados (por RNAi, siRNA ou agentes químicos) evitando a ocorrência de recombinações gênicas (Figura 1). Após a cultura de gametófitos, obtêm-se plantas haploides, que após serem tratadas com inibidores do fuso acromático (geralmente colchicina, 8-hidroxiquinoleína ou frio) originam plantas duplo-haploides (Dirks et al., 2009).

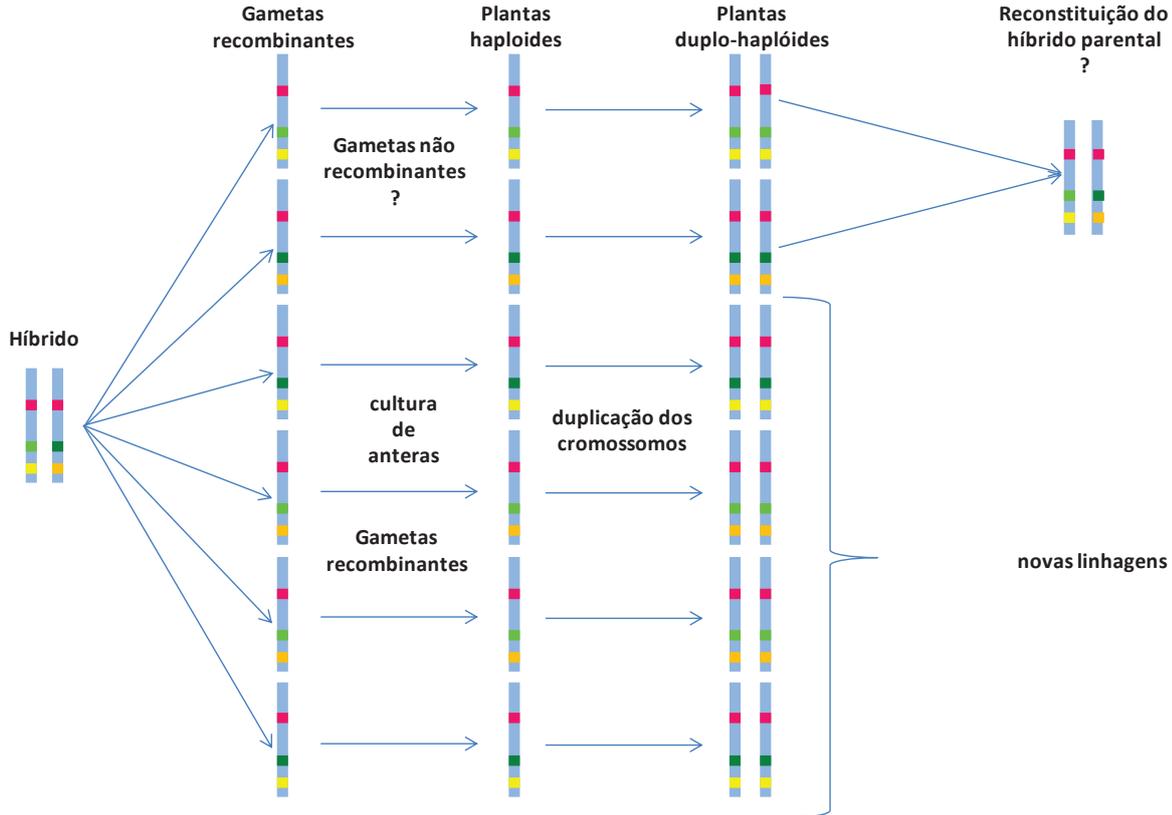
Uma característica interessante do método de cultivo de gametófitos consiste no fato de que, da mesma forma que ocorre no melhoramento tradicional, híbridos poderão ser continuamente produzidos a partir das linhagens parentais duplo-haploides. Além disso, o método apresenta a vantagem de que os efeitos de genes recessivos deletérios que afetam o desenvolvimento das plantas ou a produção de sementes são prontamente eliminados da população ainda na primeira fase de produção de duplo-haploides (Chang; Coe, 2009).

O Melhoramento Reverso, tema deste documento, pode ser usado em qualquer fase do programa de melhoramento para fixar características de interesse que tenham sido previamente observadas em plantas segregantes. Após o cruzamento entre diferentes linhagens homozigotas, as células gametofíticas de híbridos da geração F1 ou de gerações mais avançadas apresentando características agrônômicas desejadas poderão ser cultivadas *in vitro* para produção de plantas duplo-haploides não recombinantes, que poderão ser usadas para reconstituir as linhagens ou híbridos parentais ou ainda linhagens apresentando substituições cromossômicas (Figura 1). Em estágios avançados de um programa de melhoramento, híbridos bem caracterizados poderão ser transformados em linhagens homozigotas em apenas uma geração, possibilitando superar etapas recorrentes no processo de seleção para a homozigose quando se emprega o método tradicional. Além disso, o Melhoramento Reverso reduz o número de indivíduos que deverão ser avaliados em uma população para obtenção do fenótipo ou genótipo de interesse.

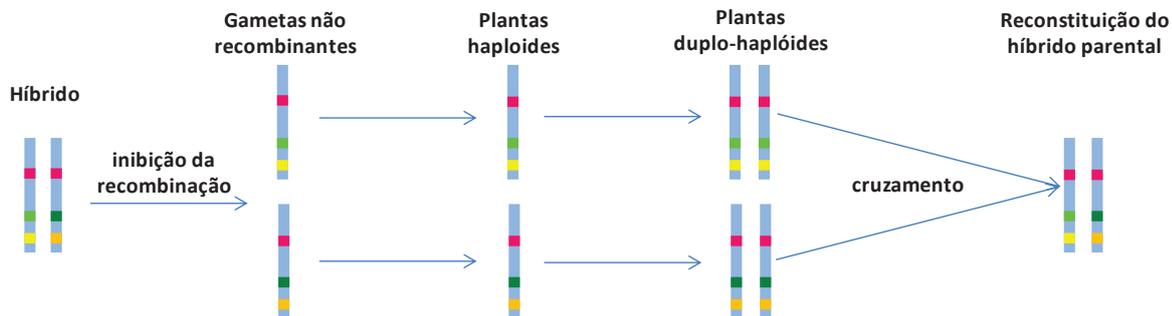
### A- MELHORAMENTO TRADICIONAL



### B- DUPLO-HAPLÓIDE



### C- MELHORAMENTO REVERSO



**Figura 1.** Comparação dos três métodos empregados para obtenção de linhagens homozigotas. (A) - No melhoramento clássico são necessárias entre seis e oito gerações de autofecundação para obtenção de linhagens com aproximadamente 99% de homozigose, enquanto que nos métodos que utilizam duplos-haplóides (B e C) a homozigose é obtida em apenas uma geração de cultivo *in vitro* de gametófitos, seguido da duplicação dos cromossomos, espontaneamente ou pelo emprego de agentes inibidores da formação do fuso acromático. No cultivo de anteras para produção de duplo-haplóides é possível gerar linhagens a partir de um único cruzamento ou população segregante (B). No Melhoramento Reverso (C), diferentemente do que ocorre em A e B, a supressão do *crossing over* reduz drasticamente o número de genótipos recombinantes, decorrentes apenas da orientação aleatória dos cromossomos paterno e materno na placa metafásica da meiose I. Na Figura B, a interrogação (?) está chamando a atenção para o fato de que a reconstituição do híbrido parental pela união de dois gametas não recombinantes, apesar de ser possível, apresenta uma probabilidade quase nula de ocorrer naturalmente, pois seria decorrente da ausência absoluta de recombinação gênica. Fonte: Autores.

## Aplicações do Melhoramento Reverso

O melhoramento de plantas é um processo longo, e reduzir o tempo necessário para produção de uma nova variedade significa diminuir custos e antecipar lucros. O uso da genética reversa no melhoramento de plantas aplicando o conceito de Melhoramento Reverso é uma das alternativas para reduzir esse tempo (Ben-Amar et al., 2016; Bayou, 2017). Contudo, a utilização dessa técnica em programas de melhoramento ainda não é uma prática rotineira pelo fato de não existirem métodos eficientes para indução e regeneração de plantas haploides a partir do cultivo de micrósporos na maioria das espécies.

O Melhoramento Reverso pode ser usado em diferentes objetivos, tais como restauração de germoplasma parental, fixação de genótipos heterozigotos superiores em populações segregantes, geração de linhagens puras a partir de plantas heterozigotas, melhoramento ao nível de um cromossomo apenas, produção de linhagens de substituição cromossômica, introgressão de genes em linhagens parentais para melhorar o desempenho de híbridos, melhoramento assistido por marcadores moleculares (Guan et al., 2015), retrocruzamentos usando estoques macho-estéreis (CMS, *Cytoplasmic male sterility*) (Wijnker et al., 2012; Kumari et al., 2018).

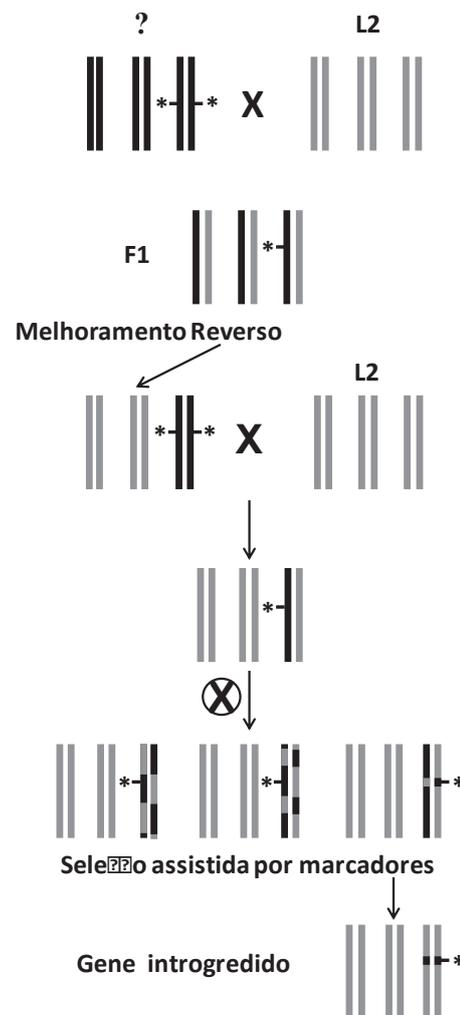
O Melhoramento Reverso combinado à seleção assistida por marcadores (fenotípicos ou moleculares) tem aplicações na geração de mapas genéticos, nos estudos de interações gênicas e identificação de QTLs (Wijnker et al., 2012; Kushwaha, 2018).

Em espécies que não possuem ampla coleção de linhagens para uso no melhoramento, seja pela escassez de informações sobre a espécie ou pela existência de autoincompatibilidade, MR pode acelerar o desenvolvimento de novas variedades. Nessas espécies, híbridos superiores podem ser selecionados, fixados e propagados sem a necessidade do conhecimento prévio da constituição genética ou do genoma da espécie (Figura 1).

O melhoramento do desempenho de híbridos comerciais somente é possível pelo melhoramento das linhagens parentais, o que requer cruzamentos com a planta portadora da nova característica que se deseja introduzir na linhagem-elite. Isso implica novos ciclos de seleção e retrocruzamentos para recuperar a linhagem original. O Melhoramento Reverso assistido por marcadores possibilita acelerar a seleção da linhagem parental modificada para o gene de interesse (Figura 2).

Após a identificação de um gene ou QTL de interesse (\*), a característica desejada poderá ser introduzida em uma linhagem-elite, abreviando a necessidade de realização de vários ciclos de retrocruzamentos. Nesse caso, um dos parentais poderá ser uma linhagem ou planta segregante portadora do gene de interesse. No caso de plantas segregantes, ela poderá ser homozigota (\*\*), como na figura, ou heterozigota (-\*) para a característica alvo. Após o cruzamento, as plantas F1 apresentando o fenótipo desejado, resistência à doença, por exemplo, são submetidas ao Melhoramento Reverso por meio de inibição da expressão dos genes da recombinação usando RNAi, siRNA ou tratamento químico. Em seguida, emprega-se a cultura de micrósporos para obtenção de plantas haploides, que após a duplicação dos cromossomos serão cultivadas para produção de sementes. As plantas homozigotas para o cromossomo portador do caráter de interesse (gene ou QTL) serão selecionadas para cruzamentos com a linhagem-elite que se deseja melhorar. As plantas descendentes, agora heterozigotas para o caráter-alvo, são autofecundadas ou cruzadas entre si. Por meio de marcadores moleculares ao longo do cromossomo serão selecionadas as plantas que apresentam o menor seguimento do genótipo doador carregando o gene de interesse. Novos cruzamentos entre as plantas selecionadas e a linhagem original irão possibilitar a reconstrução da linhagem parental diferindo apenas para caráter introduzido. Fonte: Autores.

O Melhoramento Reverso combinado com marcadores moleculares em genotipagem de alta resolução (Montgomery et al., 2007) acelera o processo de identificação de parentais complementares em populações DH e permite estudar as interações gênicas em famílias de heterozigotos. O escrutínio de populações que segregam para caracteres localizados em um único cromossomo permite a identificação rápida de QTLs, auxilia na criação de mapas genéticos detalhados, ajuda a entender a natureza de grupos heteróticos e a estabelecer grupos de ligação e mapas genéticos e cromossômicos bastante precisos e detalhados (Kushwaha, 2018).



**Figura 2.** Melhoramento Reverso para introgressão gênica em linhagens-elite.

O MR também produz plantas heterozigotas para apenas um par de cromossomos que irão segregar caracteres presentes apenas nesses cromossomos. Essa é uma ferramenta útil para melhoristas e geneticistas e possibilita o estudo de interações gênicas, a identificação de grupos de ligação e o mapeamento gênico, principalmente em espécies em que os estudos de genética são escassos ou cujos genomas ainda não foram sequenciados (Wijnker et al., 2012).

Ao longo dos anos, linhagens com substituições cromossômicas, ou seja, aquelas linhagens em que um dos cromossomos de uma determinada linhagem é substituído pelo cromossomo homólogo de outra linhagem, têm sido geradas por meio de cruzamentos apropriados e seleção por várias gerações e extensiva genotipagem até que se identifique a substituição cromossômica desejada (Kuspira; Unrau, 1956; Korzun et al., 1997; Morris et al., 1999; Ali et al., 2010; Li et al., 2015; Yang et al., 2016). A aplicação do conceito de Melhoramento Reverso possibilita a obtenção de todas as

possíveis substituições cromossômicas de uma determinada espécie em curto período de tempo (Dirks et al., 2009).

A tecnologia MR permite reduzir o tempo para melhoramento de linhagens com substituições de um ou mais cromossomos (Figura 3). Isso é extremamente importante para o melhoramento, nos casos em que se deseja introduzir um único gene ou alguns genes ligados (QTLs), em uma linhagem importante que já está sendo utilizada para produzir híbridos produtivos.

Um híbrido entre duas linhagens ou plantas segregantes em gerações avançadas dos programas de melhoramento, submetidas ao Melhoramento Reverso (inibição do crossing over), irá produzir populações de linhagens duplo-haplóides em que algumas plantas reconstituem as linhagens parentais e outra parte, a maioria das plantas, terá diferentes substituições de cromossomos (Figura 3).

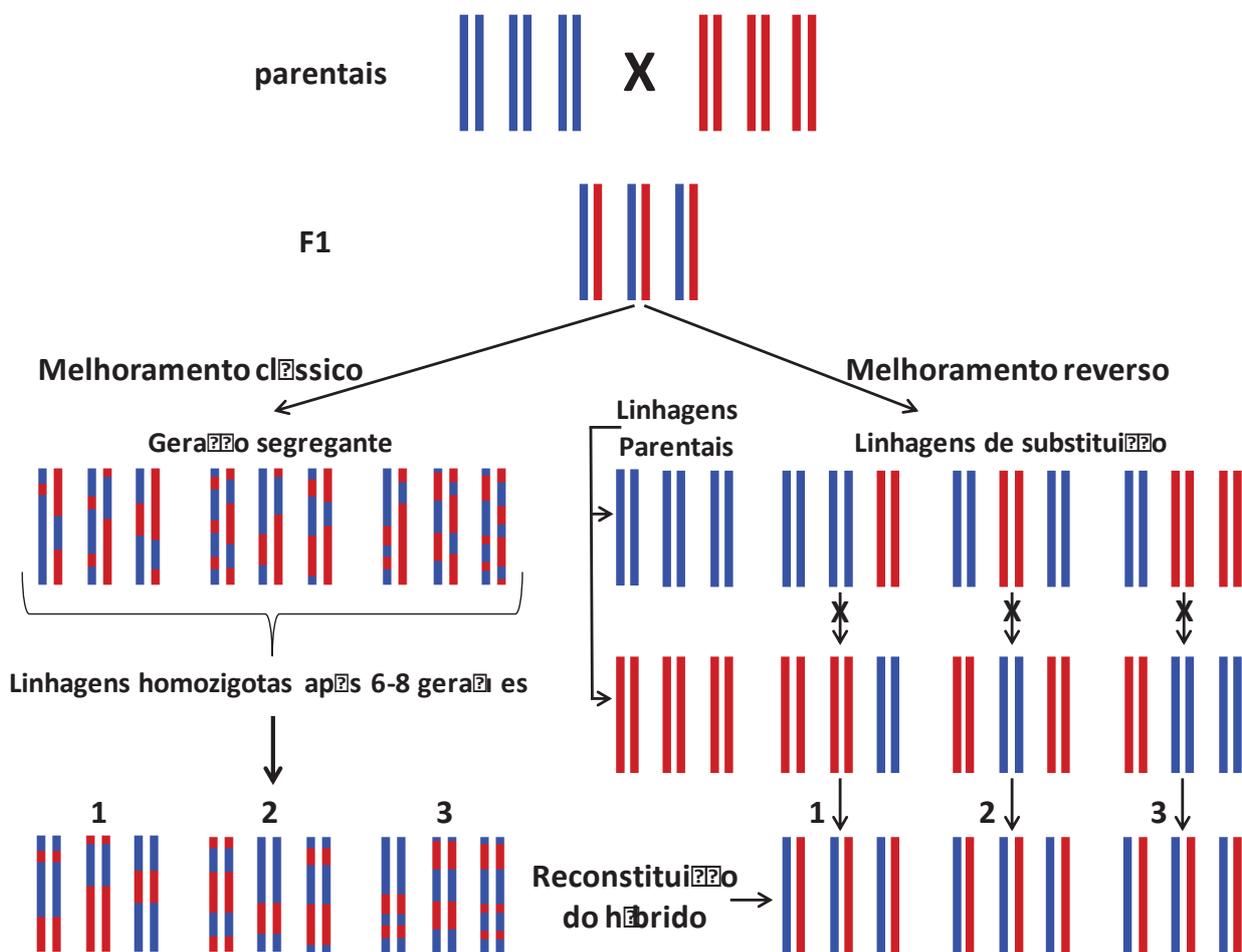


Figura 3. Comparação entre os métodos de melhoramento genético tradicional e o Melhoramento Reverso.

O cruzamento de linhagens DH e parentais irá produzir plantas apresentando apenas um par de cromossomos em heterocigose. Esse procedimento facilita o melhoramento de linhagens, reduzindo o número de retrocruzamentos e seleção para retornar a linhagem original. Além disso, esse procedimento possibilita a identificação de alelos e QTLs nos cromossomos.

No melhoramento clássico são necessárias várias gerações de retrocruzamento para obtenção de linhagens homocigotas. Isso se deve principalmente à recombinação gênica e à segregação dos alelos nas várias gerações. No Melhoramento Reverso, plantas homocigotas são produzidas em apenas uma geração de cultura de micrósporos *in vitro*. Além disso, a inibição da recombinação

(crossing over) reduz drasticamente o número de plantas recombinantes, pois a variabilidade na primeira geração DH é devida apenas à segregação aleatória dos genomas parentais. Outra vantagem do método MR mostrado na figura consiste na possibilidade de reconstituição das linhagens parentais e na produção de DHs com diferentes substituições cromossômicas. Baseado em Wijnker e Jong (2008) e Dirks et al. (2009).

Durante o processo de melhoramento clássico, são selecionadas plantas segregantes reunindo características agronômicas desejáveis, que deverão ser cruzadas várias vezes entre si para no final se obter linhagens ou variedades comerciais. Por meio de Melhoramento Reverso, plantas híbridas de interesse podem ser fixadas em apenas duas gerações, gerando linhagens que, aos serem cruzadas entre si, irão reconstituir o híbrido de interesse (Figura 4). Nesses casos, após a supressão do crossing over no híbrido selecionado, aplica-se a cultura de micrósporos para obtenção de duplo-haploides, não recombinantes, contendo diferentes combinações dos cromossomos parentais. Após a identificação dos genótipos DH complementares aos parentais, procede-se ao cruzamento entre eles, reconstituindo-se indefinidamente o híbrido parental, conforme mostrado na Figura 4. A reconstituição de germoplasma heterozigoto é particularmente útil em espécies altamente heterozigotas para as quais o genoma ainda é pouco conhecido e o processo de obtenção de linhagens homozigotas ainda não é possível ou muito demorado. Uma vez que é impossível a fixação de heterozigotos pelo melhoramento tradicional, o Melhoramento Reverso apresenta-se como um procedimento que irá revolucionar o futuro do melhoramento de plantas (Dirks et al., 2009).

Empregam-se duas ou mais linhagens parentais (P). Plantas da população  $F_1$  são autofecundadas ou deixadas polinizar livremente obtendo-se a geração segregante  $F_2$ . Alternativa consiste na seleção do próprio híbrido simples, duplo ou triplo para realizar a genética reversa de plantas superiores, selecionadas para caracteres agronômicos de interesse. No passo seguinte é realizado o silenciamento de um ou mais genes envolvidos na recombinação gamética. Geralmente são utilizados os genes envolvidos na sinapse cromossômica durante a meiose I. Dessa forma, serão produzidos gametas apresentando apenas recombinação aleatória dos cromossomos parentais na placa metafásica. No exemplo acima, foi considerada uma espécie com  $2n = 6$  cromossomos ( $n = 3$ ), que produzirá  $2n$  gametas, ou seja, apenas oito tipos de gametas diferentes. Os cromossomos foram assinalados por letras (A, B, C, D, E, e F) para facilitar a compreensão. Em seguida, os gametófitos da planta silenciada para o *crossing over* são cultivados *in vitro* para indução da formação de calos e posterior regeneração de plantas haploides que serão tratadas com agentes inibidores da formação do fuso acromático (colchicina, hidroxiquinoleína ou frio) para duplicação dos cromossomos. Plantas oriundas de sementes dos duplo-haploides serão cruzadas entre si para reconstituição do híbrido parental. Na figura, as plantas foram numeradas de 1 a 8 e representam os genótipos possíveis de serem obtidos para uma espécie com  $2n = 6$ . Embora alguns cruzamentos não reproduzam o genótipo do híbrido original, podemos observar que quatro cruzamentos, plantas 1 e 5, 2 e 6; 3 e 7, 4 e 8, irão reconstituir o genótipo do híbrido parental, ou seja, no exemplo, a população com apenas 8 genótipos diferentes, e 36 cruzamentos possíveis, quatro deles (aproximadamente 11%) restabelecerão o genótipo do híbrido parental, previamente selecionado. MR também simplifica os procedimentos para obtenção de linhagens com substituições de um ou mais cromossomos (plantas 2 a 8). Baseado em Wijnker e Jong (2008) e Dirks et al. (2009).

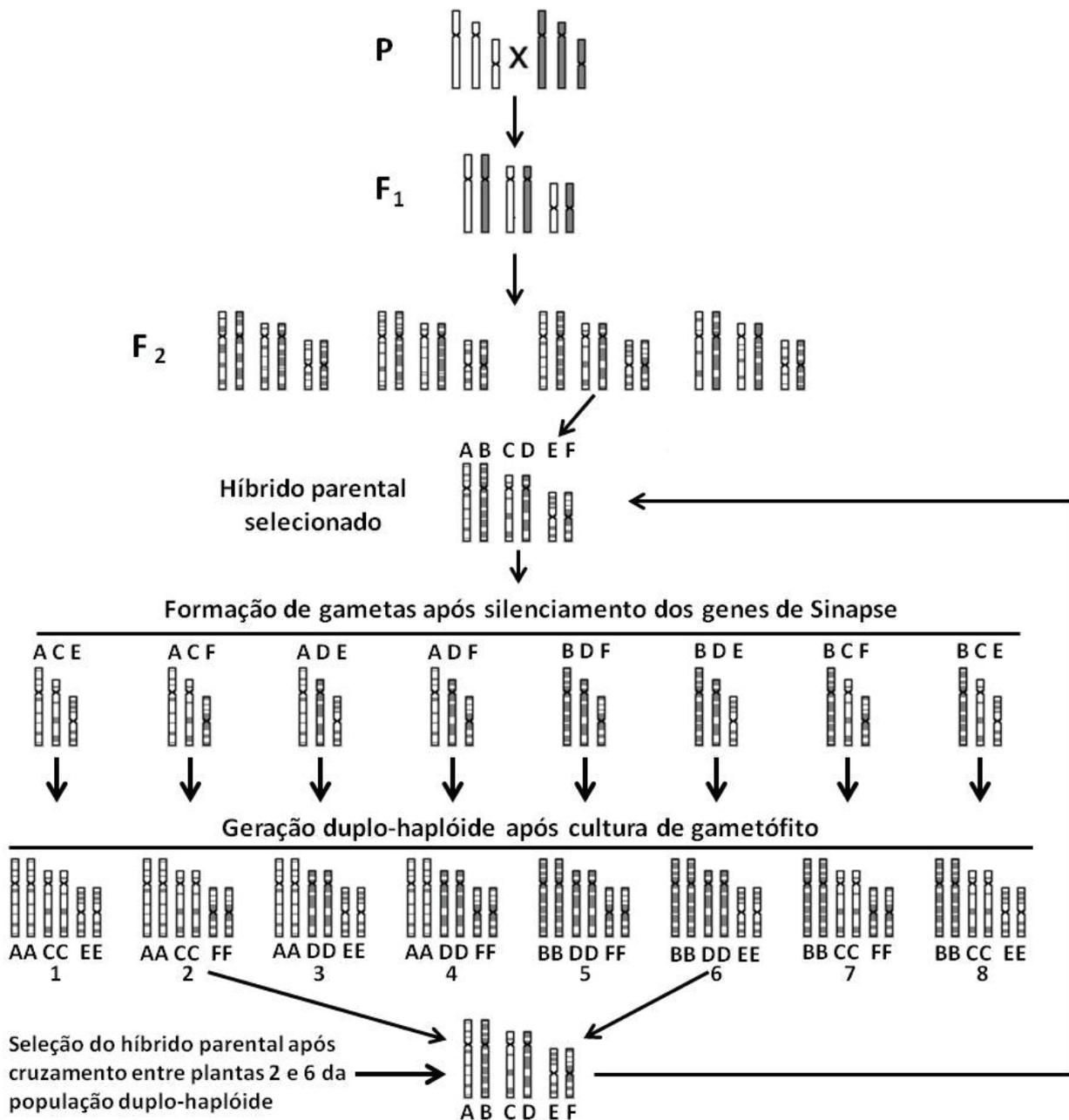


Figura 4. Diagrama da técnica de Melhoramento Reverso para reconstituição e fixação de híbridos superiores.

## Princípios do Método de Melhoramento Reverso

O Melhoramento Reverso compreende duas etapas essenciais: inibição do crossing over e obtenção de plantas haploides por cultivo de gametófitos (Dirks et al., 2009). A primeira etapa consiste na inibição do crossing over na planta selecionada, utilizando RNAi, siRNA ou agentes químicos. Nesse caso, a planta selecionada é transformada com construções contendo genes truncados envolvidos no pareamento cromossômico, ou tratada com agentes químicos que inibem a ocorrência de crossing over. Na segunda etapa, os micrósporos são cultivados in vitro, e as plantas haploides regeneradas são tratadas com agentes inibidores da formação do fuso acromático (colchicina, 8-hidroxiquinoleína, frio, etc.) para duplicação do número de cromossomos. Em seguida, as plantas são transferidas para casa de vegetação para produção de sementes, que serão posteriormente plantas para seleção dos genótipos de interesse.

A variabilidade fenotípica observada em gerações segregantes é decorrente de dois fenômenos: 1) a recombinação gênica dos alelos homólogos durante a meiose I; e 2) orientação independente dos diferentes cromossomos parentais na placa metafásica durante a metáfase I da gametogênese. Portanto, na ausência de *crossing over*, o único fator determinante na recombinação gamética é a orientação aleatória dos cromossomos não homólogos parentais na placa metafásica. Nesse caso, o número de genótipos recombinantes é bastante reduzido e depende do número haploide de cromossomos da espécie e da probabilidade de orientação aleatória dos cromossomos “materno e paterno” em direção ao mesmo polo na placa metafásica durante a meiose I. Assim, ao considerarmos uma espécie com  $n = 10$  cromossomos, em que cada cromossomo homólogo é diferente entre si, então teremos que a probabilidade de formação de gametas diferentes é dada pela fórmula  $2n=1024$ , em que  $n$  é o conjunto haploide de cromossomos da espécie considerada.

O *crossing over* produz recombinação de alelos por troca de fragmentos de cromossomos, enquanto que a orientação de homólogos na metáfase I gera apenas novas combinações entre os cromossomos parentais. Portanto, se o processo de *crossing over* for inibido é possível reduzir drasticamente a variabilidade genética na geração filial e principalmente, preservar grupos de ligação que determinam fenótipos agrônomicos desejáveis.

## Descrição da Técnica de Melhoramento Reverso

A técnica de produção de duplo-haploides por inibição do *crossing over* via silenciamento gênico é denominada Melhoramento Reverso (Wijnker et al., 2012), e foi desenvolvida por uma empresa holandesa que detém a patente desse processo (Dirks et al., 2009; Van Dun; Dirks, 2006, 2016).

O Melhoramento Reverso se baseia na inibição do *crossing over* durante a meiose I para fixar genótipos híbridos selecionados durante os programas de melhoramento. Para tanto, é necessário empregar técnicas de silenciamento gênico por meio de RNAi (RNA interferente, ou RNA de interferência) ou siRNA (RNA interferente curto) para impedir a expressão de genes associados ao pareamento dos cromossomos homólogos e formação do *crossing over* durante a meiose I. Entre eles, o silenciamento do gene que participa da sinapse de cromossomos homólogos, é o mais empregado [*PAIR2* de arroz (Nonomura et al., 2007), *ASY1* de *Brassica* (Armstrong et al., 2002), *Dmc1* de *Arabidopsis thaliana* (Couteau et al., 1999)]. Esses genes são muito conservados entre animais e plantas, e por isso podem ser utilizados para a supressão da recombinação em espécies em que esses genes ainda não foram isolados. Genes ortólogos, ou seja, aqueles genes com diferentes graus de similaridade por causa da ancestralidade comum, podem ser utilizados na construção do cassete de silenciamento, não sendo absolutamente necessário o conhecimento do gene-alvo na espécie em estudo.

Alternativa ao silenciamento do gene-alvo pode ser feita empregando compostos que inibem o *crossing over* (Flachowsky et al., 2012). Contudo, a eficiência de produção de eventos sem *crossing over* não é de 100%, pois a recombinação sempre ocorre mesmo em baixa frequência. Portanto, é importante o monitoramento dos indivíduos resultantes pelo uso de marcadores moleculares para confirmar a homozigose ou heterozigose. Nessas duas últimas abordagens, o duplo-haploide resultante não contém o transgene, ou seja, o gene empregado para o silenciamento gênico e as sequências de DNA do vetor utilizado para a construção não são incorporados ao genoma da espécie de interesse.

Ao utilizar o silenciamento gênico mediado por RNAi para suprimir a ação de genes envolvidos no *crossing over*, os genótipos resultantes poderão ser de dois tipos diferentes: transgênicos, caso a

sequência utilizada para o silenciamento seja incorporada ao genoma da planta receptora e expresse de modo permanente nas plantas descendentes, ou não transgênicos, no caso da expressão da construção empregada para o silenciamento dos genes envolvidos na recombinação seja expressa de modo transiente, ou seja, a construção não será incorporada ao genoma. Nesse aspecto, a supressão dos genes de recombinação empregando agentes químicos é desejável, pois não tem nenhum efeito de alteração do genoma.

Na técnica de Melhoramento Reverso utiliza-se transformação genética para silenciar genes envolvidos no processo de *crossing over*. O evento de transformação promove o silenciamento de genes em hemizigose, de modo que é possível selecionar as plantas para eliminar do produto final, ou seja, o transgene contendo sequências truncadas para o silenciamento de genes envolvidos no crossing over que foram introduzidas na planta de interesse. Assim, se nenhuma sequência pode ser detectada por meio de técnicas usuais (PCR, qPCR, Northern Blot, análise de proteínas ou análise de metabólitos), as plantas resultantes da tecnologia de Melhoramento Reverso não poderão ser consideradas transgênicas.

## Estratégias para Suprimir a Recombinação Meiótica

A meiose representa um desafio para todas as espécies de animais e plantas no sentido de assegurar a segregação balanceada dos cromossomos homólogos durante a formação dos gametas (Lambing et al., 2017). Em espécies poliploides, esse desafio é ainda maior por causa da tendência de pareamento entre cromossomos homeólogos. Em trigo, por exemplo, apesar da homologia cromossômica, o gene *Ph1* controla o pareamento entre bivalentes evitando configurações múltiplas de pareamento de cromossomos homólogos e homeólogos. *Deleção ou inativação de Ph1 resulta na formação de configurações multivalentes na meiose I e em defeitos na segregação balanceada dos cromossomos na anáfase, gerando gametas desbalanceados que reduzem a fertilidade das plantas. Por esse motivo, a aplicação de MR em espécies poliploides é muito limitada* (Lambing et al., 2017).

A segregação dos cromossomos durante a meiose depende do controle preciso da coesão entre as cromátides irmãs, da orientação correta dos diferentes cromossomos e do estabelecimento de uma conexão física entre cada par de cromossomos homólogos para formarem as associações bivalentes (Blary; Jenczewski, 2019). A complexidade do processo pode ser entendida pelo fato de já terem sido identificados mais de 80 genes envolvidos na meiose (Mercier et al., 2015).

O silenciamento (knockdown) de genes envolvidos na recombinação gênica é essencial para o Melhoramento Reverso e pode ser feita empregando RNA interferente (RNAi) ou siRNAs, mutantes dominantes para supressão da recombinação, ou por agentes químicos (Higgins et al., 2004; Siaud et al., 2004; Dupré et al., 2008). O bloqueio do crossing over por RNAi ou siRNA emprega um ou dois genes envolvidos no processo de recombinação gênica. Os mais utilizados para o silenciamento têm sido DMC1, RecA e SPO11. Esses genes são altamente conservados entre os diferentes grupos de plantas, o que possibilita o emprego de genes ortólogos para bloquear a recombinação em espécies cujas informações sobre os genes ou o genoma são pouco conhecidas (Wijnker et al., 2012). Entre os compostos químicos usados para inibir a recombinação, destaca-se o MIRIN (6-(4-hydroxyphenyl)-2-thioxo-2,3-dihydro-4(1H)-pyrimidinone), que é um inibidor do complexo MRN (Mre11-Rad50-Nbs1)-ATM (ataxia-telangiectasia mutated protein Serine/threonine kinase) que desempenha um papel central na recombinação gênica (Lukaszewicz et al., 2018; Yanowitz; Li, 2019). Mirin prolonga a duração do período G2 da meiose e inibe a fosforilação de ATM (Dupré et al., 2008).

## Limitações da Técnica

O Melhoramento Reverso envolve basicamente quatro etapas: supressão do crossing over, produção de plantas duplo-haploides, geração de linhagens complementares e o cruzamento entre elas para obtenção do genótipo planejado (Kushwaha, 2018).

A inibição do *crossing over* afeta o pareamento dos cromossomos homólogos durante a meiose I, e conseqüentemente conduz a formação de gametas desbalanceados. Portanto, na medida em que o número haploide aumenta (>12), diminui a probabilidade de obtenção de gametas balanceados. Outro aspecto está relacionado com a redução da ocorrência de eventos de inibição de *crossing over*. Dessa forma, as chances de obtenção de plantas haploides normais após a cultura de esporos estarão reduzidas. Por isso, o emprego de MR é factível apenas naquelas espécies que possuem conjuntos haploides de cromossomos menores do que  $n=12$ . Portanto, essa técnica não se aplica às espécies com elevado número de cromossomos como a soja ( $2n=40$ ) ou espécies poliploides como o trigo ( $2n=42$ ), batata ( $2n=48$ ), algodão ( $2n=52$ ), entre outras (Dirks et al., 2009; Wijnker et al., 2012). Considerando que a maioria das plantas cultivadas possui número cromossômico haploide menor ou igual a 12, verifica-se que o Melhoramento Reverso poderá futuramente ser aplicado também a essas espécies (Tabela 1). Por último, a execução da técnica exige o cultivo *in vitro* de esporos, e não se aplica às espécies que são recalcitrantes ao cultivo de gametófitos (Wijnker et al., 2012).

**Tabela 1.** Algumas espécies agronomicamente importantes que apresentam número cromossômico haploide  $n \leq 12$ .

Organismo	Espécie	Cromossomos diploides (2n)
Alho	<i>Allium sativum</i>	16
Arroz	<i>Oryza sativa</i>	24
Alfafa	<i>Medicago sativa</i>	32
Abacate	<i>Persea americana</i>	24
Beterraba	<i>Beta vulgaris</i>	18
Cacau	<i>Theobroma cacao</i>	20
Cebola	<i>Allium cepa</i>	16
Cevada	<i>Hordeum vulgare</i>	14
Cenoura	<i>Daucus carota</i>	18
Centeio	<i>Secale cereale</i>	14
Ervilha	<i>Pisum sativum</i>	14
Feijão	<i>Phaseolus vulgaris</i>	22
Mamão	<i>Carica papaya</i>	18
Melão	<i>Cucumis melo</i>	24
<b>Milho</b>	<b><i>Zea mays</i></b>	<b>20</b>
Pimenta	<i>Capsicum annum</i>	24
Rabanete	<i>Raphanus sativus</i>	18
<b>Sorgo</b>	<b><i>Sorghum bicolor</i></b>	<b>20</b>
Tamarindo	<i>Tamarindus indica</i>	24
Tomate	<i>Lycopersicon esculentum</i>	24

Fonte: Armstr Fonte: Armstrong (2012) ong (2012)

## Limitações para o Emprego do Melhoramento Reverso em Milho

Em milho, plantas haploides também podem ser obtidas por cultivo de anteras e óvulos (Zheng et al., 2003), ou pelo método *in vivo*, via cruzamento com genótipos indutores de haploidia (Trindade et al., 2015; Zhong et al., 2011). Contudo, no caso de cultivo de gametófitos, a frequência de sucesso ainda é muito baixa e mesmo após vários anos de pesquisas para tentar aperfeiçoar a técnica de cultura de anteras em milho permanecem as dificuldades para obtenção de calos a partir de micrósporos (androgênese) e a diferenciação dos calos em plantas (embriogênese) (Brettell et al., 1981; Chu, 1981; Ku et al., 1981; Pauk, 1985; Ting, 1985; Kuo et al., 1986; Barnabás et al., 1987, 1999; Mohammadi et al., 2007; Mahato, 2016). Em razão dessas características serem dependentes do genótipo doador (genótipo responsivo), foram realizadas diversas pesquisas para identificar genótipos de milho responsivos ao cultivo de anteras *in vitro* (Miao, 1980; Miao et al., 1981; Brettell et al., 1981; Ting et al., 1981; Genovesi; Collins, 1982; Ting, 1985; Dieu; Beckert, 1986; Petolino; Jones, 1986; Petolino; Thompson, 1987; Wan et al., 1992; Barnabás, 2003; Zheng et al., 2003). Atualmente, sabe-se que a capacidade de regeneração de calos derivados de cultura de embriões imaturos (Rosati et al., 1994; Jones, 2009; Zhong et al., 2011) ou cultura de esporos (Wan et al., 1992) em milho é determinada por pequeno número de genes com efeitos aditivos e que eles podem ser transferidos por cruzamento para genótipos-elite não responsivos. Contudo, ainda não existem estudos para determinar se os genes envolvidos na regeneração de calos de embriões imaturos são os mesmos genes responsáveis pela regeneração de calos resultantes da cultura de micrósporos. Estudos moleculares sobre as bases genéticas da androgênese em milho foram realizados para entender esse processo visando aperfeiçoá-lo (Armstrong et al., 2002; Cowen et al., 1992; Wan et al., 1992). Esses autores demonstraram que a resposta androgenética em milho é condicionada por QTLs, localizados nos cromossomos 1, 2, 3 e 9.

Apesar dos avanços no entendimento sobre a androgênese em milho, os resultados indicam a necessidade de novas pesquisas para solucionar os problemas que ocorrem nas diferentes etapas da produção de DH, tais como: a baixa frequência indução de calos, a regeneração de plantas e a identificação e melhoramento de genótipos responsivos. Portanto, a técnica de DH a partir da cultura *in vitro* de gametófitos ainda não tem sido utilizada em milho. Atualmente, emprega-se a estratégia *in vivo* para obtenção comercial de duplo-haploides em milho, que consiste basicamente no uso de linhagens indutoras de haploidia, seguido da recuperação do embriões haploides e duplicação cromossômica das plântulas por colchicina, gerando os duplo-haploides (Trindade et al., 2015).

## MARB: Melhoramento Reverso assistido por marcadores moleculares

Guan et al. (2015) desenvolveram um método alternativo o qual denominaram de Melhoramento Reverso assistido por marcadores (MARB, marker-assisted reverse breeding). Essa metodologia dispensa o uso de RNAi e a necessidade de cultivo de gametófitos para produção de DH, sendo particularmente importante como nova estratégia para o melhoramento do milho. O procedimento consiste no emprego de chips SNP (Single Nucleotide Polymorphism) de baixa densidade, desenhados com marcadores polimórficos entre os dois genótipos parentais e uniformemente distribuídos pelos 10 cromossomos do milho. Segundo os autores, esse método possibilita reverter qualquer híbrido de milho em suas linhagens parentais e baseia-se no fato de que todo o DNA do pericarpo é de origem materna, enquanto a metade do genoma do embrião é de origem paterna.

Assim, extrai-se, separadamente o DNA do embrião e do pericarpo do híbrido selecionado e em seguida determinam-se os genótipos dos dois parentais com os chips SNPs. Dessa forma, os autores demonstraram que é possível rapidamente reverter qualquer híbrido de milho em linhagens que apresentam diferentes níveis de similaridade com as linhagens parentais, o que representa um ganho de redução no tempo necessário para obtenção de linhagens quando comparamos com o método tradicional.

**Tabela 2.** Comparação entre as vantagens e limitações das técnicas RMRB (RNA Mediated Reverse Breeding) e MARB (Marker Assisted Reverse Breeding).

Parâmetros	RMRB	MARB
Necessidade de silenciamento dos genes de crossing over	sim	não
Tempo em anos para obtenção de linhagens homozigotas	2-2,5	1-1,5
Limitações quanto ao número de cromossomos haploides da espécie	<12	Não existe limite
Necessidade de produção de DH	sim	não

## Tamanho Mínimo Ideal para Seleção do Genótipo de Interesse

O número de plantas DH necessário para que a seleção do híbrido parental tenha sucesso aumenta na medida em que o número de cromossomos da espécie também aumenta. No estudo de Dirks et al. (2009), os autores apresentam uma tabela com diferentes probabilidades para reconstituição de linhagens para espécies com diferentes números de cromossomos. Por exemplo, para uma espécie com número haploide (x) igual a 5 cromossomos, a probabilidade de que pelo menos um par de duplo-haploides (n) reconstitua o híbrido parental é calculada pela fórmula:  $[(2x - 1)/2x]^{n(n-1)/2} = 0.01$  (P=99%), ou seja, igual a 18 combinações de DHs, e para P= 1.00 esse número será igual a 47. Em outro exemplo, considerando-se uma espécie com n = 10, então serão necessárias 69 e 266 DHs diferentes para que a probabilidade de sucesso seja de 90% e 100%, respectivamente (Dirks et al., 2009).

## Considerações Finais

O Melhoramento Reverso é baseado em dois princípios fundamentais: inibição da recombinação gênica e cultivo *in vitro* de micrósporos para produção de linhagens duplo-haploides, e promete revolucionar o melhoramento de espécies nas quais esses princípios podem ser aplicados.

Entre as limitações para o emprego da técnica no melhoramento encontram-se as espécies recalcitrantes ao cultivo *in vitro*, espécies cujo conjunto haploide de cromossomos supera o número de 12 cromossomos, e espécies poliploides.

Apesar do desenvolvimento relativamente recente, o Melhoramento Reverso evidenciou a necessidade de novos estudos para solucionar o cultivo de micrósporo em espécies recalcitrantes e gerou alternativas para acelerar o melhoramento dessas espécies, como o Melhoramento Reverso assistido por marcadores moleculares (MARB), conforme ficou demonstrado para o milho.

## Referências

- ALI, M. L.; SANCHEZ, P. L.; YU, S. B.; LORIEUX, M.; EIZENGA, G. C. Chromosome segment substitution lines: a powerful tool for the introgression of valuable genes from *Oryza* wild species into cultivated rice (*O. sativa*). **Rice**, v. 3, n. 4, p. 218-234, 2010.
- ARMSTRONG, S. J.; CARYL, A. P.; JONES, G. H.; FRANKLIN, F. C. H. Asy1, a protein required for meiotic chromosome synapsis, localizes to axis-associated chromatin in Arabidopsis and Brassica. **Journal of Cell Science**, v. 115, n. 18, p. 3645-3655, 2002.
- ARMSTRONG, K. C. **Chromosome numbers of crop species**. [S.l.: s.n.], 2012.
- BARNABÁS, B. Anther culture of maize (*Zea mays* L.). In: MALUSZYNSKI, M.; KASHA, K. J.; FORSTER, B. P.; SZAREJKO, I. (Ed.). **Double haploid production in crop plants: a manual**. New York: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 103-108.
- BARNABÁS, B.; OBERT, B.; KOVÁCS, G. Colchicine, an efficient genome-doubling agent for maize (*Zea mays* L.) microspores cultured in anthero. **Plant Cell Reports**, v. 18, n. 10, p. 858-862, 1999.
- BARNABÁS, B.; FRANZ, P. F.; SCHEL, J. H. N. Ultrastructure studies on pollen embryogenesis in maize (*Zea mays*). **Plant Cell Reports**, v. 6, n. 3, p. 212-215, 1987.
- BAYOU, K. Current techniques and applications of reverse genetics: an overview. **International Journal of Genetics**, v. 7, n. 2, p. 31-37, 2017.
- BEN-AMAR, A.; DALDOUL, S.; REUSTLE, G. M.; KRCZAL, G.; MLIKI, A. Reverse genetics and high throughput sequencing methodologies for plant functional genomics. **Current Genomics**, v. 17, n. 6, p. 460-475, 2016.
- BLARY, A.; JENCZEWSKI, E. Manipulation of crossover frequency and distribution for plant breeding. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 132, n. 3, p. 575-592, 2019.
- BRETTELL, R. I.; THOMAS, E.; WERNICKE, W. Production of haploid maize plants by anther culture. **Maydica**, v. 26, n. 2, p. 101-111, 1981.
- CHU, C. C. The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. In: **SYMPOSIUM PLANT TISSUE CULTURE, 1981**, Beijin. **Proceedings...** Boston: [s.n.], 1981. p. 43-50.
- CHANG, M. T.; COE, E. H.; Doubled haploids. In: KRIZ, A. L.; Larkins, B. A. (Ed.). **Molecular genetic approaches to maize improvement**. Berlin: Springer-Verlag, 2009. p. 127-142. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, v. 63).
- COUTEAU, F.; BELZILE, F.; HORLOW, C.; GRANDJEAN, O.; VEZON, D.; DOUTRIAUX, M. P. Random chromosome segregation without meiotic arrest in both male and female meiocytes of a *dmc1* mutant of Arabidopsis. **Plant Cell**, v. 11, p. 1623-1634, 1999.
- COWEN, N. M.; JOHNSON, C. D.; ARMSTRONG, K.; MILLER, M.; WOOSLEY, A.; PESTICELLI, S.; SKOKUT, M.; BELMAR, S.; PETOLINO, J. F. Mapping genes conditioning *in vitro* androgenesis in maize using RFLP analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 84, n. 5/6, p. 720-724, 1992.
- DIEU, E.; BECKERT, M. Further studies of androgenetic embryo production and plant regeneration from *in vitro* cultured anthers in maize (*Zea mays* L.). **Maydica**, v. 31, n. 3, p. 245-259, 1986.

DIRKS, R.; DUN, K.; SNOO, C. B.; BERG, M.; LELIVELT, C. L. C.; VOERMANS, W.; WOUDEBERG, L.; WIT, J. P. C.; REININK, K.; SCHUT, J. W.; ZEEUW, E.; VOGELAAR, A.; FREYMARK, G.; GUTTELING, E. W.; KEPPEL, M. N.; DRONGELEN, P.; KIENY, M.; ELLUL, P.; TOURAEV, A.; MA, H.; JONG, H.; WIJNKER, E. Reverse breeding: a novel breeding approach based on engineered meiosis. **Plant Biotechnology Journal**, v. 7, n. 9, p. 837-845, 2009.

DUPRÉ, A.; BOYER-CHATENET, L.; SATTLER, R. M.; MODI, A. P.; LEE, J. H.; NICOLETTE, M. L.; KOPELOVICH, L.; JASIN, M.; BAER, R.; PAULL, T. T.; GAUTIER, J. A forward chemical genetic screen reveals an inhibitor of the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. **Nature Chemical Biology**, v. 4, n. 2, p. 119-125, 2008.

FLACHOWSKY, H.; TRÄNKNER, C.; SZANKOWSKI, I.; WAIDMANN, S.; HANKE, M. V.; TREUTTER, D.; FISCHER, T. C. RNA-mediated gene silencing signals are not graft transmissible from the rootstock to the scion in greenhouse-grown apple plants *Malus* sp. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 8, p. 9992-10009, 2012.

GENOVESI, A. D.; COLLINS, G. B. *In vitro* production of haploid plants of corn via anther culture. **Crop Science**, v. 22, n. 6, p. 1137-1144, 1982.

GUAN, Y. X.; WANG, B. H.; FENG, Y.; LI, P. Development and application of marker-assisted reverse breeding using hybrid maize germplasm. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 14, n. 12, p. 2538-2546, 2015.

HIGGINS, J. D.; ARMSTRONG, S. J.; FRANKLIN, F. C. H.; JONES, G. H. The Arabidopsis MutS homolog AtMSH4 functions at an early step in recombination: evidence for two classes of recombination in Arabidopsis. **Genes & Development**, v. 18, n. 20, p. 2557-2570, 2004.

JONES, T. J. Maize tissue culture and transformation: the first 20 years. In: KRIZ, A. L.; LARKINS, B. A. (Ed.). **Molecular genetic approaches to maize improvement**. Berlin: Springer-Verlag, 2009. p. 7-27. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, v. 63).

JANKOWICZ-CIESLAK, J.; TILL, B. Forward and reverse genetics in crop breeding.

In: AL-KHAYRI, J.; JAIN, S.; JOHNSON, D. (Ed.). **Advances in plant breeding strategies: breeding, biotechnology and molecular tools**. Berlin: Springer-Verlag, 2016. p. 215-240.

KORZUN, V.; BÖRNER, A.; WORLAND, A. J.; LAW, C. N.; RÖDER, M. S. Application of microsatellite markers to distinguish inter-varietal chromosome substitution lines of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica*, v. 95, n. 2, p. 149-155, 1997.

KU, M. K.; CHENG, W. C.; KUO, L. C.; KUAN, Y. P.; AN, H. P.; HUANG, C. H. Induction factors and morpho-cytological characteristics of pollen-derived plants in maize (*Zea mays*). In: **SYMPOSIUM ON TISSUE CULTURE, 1981**, Beijin. **Proceedings...** Boston: [s.n.], 1981. p. 35-42.

KUO, C. S.; LU, W. L.; KUI, Y. L. Corn (*Zea mays*): Production of pure lines through anther culture. In: BAJAI, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry: crops I**. Berlin: Springer, 1986. v. 2, p. 1520164.

KUMARI, P.; NILANJAYA; SINGH, N. K. Reverse breeding: accelerating innovation in plant breeding. **Journal of Pharmacognosy Phytochemistry**, p. 1811-1813, 2018.

KUSHWAHA, U. K. S. **Importance of reverse breeding in modern plant breeding era**. [S.l.: s.n.], 2018.

- KUSPIRA, J.; UNRAU, J. Genetic analyses of certain characters in common wheat using whole chromosome substitution lines. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 37, p. 300-326, 1956.
- LAMBING, C.; FRANKLIN, F. C. H.; WANG, C. J. R. Understanding and manipulating meiotic recombination in plants. **Plant Physiology**, v. 173, n. 3, p. 1530-1542, 2017.
- LI, X.; WANG, W.; WANG, Z.; LI, K.; LIM, Y. P.; PIAO, Z. Construction of chromosome segment substitution lines enables QTL mapping for flowering and morphological traits in *Brassica rapa*. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, article 432, 2015.
- LUKASZEWICZ, A.; LANGE, J.; KEENEY, S.; JASIN, M. Control of meiotic double-strand-break formation by ATM: local and global views. **Cell Cycle**, v. 17, n. 10, p. 1155-1172, 2018.
- LUSSER, M.; PARISI, C.; PLAN, D.; CERESO, E. R. **New plant breeding techniques**. Sevilla: Institute for Prospective Technological Studies, 2011. 220 p.
- MAHATO, P. **Regeneration of plantlets through anther culture of maize (*Zea mays* L.)**. 2016. 57 f. Thesis (Master of Science in Biotechnology) - BIRSA Agricultural University, Kanke Ranchi, 2016.
- MERCIER, R.; MÉZARD, C.; JENCZEWSKI, E.; MACAISNE, N.; GRELON, M. The molecular biology of meiosis in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 66, p. 297-327, 2015.
- MIAO, S. H. Effect of different ammonium salts on the formation of maize pollen embryoids. **Acta Botanica Sinica**, v. 22, p. 356-359, 1980.
- MIAO, S. H.; KUO, C. S.; KWEI, Y. L.; SUN, A. T.; KU, S. Y.; LU, W. L.; WANG, Y. Y. Induction of pollen plants of maize and observations on their progeny. In: *SYMPOSIUM PLANT TISSUE CULTURE, 1981*, Beijin. **Proceedings...** Boston: [s.n.], 1981. p. 23-34.
- MONTGOMERY, J.; WITTEWER, C. T.; PALAIS, B.; ZHOU, L. Simultaneous mutation and genotyping by high-resolution DNA melting analysis. **Nature Protocols**, v. 2, n. 1, p. 59-66, 2007.
- MOHAMMADI, P. P.; MOIENI, A.; JAVARAN, M. J. Colchicine induced embryogenesis and doubled haploid production in maize (*Zea mays* L.) antherculture. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 3, p. 140-146, 2007.
- MORRIS, C. F.; DEMACON, V. L.; GIROUX, M. J. Wheat grain hardness among chromosome 5D homozygous recombinant substitution lines using different methods of measurement. **Cereal Chemistry**, v. 76, n. 2, p. 249-254, 1999.
- NONOMURA, K. I.; MOROHOSHI, A.; NAKANO, M.; EIGUCHI, M.; MIYAO, A.; HIROCHIKA, H.; KURATA, N. A germ cell-specific gene of the *ARGONAUTE* family is essential for the progression of premeiotic mitosis and meiosis during sporogenesis in rice. **The Plant Cell**, v. 19, p. 2583-2594, 2007.
- PAUK, J. Production of haploid plants of maize (*Zea mays* L.) thorough androgenesis. **Cereal Research Communications**, v. 13, n. 1, p. 47-53, 1985.
- PETOLINO, J. P.; JONES, A. M. Anther culture of elite genotypes of maize. **Crop Science**, v. 26, n. 5, p. 1072-1074, 1986.
- PETOLINO, J. F.; THOMPSON, S. A. Genetic analysis of anther culture response in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 74, n. 2, p. 246-286, 1987.

ROSATI, C.; LANDI, P.; TUBEROSA, R. Recurrent selection for regeneration capacity from immature embryo-derived calli in maize. *Crop Science*, v. 34, n. 2, p. 343-347, 1994.

SIAUD, N.; DRAY, E.; GY, I.; GÉRARD, E.; TAKVORIAN, N.; DOUTRIAUX, M. P. Brca2 is involved in meiosis in *Arabidopsis thaliana* as suggested by its interaction with Dmc1. **EMBO Journal**, v 23, n. 6, p. 1392-1401, 2004.

TING, Y. C. Meiosis and fertility of anther culture-derived maize plants. **Maydica**, v. 30, p. 161-169, 1985.

TING, Y. C.; YU, M.; ZHENG, W. Z. Improved anther culture of maize (*Zea mays*). **Plant Science Letters**, v. 23, n. 2, p. 139-145, 1981.

TRINDADE, R. S.; SILVA, A. C. A.; MARIZ, B. L.; GUIMARÃES, L. J. M.; SOUZA, I. R. P.; GUIMARÃES, P. E. O.; NETTO, D. M. Características agrônomicas de indutores de haploidia androgenéticos e gimnogenéticos adaptados ao ambiente tropical. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 8., 2015, Goiânia. **O melhoramento de plantas, o futuro da agricultura e a soberania nacional**: anais. Goiânia: UFG: SBMP, 2015.

VAN DUN, C. M. P.; DIRKS, R. H. G. **Near reverse breeding**. [S.l.:s.n.], 2006. Publication nº WO/2006/094773.

VAN DUN, C. M. P.; DIRKS, R. H. G. 2008. **Near reverse breeding**. [S.l.:s.n.], 2016. United States Patent nº US 9,332,697 B2.

WAN, Y.; ROCHEFORD, T. R.; WIDHOLM, J. M. RFLP analysis to identify putative chromosomal regions involved in the anther culture response and callus formation in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 85, n. 1/2, p. 360-365, 1992.

WIJNKER, E.; JONG, H. Managing meiotic recombination in plant breeding. **Trends in Plant Science**, v. 13, n. 12, p. 640-646, 2008.

WIJNKER, E.; KEES, D.; SNOO, S. B.; LELIVELT, C. L. C.; KEURENTJES, J. J. B.; NAHARUDIN, N. I. S.; RAVI, M.; CHAN, S. W. L.; JONG, H.; DIRKS, R. Reverse breeding in *Arabidopsis thaliana* generates homozygous parental lines from a heterozygous plant. **Nature Genetics**, v. 44, p. 467-471, 2012.

YANG, D.; YE, X.; ZHENG, X.; CHENG, C.; YE, N.; HUANG, F. Development and evaluation of chromosome segment substitution lines carrying overlapping chromosome segments of the whole wild rice genome. **Frontiers in Plant Science**, v. 24, n. 7, article 1737, 2016.

YANOWITZ, J.; LI, W. ATM and ATR Influence meiotic crossover formation through antagonistic and overlapping functions in *C. elegans*. **Genetics**, v. 212, p. 441-443, 2019.

ZHENG, M. Y.; WENG, Y.; SAHIBZADA, R.; KONZAK, C. F. Isolated microspore culture in maize (*Zea mays* L.), production of doubled-haploid via induced androgenesis. In: MALUSZYNSKI, M.; KASHA, K. J.; FORSTER, B. P.; SZAREJKO, I. (Ed.). **Double haploid production in crop plants**: a manual. New York: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 95-102.

ZHONG, D. Y.; ZHU, Y. Y.; LIU, Q.; ZHOU, T.; ZHAO, D. G. Production of embryogenic callus and plant regeneration from elite Guizhou waxy maize inbred lines. **Agricultural Sciences in China**, v. 10, n. 4, p. 490-498, 2011.

**Embrapa**

---

**Milho e Sorgo**

**DOCUMENTOS 239**



MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO



**CGPE 15590**

