Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Duplo-haploides em milho tropical: efeito das gerações F_1 e F_2 na expressão do *R1-navajo*, obtenção de linhagens e variabilidade genética

Évellyn Giselly de Oliveira Couto

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2017

Évellyn Giselly de Oliveira Couto
Bacharel em Ciências Biológicas

Duplo-haploides em milho tropical: efeito das gerações F_1 e F_2 na expressão do *R1-navajo*, obtenção de linhagens e variabilidade genética

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **ROBERTO FRITSCHE NETO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Couto, Évellyn Giselly de Oliveira

Duplo-haploides em milho tropical: efeito das gerações F_1 e F_2 na expressão do *R1-navajo*, obtenção de linhagens e variabilidade genética / Évellyn Giselly de Oliveira Couto. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2017.

63 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Linhagens indutoras 2. Genes de inibição 3. SNP 4. Estrutura populacional I. Título

DEDICATÓRIA

À minha avó ***Laurinda*** *por ser uma fonte inspiradora de fé, alegria e perseverança. Aos meus pais* ***Roselane e Amâncio****, por sempre acreditarem nos meus sonhos. Aos meus irmãos* ***John e Erick****, por serem todo o conforto que preciso. Ao* ***Kaio****, por todo o amor.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela dádiva da vida, e à Nossa Senhora Aparecida por toda proteção e por me darem forças para seguir em frente em busca dos meus sonhos.

À Capes pela bolsa de estudos concedida durante o primeiro ano de curso e ao CNPq pela bolsa de estudos e recursos concedidos durante os três anos até a conclusão deste trabalho.

À DuPont Pionner por sua colaboração na genotipagem das linhagens duplo haploides.

À Esalq-USP e ao Departamento de Genética pelo excelentíssimo em educação de qualidade que me permitiram amadurecer profissionalmente durante o doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas e espelhar em professores renomados. Aos funcionários do departamento de Genética pela gentileza, ajuda e paciência no exercício de suas funções, em especial à Léia, Berdan, Fernandinho, Cláudio Segatelli, Aparecido e Natálio.

Ao Roberto Fritsche-Neto pela orientação, confiança e oportunidade de trabalhar com duplo-haploides e por ser uma inspiração de profissional determinado que busca sempre crescer e aprender mais.

Aos amigos do laboratório de Melhoramento de Plantas Alógamas Ítalo Granato, Filipe Couto, Filipe Matias, Massaine Bandeira, Danilo Lira, Giovanni Galli, Leandro Mendonça, Júlia Morosini, Míriam Vidotti, Anna Rita, Pedro Patric, Luciano Rogério e Guilherme Diehl, pelo convívio diário, pelos dias de campo felizes e as vezes chuvosos, por todos os churrascos de confraternização, pelo conhecimento compartilhado e por toda ajuda na condução do experimento deste trabalho. Um agradecimento especial ao Miguel Ribeiro por me ajudar no experimento de campo e por seus ensinamentos.

Ao CIMMYT, no México, pela oportunidade de estágio internacional, em especial ao laboratório BSU. Agradeço aos colegas que me recepcionaram muito bem e por serem tão solícitos e aos pesquisadores José Crossa e Juan Burgueño pelas sugestões nas análises estatísticas, incentivo e amizade que criamos. Ainda, agradeço ao Vijay Chaikam, Leocádio e Luiz por me apresentarem a tecnologia duplo-haploides com tanto empenho.

Aos meus pais Amâncio e Roselane, pelo amor incondicional, por abdicarem muitas vezes dos seus sonhos pelos meus, por acreditarem em mim e me apoiarem, e por compreenderem meus momentos longe da família.

Aos meus irmãos, John e Erick, por serem os amigos que preciso, por sempre levarem alegria onde vão e por todas as palavras de carinho e força.

Aos meus avós Amâncio, Afonsina, Deusdedito (em memória) pela inesquecível convivência, e por serem um exemplo de caráter e determinação. E à minha avó Laurinda, pelo amor adocicado, aconchego, por seu jeito simples que encanta, e por todas as orações.

À todos os meus tios e primos que sempre torceram por mim.

Ao Kaio, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos desta caminhada, por todo o seu amor, carinho e paciência nos períodos em que estivemos distântes. Obrigada por me tornar uma pessoa melhor e por me fortalecer com seu apoio.

Aos amigos que estiveram comigo durante esta trajetória, sempre me apoiando, principalmente àqueles da Esalq, que foram companheiros nos momentos de lazer e naqueles de sufoco, que estiveram presentes nas disciplinas e trabalhos, tornando esta caminhada divertida e inesquecível. Um agradecimento em especial à Leticia Lara, companheira de república, por ser uma amiga irmã sincera que tornou estes 4 anos especiais.

À Mayara Neves, pela amizade que cultivamos, por ter acompanhado este trabalho desde o ínicio, pelo seu esforço, ajuda, e por permitir que eu pudesse ensinar e aprender.

À minha família mexicana Emilie, Carlos, Karla, Alfonso e Ximena, por me ajudarem em todos os momentos do intercâmbio e por me permitirem conhecer a cultura deles com tanto carinho. E à Massaine, Haroldo, Mirko e Marcela pelos momentos compartilhados nesta etapa maravilhosa que ficarão para sempre em minha memória.

Enfim, a todos aqueles que passaram na minha vida e que trouxeram incentivos, alegrias, novas formas de ver o mundo e de pesquisar, possibilitando a concretização deste trabalho.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO **7**

ABSTRACT **8**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS **9**

1. INTRODUÇÃO **11**

1.1. OBJETIVOS 14

1.1.1. Objetivo geral *14*

1.1.2. Objetivos específicos *14*

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **15**

2.1. DUPLO-HAPLOIDES NO MELHORAMENTO DE MILHO 15

2.2. INDUÇÃO EM MILHO TROPICAL E A PRESENÇA DE GENES INIBIDORES 18

2.3. GERAÇÃO DE INDUÇÃO E VARIABILIDADE GENÉTICA 21

3. MATERIAL E MÉTODOS **25**

3.1. MATERIAL GENÉTICO 25

3.2. INDUÇÃO DE HAPLOIDES EM CLIMA TROPICAL 26

3.3. SELEÇÃO DE SEMENTES POR MEIO DA EXPRESSÃO DE ANTOCIANINA 26

3.4. GERMINAÇÃO E DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA ARTIFICIAL 27

3.5. CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO A CAMPO APÓS DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA 27

3.6. COLHEITA DAS ESPIGAS D_1 29

3.7. ANÁLISE DE DADOS FENOTÍPICOS 29

3.7.1. Expressividade da antocianina devido o marcador R1-navajo *29*

3.7.2. Eficiência relativa na obtenção de linhagens duplo-haploides *30*

3.8. ANÁLISE DOS DADOS GENOTÍPICOS 31

3.8.1. Genotipagem e controle de qualidade *31*

3.8.2. Análise da variação genômica *32*

3.8.3. Estrutura populacional e parentesco *33*

3.8.4. Desequilíbrio de ligação *33*

4. RESULTADOS **35**

4.1. INDUÇÃO DE HAPLOIDES E EXPRESSIVIDADE DO MARCADOR *R1-NAVAJO* 35

4.2. EFICIÊNCIA RELATIVA NAS ETAPAS DE OBTENÇÃO DE LINHAGENS DH 37

4.3. CONTROLE DE QUALIDADE NOS DADOS DE MARCADORES 41

4.4. VARIABILIDADE GENÉTICA 41

4.5. ESTRUTURA POPULACIONAL E PARENTESCO GENÔMICO 42

4.6. DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO (LD) 44

5. DISCUSSÃO **47**

5.1. EFEITO DAS GERAÇÕES F_1 E F_2 NA INDUÇÃO DE HAPLOIDES E NA EXPRESSIVIDADE DA ANTOCIANINA DEVIDO O *R1-NAVAJO* 47

5.2. GERAÇÕES F_1 E F_2 NA OBTENÇÃO DE LINHAGENS DH EM MILHO TROPICAL 49

5.3. VARIABILIDADE GENÉTICA DE LINHAGENS DH OBTIDAS DE GERAÇÕES F_1 E F_2 51

6. CONCLUSÕES **55**

REFERÊNCIAS **57**

APÊNDICES **61**

RESUMO

Duplo-haploides em milho tropical: efeito das gerações F_1 e F_2 na expressão do *R1-navajo*, obtenção de linhagens e variabilidade genética

Dentre as diversas questões envolvendo a tecnologia duplo haploides (DH) em milho, uma que tem sido pouco discutida é a geração em que se deve induzir haploides, no caso, F_1 ou F_2. Destas, a F_1 tem sido a mais utilizada. No entanto, o seu uso constante pode levar a perdas de ganhos genéticos, devido ao menor número de recombinações. Com isso, alguns autores aconselham o uso da F_2 na indução, o que possibilitaria maiores ganhos em variabilidade genética. Desse modo, os objetivos foram verificar o efeito das gerações F_1 e F_2 na expressão do R*1-navajo* em germoplasma tropical, na eficiência relativa de cada uma das etapas da metodologia e na variabilidade genética das linhagens DH obtidas. Para isso, cinco fontes de germoplasma, em gerações F_1 e F_2, foram cruzadas com o indutor de haploidia tropicalizado LI-ESALQ. As sementes deste cruzamento foram agrupadas por meio do marcador R*1-navajo* em três classes: haploides putativos, diploides e inibidas. Após esta etapa, as sementes dos haploides putativos foram submetidas à duplicação cromossômica e as plantas duplicadas foram transplantadas a campo para a obtenção de linhagens DH. As unidades de sementes, plântulas e plantas em cada etapa da metodologia foram quantificadas para o estudo da eficiência relativa na obtenção de DH. Também foram coletadas amostras foliares das linhagens DH para genotipagem por meio de marcadores SNP (Single nucleotide polymorphism). As taxas de indução de haploides (HIR), sementes diploides (DSR) e inibidas (ISR) foram analisadas por meio de um modelo linear generalizado misto considerando distribuição logit multinomial. As eficiências relativas das fontes de germoplasma e gerações em cada etapa da metodologia DH foram estimadas por meio de porcentagem. Os marcadores SNP foram utilizados em estudos de diversidade genética, estrutura populacional e desequilíbrio de ligação. Os valores médios observados para as taxas de HIR, ISR e DSR foram, respectivamente, 1,23%, 23,4% e 75,2% para a geração F_1 e 1,78%, 19,6% e 82,3% para a geração F_2. O maior valor de HIR na F_2 ocorreu devido à segregação dos genes que inibem o marcador R*1-navajo* durante a indução de haploides. Entretanto, apesar da geração F_2 apresentar maior HIR, ela não deve substituir a F_1, uma vez que se perde tempo com um ciclo adicional. A eficiência relativa na obtenção de linhagens DH apresentou o mesmo valor (0,4%) para as gerações F_1 e F_2, indicando que a escolha da geração não interfere na quantidade de DH produzidos. As estimativas dos parâmetros populacionais para as linhagens DH obtidas de geração F_1 apresentaram valores para variância genética (V_G) de 700,55, tamanho efetivo populacional (N_e) de 43,1, diversidade genética de Nei (GD) de 0,28 e conteúdo de informação polimórfica (PIC) de 0,23. Para a geração F_2 as estimativas foram de V_G=648,88, N_e=39,61, GD=0,26 e PIC=0,22. Os valores de desequilíbrio de ligação foram de 0,069 na geração F_1 e de 0,067 na geração F_2. Ou seja, as linhagens DH oriundas destas duas gerações apresentaram magnitudes semelhantes de diversidade genética e de desequilíbrio de ligação. O uso da geração F_2 teoricamente permitiria obter maior variabilidade genética, devido à recombinação adicional. Entretanto, neste trabalho esta tendência não foi observada. Com isto, em milho tropical, recomenda-se o uso da geração F_1 para a obtenção de DH, por apresentar o melhor balanço entre tempo e variabilidade genética.

Palavras-chave: Linhagens indutoras; Genes de inibição; SNP; Estrutura populacional

ABSTRACT

Doubled haploids in tropical maize: effect of F_1 and F_2 generation on the expressiveness of *R1-navajo*, lines obtaining and genetic variability

Among the several questions involving doubled haploid technology (DH), one that has been little discussed is the generation in which one should induce haploids, in the F_1 or F_2. Overall, the F_1 generation has been the most used. However, their constant use can lead to losses of genetic gains with the selection cycles due to the lower number of recombination. Thereby, some authors advise the use of F_2 in inductions, which would allow greater gains in genetic variability. Thus, the objectives were to check the effect of the F_1 and F_2 generations on the expression of the R*1-navajo* in tropical germplasm, on the relative efficiency of each step of the methodology and the genetic variability of the DH lines obtained. For this purpose, five germplasm sources, in F_1 and F_2 generations, were crossed with the tropicalized haploid inducer LI-ESALQ. The seeds from this cross were grouped using the R*1-navajo* marker into three classes: putative haploids, diploid and inhibited. Then, putative haploid seeds were submitted to chromosome duplication, and the duplicate seedlings were transplanted to the field in order to obtain DH lines. Hence, seed, seedling, and plant at each stage of the methodology were quantified to study the relative efficiency in developing DH lines. Moreover, leaf samples from the D_0 lines were collected for genotyping using SNP (Single nucleotide polymorphism) markers. Finally, the haploid inducer rate (HIR), diploid seed rate (DSR) and inhibited seed rate (ISR) were analyzed using a generalized linear mixed model considering multinomial logit distribution. The relative efficiency of germplasm sources and generation in each stage of the DH methodology was estimated by percentage. SNP markers were used in studies of genetic diversity, population structure, and linkage disequilibrium. The observed mean values of HIR, ISR and DSR were, respectively, 1.23%, 23.4% and 75.2% for the F_1 generation and 1.78%, 19.6% and 82.3% for the F_2 generation. The higher value of HIR in F_2 occurred due to the segregation of genes, which inhibit the R*1-navajo* marker during haploid induction. However, in spite of the higher value of HIR for F_2 generation, it should not replace F_1 since time is lost with an additional cycle. The relative efficiency observed in the obtention of DH lines was the same value (0.4%) for generations F_1 and F_2, indicating that the choice between those generations does not interfere with the quantity of produced DH. Estimates of the population parameters for the DH lines obtained from F_1 generation presented values for genetic variance (VG) of 700.55, effective population size (Ne) of 43.1, Nei's genetic diversity (DG) of 0.28 and polymorphic information content (PIC) of 0.23. For F_2 generation the estimates were VG = 648.88, Ne = 39.61, GD = 0.26 and PIC = 0.22. Linkage disequilibrium values were 0.069 in the F_1 generation and 0.067 in the F_2 generation. Thus, DH lines from these two generations showed similar values of genetic diversity and linkage disequilibrium. Nonetheless, the use of the F_2 generation theoretically would allow obtaining greater genetic variability, due to the additional cycle of crossing-overs. However, this trend was not observed in this study. Thus, in tropical maize, the use of the F_1 generation to obtain DH lines is recommended, because it performs the best balance between time and genetic variability.

Keywords: Haploid inducer lines; Inhibition genes; SNP; Population structure

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DH	linhagens duplo-haploides
DSR	taxa de sementes diploides
HIR	taxa de indução de haploides
ISR	taxa de sementes inibidas
FDR	taxa de falso positivo
R1-nj	marcador *R1-navajo*
Real HIR	taxa real de indução de haploides
SNP	polimorfismo de nucleotídeo único (do inglês, single nucleotide polymorphism)
D_G	diversidade genética de Nei
PIC	conteúdo de informação polimórfica
MAF	menor frequência alélica (*minor allele frequency*)
V_G	variância genética
H_0	heterozigosidade observada
N_e	tamanho efetivo populacional
LD	desequilíbrio de ligação
QTL	loci de caráter quantitativo (do inglês, quantitative trait locus)

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a obtenção de linhagens duplo-haploides (DH) em milho tem se tornado uma prática comum em instituições públicas e privadas em todo o mundo. Isto é devido a esta permitir a obtenção rápida de linhagens completamente homozigotas, propiciando material teste para uma seleção mais confiável do que via linhagens obtidas por meio de autofecundações sucessivas. Além disso, a implementação desta tecnologia em um programa de melhoramento aumenta o ganho genético, simplifica a logística utilizada no desenvolvimento e manutenção das linhagens, possibilita um fácil registro de variedades de plantas e potencializa o desenvolvimento de novos híbridos (MELCHINGER et al., 2005; MELCHINGER et al., 2016a).

Resumidamente, a metodologia DH é classificada pelas seguintes etapas: 1) cruzamento entre uma linhagem indutora de haploidia e genótipo doador; 2) seleção de sementes de putativos haploides por meio do marcador *R1-nj* (NANDA; CHASE, 1966); 3) duplicação cromossômica, 4) autofecundação das linhagens D_0 para obtenção das linhagens D_1 (MELCHINGER et al., 2005) e 5) início dos *testcrosses* e multiplicação das linhagens D_1 para serem inseridas no programa de melhoramento.

As primeiras linhagens indutoras de haploidia que surgiram, Stock 6 (COE, 1959) e W23 (KERMICLE, 1969, 1971), são de origem temperada. A partir delas foram desenvolvidas outras linhagens com maiores taxas de indução e adaptação, tanto em ambiente temperado como tropical. Hoje, as linhagens temperadas com maiores taxas de indução de haploides (HIR), são derivadas da linhagem ginogenética Stock 6: WS14 (LASHERMES e BECKERT, 1988), RWS (RÖBER; GORDILLO; GEIGER, 2005), HZI1(ZHANG et al., 2008), PHI (ROTARENCO et al., 2010). Já em países de clima tropical o que se observa é uma implantação mais lenta da tecnologia (PRIGGE et al., 2012c), apesar das etapas da metodologia não serem afetadas por condições climáticas (PRIGGE et al., 2011). Este atraso ocorre principalmente devido a não adaptação dos indutores de haploidia ao clima tropical e à escolha do ambiente em que a metodologia é implementada, visto que as linhagens D_0 exigem um ambiente úmido com temperaturas amenas para que os grãos de pólen e estilo-estigma se desenvolvam bem para a realização da autofecundação. Neste contexto, o Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo (CIMMYT) tem desenvolvido indutores tropicais de haploidia com altas HIR, tais como Tail 8 e Tail 9, em parceria com a Universidade de Hohenheim. Em nossa universidade nós temos um indutor de haploidia ginogenético tropicalizado, LI-ESALQ, proveniente do cruzamento entre (W23xStock6) x híbrido tropical, o qual ainda não foi estudado quanto às taxas de indução de haploides e eficiência na obtenção de linhagens DH.

A escolha das fontes doadoras que serão utilizadas na indução de haploides depende dos objetivos do programa, podendo ser extraídas linhagens DH de populações ou híbridos. Em outra abordagem, que não seja a de obtenção de híbridos imediata, o uso da tecnologia DH pode permitir o resgate de linhagens elite ou selvagens, a partir da indução de haploides nestas fontes (BÖHM et al., 2017). Em um esquema padrão de obtenção de DH, a geração F_1 tem sido preferencialmente utilizada como população base (MELCHINGER et al., 2005; SMITH et al., 2008), enquanto que induções envolvendo a geração F_2 tem sido pouco abordadas no meio científico. Além disso, utilizar gerações mais tardias que a F_2 não faz sentido na tecnologia DH, já que o objetivo é acelerar o processo de obtenção de linhagens. Atualmente, todos os estudos publicados que envolvem esta questão são relacionados a regiões de clima temperado ou de simulação (BERNARDO, 2009; SLEPER; BERNARDO, 2016), de modo que as regiões de clima tropical foram pouco abordadas até o momento.

Dentre as vantagens de se utilizar a geração F_1 na indução de haploides, está o ganho de tempo na obtenção das linhagens DH e a possibilidade de se manter combinações favoráveis existentes nas linhagens parentais, uma vez que a recombinação dos genes ligados ocorrerá somente na meiose que irá originar o gameta responsável pela formação da semente haploide (PIERRE et al., 2011). Por exemplo, em estudos de simulação foi observada herança de cerca de 50% de grandes blocos gênicos intactos de 7 em cada 10 cromossomos parentais (SMITH et al., 2008). No entanto, o uso constante da geração F_1 ao longo dos ciclos de seleção tem gerado discussões no meio científico. Uma das questões abordadas é em relação à taxa de recombinação nessas linhagens ser menor que em linhagens convencionais, o que poderia acarretar em um decréscimo na resposta dos ganhos de seleção (RIGGS; SNAPE, 1977; JANNINK; ABADIE, 1999). Por outro lado, ao utilizar a geração F_2 na indução de haploides, haveria um ciclo a mais na etapa de melhoramento, o que, teoricamente, aumentaria a variabilidade genética das linhagens obtidas, mas também o tempo e os custos. Além disso, por meio de induções de haploides em geração F_2 é esperado cerca de 50% a mais de crossover que nas induções que ocorrem em geração F_1. Assim, por meio do uso da geração F_2 ocorre maior rompimento nas associações desfavoráveis, enquanto que no uso da geração F_1 ocorre maior preservação de associações favoráveis (SLEPER; BERNARDO, 2016). Além disso, na etapa de indução de haploides em geração F_2, as plantas menos vigorosas e menos sadias podem ser descartadas no campo, ao contrário das plantas em geração F_1 as quais apresentam fenótipo semelhante (BERNARDO, 2009). Diante das particularidades de cada geração, os autores Sleper e Bernardo (2016) afirmam que a escolha de qual delas utilizar na indução de haploides depende dos objetivos de cada programa de melhoramento, e do tempo e recursos que o melhorista pode investir na

metodologia. No entanto, é importante discutir a respeito do custo e benefício do uso de cada geração na indução de haploides em clima tropical.

Após a obtenção das sementes provenientes do cruzamento entre a fonte de germoplasma com o indutor, os putativos haploides são selecionados pela cor, devido a presença de antocianina nas sementes, ocasionada pelo marcador *R1-nj* (NANDA; CHASE, 1966). Este marcador é largamente utilizado, porém neste processo ocorre a presença de muitos falsos positivos. Com isto, várias metodologias já foram desenvolvidas para complementar o *R1-nj*, tais como o teor de óleo (MELCHINGER et al., 2014), a presença e ausência de lígula (PRIGGE et al., 2012a), a presença e ausência de *glossy* e a resistência a herbicidas (MELCHINGER et al., 2016a), e o uso de citometria de fluxo (BATTISTELLI et al., 2013; COUTO et al., 2013). Estas metodologias possibilitam que os indivíduos haploides sejam selecionados com maior confiabilidade, visto que o marcador *R1-nj* possui expressividade variável que depende do germoplasma utilizado como doador (PRIGGE et al., 2011), ou ainda, pode ser inibido pela presença de genes específicos presentes em germoplasma tropical (CHAIKAM et al., 2015). O germoplasma do milho tropical não possui em sua constituição os genes que atuam na rota da expressão da antocianina. Por outro lado, possui genes mutantes conhecidos como C*1-I*, C2-I*df* e *in*-1D, que atuam no sentido de impedir a expressão de antocianina nas sementes (COE et al., 1988; STINARD; SACHS, 2002). Na presença destes genes, a inibição pode ser total ou parcial, dependendo de como os alelos estarão presentes, se de modo homozigoto ou heterozigoto (CHAIKAM et al., 2015). Assim, supondo-se por exemplo, que um germoplasma com bom desempenho agronômico possua os genes inibidores da antocianina, seu uso na obtenção de novas linhagens DH seria dificultado. Neste contexto, é importante ressaltar que o comportamento destes genes inibidores na obtenção de haploides tropicais a partir de gerações F_1 e F_2 ainda não foi estudado em milho tropical.

Outro fator importante na obtenção de linhagens DH é a análise das etapas utilizadas na metodologia em relação às suas eficiências. Neste contexto, Melchinguer et al. (2016b) detalharam estas etapas e apresentaram resultados relacionados com os custos de produção das linhagens e de produtos antimitóticos utilizados na duplicação cromossômica. Entretanto até o momento não há na literatura um estudo detalhado das etapas e suas eficiências relativas, considerando induções em gerações F_1 e F_2 ou mesmo, milho tropical. Estes resultados poderiam auxiliar na identificação das etapas críticas da metodologia, direcionar a seleção e o melhoramento de indutores para estas etapas, além de oferecer um planejamento da logística necessária para cada fase da metodologia, em função do número de DH pretendido.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo geral

Analisar o efeito das gerações F_1 e F_2 de cinco fontes de germoplasma de milho na obtenção de linhagens duplo-haploides em clima tropical.

1.1.2. Objetivos específicos

1. Avaliar o efeito das gerações F_1 e F_2 na expressão do *R1-nj* em germoplasma tropical.
2. Estudar a eficiência relativa de cada uma das etapas da metodologia de obtenção de DH considerando as gerações F_1 e F_2 como população de indução.
3. Analisar o efeito das gerações F_1 e F_2 na variabilidade genética entre linhagens DH obtidas a partir de cinco fontes de germoplasma.
4. Avaliar a taxa de indução de haploides do indutor LI-ESALQ.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Duplo-haploides no melhoramento de milho

Na cultura do milho, o vigor híbrido descrito por Shull (1908, 1909, 1910), tem sido uma das mais valiosas contribuições práticas do melhoramento genético ao ser humano e à agricultura mundial. Por causa dele a superioridade dos genótipos heterozigotos tem sido explorada há muitos anos, possibilitando rentabilidade no mercado de sementes. A partir dos princípios fundamentais desenvolvidos por este pesquisador, hoje se sabe que para obter híbridos com alto desempenho é necessário o cruzamento entre linhagens elite divergentes e complementares geneticamente (SOUZA JÚNIOR, 2001). No entanto, a etapa de obtenção dessas linhagens é demorada e cara, e com seis gerações de autofecundação a homozigose dos locos atingem aproximadamente 99,22%. Devido a isso, os melhoristas de milho têm buscado por inovações tecnológicas que possam complementar a obtenção de linhagens elite e uma dessas tecnologias é a obtenção de linhagens DH. Nas últimas décadas os DH têm sido largamente utilizados nos programas de melhoramento permitindo uma redução de custo e aceleração do processo de obtenção de linhagens e consequentemente de híbridos (MELCHINGER et al., 2013).

Por causa deste sucesso, é importante introduzir o conceito de DH e explicar sobre suas vantagens e a metodologia envolvida na sua obtenção. Os DH são definidos como um genótipo ou planta que teve suas células haploides duplicadas espontaneamente ou artificialmente por meio de antimitóticos. Os DH formados a partir de duplicações espontâneas não são vantajosos para serem utilizados em programas de melhoramento, uma vez que a duplicação ocorre de forma aleatória e em menor porcentagem, tornando trabalhosa a seleção dessas linhagens no campo (WU et al., 2014). Uma técnica que poderia ser utilizada para selecionar os DH neste caso seria a citometria de fluxo que quantifica o DNA, no entanto, considerando uma produção de linhagens em massa, seria necessário analisar todas as plantas no campo, o que torna esta técnica ineficiente. Já na duplicação artificial a metodologia pode ser controlada e os protocolos podem ser ajustados para que a duplicação seja maximizada, e o melhorista tem um controle maior das plantas que foram duplicadas. Por causa disso a duplicação cromossômica artificial tem sido largamente utilizada na obtenção das linhagens DH.

Dentre as vantagens da tecnologia DH é importante citar algumas mais relevantes:

1) O ganho no tempo em relação às linhagens convencionais, visto que são necessários apenas três ciclos de melhoramento para obter as linhagens DH, a partir de induções em geração F_1 (Tabela 1).

Tabela 1. Comparações entre ciclos e etapas utilizadas na obtenção de linhagens convencionais e duplo-haploides em milho

	Linhagens convencionais		**Linhagens duplo-haploides**	
Ciclos	**Etapas**	**Colheita**	**Etapas**	**Colheita**
1	Linhagem A x Linhagem B	F_1	Linhagem A x Linhagem B	F_1
2	Formação de população recombinante	S_0	Indução de haploides	Putativos haploides
3	S_0 - autofecundação	S_1	Duplicação cromossômica e autofecundação de D_0	D_1
4	S_1 - autofecundação	S_2	Multiplicação de linhagem D_1	D_2
5	S_2 - autofecundação	S_3		
6	S_3 - autofecundação	S_4*		

*Início dos *test-crosses*

2) Obtenção de material 100% em homozigose, porcentagem que não se atinge em linhagens recombinantes, que pode já ser cruzado com testador, sendo a seleção mais confiável e preditiva que o uso de linhagens convencionais (SMITH et al., 2008).
3) A redução de custos, de mão de obra necessária nas autofecundações e o trabalho laboratorial. Simplificando a logística por trás da obtenção de linhagens recombinantes os recursos podem ser realocados em novos ciclos de melhoramento para obtenção de mais linhagens DH ou de testes para obtenção de híbridos. Além disso, os esforços para manutenção de linhagens é menor (RÖBER; GORDILLO; GEIGER, 2005).
4) Maximiza a variância genética entre as linhas DH e facilita a seleção de características quantitativas (BORDES et al., 2006).
5) Possibilita maior eficiência e precisão de seleção, principalmente se combinada com o uso de marcadores moleculares (GEIGER; GORDILLO, 2009; RÖBER; GORDILLO; GEIGER, 2005). Ainda, os marcadores moleculares permitem que o germoplasma feminino e masculino dos híbridos doadores seja acessado (HECKENBERGERA et al., 2005).
6) E por fim, se um melhorista de milho tiver a pretensão de registrar e proteger uma cultivar, as linhagens DH cumprem os critérios da DHE (distinguibilidade, homogeneidade, estabilidade) perfeitamente, devido a sua completa homozigose (GEIGER; GORDILLO, 2009).

Em relação às desvantagens da tecnologia podem ser citadas:

1) O menor número de recombinações em linhagens DH quando comparada com as linhagens convencionais. Além disso, no processo de obtenção de linhagens DH ocorre uma rápida endogamia que impossibilita a seleção dos melhores genótipos. Ao contrário,

na obtenção de linhagens convencionais a seleção dos melhores genótipos ocorre em cada ciclo de autofecundação, o que possibilita que diversas características sejam fixadas.

2) A ausência de indutores tropicalizados que dificultam o uso da tecnologia no Brasil.
3) A periculosidade do antimitótico colchicina utilizado na duplicação cromossômica, sendo importantes estudos que visem sua substituição por outros produtos.
4) A influência ambiental e do genótipo doador na expressão de antocianina nas sementes.
5) A autofecundação das linhagens D_0 que pode ser prejudicada por chuvas em excesso.

A metodologia para a obtenção dos DH inicia-se com a polinização de fontes de germoplasma, selecionadas pelo melhorista, com a linhagem indutora de haploidia utilizada como doadora de pólen. Deste cruzamento são obtidas sementes haploides que são então selecionadas visualmente, uma a uma, para serem submetidas ao protocolo de duplicação cromossômica. A seleção de sementes haploides é possibilitada pela coloração arroxeada causada pelo gene dominante do sistema *R1-navajo* (*R1-nj*), na aleurona e endosperma das sementes (COE, 1964). Assim, as sementes com embrião branco e endosperma roxo são selecionadas como indivíduos haploides, sendo as outras descartadas por serem consideradas diploides. Esta seleção pela cor ocorre devido ao seguinte processo, considerando o alelo do R*1-nj* como $\boldsymbol{R_1R_1}$, por exemplo: no endosperma o tecido é triploide, sendo um alelo do parental masculino e dois do feminino. No caso das sementes induzidas, um alelo será do indutor e os outros dois serão da fonte de germoplasma utilizada, sendo o endosperma constituído por $\boldsymbol{R_1rr}$, o que causa a expressão da antocianina na aleurona das sementes. No embrião, a constituição alélica é diploide, assim, se ocorrer a fertilização e a formação de uma semente diploide a constituição dela será $\boldsymbol{R_1r}$, ou seja, o R*1-nj* vai se expressar. Se o embrião se desenvolver em uma célula haploide, sua constituição será $\boldsymbol{r}$, impedindo a expressão do R*1-nj,* pois o embrião não contém o genoma da linhagem indutora que carrega o alelo marcador (NANDA; CHASE, 1966, PIERRE et al., 2011).

Apesar de parecer uma etapa fácil, o marcador *R1-nj* tem expressividade variável, e pode ter expressão fraca na aleurona, não fornecendo uma indicação precisa das sementes haploides e por causa disso as sementes selecionadas são chamadas de haploides putativos, já que haverá falsos positivos na amostra. Outra questão relacionada ao marcador é que as fontes de germoplasma tropicais possuem genes inibidores que impossibilitam a expressividade do R*1-nj* (CHAIKAM et al., 2015), diminuindo a eficiência da técnica nestes locais, tema que será discutido no próximo tópico.

A duplicação cromossômica artificial é realizada com antimitóticos que bloqueiem a divisão celular. Ultimamente a colchicina é um dos bloqueadores mitóticos mais utilizados nos

protocolos de duplicação cromossômica por possibilitar resultados eficientes (PRASANNA, CHAIKAM, MAHUKU, 2012). No entanto, existem pesquisas relacionadas à sua substituição por produtos mais baratos e menos cancerígenos (MELCHINGER et al., 2016b). Esse agente se liga à tubulina e inibe a polimerização dos microtúbulos que compõem as fibras dos fusos, não havendo, assim, a migração dos cromossomos para os polos das células. Dessa forma, as células que anteriormente eram x (haploides) passam a ser 2x (diploides)(PIERRE et al., 2011). Após a duplicação cromossômica artificial as plantas são transferidas para o campo. Em milho, cerca de 30% das plantas haploides submetidas ao tratamento com colchicina conseguem ser autofecundadas e produzir as sementes que serão 100% homozigóticas. Essa fase é conhecida como duplo- haploide de primeira geração (D_0) (PRIGGE; MELCHINGUER, 2012) e a partir da multiplicação dos D_0 são obtidos os duplo-haploides de segunda geração (D_1) (Figura 1). A partir dos D_1 ocorre a multiplicação de sementes e podem ser iniciados os primeiros processos de *test-crosses* (FRITSCHE-NETO, GARBUGLIO, BOREM, 2013).

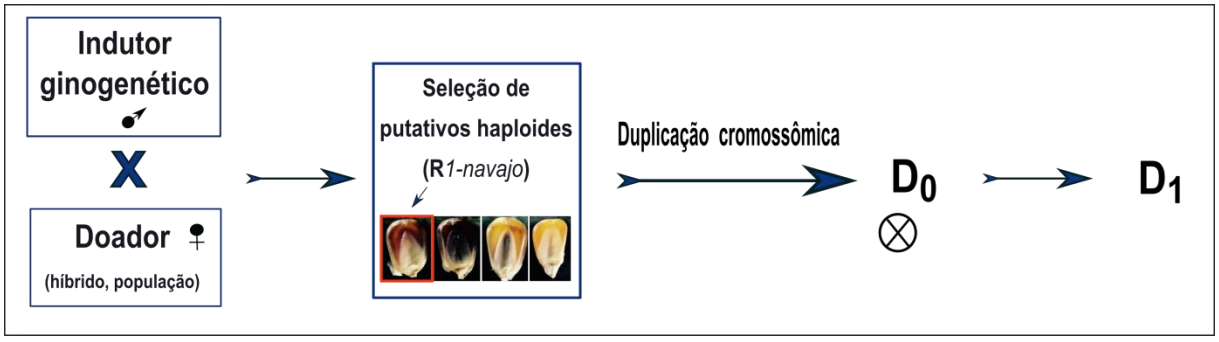

Figura 1. Esquema das etapas utilizadas na obtenção de linhagens duplo-haploides em milho

2.2. Indução em milho tropical e a presença de genes inibidores

Como dito anteriormente, a primeira etapa na obtenção dos DH envolve polinizações com uma linhagem indutora de haploidia. As primeiras linhagens indutoras descobertas no meio científico foram a W23 (KERMICLE, 1969,1971), com taxa de indução de haploides (HIR) entre 1 a 2% e a Stock 6 (COE, 1959; COE; SARKAR, 1964) com HIR de 2 a 3%. A partir destes genótipos indutores de haploidia os geneticistas incorporaram o marcador R*1-nj* para facilitar a seleção das sementes e plântulas haploides (NANDA; CHASE, 1966; GREENBLATT; BOCK, 1967; CHASE, 1969). Através dos anos, novas linhagens indutoras foram desenvolvidas a partir da Stock 6, a fim de alcançar maiores taxas de indução de haploides e melhorar as características agronômicas das plantas. Estas linhagens são conhecidas como ginogenéticas por serem utilizadas como doadoras de pólen, ou seja, o haploide formado carregará apenas o genoma da fonte de

germoplasma usada no cruzamento, e não do indutor. Dentre as linhagens desenvolvidas pode-se mencionar as de origem temperada com HIR variando de 6 a 14%: WS14 (LASHERMES; BECKERT, 1988), MHI (EDER; CHALYK, 2002), RWS (RÖBER; GORDILLO; GEIGER, 2005), PHI (ROTARENCO et al., 2010), e as variedades de origem tropical desenvolvidas no CIMMYT, que apresentam HIR de 8 a 10%, tais como Tail 8 e Tail 9 (PRIGGE et al., 2012a) e o indutor de raiz vermelha (CHAIKAM et al., 2016). As linhagens ginogenéticas são utilizadas preferencialmente na tecnologia DH por possuírem maior HIR que as androgenéticas, manejo no campo facilitado devido à altura das plantas, permitindo que vários materiais possam ser induzidos simultaneamente (FRITSCHE-NETO, GARBUGLIO, BOREM, 2013), e pelas sementes haploides herdarem o citoplasma e os cromossomos do doador. Já a linhagem androgenética W23, por ser utilizada como fêmea, não conquistou o mercado de sementes e instituições públicas por possuir baixa HIR e produzir poucas sementes, e por resultarem em linhagens DH pouco atrativas para o melhoramento de milho. Este fato se deve à constituição da semente haploide que possuirá os cromossomos das fontes de germoplasma utilizadas, mas o citoplasma será da W23 (PRASANNA,CHAIKAM, MAHUKU, 2012), fato que diminui a indução haploide.

Apesar dos indutores de haploidia ginogenéticos serem muito importantes na obtenção de linhagens DH, os mecanismos envolvidos no fenômeno da indução de haploides não foram ainda definitivamente elucidados. Dentre os estudos relacionados há duas hipóteses, a primeira é de que irregularidades entre a microsporogênese e a fertilização, distorcida geneticamente, incentivem o óvulo haploide a se desenvolver sem que tenha ocorrido a fecundação (CHALYK et al., 2003; GEIGER; GORDILLO, 2009). BARRET et al. (2008) observaram distorção de segregação no loco *ggil*, no indutor PK6, responsável pela indução de haploides maternos. Este alelo apresentou penetrância incompleta, sendo um alelo mutante que atua no desenvolvimento do pólen do indutor. Assim, na presença de distorção de segregação, a fertilização não ocorre de modo normal, formando o embrião haploide. A partir deste estudo, XU et al. (2013) detectaram uma região e a nomearam de *sed1,* sendo que ela engloba os genes envolvidos na distorção de segregação responsável pela indução de haploides em milho. Em análises de QTL em populações segregantes provenientes de cruzamentos com indutores de haploides maternos, foi observado um QTL (*qhir1*) explicando 66% da variância genética da HIR e um (*qhir8*) explicando 22%. Os resultados sugerem que a HIR e a falha na fertilização são fenômenos relacionados (PRIGGE et al., 2012b). A segunda hipótese dos mecanismos que podem acontecer na formação do embrião haploide é a eliminação cromossômica após a fertilização normal, sendo que análises citológicas revelaram a presença de micronúcleos em células mitóticas de óvulos fertilizados e de

mixoploides em raízes de plântulas haploides (ZHANG et al., 2008; ZHAO et al., 2013; QIU et al., 2014). LI et al. (2009) encontraram evidencias de eliminação cromossômica a partir do estudo de introgressão de DNA do indutor nas sementes haploides e concluíram que as eliminações podem ser iniciais ou tardias durante a fertilização, resultando em porcentagens de introgressão ou eliminação total do genoma do indutor.

Apresentado alguns dos mecanismos envolvidos na indução de haploides e as linhagens indutoras utilizadas hoje na tecnologia DH, é importante discutir dois entraves da obtenção e seleção das sementes haploides em países de clima tropical. O primeiro deles é a tropicalização das linhagens indutoras, visto que dificilmente elas produzem pólen, possuem resistência a doenças e se desenvolvem para serem incorporadas num programa de melhoramento. Como dito, no CIMMYT foram desenvolvidos indutores a partir de cruzamentos entre as linhagens indutoras e linhagens tropicais adaptadas (PRIGGE et al., 2012a) que possibilitaram as pesquisas de DH na instituição desde então. No Brasil, as empresas privadas são detentoras dos indutores tropicalizados e não difundem os resultados de suas pesquisas, sendo que nas universidades públicas o uso de indutores tropicais é incipiente. O segundo entrave está relacionado à expressividade de antocianina no germoplasma tropical. O gene R*1-navajo* possui um alelo dominante que promove a pigmentação com antocianina nas sementes, no entanto sua expressão vai variar devido a influencia do *background* genético das fontes de germoplasma, devido as mudanças ambientais e épocas de plantio (KEBEDE et al., 2011; PRIGGE et al., 2011) e ainda, devido a alguns genes inibidores presentes nas fontes de germoplasma tropicais, sendo que estes fatores dificultam a seleção das sementes haploides. Dentre os alelos dos genes inibidores pode-se citar os C*1-I*, C2-I*df* e *in*-1D (STINARD; SACHS, 2002), que atuam na rota da antocianina, impedindo a coloração arroxeada no embrião e endosperma das sementes. Se na fonte de germoplasma utilizada houver a presença de alelos inibidores dominantes C*1-I*, as sementes provenientes dos cruzamentos entre indutor de haploidia e doador serão sem coloração, impossibilitando a seleção das sementes haploides pelo R*1-nj*. Na presença de outros alelos inibidores, C2-I*df* e *in*-1D, a expressividade de antocianina pode ser segregante, o que possibilita que as sementes com coloração arroxeada somente na aleurona sejam selecionadas como haploides enquanto que aquelas que não possuírem coloração sejam descartadas (CHAIKAM et al., 2015).

Por causa deste entrave na expressividade de antocianina nas sementes, devido a presença de genes inibidores, o CIMMYT desenvolveu um indutor de haploidia ginogenético com raiz vermelha que possibilita que as sementes provenientes dos cruzamentos entre indutor de haploidia e germoplasma tropical sejam selecionadas quando a expressão da antocianina for

incompleta ou não ocorrer. A HIR deste indutor é de 8,6 a 10,2% e a seleção ocorre após a germinação das sementes, de forma rápida, pois as raízes dos haploides ficam brancas e dos diploides vermelhas. No entanto, apesar de apresentar uma solução na seleção dos haploides e possuir boa HIR, este indutor não apresentou desempenho agronômico desejável devido o experimento ter sido conduzido entre indutores temperados e acessos selvagens (detentores da coloração vermelha da raiz), e ser testado em condições tropicais, sendo necessárias ainda etapas de melhoramento para o indutor ser utilizado largamente (CHAIKAM et al., 2016).

2.3. Geração de indução e variabilidade genética

A escolha da fonte de germoplasma doadora e a geração em que ela se encontra são fatores que também devem ser discutidos na tecnologia DH devido a sua influência na HIR e na obtenção de linhagens com maior variabilidade genética.

A fonte de germoplasma influencia na indução de haploides, sendo importante num programa de melhoramento selecionar não só o material com base nas suas características agronômicas, mas também quanto a sua HIR, a fim de que o melhorista de milho não perca tempo e dinheiro em induções que não vão trazer benefícios (KEBEDE et al., 2011; PRIGGE et al., 2011). Além disso, considerando um germoplasma tropical, ele ainda deve ser escolhido quanto a sua influência na expressividade de antocianina devido os genes inibidores (CHAIKAM et al., 2015). Já a geração que deve ser utilizada na indução é uma questão pouco discutida no meio científico, sendo encontrados até o momento dois trabalhos em clima temperado, um com dados simulados (BERNARDO, 2009) e um com dados reais (SLEPER; BERNARDO, 2016). Na prática, os DH são produzidos a partir da geração F_1 (MELCHINGER et al., 2005; SMITH et al., 2008) por acelerar o processo e constituir uma amostra da viabilidade genética que se expressaria na geração F_2.

Utilizando a geração F_1 é possível manter blocos gênicos parentais nas linhagens DH, uma vez que a recombinação de genes ligados vai ocorrer somente em uma meiose (PIERRE et al., 2011). Dependendo do objetivo do programa de melhoramento pode ser vantajoso ter 95% dos locos ligados não recombinados (SMITH et al., 2008). Entretanto, alguns autores discutem a respeito da perda de ganho genético entre os ciclos de seleção, com a reduzida porcentagem de recombinação causada pelo uso constante da geração F_1 (RIGGS; SNAPE, 1977; JANNINK; ABADIE, 1999). Ao contrário, ao utilizar a geração F_2 aumenta-se um ciclo para obter linhagens devido à autofecundação da geração F_1. Porém o atraso de mais um ciclo gera 50% a mais de recombinantes nas linhagens DH e possibilita uma seleção das melhores plantas na indução de

haploides, o que não é possível na geração F_1, visto que as plantas são geneticamente idênticas (Figura 2) (SLEPER; BERNARDO, 2016).

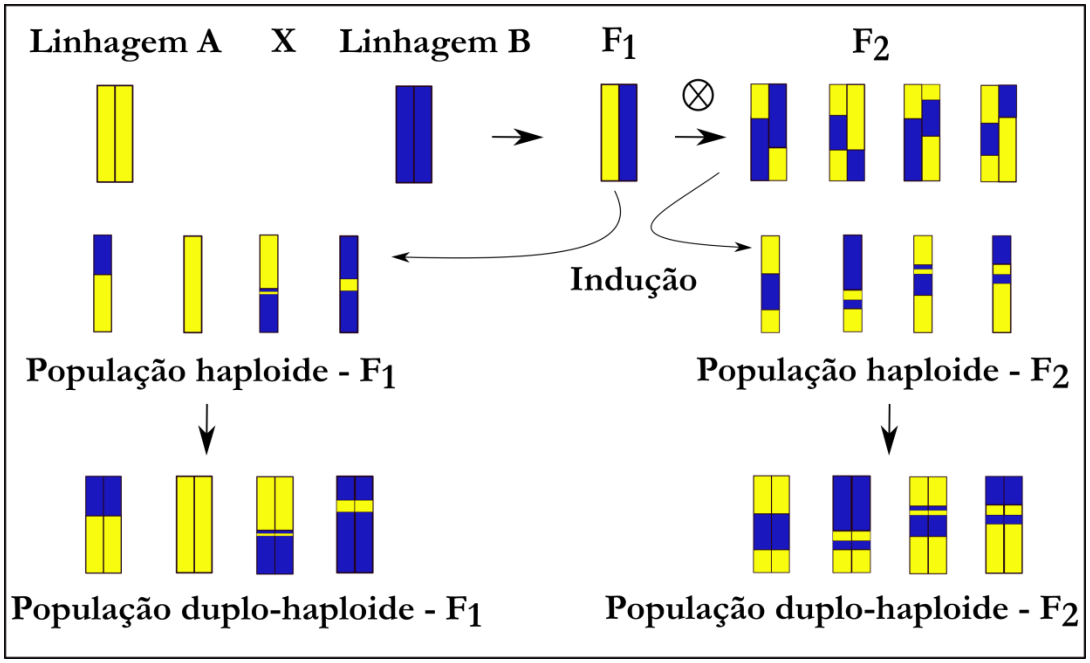

Figura 2. Esquema representando as recombinações que ocorrem em um alelo, em induções de haploides a partir de gerações F_1 e F_2 em milho.

Em estudo de simulação foi observada uma maior resposta de seleção em linhagens DH obtidas de geração F_2 que F_1, quando o número de QTL utilizado foi maior que 200. Em ciclos contínuos de seleção o ganho foi de 103% no ciclo 5 para 106% no ciclo 15. A indução de haploides também pode ser realizada a partir de gerações F_3 e F_4, porém com adicionais ciclos de autofecundação o que ocorre é uma diminuição na porcentagem de recombinação, e utilizar gerações a partir da F_2 aumenta o tempo de obtenção de linhagens e posteriormente de híbridos para o mercado, inviabilizando a lógica da metodologia DH (BERNARDO, 2009). De acordo com Sleper e Bernardo (2016), a escolha da geração F_1 ou F_2 na indução de haploides vai depender dos objetivos do melhorista, visto que cada uma apresenta suas vantagens e desvantagens próprias. No entanto, é importante discutir a respeito de qual delas apresenta maior custo benefício na obtenção de linhagens DH em clima tropical.

Alguns autores tem discutido o uso da indução de haploides e obtenção de DH como forma de resgatar diversidade genética em populações selvagens de milho *flint*. Ao contrário do milho *dent*, que possui um pool gênico abrangente originado dos EUA e sul da Europa, o qual possibilita o desenvolvimento de novas linhagens sem grandes preocupações, o milho *flint* foi extraído apenas das linhagens F2, F7, EP1 e DK105, apresentando baixa diversidade genética.

Como o sucesso na taxa de autofecundações em milho selvagem é extremamente baixo, devido os alelos deletérios e a perda de vigor, tem-se discutido o uso da tecnologia DH na obtenção de novas populações de milho *flint* (STRIGENS et al., 2013). BÖHM et al. (2017) compararam várias características de linhagens elite *dent*, linhagens selvagens que originaram o grupo *dent* e linhagens DH extraídas de milho *dent* selvagem. Os autores observaram maior resposta de seleção para a maioria das características estudadas entre as linhagens DH obtidas que os outros genótipos, indicando que a tecnologia DH é interessante no resgate de diversidade genética.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material genético

Para a condução do experimento foram selecionados cinco híbridos simples de milho comercial, a fim de representar o germoplasma comercial brasileiro presente nas empresas privadas. Para isso, foi selecionada uma fonte de germoplasma de cada empresa que possuem mesma característica de ciclo, porém diferentes origens e textura de grãos (Tabela 2). A partir destes cinco híbridos simples foram formadas populações com uma geração de endogamia. A obtenção da geração F_2 ocorreu em canteiros localizados no Laboratório de Melhoramento de Plantas Alógamas da Universidade de São Paulo/ESALQ, na cidade de Piracicaba – SP (22°42' S, 47°38' W, 539m). As parcelas foram constituídas de linhas de 1,0 m de comprimento, utilizando-se o espaçamento de 0,85 m entre linhas e 0,20 m entre plantas. A semeadura ocorreu no verão, na safra de 2013/2014. O manejo e os tratos culturais foram realizados de acordo com os procedimentos recomendados para a cultura do milho (EMBRAPA, 2016). As sementes foram colhidas, debulhadas e guardadas em câmara fria para posteriormente serem utilizadas na etapa de indução de haploides.

Tabela 2. Fontes de germoplasma de milho utilizadas na indução de haploides

Fontes de Germoplasma	Textura do Grão	Ciclo	Transgênico	Empresa
2B587PW	Semidentado	Precoce	Sim	Dow
30F53H	Semiduro	Precoce	Sim	Pionner
DKB390	Semiduro	Precoce	Não	Dekalb
STATUS VIPTERA	Duro	Precoce	Sim	Syngenta
BM820	Duro	Precoce	Não	Biomatrix

O estudo utilizou o indutor de haploidia ginogenético LI-ESALQ, o qual é proveniente do cruzamento de duas linhagens indutoras W23 X Stock6, com um híbrido adaptado às condições edafoclimáticas tropicais. Com isto, o indutor LI-ESALQ é mais adaptado ao clima e solos brasileiros. Este indutor também possui herança dominante do marcador *R1-nj*, responsável pela expressão de antocianina no endosperma e embrião das sementes (NANDA; CHASE, 1966). Neste estudo o indutor LI-ESALQ foi utilizado como doador de pólen.

3.2. Indução de haploides em clima tropical

O indutor tropical de haploidia LI-ESALQ foi utilizado na polinização das 10 fontes de germoplasma citadas anteriormente (os cinco híbridos de milho tropical e suas gerações de origem F_1 e F_2). O campo de indução de sementes haploides foi delineado em local isolado, na área experimental do Departamento de Genética da Universidade de São Paulo/ESALQ, na cidade de Piracicaba – SP (22°42' S, 47°38' W, 539m) na safra de 2014/2015. As sementes do indutor e das fontes de germoplasma foram semeadas em linhas de 7,0 metros, com número variável de plantas dentro de cada parcela, sendo o espaçamento entre plantas de 0,20 m e entre linhas de 0,85 m. Em cada linha foram distribuídas duas sementes por cova, sendo o desbaste realizado 20 dias após a emergência das plantas. Foi utilizado um delineamento de blocos completos casualizados com três repetições no tempo, sendo que as fontes de germoplasma foram intercaladas por linhas do indutor, a fim de que houvesse condições ideais para a polinização. Desse modo, foram utilizadas três linhas do indutor e cinco das fontes de germoplasma, sendo dispostas da seguinte forma: uma parcela composta pelo indutor, três parcelas das fontes de germoplasma, mais uma parcela composta pelo indutor, mais duas parcelas das fontes de germoplasma e a última parcela sendo composta por sementes do indutor. Deste modo, os plantios do indutor LI-ESALQ foram realizados em três datas, espaçadas por cinco dias, por ele possuir florescimento precoce. No florescimento, as linhas de fêmeas foram despendoadas manualmente, a fim de garantir a polinização natural por meio das plantas do indutor tropical de haploidia LI-ESALQ. Todos os tratos culturais foram realizados de acordo com as recomendações para a cultura do milho (EMBRAPA, 2016).

3.3. Seleção de sementes por meio da expressão de antocianina

Foi analisada a expressividade do marcador *R1-nj* nas diferentes fontes de germolplasma e gerações F_1 e F_2 do mês de fevereiro à julho no ano de 2015. Como mencionado anteriormente, nem todo germoplasma do milho tropical possui em sua constituição os genes que atuam na rota da expressão da antocianina. Com isto, as sementes foram separadas de acordo com Nanda e Chase (1966), e agrupadas em três categorias:

1) Haploides putativos: sementes com embrião branco e endosperma roxo.
2) Diploides: sementes com embrião e endosperma roxo.
3) Inibidoras: sementes com ausência total de coloração roxa.

As quantidades de sementes totais selecionadas como haploides putativos, diploides e inibidoras a partir do marcador morfológico foram utilizadas em análises estatísticas subsequentes.

3.4. Germinação e duplicação cromossômica artificial

Após a classificação das sementes, foi realizada a duplicação cromossômica artificial utilizando o antimitótico colchicina. Esta etapa foi conduzida no mês de novembro de 2015 no Laboratório de Melhoramento de Plantas Alógamas da ESALQ/USP. Para isso, as sementes dos haploides putativos provenientes das três épocas de semeadura foram misturadas, a fim de otimizar tempo e recursos.

As sementes dos haploides putativos foram desinfestadas com hipoclorito 2% e distribuídos em papel germitest umedecido com água destilada para que ocorresse a germinação. Em seguida, as sementes foram enroladas no papel germitest e acondicionados em BOD, em temperatura controlada de 25º C por 72 horas. Após a germinação, a fim de eliminar grande parte dos falsos positivos, foi realizada mais uma etapa de seleção. Nesta, as plântulas com alto vigor foram descartadas por apresentarem fenótipo de sementes diploides. Além disso, algumas sementes não germinaram, sendo descartadas.

Realizada a seleção das plântulas de milho por meio do vigor, as plântulas restantes foram submetidas ao tratamento com solução de 0,06% de colchicina e 0,75% de dimetilsulfóxido (DMSO), por 12 horas (DEIMILING et al., (1997), com modificação neste trabalho na porcentagem de DMSO utilizado), e mantidas no escuro à temperatura ambiente, cuja média do dia foi de 23,7º C. Finalizada a duplicação artificial, as plântulas foram lavadas em água corrente por 40 minutos e então transferidas para copos plásticos contendo substrato para plantas, da marca Basaplant, em casa de vegetação no Departamento de Genética da ESALQ/USP (22°42' S, 47°38' W, 539m). As plântulas duplicadas permaneceram por sete dias em casa de vegetação, sendo irrigadas duas vezes ao dia. Devido ao calor e suscetibilidade ao antimitótico, algumas plântulas não suportaram a duplicação artificial e morreram.

Para a análise da eficiência relativa do método foram contabilizadas as quantidades de sementes germinadas, as quantidades que foram duplicadas e também as plântulas sobreviventes em casa de vegetação.

3.5. Condução do experimento a campo após duplicação cromossômica

Após a etapa em casa de vegetação, as plantas duplicadas foram transplantadas para condições de campo, na área experimental do Departamento de Genética da ESALQ/USP.

Nesta etapa, as plantas de milho duplicadas são caracterizadas como D_0, sendo consideradas linhagens duplo-haploides, porém com pouca adaptação.

No campo, as fontes de germoplasma e geração constituíram de uma linha, sendo o espaçamento entre plantas de 0,20 m e entre linhas de 0,85 m. Nesta etapa não foi utilizado delineamento experimental. Os tratos culturais ocorreram como o recomendado para a cultura do milho (EMBRAPA, 2016), no entanto, não foram aplicados herbicidas, uma vez que as linhagens duplo-haploides são sensíveis a estes. Assim, o controle de plantas daninhas foi realizado de forma mecânica.

Um mês após o transplantio, que ocorreu em dezembro de 2015, foi realizada uma nova seleção e descarte de falsos positivos. Para isso, as plantas que apresentaram vigor, tais como altura de mais de um metro e meio, caule grosso e com expressão de antocianina, folhas verde escuro e pendão com muitas ramificações, foram eliminadas (Figura 3). Esta seleção permitiu que permanecessem no campo apenas linhagens D_0, e consequentemente, que fosse realizada a estimativa da taxa de falsos positivos em cada geração.

Figura 3. Área experimental das linhagens duplo-haploides (D_0). No centro da imagem é possível observar que toda a linha apresenta características de linhagens duplo-haploides. Ao lado da linha central de duplo-haploides há falsos positivos (seta preta), que foram descartados.

A taxa de falsos positivos (FDR) refere-se à probabilidade de uma amostra ser negativa verdadeira, ou seja, é a proporção de sementes diploides presentes no grupo de sementes selecionadas como haploides pelo marcador *R1-nj*. Para estimar esta taxa foi utilizada a seguinte equação, conforme Melchinguer et al. (2013):

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

em que, FP (falso positivo) é a quantidade de sementes diploides no grupo de sementes haploides selecionadas pelo marcador *R1-nj* e TP (verdadeiro positivo) é a quantidade de plantas haploides

no campo após o desbaste. Também foi estimada a verdadeira taxa de indução de haploides (Real HIR), dividindo as quantidades de plantas haploides no campo pelo número total de sementes induzidas em cada fonte de germoplasma.

A fase de florescimento das linhagens D_0 iniciou-se no final do mês de dezembro de 2015 com duração até o meio do mês de janeiro de 2016. Nesta etapa foi realizada autofecundação artificial com o objetivo de obter as linhagens D_1. Todas as plantas que apresentaram desenvolvimento de pólen, até mesmo uma única antera aberta, foram submetidas à autofecundação manual. As espigas que apresentaram atraso na liberação do estilo-estigma foram cortadas em 2 a 3 centímetros a partir do ápice, para possibilitar o sincronismo do crescimento do estilo-estigma com a liberação do pólen pela planta.

Nesta etapa de condução do experimento em campo, foram contabilizadas as quantidades totais de plantas D_0 e as quantidades de plantas D_0 que foram autofecundadas.

3.6. Colheita das espigas D_1

As espigas das linhagens D_1 foram colhidas no final do ciclo das linhagens D_0, no mês de fevereiro de 2016, na maturidade fisiológica da semente de milho (55 a 65 dias após o florescimento). Na etapa do florescimento das linhagens D_0 ocorreram muitas chuvas na cidade de Piracicaba – SP, média de 267 mm (POSTO METEOROLÓGICO DA ESALQ) e por causa disto foram obtidas menos sementes que o esperado. As espigas D_1 foram selecionadas em função do tamanho, da quantidade de sementes e da expressão do R*1-nj*.

3.7. Análise de dados fenotípicos

3.7.1. Expressividade da antocianina devido o marcador *R1-navajo*

Para as análises estatísticas foram considerados os dados fenotípicos obtidos a partir da seleção de sementes nas categorias de haploides putativos, diploides e inibidoras. As quantidades totais de sementes calculadas nestas categorias foram selecionadas por espiga e por meio do marcador morfológico *R1-nj* como descrito anteriormente. A partir destas quantidades foram analisadas as taxas de indução de haploides (HIR), de sementes inibidas (ISR) e de sementes diploides (DSR).

Os dados obtidos neste estudo são categóricos para as variáveis independentes e nossa variável de interesse consistiu nas contagens que obtivemos em cada categoria de semente (HIR, ISR, DSR). Devido a esta estrutura dos dados, foi utilizado um modelo linear generalizado misto com distribuição logit multinomial, uma vez que este modelo nos permitiu predizer as

probabilidades das diferentes taxas de sementes para as fontes de germoplasma e gerações utilizadas:

$$Y_{ktj} = \mu + S_k + G_t + (SG)_{kt} + B_j + \varepsilon_{ktj}$$

$Y \sim \text{Multinomial}(N, \pi)$

$B_j \sim \text{N}(0, \sigma_B^2)$

$\varepsilon_{ktj} \sim \text{N}(0, \sigma^2)$

Sendo Y_{ktj} o valor das taxas de HIR, ISR e DSR nas fontes de germoplasma *k*, gerações *t* e blocos *j*, μ o valor da média geral, S_k o efeito fixo da fonte de germoplasma *k*, G_t o efeito fixo da geração *t*, $(SG)_{kt}$ o efeito da interação de fontes de germoplasma x geração, B_j o efeito aleatório de blocos *j* e ε_{ktj} o efeito do erro experimental.

Em relação à distribuição binomial foi utilizada a função *logit*, cuja expressão é:

$$g(.) = \ln\left(\frac{\pi_{kti}}{1-\pi_{kti}}\right) \qquad \pi_i = \frac{e^{X_i'\beta}}{1+e^{X_i'\beta}}$$

em que π_{kti} é a probabilidade de haver sementes haploides, diploides ou inibidas nas gerações *t* e fontes de germoplasma *k* na i-ésima unidade de observação (total de sementes).

Estas análises foram realizadas com o procedimento PROC GLIMMIX do software SAS (SAS UNIVERSITY EDITION, 2016). Os gráficos relacionados a estes cálculos foram obtidos por meio do pacote ggplot2 (WICKHAM, 2009) do software R versão 3.3.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2016).

3.7.2. Eficiência relativa na obtenção de linhagens duplo-haploides

Para o estudo de eficiência relativa foram consideradas todas as etapas utilizadas na obtenção das linhagens DH (Tabela 3):

Tabela 3. Etapas (E_n) utilizadas na obtenção de linhagens DH em milho

Etapa	Descrição
1.	Total de sementes de putativos haploides
2.	Duplicação cromossômica
3.	Etapa em casa de vegetação
4.	Campo
5.	Campo após descarte de falsos positivos
6.	Autofecundação de linhagens D_0
7.	Total de espigas colhidas
8.	Total de espigas D_1

Desse modo, as quantidades de unidades presentes (sementes, plântulas e plantas, como também sementes D_1) em cada uma dessas etapas foram utilizadas na análise da eficiência relativa. As análises foram realizadas conforme proposto por Melchinguer et al. (2016), porém considerando todas as oito etapas. Assim, o efeito de cada etapa foi obtido por:

$\% = \frac{E_n}{E_1}$ porcentagem *per se* de cada etapa (E_n) em relação à quantidade inicial de putativos haploides (E_1).

$\%_R = \frac{E_n}{E_{n-1}}$ porcentagem relativa de cada etapa (E_n) em relação à etapa anterior (E_{n-1}).

As porcentagens *per se* (%) obtidas referem-se às etapas posteriores à germinação de putativos haploides, ou seja, indica quanto por cento de material biológico foi perdido desde a seleção de putativos haploides até a obtenção das sementes D_1 propriamente ditas. Por outro lado, as porcentagens relativas ($\%_R$) referem-se a quanto por cento de material biológico foi perdido de uma etapa seguinte em relação à última.

Os valores obtidos foram explorados de forma gráfica e também em tabelas para comparar as fontes de germoplasma e suas gerações quanto às eficiências estudadas. Cálculos de porcentagens e porcentagens relativas possibilitaram que fossem realizadas comparações, uma vez que nesta etapa do experimento não houve repetições. É importante mencionar que as quantidades iniciais de sementes variaram entre cada fonte de germoplasma e geração, sendo todas elas utilizadas neste estudo.

3.8. Análise dos dados genotípicos

As análises dos dados genotípicos foram realizadas com o objetivo de quantificar a variabilidade genética proveniente do uso da cada geração e fonte de germoplasma nas induções de haploides, como também verificar possíveis estruturações populacionais das linhagens DH obtidas.

3.8.1. Genotipagem e controle de qualidade

Para os estudos de variabilidade genética por meio de marcadores moleculares foram coletadas amostras foliares das linhagens D_0 obtidas de gerações F_1 e F_2, uma vez que o total de linhagens D_1 obtidas não foi suficiente para serem utilizadas nas análises genotípicas.

As quantidades totais de linhagens D_0 em cada fonte de germoplasma e geração variaram entre si e foram menores que aquelas presentes no campo na etapa de autofecundação. Isto ocorreu porque foi feita uma amostragem das plantas que pudessem representar toda a população, sendo coletadas folhas das plantas isentas de doenças e daquelas que foram autofecundadas (Tabela 4).

Tabela 4. Quantidades totais de linhagens D_0 de diferentes gerações e fontes de germoplasma que foram genotipadas por meio de marcadores SNP

Fontes de germoplasma	D_0F_1	D_0F_2
30F53H	16	20
2B587PW	20	15
BM820	19	14
STATUS VIPTERA	23	16
DKB390	17	13
Total	95	78

Cada uma das amostras foi genotipada com 7430 marcadores do tipo SNP. Esta etapa foi realizada pela DuPont-Pioneer®, por meio da plataforma Illumina *GoldenGate*®. Os dados genotípicos foram otimizados para serem utilizados nos estudos de variabilidade genética, sendo excluídos os marcadores que apresentaram mais de 10% de dados perdidos ou mais de 10% de heterozigosidade (SLEPER; BERNARDO, 2016), e aqueles que apresentaram menos de 5% de menor frequência alélica (MAF). Os indivíduos que apresentaram heterozigosidade maior ou igual a 10% também foram eliminados das análises de variabilidade genética por não corresponderem a linhagens DH e sim a falsos positivos.

Este controle de qualidade e a conversão dos marcadores SNP para algarismos numéricos foi realizada por meio da função raw.data() do pacote *snp*Ready (https://github.com/italo-granato/snpReady) do software R versão 3.3.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2016).

3.8.2. Análise da variação genômica

Os parâmetros populacionais das linhagens DH provenientes das gerações F_1 e F_2 foram estimados para cada SNP, por grupo (gerações) e subgrupo (fontes de germoplasma), por meio da função popgen() do pacote *snp*Ready (https://github.com/italo-granato/snpReady) do software R versão 3.3.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2016), sendo estas:

1) *Minor allele Frequency* (MAF= $\frac{H_e + R}{2x(D + H_e + R)}$) em que H_e é o total de locos heterozigotos para o SNP avaliado, D é o total de locos homozigotos para o alelo *i*, R é o total de locos homozigotos para o alelo *j'*, sendo este último alelo de menor frequência.

2) Heterozigosidade observada ($H_0 = \frac{H_e}{D + H_e + R}$), em que H_e é o total de locos heterozigotos para o SNP avaliado, *D* é o total de locos homozigotos para o alelo *i*, *R* é o total de locos homozigotos para o alelo *j'*.

3) Conteúdo de informação polimórfica (*Polimorphism Information Content),* sendo PIC = $1 - \sum_{i=1}^{k} p_i^2 - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^{k} 2 p_i^2 p_j^2$, em que p_i e p_j é a frequência do alelo *i* e *j* para o SNP avaliado.

4) Diversidade genética de Nei *et al* (1983), estimada pela equação ($D_{nn'} = H_{nn'} - \frac{H_n + H_{n'}}{2}$), em que $D_{nn'}$ mede a diversidade entre a n-ésima e a n'-ésima subpopulação, H_n é a estimativa de heterozigosidade no n-ésimo loco e $H_{n'}$ é a heterozigosidade no n'-ésimo loco.

5) Variância genética (V_G), sendo calculada neste trabalho pela soma das porções variâncias aditivas e dominantes devidas as frequências alélicas, sendo $V_G = 2pq + 4p_i^2q_i^2$.

6) Tamanho efetivo populacional ($N_e = \frac{1}{1 + f_i}$) em que f_i é o coeficiente de endogamia populacional. O f_i foi estimado pela proporção de locos em homozigose de um indivíduo i.

3.8.3. Estrutura populacional e parentesco

Para o estudo da estrutura populacional foi realizada uma análise de componentes principais (PCA), sendo selecionados os dois primeiros valores de PCA, por meio do pacote pcaMethods (STACKLIES, 2007) do software R. Já para avaliar o parentesco entre as linhagens DH, em cada fonte de germoplasma, foi construída a matrix de parentesco genômica aditiva pelo método Yang et. al. (2010), por meio do pacote *snp*Ready. A partir desta foi construído um gráfico *Heatmap,* pelo software R versão 3.3.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2016).

3.8.4. Desequilíbrio de ligação

Visto que um dos objetivos foi comparar a variabilidade genética entre as linhagens DH proveniente das gerações F_1 e F_2, foi estimado o desequilíbrio de ligação (LD) para o grupo de DH obtido. Por meio desta estimativa a variabilidade genética pode ser melhor compreendida, uma vez que o LD é inversamente proporcional à recombinação existente. O desequilíbrio de

ligação foi estimado para 153 linhagens DH e 1897 marcadores SNP que apresentavam os números cromossômicos e posições no genoma do milho. Para isso, foi usado o parâmetro r^2, sendo este obtido par a par entre todos os marcadores de cada cromossomo, por meio do pacote synbreed (WIMMER, 2012) do software R versão 3.3.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2016):

$$D = \rho AB - \rho A \rho B$$

e

$$r^2 = \frac{D^2}{\rho A \rho B \rho a \rho b}$$

em que ρAB corresponde à frequência observada do haplótipo AB, e ρA = 1- ρa e ρB =1- ρb a frequência observada dos alelos A e B.

Os resultados de LD e da distância (kb) entre os marcadores foram organizados em forma de gráfico, por meio do pacote ggplot2 (WICKHAM, 2009), conforme descrito por MARRONI et al. (2011).

4. RESULTADOS

4.1. Indução de haploides e expressividade do marcador *R1-navajo*

Pela análise multinomial das taxas de indução de haploides (HIR), de sementes diploides (DSR) e sementes inibidas (ISR), foram observadas diferenças significativas entre fontes de germoplasma ($p < 0,05$), gerações ($p < 0,05$) e fontes de germoplasma x geração ($p < 0,05$) (Tabela 5). Do total de 415979 sementes obtidas neste estudo, 1.45% foram selecionadas como haploides putativos, 19,2% tiveram a expressão do marcador inibida e 79,27% foram selecionadas como sementes diploides (Tabela 6).

Tabela 5. Análise multinomial para efeitos fixos: fontes de germoplasma, geração e fontes de germoplasma x geração

Efeito	DF	F value
Fontes de germoplasma	8	6567,5*
Geração	2	1118,2*
Fontes de germoplasma x Geração	8	66,1*

* Diferenças significativas com probabilidade de 95%

As médias de HIR das fontes de germoplasma variaram de 0,77 a 3,76%, sendo a taxa do genótipo 30F53H da empresa Pionner® a maior, em ambas as gerações (Tabela 6). Este genótipo também apresentou o maior número de sementes de putativos haploides selecionadas pelo marcador *R1-nj* em ambas as gerações, enquanto o genótipo 2B587PW da empresa Dow® apresentou as menores quantidades de sementes. As ISR variaram de 4,6 a 57,7%, sendo o genótipo 2B587PW o que apresentou a maior inibição nas gerações estudadas, seguido do genótipo BM820 da Biomatrix®. Em relação às DSR, o genótipo 2B587PW apresentou as menores taxas que variaram de 41,4 a 57,3%, enquanto que os genótipos STATUS VIPTERA da Syngenta® e DKB390 da Dekalb® apresentaram as maiores taxas de DSR.

Comparando as duas gerações de indução, observa-se que a F_2 apresentou maior HIR, (1,78%) que a F_1 (1,23%) e também maior DSR (82,32%) que a F_1 (75,22%), mesmo que a quantidade de sementes diploides e haploides na geração F_2 tenha sido menor. Em relação a ISR, se observou uma menor taxa de sementes inibidas na geração F_2 (15,78%) que na F_1 (23,46%) (Tabela 6).

Tabela 6. Número de sementes totais (T_S), diploides (T_D), haploides (T_H) e inibidas (T_I) de diferentes fontes de germoplasma e gerações (F_n) utilizadas em análises multinomiais; médias de taxas de indução de haploides (HIR), de sementes inibidas (ISR), de sementes diploides (DSR) e intervalo para HIR

Fontes de germoplasma	F_n	T_D	T_I	T_H	T_S	HIR, %		ISR, %	DSR,%
						Média	Intervalo	Média	Média
30F53H		53293	6371	1598	61262	2,6	0,17 – 8,01	10,4	87,0
2B587PW		20359	28408	383	49150	0,77	0,14 – 4,78	57,7	41,4
STATUS VIPTERA	F_1	56289	5603	614	62506	0,97	0,18 – 5,15	8,9	90,0
BM820		32504	17196	402	50102	0,8	0,13 – 4,46	34,4	64,7
DKB390		51546	3292	582	55420	1,05	0,17 – 5,88	5,9	93,0
Total		213991	60870	3579	278440	-	-	-	-
Média		-	-	-	-	1,23	-	23,4	75,2
30F53H		26276	1651	1054	28981	3,76	0,20 – 15,49	5,4	90,7
2B587PW		12958	9774	186	22918	0,85	0,17 – 4,79	41,7	57,3
STATUS VIPTERA	F_2	35659	1762	569	37990	1,51	0,21 – 7,59	4,6	93,8
BM820		15085	4370	225	19680	1,25	0,19 – 8,05	21,1	77,6
DKB390		25811	1724	435	27970	1,53	0,21 – 3,96	6,1	92,2
Total		115789	19281	2469	137539	-	-	-	-
Média		-	-	-	-	1,78	-	15,7	82,3
Total Geral		329780	80151	6048	415979	-	-	-	-
Média Geral		-	-	-	-	1,50	-	19,6	78,7

Na geração F_2 a expressividade do marcador *R1-nj* é mais evidenciada que na F_1 indicando a segregação dos genes *C1-I*, *C2-Idf* e *In1-D,* responsáveis pela inibição da antocianina na aleurona da semente (COE, 1994) (Figura 4). Dentre as fontes de germoplasma utilizadas na indução de haploides, é possível observar que as espigas do genótipo 2B587PW foram as que menos apresentaram coloração arroxeada, reiterando o observado pela taxa de ISR.

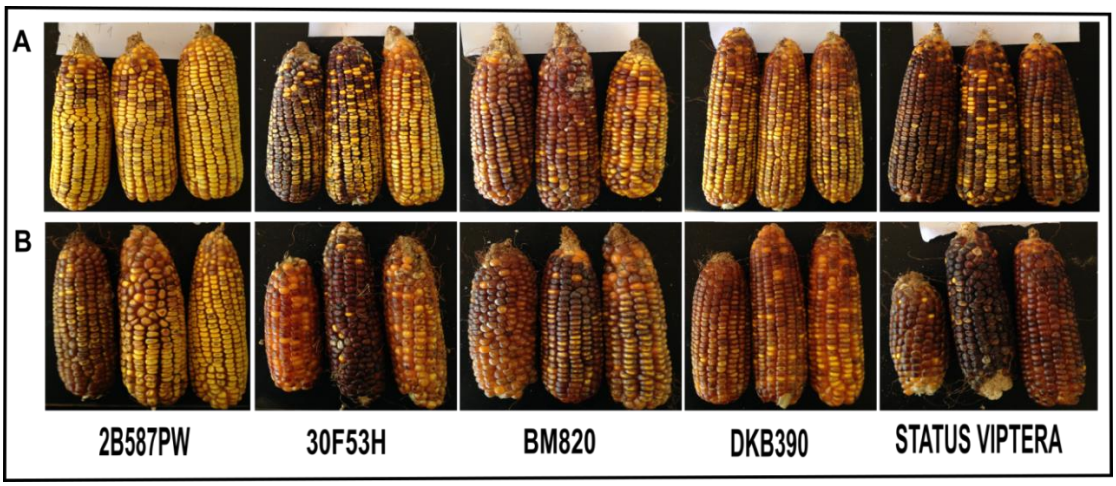

Figura 4. Variações na intensidade da coloração da expressividade do marcador *R1-nj* nas sementes. A. Geração F_1; B. Geração F_2.

As análises da taxa real de indução de haploides (real HIR) e porcentagem de falsos positivos (FDR) apresentaram valores médios de 0,21% e de 82,11%, respectivamente (Tabela 7). O genótipo 30F53H apresentou a maior FDR, tendo média de 90,75%, ou seja, do total de 1598 sementes selecionadas como putativos haploides, 148 sementes correspondiam a haploides verdadeiros (Tabela 6). Isto indica que uma maior quantidade de sementes selecionadas pelo marcador *R1-nj* não corresponde em maior sucesso na seleção de haploides verdadeiros. Na taxa de Real HIR o genótipo 2B587PW apresentou os menores valores em ambas as gerações. Assim, a partir da taxa média de FDR, do total de 6048 sementes selecionadas como haploides putativos, 4966 sementes foram classificadas erroneamente por meio do marcador *R1-nj* (Tabela 6).

Tabela 7. Taxa de falsos positivos (FDR) e taxa de indução real de haploides (Real HIR) nas cinco fontes de germoplasma e gerações F_1 e F_2

Fontes de germoplasma	Geração	FDR, %	Real HIR %
30F53H	F_1	91,2	0,22
	F_2	90,3	0,34
2B587PW	F_1	77,3	0,17
	F_2	87,3	0,11
STATUS VIPTERA	F_1	82,1	0,17
	F_2	83,8	0,22
BM820	F_1	64,9	0,27
	F_2	76,4	0,24
DKB390	F_1	80,7	0,20
	F_2	86,6	0,20
Médias	-	82,1	0,21

4.2. Eficiência relativa nas etapas de obtenção de linhagens DH

Inicialmente serão apresentados resultados referentes às análises gerais das etapas da metodologia, considerando todas as fontes de germoplasma e geração. O total de haploides putativos foi definido com uma porcentagem de 100% para que houvesse comparações. Assim, após a germinação dos haploides putativos, ocorreram descartes de plântulas vigorosas, sendo utilizada na etapa de duplicação cromossômica 46,4% do total de plântulas (Tabela 8). O descarte é necessário para que o pesquisador não perca tempo e recursos na duplicação artificial de falsos positivos e na condução deles no campo. Após a duplicação cromossômica, a porcentagem *per se*

de plantas que foram levadas à casa de vegetação foi de 36,6%. Na etapa de campo foi observada uma eficiência de 31,1% e, após o descarte dos falsos positivos, esta eficiência caiu para 14,8%. O inicio do florescimento das linhagens D_0 aconteceu 45 dias após a germinação. Nesta etapa, todas as plantas que possuíam pendão fértil e estilo-estigma compatível foram autofecundadas, sendo a eficiência de 5,9%. No fim do ciclo do milho, todas as espigas autofecundadas foram colhidas, representando uma eficiência de 1,6%, e após isto, selecionadas como espigas D_1 aquelas que apresentavam fenótipo de linhagens DH, sendo a eficiência de 0,4%. Dessa forma, a partir de 6048 sementes de haploides putativos foram obtidas 27 linhagens D_1 de diferentes fontes de germoplasma e geração, quando se utilizou o indutor LI-ESALQ.

No estudo da porcentagem relativa observou-se uma perda maior de material biológico após o desbaste dos falsos positivos, permanecendo no campo menos da metade (47,8%) do total de 1882 plantas. Esta perda de plantas ocorreu devido à baixa taxa de indução de haploides (HIR) do indutor LI-ESALQ e da expressividade variável do *R1-nj* que fez com que falsos positivos fossem selecionados como haploides.

Tabela 8. Etapas da metodologia usadas na obtenção de linhagens duplo-haploides em milho tropical. Neste caso, % é a porcentagem *per se* e $\%_R$ é a porcentagem relativa

Etapas da metodologia	**Total**	**%**	**$\%_R$**
1. Total de haploides putativos	6048	100	-
2. Duplicação cromossômica	2868	46,4	46,4
3. Casa de vegetação	2218	36,6	78,9
4. Campo	1882	31,1	84,8
5. Campo após desbaste de falsos positivos	901	14,8	47,8
6. Autofecundação de plantas	358	5,9	39,7
7. Espigas colhidas	99	1,6	27,6
8. Espigas D_1 colhidas	27	0,4	27,2

Nas análises relacionadas a cada geração, foi observada uma maior quantidade de material biológico em todas as etapas da metodologia na geração F_1 do que na geração F_2. Este resultado já era esperado, visto que um híbrido F_1 produz mais que um híbrido F_2, e, consequentemente, mais sementes haploides foram selecionadas. No entanto, a menor quantidade de material biológico na geração F_2 não influenciou na eficiência da metodologia DH (Tabela 9).

Dentre as etapas da metodologia utilizadas, observa-se que a geração F_1 apresentou porcentagens maiores que a geração F_2 até a etapa de desbaste de falsos positivos. As porcentagens de plântulas com vigor descartadas após a germinação foram semelhantes entre as gerações, sendo de 47 e 48%, respectivamente. No entanto, nas etapas de autofecundação de plantas e colheita de espigas o que se observa é um valor maior na porcentagem relativa da

geração F_2. Assim, mesmo com menos material biológico, a geração F_2 possuiu mais plantas no campo com pendão fértil que a geração F_1, característica que possibilitou quase a mesma quantidade de espigas no final do ciclo entre as gerações. Apesar das gerações F_1 e F_2 terem apresentado variações nas etapas da metodologia, quanto às porcentagens e quantidades de material biológico, a porcentagem de linhagens D_1 obtidas foi à mesma, de 0,4% (Tabela 9), indicando que maior quantidade de sementes haploides no início da metodologia não implica necessariamente em obtenção de mais linhagens DH, e que a escolha da geração não influencia em uma maior porcentagem de linhagens DH obtidas.

Tabela 9. Etapas da metodologia usadas na obtenção de linhagens duplo-haploides em milho tropical considerando as gerações F_1 e F_2. % é a porcentagem *per se* e $\%_R$ é a porcentagem relativa

Etapas da metodologia	F_1			F_2		
	Total	**%**	**$\%_R$**	**Total**	**%**	**$\%_R$**
0. Total de sementes	278440			137539		
1. Total de haploides putativos	3579	100	1,2	2469	100	1,7
2. Duplicação cromossômica	1681	47,0	46,9	1187	48,0	48,0
3. Casa de vegetação	1362	38,0	81,0	856	34,6	72,1
4. Campo	1170	32,6	85,9	712	28,8	83,1
5. Campo após o desbaste de falsos positivos	585	16,3	49,9	316	12,7	44,3
6. Autofecundação de plantas	222	6,2	37,9	136	5,5	43,0
7. Espigas colhidas	50	1,3	22,5	49	1,9	36,0
8. Espigas D_1 colhidas	16	0,4	31,6	11	0,4	22,4

Os dados das eficiências agrupados por fontes de germoplasma podem ser consultados no Apêndice. As porcentagens *per se* (%) variaram entre as fontes de germoplasma utilizadas, indicando que o sucesso das etapas da metodologia também depende delas (Figura 5). Na duplicação cromossômica, por exemplo, o genótipo 2B587PW apresentou a maior porcentagem de plântulas duplicadas, sendo de 70,4% na geração F_1 e 60,2% na geração F_2 (Tabela A1). Enquanto o genótipo 30F53H da geração F_1 apresentou a menor porcentagem *per se* da eficiência relativa, sendo de 33,9%, devido ao maior descarte de plântulas. Na etapa de casa de vegetação, o genótipo 2B587PW apresentou os maiores valores, sendo de 56,1% na F_1 e de 53,2% na F_2, enquanto os genótipos 30F53H e STATUS VIPTERA apresentaram os menores valores, de 27,5% na F_1 e 30,5% na F_2, respectivamente. No transplantio a campo, o 2B587PW apresentou mais uma vez a maior porcentagem *per se*, sendo de 51,1% na F_1 e de 39,7% na F_2 e as menores porcentagens foram observadas na geração F_1 do genótipo 30F53H, de 23,5% e na F_2 do DKB390, de 25,2%. Após o desbaste, as maiores porcentagens *per* se foram observadas nas gerações do BM820, sendo de 14,6% na F_1 e 9,7% na F_2 e as menores porcentagens observadas

no DKB390, sendo de 3,26% na F_1 e 3,6 na F_2. No total de espigas colhidas, 31, e de espigas D1 obtidas, 7, o genótipo 30F53H apresentou os maiores valores totais, mas não as maiores porcentagens *per se*.

Na análise das porcentagens relativas ($\%_R$) entre as fontes de germoplasma é importante discutir a respeito do genótipo 30F53H que apresentou os maiores valores no total de haploides putativos sobre o total de sementes, sendo de 2,6% na F_1 e 3,6% na F_2 (valores que correspondem à taxa de indução de haploides-HIR). Como mencionado, este genótipo apresentou as maiores taxas de falsos positivos (FDR) (Tabela 7), e teve um maior descarte de plântulas e plantas que nos outros genótipos. Por causa disso, a sua porcentagem relativa após o desbaste no campo foi de 36,1%, na geração F_1, e de 33,2% na geração F_2. Porém, mesmo apresentando taxas elevadas de FDR, este genótipo teve a maior quantidade de linhagens DH obtidas (7), sendo que nos outros genótipos os valores variaram de zero a três linhagens (Tabela A2).

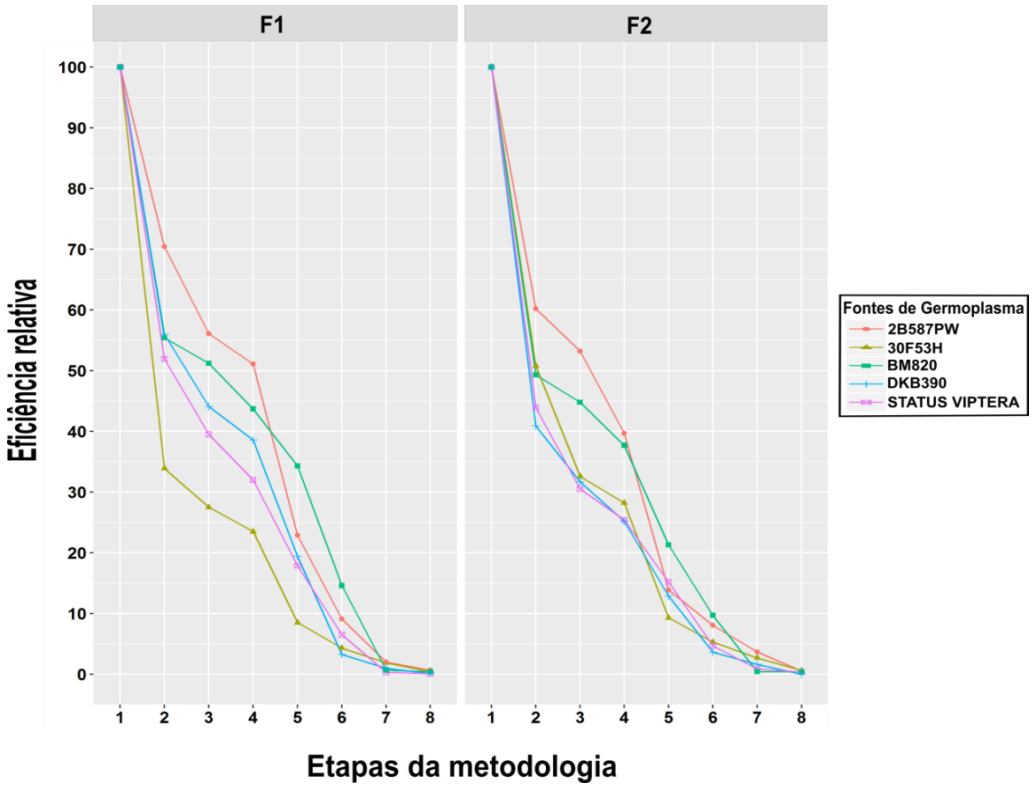

Figura 5. Eficiência relativa das etapas da metodologia utilizadas na obtenção de linhagens DH considerando cinco fontes de germoplasma e gerações F_1 e F_2. 1. Total de sementes de putativos haploides. 2. Duplicação cromossômica. 3. Etapa em casa de vegetação. 4. Campo. 5. Campo após descarte de falsos positivos. 6. Autofecundação de linhagens D_0. 7. Total de espigas colhidas. 8. Total de espigas D_1.

4.3. Controle de qualidade nos dados de marcadores

Como foram obtidas apenas 27 linhagens D_1 foi optado por utilizar as linhagens D_0. Isto para que fosse possível realizar de modo confiável os estudos de variabilidade genética e as comparações entre as fontes de germoplasma utilizadas e as gerações F_1 e F_2.

Em relação aos marcadores SNP, do total de 7430 utilizados na genotipagem das linhagens DH, 1367 foram eliminados no controle de qualidade e 4147 foram eliminados por possuírem menos de 90% de locos em homozigose. Dentre os 173 indivíduos utilizados, 20 foram eliminados por terem apresentado H_0 maior ou igual a 0,10. Após as etapas de controle de qualidade e remoção de heterozigotos, 153 indivíduos (83 da geração F_1 e 70 da geração F_2) e 1916 marcadores foram utilizados nas análises de diversidade genética, estrutura populacional e 1897 marcadores no desequilíbrio de ligação.

4.4. Variabilidade genética

As análises de diversidade genética foram feitas em níveis de gerações, F_1 e F_2, e de indivíduos. Em nível de gerações, foi observado valor médio de variância genética (V_G) maior nas linhagens DH provenientes da geração F_1, sendo de 700,55, que na geração F_2, de 648,88 (Tabela 10). De forma semelhante, os valores médios de tamanho efetivo populacional (N_e), de diversidade genética (D_G), conteúdo de informação polimórfica (PIC) e *minor allele frequency* (MAF), foram maiores entre as linhagens DH provenientes da geração F_1 que da F_2. Em relação à heterozigosidade a geração F_2 apresentou valor de 0,03 nos locos estudados, sendo maior que da geração F_1, a qual foi de 0,01.

Tabela 10. Estimativa dos parâmetros populacionais de linhagens DH provenientes de gerações F_1 e F_2. Tamanho efetivo da população (N_e), variância genética (V_G), diversidade genética de Nei (D_G), conteúdo de informação polimórfica (PIC), *minor allele frequency* (MAF) e heterozigosidade observada (Ho)

Geração	Número de indivíduos	N_e	V_G	DG	PIC	MAF	Ho
F1	83	43,1	700,55	0,28	0,23	0,18	0,01
F2	70	39,61	648,88	0,26	0,22	0,17	0,03

Dentre as cinco fontes de germoplasma utilizadas no estudo, a V_G variou de 349,97 a 525,16, a D_G variou de 0,13 a 0,19, a Ho de 0,00 a 0,07, o PIC de 0,10 a 0,14 e a MAF de 0,10 a 0,16 (Tabela 11). O maior valor de N_e e H_0 foi observado entre as linhagens provenientes da geração F_2 do genótipo 30F53H sendo de 17,56 e 0,07, respectivamente. As linhagens provenientes das fontes de germoplasma DKB390, 2B587PW e 30F53H também apresentaram locos em heterozigose. Já as linhagens DH provenientes do STATUS VIPTERA apresentaram os

maiores valores de V_G, D_G e MAF, em ambas as gerações estudadas. Em relação às gerações F_1 e F_2, o genótipo DKB390 apresentou maior V_G, D_G, PIC e MAF na geração F_2 que na F_1.

Tabela 11. Estimativa dos parâmetros populacionais de linhagens DH obtidas de cinco fontes de germoplasma e duas gerações (Fn): Tamanho efetivo da população (N_e), variância genética (V_G), diversidade genética de Nei (D_G), conteúdo de informação polimórfica (PIC), *minor allele frequency* (MAF) e heterozigosidade observada (Ho)

Fontes de germoplasma	Fn	Número de indivíduos	Ne	V_G	D_G	PIC	MAF	Ho
DKB390	F1	10	5,01	401,06	0,14	0,11	0,12	0,00
DKB390	F2	8	4,32	438,36	0,16	0,12	0,13	0,01
2B587PW	F1	19	10,88	386,42	0,14	0,12	0,11	0,00
2B587PW	F2	15	11,68	349,97	0,13	0,10	0,10	0,05
BM820	F1	19	9,51	468,35	0,17	0,14	0,13	0,00
BM820	F2	13	6,51	416,66	0,15	0,12	0,12	0,00
STATUS VIPTERA	F1	20	10,02	525,16	0,19	0,14	0,16	0,00
STATUS VIPTERA	F2	15	7,51	503,42	0,18	0,14	0,15	0,00
30F53H	F1	15	9,50	424,94	0,16	0,12	0,12	0,03
30F53H	F2	19	17,56	389,68	0,15	0,12	0,10	0,07

4.5. Estrutura populacional e parentesco genômico

Nas análises de estrutura populacional pelo método PCA (Figura 6) observou-se o agrupamento de três grupos, sendo que um deles foi formado pelas fontes de germoplasma 30F53H, DKB390, 2B587PW. As demais populações ficaram separadas. As linhagens provenientes do genótipo STATUS VIPTERA separaram-se dos outros genótipos no eixo do primeiro componente principal e as do BM820 pelo segundo componente. Dentro de cada fonte não houve a separação de subgrupos devido ao fator gerações, ou seja, F_1 e F_2.

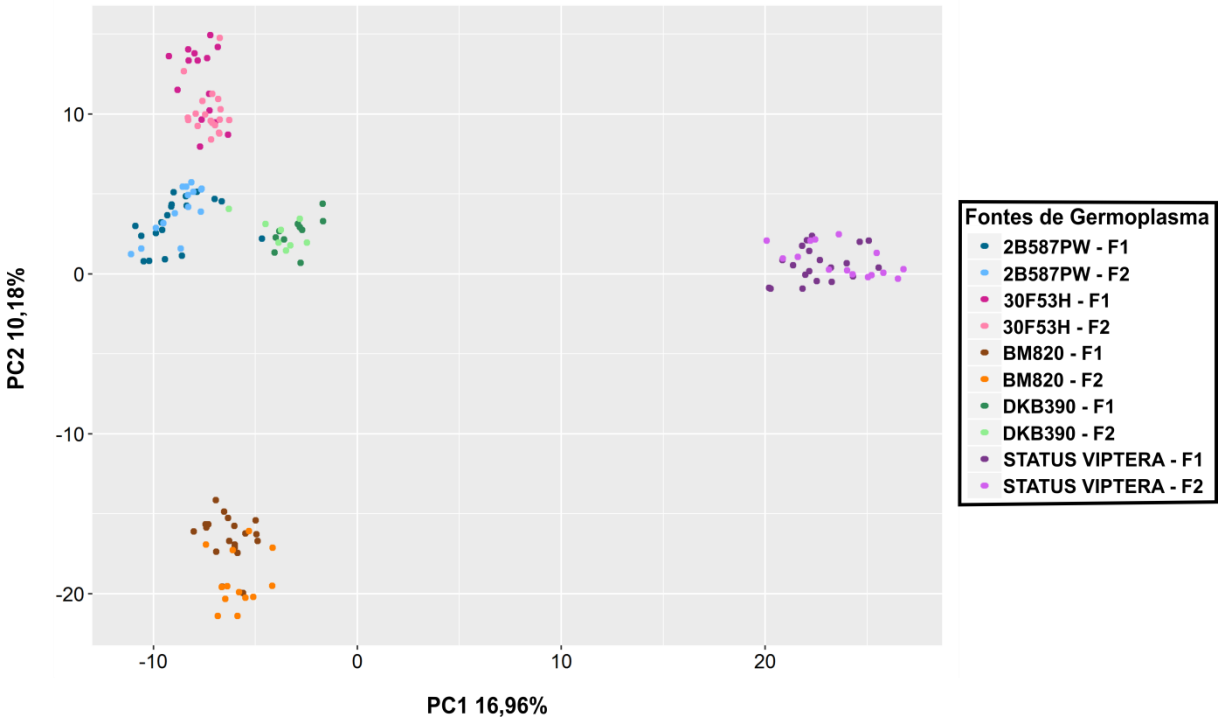

Figura 6. Análise de componentes principais em linhagens DH obtidas de cinco fontes de germoplasma e das gerações F_1 e F_2.

A partir do coeficiente de parentesco genômico estimado entre as linhagens DH obtidas, observou-se o agrupamento dos cinco genótipos e suas gerações F_1 e F_2 (Figura 7). As linhagens DH provenientes dos genótipos STATUS VIPTERA e DKB390 não apresentaram valores de parentesco muito diferentes entre si, visto que os blocos das gerações F_1 e F_2 formaram um só. Na análise de PCA o genótipo DKB390 apresentou valores maiores de D_G entre as linhagens obtidas da geração F_2 que F_1. No entanto, este valor de D_G não foi suficiente para separar as linhagens DH das duas gerações em diferentes grupos, visto que os indivíduos deste genótipo são mais aparentados entre si que as linhagens dos outros grupos, devido o coeficiente de parentesco. Já nas linhagens DH provenientes dos genótipos 2B587PW, BM820 e 30F53H percebe-se uma diferença na coloração dos grupos formados pelas gerações F_1 e F_2, indicando parentesco entre as linhagens DH.

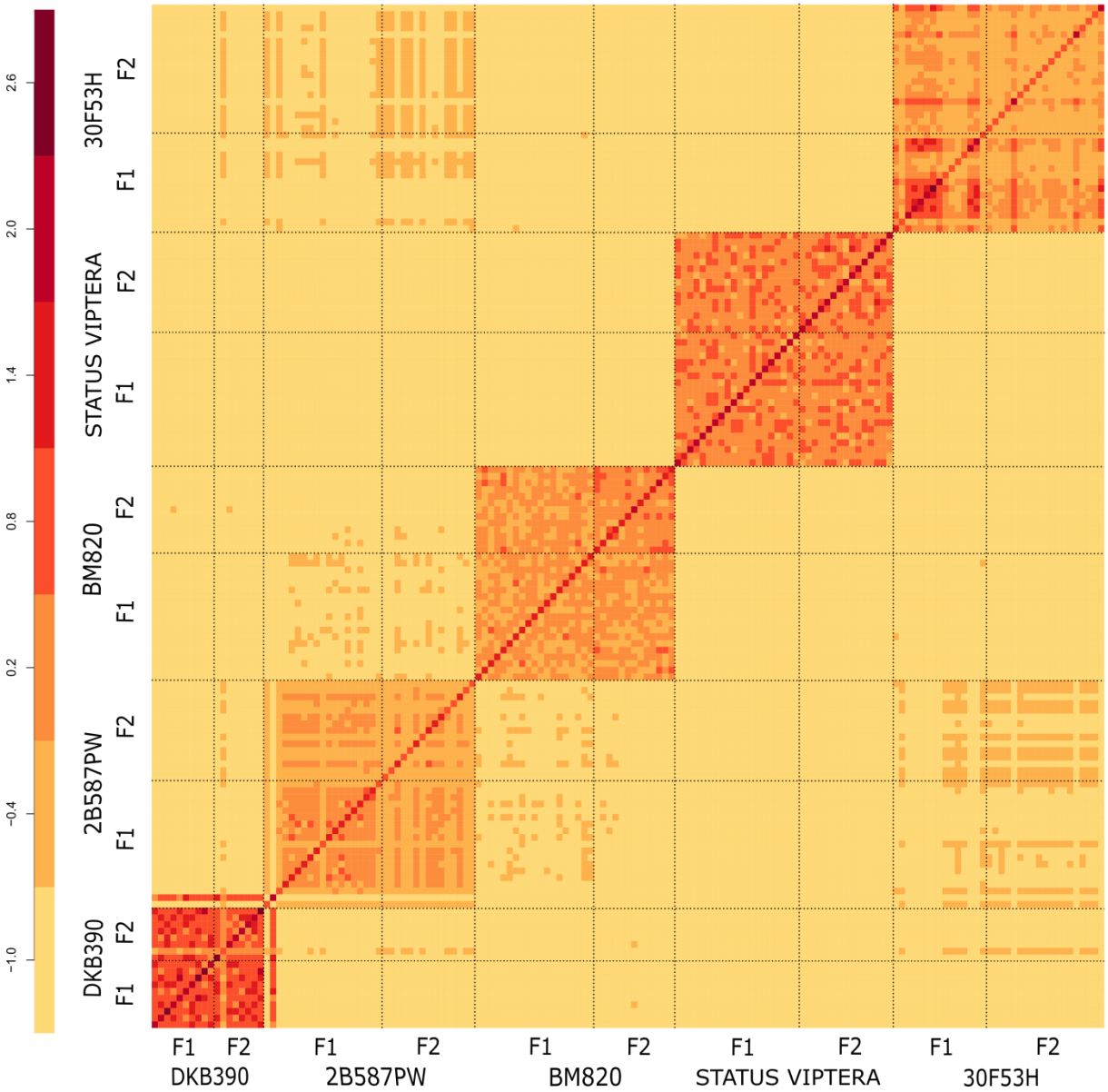

Figura 7. *Heatmap* do coeficiente de parentesco de 153 linhagens DH obtidas de cinco genótipos e gerações F_1 e F_2 baseado na metodologia de Yang et al. (2010).

4.6. Desequilíbrio de ligação (LD)

As médias gerais de r^2 nas linhagens DH provenientes das gerações F_1 e F_2 foram de 0,069 e 0,067 respectivamente, ou seja, praticamente iguais e muito baixas (Tabela 12). Com isto, foi observado um declínio acentuado do LD em função da distância (Figura 8). Dentre as linhagens DH obtidas da geração F_1, o cromossomo quatro apresentou o maior valor de LD, de 0,079, enquanto naquelas da F_2 o cromossomo dez foi o que apresentou maior valor de LD, de 0,080. A maior diferença entre os valores de LD das linhagens DH provenientes de geração F_1 e F_2 pode ser observada no cromossomo cinco sendo de um ponto percentual.

Tabela 12. Média do desequilíbrio de ligação (LD, r^2) entre todos os SNP de cada cromossomo do milho

Cromossomo	Fn	Número de SNP	Média (r^2)
1	F_1	333	0,066
	F_2		0,061
2	F_1	233	0,065
	F_2		0,066
3	F_1	223	0,064
	F_2		0,061
4	F_1	178	0,079
	F_2		0,078
5	F_1	196	0,076
	F_2		0,066
6	F_1	124	0,065
	F_2		0,066
7	F_1	159	0,065
	F_2		0,071
8	F_1	149	0,071
	F_2		0,074
9	F_1	141	0,078
	F_2		0,074
10	F_1	161	0,077
	F_2		0,080
Total	F_1	1897	0,069
	F_2		0,067

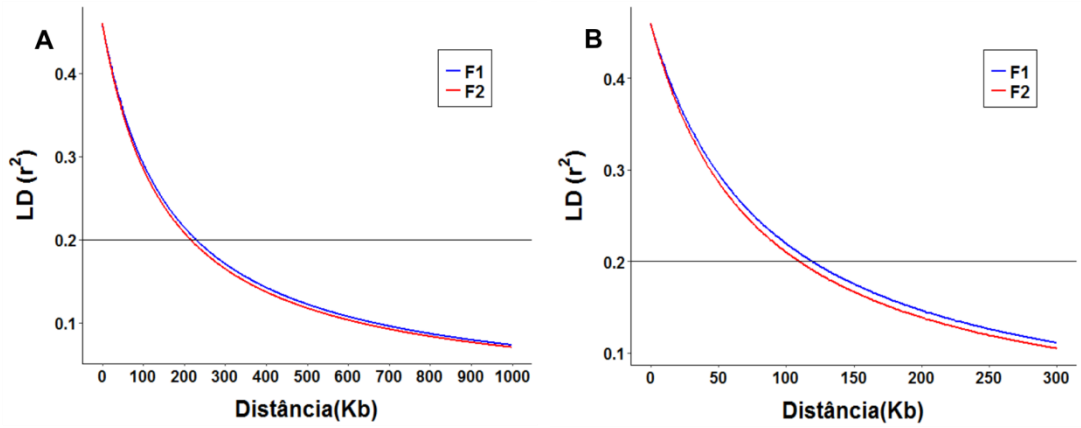

Figura 8. LD *decay* (r^2) versus distância genética (Kb) das linhagens DH obtidas das gerações F_1 e F_2. A. Distância genética de 1000 Kb. B. Zoom na distância genética, de 300 Kb. Linha preta é o r^2 =0,20.

5. DISCUSSÃO

5.1. Efeito das gerações F_1 e F_2 na indução de haploides e na expressividade da antocianina devido o *R1-navajo*

Como observado, as HIR, ISR e DSR variaram entre as fontes de germoplasma e gerações utilizadas, a partir da metodologia de seleção de sementes por meio do *R1-nj* (Tabela 6). Esta variação ocorreu, pois o *R1-nj* possui expressividade variável influenciada pelo *background* das fontes de germoplasma utilizadas como doadoras (PRIGGE et al., 2011), como também é influenciado pelos alelos *C1-I*, *C2-Idf* e *in-1D* dos genes que causam inibição da coloração roxa na aleurona das sementes (CHAIKAM et al., 2015; STINARD; SACHS, 2002). A expressividade de antocianina mostrou que o genótipo 2B587PW possui os alelos que contribuem para uma maior taxa de inibição, diferente dos outros genótipos utilizados no estudo (Figura 4). Além disso, é possível perceber que a partir da expressividade de antocianina, a HIR da geração F_2 foi maior que a da F_1 devido à segregação que os alelos dos genes de inibição sofreram com uma recombinação adicional, o que permitiu que mais sementes de putativos haploides fossem selecionadas (Figura A1). A expressividade de antocianina também contribuiu no resultado das DSR e ISR, pois com a segregação dos alelos dos genes inibidores que atuam na rota do R*1-nj*, a geração F_2 pode apresentar menor ISR e maior DSR que a geração F_1.

Por meio desses resultados fica evidenciada a importância da escolha da geração e fontes de germoplasma que serão utilizados na indução de haploides em milho tropical. Devido a expressividade de antocianina, a melhor geração para se induzir haploides em clima tropical seria a F_2, dependendo dos objetivos do programa de melhoramento, visto que a segregação dos alelos *C1-I*, *C2-Idf* e *in-1D* possibilitariam maior seleção de haploides e menor perda de sementes inibidas. Entretanto, utilizar a geração F_2 na indução de haploides somente por esta finalidade, é inviável, uma vez que o tempo utilizado na obtenção de linhagens DH será maior. Além disso, as diferenças nas taxas de indução de haploides (HIR) entre as gerações F_1 (1,23%) e F_2 (1,78%) foi de 0,55%, valor este muito baixo para se perder tempo e recursos com um ciclo adicional. O que pode acontecer neste caso é o uso da geração F_2 em situações específicas de um programa de melhoramento de milho, como a necessidade de induzir haploides em um híbrido produtivo que apresente alta taxa de inibição de antocianina nas sementes. Dessa forma o melhorista não descartaria um bom material por causa da inibição do R*1-nj* e o tempo perdido com um ciclo adicional pode ser recuperado com a obtenção de linhagens DH promissoras. Neste caso, as

induções continuariam acontecendo nos híbridos de geração F_1 e as induções em F_2 ocorreriam em poucos materiais, de modo a não interferir no desempenho da empresa.

Diante desses fatos, a geração F_1 deve continuar sendo utilizada na metodologia DH, e não ser substituída por outras gerações, por apresentar vantagens, uma vez que ao se utilizar a F_1 na indução de haploides, se ganha tempo nos ciclos de melhoramento e economia de recursos, pois evita-se o oneroso trabalho de autofecundar todos as plantas. Além disso, é possível herdar quase 90% do genoma do doador (SLEPER; BERNARDO, 2016), pois a recombinação dos genes ligados irá ocorrer somente em uma meiose, a que originou o gameta responsável pela formação da planta DH (PIERRE et al., 2011). Esta característica facilita o acesso ao germoplasma que já está presente no meio comercial e que tem boa adaptabilidade (SMITH et al., 2008), possibilitando que recombinações existentes em linhagens parentais sejam preservadas. Para as instituições públicas ou para um melhorista que quer iniciar um programa de melhoramento e não tem germoplasma, é uma alternativa para acelerar as pesquisas e obter linhagens elite, visto que inserir um germoplasma exótico pode ser dispendioso, dependendo das leis de importação de sementes do seu país. No entanto, o uso de material comercial para induzir haploides não deve diminuir ou infringir a lei de proteção de cultivares dos países em que for utilizado (SMITH et al., 2008). E no caso dos países que possuem permissão para produzir transgênicos, é importante que sejam pagos royalties caso as linhagens DH ou os híbridos produzidos sejam comercializados com o evento transgênico. Para as instituições privadas, que já possuem seus grupos heteróticos estabelecidos, induzir haploides em geração F_1 é uma alternativa para preservar os genes que já estão sendo utilizados nos híbridos comerciais, e a partir deles criar novas linhagens que formarão híbridos mais produtivos.

O indutor de haploidia LI-ESALQ apresentou uma taxa média de HIR de 1,5% (Tabela 6), e taxas de FDR que variaram de 64,97 a 91,23%. Quanto menor a taxa de indução de um indutor, maior é a taxa FDR, visto que a expressividade variável do *R1-nj* faz com que sementes haploides sejam selecionadas erroneamente. Dessa forma, se a taxa HIR de um indutor é mais alta, como as taxas observadas nos indutores temperados RWS e UH400 e tropicais Tail 8 e Tail 9 (médias de 8 a 10%) (CHAIKAM et al., 2016; PRIGGE et al., 2012a; ROTARENCO et al., 2010), maior quantidade de haploides reais serão encontrados nas sementes selecionadas pelo *R1-nj*. Estes indutores com maiores HIR produzem mais haploides reais, pois foram massivamente selecionados de acordo com o loco *sed 1* que causa distorção de segregação, responsável pela formação da semente haploide (XU et al., 2013). Assim, para aumentar a HIR do indutor LI-ESALQ são necessárias etapas de melhoramento para que a pressão de seleção force a presença do loco *sed 1* cada vez mais na população, uma vez que sem as etapas de melhoramento a

característica de indução pode desaparecer da população indutora (MELCHINGER et al., 2016a; XU et al., 2013).

Na literatura, é possível encontrar diversas metodologias que complementam o marcador R*1-nj* na seleção de haploides, já que os falsos positivos são uma realidade na tecnologia DH. Dentre elas pode ser citada a maior quantidade de óleo nas sementes haploides, que acontece devido o uso de um testador com alta quantidade de óleo. A seleção ocorre de forma não destrutiva com o uso de aparelho específico, que utiliza ressonância magnética nuclear (MELCHINGER et al., 2013). A seleção das sementes haploides pela quantidade de óleo possibilita que haja menos falsos positivos antes da duplicação cromossômica e que seja economizada solução de colchicina, espaço e trabalho no campo. A outra metodologia é a coloração vermelha nas radículas das plântulas diploides e ausência desta coloração nas plântulas haploides. Esta coloração ocorre graças ao uso do indutor de raiz vermelha desenvolvido no CIMMYT (CHAIKAM et al., 2016) na indução de haploides. Há ainda metodologias utilizadas na seleção de haploides quando a planta apresenta no mínimo quatro folhas, não permitindo que a seleção seja feita antes da duplicação cromossômica de plântulas, mas que podem ser utilizadas para outros fins, como a citometria de fluxo, a ausência de lígula e presença de resistência a herbicida. A citometria de fluxo possibilita análise de quantidade de DNA e já foi utilizada em estudos de protocolos de duplicação cromossômica (COUTO et al., 2015), obtenção de DH (BATTISTELLI et al., 2013) e duplicação espontânea (WU et al., 2014). A ausência de lígula é uma característica condicionada pelo alelo *lglg* presente no germoplasma do doador e não do indutor. Assim, quando ocorre a indução haploide, as plantas com lígula são descartadas por apresentarem genoma do indutor, e aquelas sem lígula são consideradas haploides (PRIGGE et al., 2012a). O uso de resistência a herbicidas também é uma alternativa para a seleção de plantas haploides, já que estas possuirão o alelo que condiciona resistência. Neste caso, o indutor de haploides é cruzado com um doador transgênico a fim de que as plantas haploides possuam a resistência (MELCHINGER et al., 2016a). Na ausência destas metodologias citadas, o ideal é descartar plântulas antes da duplicação e plantas vigorosas no campo, sendo uma estratégia mais rápida e barata, como o feito neste trabalho.

5.2. Gerações F_1 e F_2 na obtenção de linhagens DH em milho tropical

Conhecer as eficiências das etapas da metodologia possibilita que o melhorista possa ter um controle maior da quantidade de sementes iniciais que devem ser induzidas, da quantidade de colchicina que deve ser reservada para a duplicação cromossômica e de quantas linhagens DH ele pode obter, visto que na metodologia há perda de material biológico por estresse e devido a

presença de falsos positivos. A perda de material biológico devido fatores estressantes ocorre em toda a metodologia de obtenção de DH, sendo o antimitótico o fator inicial, seguido da transferência das mudas para o campo e terminando com as condições climáticas na etapa de florescimento. A etapa de florescimento é uma das mais delicadas da metodologia, visto que há pouca produção de pólen, o que exige maior atenção nas autofecundações para que haja um sucesso na fertilização e também para evitar contaminações. Além disso, as plantas duplicadas não suportam altas temperaturas, o que prejudica a fertilidade do pendão, e chuvas na etapa do florescimento diminuem a taxa de fecundação. Em nosso trabalho tivemos este cenário, o que explica a quantidade de espigas D_1 colhidas, sendo a média de temperatura no verão de 2015 de 21,22º a 31,93º C e 267 mm de chuva no mês das polinizações. Neste contexto, a eliminação de material biológico falso positivo é necessária para que se diminua custos com colchicina, área no campo, e tempo, uma vez que o objetivo é cultivar apenas plantas haploides que tenham sido duplicadas.

Induções de haploides em gerações F_1 e F_2 não interferem na eficiência de obtenção de linhagens DH, já que mesmo tendo maior quantidade de material biológico a geração F_1 apresentou a mesma porcentagem (%) de linhagens que a geração F_2 (Tabela 9). Por outro lado, as fontes de germoplasma utilizadas além de influenciarem a taxa de indução de haploides (HIR) e a taxa de falsos positivos (FDR), também interferem na metodologia DH. Por exemplo, um genótipo pode ser mais suscetível à colchicina que outro, ou mais resistente ao estresse climático que ocorre após a duplicação, ou ser mais propício à autofecundação e fertilização, sendo importante escolher a fonte de germoplasma também em relação à sua resposta à metodologia (Tabela A1 e Tabela A2). De toda forma, a influência dos genótipos na metodologia vai iniciar na indução de haploides. Depois disso, há a influência na expressividade do R*1-nj* que acarreta na seleção de haploides verdadeiros e falsos positivos, e então na duplicação cromossômica e campo. Por exemplo, a fonte de germoplasma 30F53H apresentou a maior HIR (Tabela 6) e valor médio de FDR de 90,75% (Tabela 7), indicando que nem sempre taxas elevadas de HIR correspondem a um sucesso na seleção de sementes de verdadeiros haploides. Consequentemente, a maioria das sementes de putativos haploides selecionadas correspondia a híbridos. Todavia, a quantidade de linhagens DH foi maior a partir desta fonte, indicando que seu comportamento nas outras etapas foi satisfatório.

A partir do estudo das etapas da metodologia de DH é possível que sejam estimadas as necessidades de material biológico, espaço, recursos e tempo, em situações de clima tropical. Por exemplo, neste trabalho foram obtidas 415.979 sementes induzidas, sendo que 6.048 sementes foram selecionadas como putativos haploides (Tabela 6). Considerando estes dados, se o objetivo

de um melhorista fosse obter 1.000 linhagens DH, seria necessário obter 224.000 sementes de putativos haploides, retiradas de um campo de indução de cerca de 15 milhões de sementes. Considerando o número médio de 446 sementes por espiga induzida em gerações F_1 e F_2 neste trabalho, seriam necessárias cerca de 33632 plantas das fontes doadoras no campo de indução, se for colhida apenas uma espiga por planta. Estes valores são altos pois foram estimados considerando a indução média de 1,5% do indutor LI-ESALQ. No entanto, se um indutor com maior HIR for utilizado na tecnologia, possivelmente o número de sementes que se deve induzir será menor e as etapas da metodologia ficariam menos dispendiosas. Este cálculo também pode ser comparado entre gerações, utilizando as 16 linhagens obtidas na geração F_1 e as 11 obtidas na geração F_2. Assim, considerando ainda a quantidade de 1000 linhagens DH, se a indução fosse realizada em geração F_1, seriam necessárias 223.687 sementes de putativos haploides e cerca de 17 milhões de sementes induzidas, que a partir de uma média de 520 sementes por espiga, correspondem a cerca de 32692 plantas doadoras no campo de indução. Se a indução fosse realizada em geração F_2, seriam necessárias 224.454 sementes de putativos haploides e cerca de 12 milhões de sementes induzidas, ou seja, 5 milhões menos de sementes induzidas que na geração F_1 para se obter a mesma porcentagem de DH (Tabela 9). Neste caso, considerando uma média de 372 sementes por espiga, seriam necessárias cerca de 32258 plantas doadoras no campo de indução, que correspondem a 434 menos plantas que na F_1. Por meio deste simples cálculo é possível comparar as gerações na indução de haploides em milho. Como observado, utilizando a F_2, ocorrerá uma menor quantidade de material biológico, mas o tempo gasto para obter as linhagens DH é maior. Além disso, como há uma recombinação adicional, os falsos positivos poderão ter o fenótipo parecido com os haploides duplicados, devido os alelos recessivos. Desse modo, haploides duplicados podem ser confundidos com falsos positivos e serem descartados no campo. Já com a geração F_1, o tempo é menor, e com maior quantidade de material biológico o descarte de falsos positivos é facilitado, visto que a segregação alélica é menor, acarretando em plantas mais parecidas fenotipicamente, e assim os falsos positivos são mais facilmente detectados no campo. Como as porcentagens de obtenção de linhagens DH foram as mesmas, em ambas as gerações, é preferível que as induções sejam em F_1, pois as plantas duplicadas irão apresentar a variabilidade presente nos parentais.

5.3. Variabilidade genética de linhagens DH obtidas de gerações F_1 e F_2

Como já discutido, a geração que se utiliza na indução de haploides em milho influencia na quantidade de sementes iniciais colhidas, nas taxas de indução de haploides (HIR), de sementes diploides (DSR) e sementes inibidas (ISR). Já na eficiência das etapas da metodologia,

não foram observadas diferenças. Além dessas características, outra abordagem importante em relação ao uso das gerações F_1 e F_2 é em relação à variabilidade genética. Dentre as estimativas dos parâmetros utilizados, a geração F_1 apresentou maiores valores de tamanho efetivo (N_e), variância genética (V_G), diversidade genética (D_G), menor frequência alélica (MAF) e conteúdo de informação polimórfica (PIC) que a geração F_2 (Tabela 10), contrariando o que era esperado (BERNARDO, 2009; MCCLOSKY; TANKSLEY, 2013). Dessa forma, não é justificável o uso da geração F_2 em induções de haploides, uma vez que as linhagens provenientes de F_1 apresentaram maiores valores de variabilidade genética. Para os programa de melhoramento de milho que buscam ganhar tempo no lançamento de híbridos, o importante é continuar nas induções de haploides em F_1.

Diferenças na variância genética entre linhagens DH obtidas de gerações F_1 e F_2 já foram abordadas em outros estudos, sendo que apenas um ciclo de seleção não é suficiente para obter ganhos de seleção superiores ao anterior (COVARRUBIAS-PRIETO, 1987). Sleper e Bernardo (2016) observaram maiores valores de V_G para a variável resposta umidade de linhagens DH de geração F_2, enquanto nas características altura de plantas e produtividade foi observado o contrário, maior V_G em linhagens provenientes de geração F_1. Segundo estes autores, a maior V_G entre linhagens DH provenientes de F_2 que em F_1 é acessada quando há QTLs ligados em fase de repulsão. E quando o QTL está ligado em fase de atração o que ocorre é uma maior V_G entre linhagens DH provenientes de geração F_1 que F_2. Em estudos de simulação, Bernardo (2009) observou ganhos em respostas de seleção maiores entre linhagens DH de geração F_2 que F_1, quando utilizou 200 QTLs nas análises em ciclos de melhoramento crescentes, indicando teoricamente que o uso da geração F_2 possibilita maior ganho de seleção no melhoramento. O menor valor de V_G em linhagens DH oriundas da geração F_2 não indica, porém, que houve menor recombinação, uma vez que as análises de desequilíbrio de ligação apresentaram um menor valor nas linhagens DH de geração F_2 (Figura 8). Apesar de ser levemente menor este valor de LD na geração F_2, este indica que houve quebra de blocos gênicos ocasionada pela recombinação. No entanto, por estes serem naturalmente muito baixos (em torno de 0,07), indicando que a maioria dos marcadores segregou de forma independente, o LD não foi suficiente para separar as linhagens provenientes de cada geração em subgrupos, indicando mais uma vez que a geração F1 deve continuar sendo utilizada nos programas de duplo haploides em milho.

O genótipo STATUS VIPTERA apresentou os maiores valores de D_G e PIC (Tabela 11) entre todos os outros utilizados na indução de haploides. Neste contexto, Andrade et al., (2016) estudaram 20 híbridos brasileiros de diferentes empresas privadas e observaram que os

híbridos da empresa Syngenta possuíam 11 alelos exclusivos, o que contribuiu para sua maior diversidade genética quando comparado com os outros híbridos avaliados. Assim, acredita-se que estes alelos exclusivos tenham contribuído para a maior D_G nas linhagens DH neste trabalho, o que acarretou no agrupamento destes materiais de forma isolada (Figura 6).

Estudos envolvendo genotipagem em linhagens DH são incipientes e em nenhum deles foi abordada a presença de alguns locos em heterozigose. A presença de locos em heterozigose já era esperada nas amostras genotipadas por serem coletadas de linhagens D_0. As linhagens D_0 foram utilizadas neste trabalho porque foram obtidas somente 27 linhagens D_1, não sendo um número suficiente para estudos de diversidade genética, estrutura populacional e desequilíbrio de ligação. A presença de falsos positivos no campo é comum na metodologia DH, principalmente quando o rigor no descarte de plântulas antes da duplicação cromossômica é menor. Como o indutor LI-ESALQ não tinha sido estudado ainda quanto as suas taxas de indução de haploides (HIR), de sementes diploides (DSR) e sementes inibidas (ISR), o descarte das plântulas foi feito com cautela a fim de evitar a perda de verdadeiros haploides, uma vez que não foi utilizada nenhuma outra técnica nesta etapa, apenas a seleção visual do vigor. Desta forma, como a quantidade de sementes putativas haploides foi menor na geração F_2, o filtro para descarte de plântulas foi menor que na geração F_1, acarretando em maior quantidade de falsos positivos em D_0, sendo estes indivíduos eliminados após o controle de qualidade dos marcadores SNP. Diante destes resultados, fica evidenciada a importância de se realizar o descarte antes da duplicação cromossômica e no campo, antes do florescimento, para eliminar os falsos positivos e garantir maior eficiência na obtenção de linhagens DH.

Teoricamente, esperava-se que os valores de H_0 fossem 0,00 para todas as linhagens DH. Estes alelos em heterozigose nas linhagens D_0 podem ter ocorrido devido a duas hipóteses: a primeira seria um erro na genotipagem, sendo os alelos homozigotos lidos como heterozigotos. A segunda hipótese pode indicar a existência de locos heterozigotos que não foram eliminados durante a indução de haploides e que por causa deles não foi observado valor de 0,0 na estimativa do parâmetro H_0. Dentre os mecanismos que envolvem a indução de haploides, um deles diz a respeito da eliminação de cromossomos que pode iniciar no pólen do indutor (QIU et al., 2014) e ser presente na fertilização das sementes provenientes do cruzamento do indutor de haploidia com o doador (XU et al., 2013; ZHANG et al., 2008). De acordo com Zhang et al. (2008), que avaliou raízes de sementes de milho haploides em diferentes tempos de crescimento, as células que sofreram eliminação cromossômica nem sempre tiveram valores de n=10, sendo observado valores de n=13 ou n=15. Nas linhagens DH deste trabalho pode ter ocorrido algumas plantas com cromossomos diferentes de n=10 e estas foram genotipadas pelo marcador SNP,

evidenciando o alelo heterozigoto. Como a indução é genótipo dependente, a fonte de germoplasma 30F53H, por exemplo, a qual apresentou maior H_0, indica uma eficiência duvidosa na obtenção de linhagens DH. Além disso, como já discutido, neste genótipo também foram observadas taxas elevadas de FDR, em ambas as gerações. Outro fator interessante é que a presença de DNA do indutor nas sementes haploides já foi confirmada em estudos anteriores (LI et al., 2009). Assim, os locos em heterozigosidade obervados nas linhagens DH deste trabalho podem ser o resultado da introgressão de DNA do indutor.

Diante dos resultados obtidos para milho tropical fica evidenciada a importância de se conhecer inicialmente as fontes de germoplasma que serão utilizadas na obtenção de linhagens DH, devido ao grande efeito destas na eficiência das diferentes etapas da metodologia. Além disso, um ciclo de autofecundação antes de ocorrer a indução de haploides não indicou ser vantajoso, em termos de variabilidade genética e possíveis ganhos com a seleção. No entanto, o uso da geração F_2 não pode ser totalmente descartado, principalmente nos casos específicos em que há a presença de genes inibidores, os quais impedem que uma fonte de germoplasma produtiva e resistente a doenças, por exemplo, possa ser utilizada como fonte de indução de haploides.

6. CONCLUSÕES

As linhagens DH oriundas de diferentes gerações apresentaram variabilidade genética e desequilíbrio de ligação semelhante. Com isto, em milho tropical, recomenda-se o uso da geração F_1 para a obtenção de DH, por apresentar o melhor balanço entre tempo e variabilidade genética.

A indução de haploides em geração F_2 possibilita a segregação dos genes que inibem o marcador R*1-nj*, aumentando a taxa de indução de haploides (HIR) e diminuindo a taxa de inibição de sementes (ISR), o que acarreta na seleção de mais sementes de haploides putativos. No entanto, somente nos casos específicos em que houver a presença de inibição em um genótipo promissor, a geração F_2 deve ser utilizada.

O uso das gerações F_1 e F_2 na indução de haploides não interfere na eficiência do processo. Por outro lado, a fonte de germoplasma sim.

O indutor tropicalizado LI-ESALQ apresentou taxa média de indução de haploides de 1,5%.

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.

BATTISTELLI, G. M. et al. Production and identification of doubled haploids in tropical maize. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 4230–4242, 2013.

BELICUAS, P. R. et al. Androgenetic haploids and SSR markers as tools for the development of tropical maize hybrids. **Euphytica**, v. 156, n. 1–2, p. 95–102, 21 fev. 2007.

BERNARDO, R. Should maize doubled haploids be induced among F(1) or F (2) plants? **Theoretical and applied genetics.**, v. 119, n. 2, p. 255–62, jul. 2009.

BÖHM, J. et al. Tapping the genetic diversity of landraces in allogamous crops with doubled haploid lines: a case study from European flint maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 130, n. 5, p. 861–873, 2017.

BORDES, J. et al. Doubled haploid versus S1 family recurrent selection for testcross performance in a maize population. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 112, n. 6, p. 1063–1072, 2006.

CHAIKAM, V. et al. Analysis of effectiveness of R1-nj anthocyanin marker for in vivo haploid identification in maize and molecular markers for predicting the inhibition of R1-nj expression. **TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik**, v. 128, n. 1, p. 159–171, 2015.

CHAIKAM, V. et al. Development and Validation of Red Root Marker-Based Haploid Inducers in Maize. **Crop Science**, v. 56, n. 4, p. 1678, 2016.

COUTO, E. G. DE O. et al. Identifica????o de milho haploide por citometria de fluxo, marcadores morfol??gicos e moleculares. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 37, n. 1, p. 25–31, 2013.

DE ANDRADE, L. R. B. et al. Genetic vulnerability and the relationship of commercial germplasms of maize in Brazil with the nested association mapping parents. **PLoS ONE**, v. 11, n. 10, p. 1–14, 2016.

DE OLIVEIRA COUTO, E. G. et al. Verification and characterization of chromosome duplication in haploid maize. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 14, n. 2, p. 6999–7007, 2015.

EDER, J.; CHALYK, S. In vivo haploid induction in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, n. 4, p. 703–708, 2002.

FRITSCHE- NETO, GARBUGLIO, B. Duplo-Haploides. In: BOREM, A., FRITSCHE- NETO, R. (Ed.). . **Biotecnologia aplicada ao melhoramento de plantas**. 1º ed. [s.l.] Suprema, 2013. p. 267–302.

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

GENETICS, A. Anthocyanin Genetics. In: IN: FREELING M, W. V. (EDS) (Ed.). . **The maize handbook**. New York: Springer- Verlag, 1994. p. 279–281.

HECKENBERGERA M, K. M. B. D.; MELCHINGER A.E. Identification of Essentially Derived Varieties Obtained from Biparental Crosses of Homozygous Lines II. Morphological Distances and Heterosis in Comparison with Simple Sequence Repeat and Amplified Fragment Length

Polymorphism Data in Maize. **Crop Sci 45:1132-1140 (2005)**, v. 1140, p. 1120–1131, 2005.

KEBEDE, A. Z. et al. Effect of source germplasm and season on the in vivo haploid induction rate in tropical maize. **Euphytica**, v. 180, n. 2, p. 219–226, 2011.

LI, L. et al. Morphological and molecular evidences for DNA introgression in haploid induction via a high oil inducer CAUHOI in maize. **Planta**, v. 230, n. 2, p. 367–376, 2009.

MARRONI, F. et al. Nucleotide diversity and linkage disequilibrium in Populus nigra cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD4) gene. **Tree Genetics and Genomes**, v. 7, n. 5, p. 1011–1023, 2011.

MCCLOSKY, B.; TANKSLEY, S. D. The impact of recombination on short-term selection gain in plant breeding experiments. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 126, n. 9, p. 2299–2312, 2013.

MELCHINGER, A. et al. **Hybrid maize breeding with doubled haploid lines: quantitative genetic and selection theory for optimum allocation of resources**. Proc.41st Annual Illinois Corn Breeder's School, Urbana Champaign. **Anais**...Illinois: 2005Disponível em: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Hybrid+maize+breeding+with+doubled+haploid+lines+:+quantitative+genetic+and+selection+theory+for+optimum+allocation+of+resources#0>

MELCHINGER, A. et al. In Vivo haploid induction in maize: comparison of different testing regimes for measuring haploid induction rates. **Crop Science**, v. 56, n. june, p. 1–2, 2016a.

MELCHINGER, A. E. et al. Rapid and accurate identification of in vivo-induced haploid seeds based on oil content in maize. **Scientific reports, Nature**, v. 3, n. 2129, p. 1–5, 2013.

MELCHINGER, A. E. et al. In vivo haploid induction in maize: Identification of haploid seeds by their oil content. **Crop Science**, v. 54, n. 4, p. 1497–1504, 2014.

MELCHINGER, A. E. et al. Colchicine alternatives for chromosome doubling in maize haploids for doubled- haploid production. **Crop Science**, v. 56, n. 2, p. 559–569, 2016b.

PIERRE, P. M. O. et al. Doubled haploids: importance in the genetic breeding of maize. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 10, n. 1, p. 1–16, 2011.

PRASANNA BM, CHAIKAM VIJAY, M. G. **Doubled Haploid Technology in Maize Breeding: Theory and Practice**. [s.l: s.n.].

PRIGGE, V. et al. Doubled haploids in tropical maize: I. effects of inducers and source germplasm on in vivo haploid induction rates. **Crop Science**, v. 51, n. 4, p. 1498–1506, 2011.

PRIGGE, V. et al. Development of in vivo haploid inducers for tropical maize breeding programs. **Euphytica**, v. 185, n. 3, p. 481–490, 2012a.

PRIGGE, V. et al. 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, 2012b.

PRIGGE, V. et al. Doubled haploids in tropical maize: II. Quantitative genetic parameters for testcross performance. **Euphytica**, v. 185, n. 3, p. 453–463, 25 jan. 2012c.

QIU, F. et al. Morphological, cellular and molecular evidences of chromosome random elimination in vivo upon haploid induction in maize. **Current Plant Biology**, v. 1, p. 83–90, 2014.

RIGGS, T. J.; SNAPE, J. W. Effects of linkage and interaction in a comparison of theoretical

populations derived by diploidized haploid and single seed descent methods. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 49, n. 3, p. 111–115, 1977.

RÖBER, F. K.; GORDILLO, G. A.; GEIGER, H. H. In vivo haploid induction in maize - Performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding. **Maydica**, v. 50, n. 3–4, p. 275–283, 2005.

ROTARENCO, V. et al. New inducers of maternal haploids in maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v. 84, n. 3, p. 1–7, 2010.

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

_____. A pure line method of corn breeding. **American Breeders Association Report**, Washington, v. 5, p. 51–59, 1909.

_____. Hybridization methods in corn breeding. **American Breeders Association Report**, Washington, v. 6, p. 63–72, 1910.

SLEPER, J. A.; BERNARDO, R. Recombination and genetic variance among maize doubled haploids induced from F1 and F2 plants. **Theoretical and Applied Genetics**, 2016.

SMITH, J. S. C. et al. Use of doubled haploids in maize breeding: Implications for intellectual property protection and genetic diversity in hybrid crops. **Molecular Breeding**, v. 22, n. 1, p. 51–59, 2008.

SOUZA JÚNIOR, C.L. Melhoramento de espécies alógamas. In: NASS, L.L; VALOIS, A.C.C.; MELO, T.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001.p. 694-671.

STINARD, P. S.; SACHS, M. M. The identification and 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.

STRIGENS, A. et al. Unlocking the Genetic Diversity of Maize Landraces with Doubled Haploids Opens New Avenues for Breeding. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. 7–9, 2013.

WU, P. et al. Early spontaneous diploidization of maternal maize haploids generated by in vivo haploid induction. **Euphytica**, p. 127–138, 2014.

XU, X. et al. Gametophytic and zygotic selection leads to segregation distortion through in vivo induction of a maternal haploid in maize. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 4, p. 1083–1096, 2013.

YANG, J. et al. Common SNPs explain a large proportion of the heritability for human height. Nature Genetics, v. 569, p. 565–569, 2010.

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

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

APÊNDICES

Tabela A1. Eficiência relativa em cada etapa da metodologia utilizada na obtenção de linhagens DH em cinco fontes de germoplasma, representada pelas porcentagens

Etapas da metodologia	F1										F2									
	30F53H		2B587PW		STATUS VIPTERA		BM820		DKB390		30F53H		2B587PW		STATUS VIPTERA		BM820		DKB390	
	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%
0. Total de sementes	61262		49150		62506		50102		55420		28981		22918		37990		19680		27970	
1. Total de haploides putativos	1598	100	383	100	614	100	402	100	582	100	1054	100	186	100	569	100	225	100	435	100
2. Duplicação cromossômica	543	33,9	270	70,4	319	51,9	223	55,4	326	56,0	536	50,8	112	60,2	250	43,9	111	49,3	178	40,9
3. Casa-de-vegetação	441	27,5	215	56,1	243	39,5	206	51,2	257	44,1	344	32,6	99	53,2	174	30,5	101	44,8	138	31,7
4. Total transplantado a campo	376	23,5	196	51,1	197	32,0	176	43,7	225	38,6	298	28,2	74	39,7	145	25,4	85	37,7	110	25,2
5. Total no campo após desbaste de plantas F1	136	8,5	88	22,9	110	17,9	138	34,3	113	19,4	99	9,3	26	13,9	87	15,2	48	21,3	56	12,87
6. Autofecundação	69	4,3	35	9,1	40	6,5	59	14,6	19	3,26	56	5,3	15	8,06	27	4,7	22	9,7	16	3,6
7. Total de espigas colhidas	31	1,9	8	2,0	2	0,3	3	0,7	6	1,0	29	2,7	7	3,7	5	0,8	1	0,4	7	1,6
8. Total de espigas D_1 colhidas	7	0,4	3	0,7	1	0,1	2	0,4	3	0,5	7	0,6	1	0,5	2	0,3	1	0,4	0	0

Tabela A2. Eficiência relativa em cada etapa da metodologia utilizada na obtenção de linhagens DH em cinco fontes de germoplasma, representada pelas porcentagens relativas

Etapas da metodologia	F1										F2									
	30F53H		2B587PW		STATUS VIPTERA		BM820		DKB390		30F53H		2B587PW		STATUS VIPTERA		BM820		DKB390	
	Total	%R	Total	%R	Total	%R	Total	%R	Total	%R	Total	%R	Total	%R	Total	%R	Total	%R	Total	%R
0. Total de sementes	61262		49150		62506		50102		55420		28981		22918		37990		19680		27970	
1. Total de haploides putativos	1598	2,6	383	0,7	614	0,9	402	0,8	582	1,0	1054	3,6	186	0,8	569	1,4	225	1,1	435	1,5
2. Duplicação cromossômica	543	33,9	270	70,4	319	51,9	223	55,4	326	56,0	536	50,8	112	60,2	250	43,9	111	49,3	178	40,9
3. Casa-de-vegetação	441	81,2	215	79,6	243	76,1	206	92,3	257	78,8	344	64,1	99	88,3	174	69,6	101	90,9	138	77,5
4. Total transplantado a campo	376	85,2	196	91,1	197	81,0	176	85,4	225	87,5	298	86,6	74	74,7	145	83,3	85	84,1	110	79,7
5. Total no campo após desbaste das plantas F1	136	36,1	88	44,8	110	55,8	138	78,4	113	50,2	99	33,2	26	35,1	87	15,2	48	56,4	56	50,9
6. Autofecundação	69	50,7	35	39,7	40	36,3	59	42,7	19	16,8	56	56,5	15	57,6	27	31,0	22	45,8	16	28,5
7. Total de espigas colhidas	31	44,9	8	22,8	2	5,0	3	5,0	6	31,5	29	51,7	7	46,6	5	18,5	1	4,5	7	43,7
8. Total de espigas D_1 colhidas	7	22,5	3	37,5	1	50,0	2	66,6	3	50,0	7	24,1	1	14,2	2	40,0	1	100	0	0

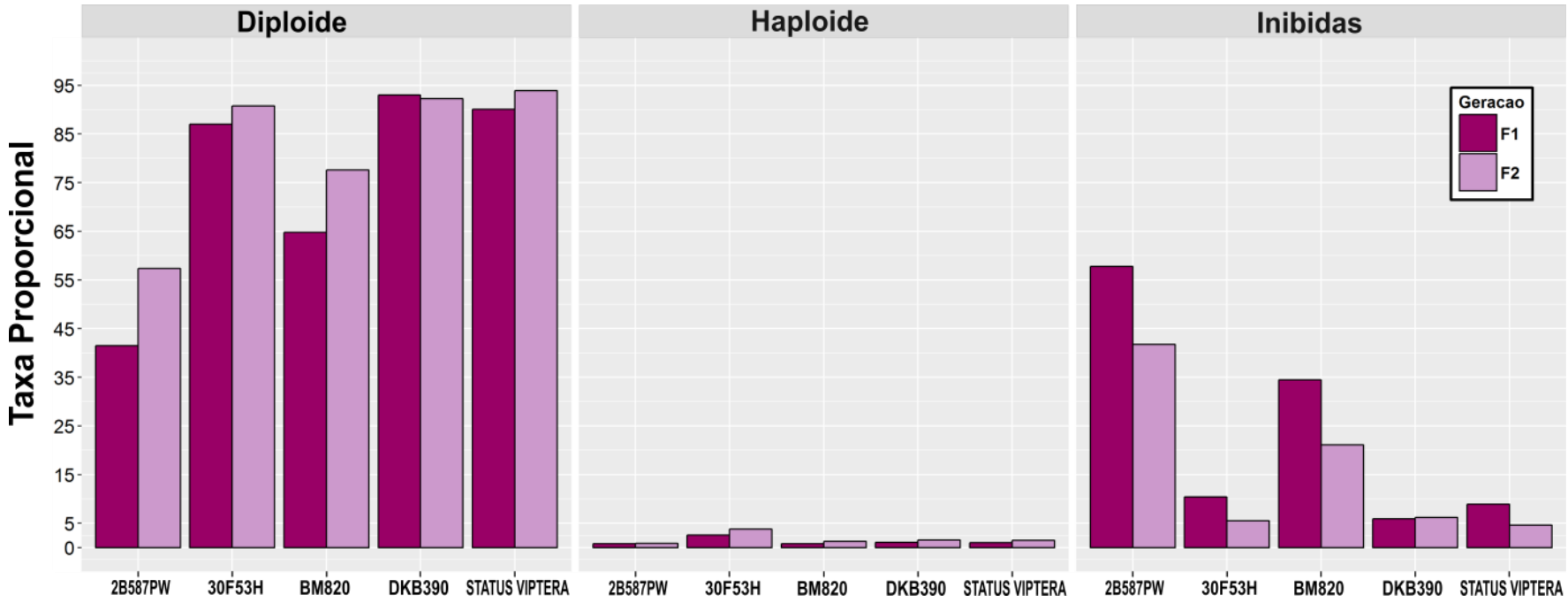

Figura A1. Taxas proporcionais de sementes diploides (DSR), haploides (HIR) e inibidas (ISR) obtidas de análises multinomiais. As proporções são representadas em cada geração e fontes de germoplasma.