

## Indução de haploidia em milho: efeito do avanço de gerações e do grupo heterótico da população-fonte

**Roberto dos Santos Trindade<sup>(1)</sup>; Lauro José Moreira Guimarães<sup>(2)</sup>; Isabel Regina Prazeres de Souza<sup>(2)</sup>; Paulo Evaristo de Oliveira Guimarães<sup>(2)</sup>; Dea Alecia Martins Netto<sup>(2)</sup>; Ana Carolina Aparecida da Silva<sup>(3)</sup>; Bruna Lopes Mariz<sup>(3)</sup>.**

<sup>(1)</sup> Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Minas Gerais, [roberto.trindade@embrapa.br](mailto:roberto.trindade@embrapa.br); <sup>(2)</sup> Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo; <sup>(3)</sup> Estudante de Agronomia da Universidade Federal de São João Del Rey, Campus Sete Lagoas – Estagiárias da Embrapa Milho e Sorgo.

**RESUMO:** A indução de haploidia em milho depende de uma série de fatores, dentre eles, a constituição genética dos genótipos-fonte. O objetivo deste trabalho foi o de avaliar o efeito do avanço de gerações e do grupo heterótico da população-fonte na indução e identificação de haploides em milho. Os dados avaliados foram originados de um campo de indução de haploidia implantado na Embrapa Milho e Sorgo, em setembro de 2015. Como populações-fonte foram utilizados 20 genótipos dos grupos heteróticos Flint e Dent, nas gerações F1 e F2, que foram semeados em sete linhas de 4,2m para cada fonte. O indutor de haploidia utilizado foi obtido do cruzamento entre plantas do híbrido TAIL P1 x TAIL P2. Em cada linha, foi tomada uma espiga polinizada manualmente para avaliação. Foram determinados o número de grãos, a expressão do gene R1-navajo e as taxas de indução de haploidia, dentre outros caracteres. Para comparação da taxa de indução de haploidia entre grupos heteróticos e gerações utilizou-se o teste de Wilcoxon para duas médias. Foi identificado maior número de haplóides em genótipos do grupo Dent, em comparação com indivíduos Flint. Não foi possível determinar um padrão de redução ou aumento das taxas de indução de haplóides entre gerações, havendo variação em função da população-fonte em estudo, do grupo heterótico e avanço de gerações.

**Termos de indexação:** Melhoramento de milho; desenvolvimento de linhagens; Expressão do gene *R1-navajo*.

### INTRODUÇÃO

A tecnologia de duplo-haploides (DHs) tem ganhado importância nos programas de melhoramento de milho para o desenvolvimento de híbridos, uma vez que diminui o tempo para obtenção de linhagens homocigotas de milho para até três gerações, o que reduz custos e acelera a introgressão de características de interesse agrônomo em genótipos de interesse. A produção

de linhagens duplo-haplóides passa por quatro passos básicos (Prigge & Melchinger, 2012): i) indução de haploidia; ii) identificação de possíveis haplóides; iii) duplicação cromossômica, e; iv) a autofecundação das linhagens obtidas para incremento de sementes.

A geração de haploides utilizando indutores maternos se dá pelo contato do núcleo reprodutivo do grão de pólen do indutor com a oosfera do genótipo-fonte no interior do saco embrionário. Este fenômeno induz a divisão mitótica da oosfera em um embrião haploide, portando genes herdados apenas do genitor feminino. Após esta etapa, as possíveis sementes de indivíduos haploides são selecionadas com base na expressão do gene R1-navajo (R1-nj) que codifica pigmentação com antocianina no endosperma e embrião de sementes de milho, sendo consideradas haploides sementes com ausência de pigmentação púrpura em seu embrião e presença de pigmentação púrpura no endosperma.

A indução de haploidia e a expressão do gene R1-nj dependem de uma série de fatores, dentre eles a constituição genética dos genótipos-fonte. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar o efeito do nível de endogamia e do grupo heterótico da população-fonte na indução e identificação de haploides em milho.

### MATERIAL E MÉTODOS

Os dados analisados foram obtidos de campo de indução de haploidia implantado em área experimental da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, Minas Gerais, em setembro de 2015.

A Embrapa Milho e Sorgo fez a aquisição de licença de uso de indutores de haploidia gimnogenéticos adaptados ao clima tropical, desenvolvidos pelo Centro Internacional Melhoramento de Milho e Trigo (CIMMYT), denominados TAILs (Tropically Adapted Inducer Lines), com taxa de indução entre 6 a 12% (Prigge et al., 2012). Como indutor foi utilizado uma

população derivada do cruzamento entre plantas do híbrido TAIL P1 x TAIL P2, híbrido este obtido pelo cruzamento entre essas linhagens indutoras.

As populações-fonte se constituíram de genótipos obtidos a partir do cruzamento de linhagens-elite de milho do programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo, a saber: i) quatro indivíduos F1 obtidos do cruzamento entre linhagens do grupo heterótico Flint e quatro indivíduos F2 obtidos por autofecundação dos genótipos F1; ii) seis indivíduos F1 obtidos do cruzamento entre linhagens do grupo heterótico Dent e seis indivíduos F2 obtidos por autofecundação dos genótipos F1, totalizando assim 20 genótipos, os quais foram codificados de acordo com o número da primeira fileira que ocuparam no campo (Figura 1). As 20 populações-fonte foram semeadas em sete linhas de 4,2m, com espaçamento entre linhas de 0,8m e plantio de cinco sementes por metro linear. Entre as linhas das populações-fonte, foram semeadas linhas dos indutores de haploidia na proporção 1:1, em três épocas distintas: 0, 10 e 20 dias após o plantio das populações-fonte, visando sincronizar ao máximo o florescimento das fontes com o dos indutores. Após o último plantio, houve um isolamento no tempo de 20 dias de outros plantios próximos, para evitar a contaminação do campo com pólen exógeno. A condução do plantio seguiu todos os tratamentos culturais adotados para a cultura do milho.

Para indução de haploides, no florescimento, removeram-se todos os pendões das populações-fonte, de forma que todo o pólen no campo fosse do genótipo indutor. Em todas as linhas das populações-fonte foram efetuadas polinizações manuais em três espigas, garantindo a obtenção de haplóides em todas as linhas. A colheita foi efetuada manualmente, com identificação de espigas conforme a linha onde foi colhida e separação de espigas cruzadas por polinização manual de espigas cruzadas de forma natural com o indutor.

Para avaliação da indução de haploidia nas populações-fonte, de cada uma das sete linhas semeadas foi tomada uma espiga polinizada manualmente com pólen do indutor. Estas espigas foram separadas por linha, grupo heterótico e geração de endogamia para debulha e identificação de sementes haploides, diploides e com inibição da expressão do gene R1-nj. A eficiência da indução de haploidia foi avaliada com base nos seguintes parâmetros: i) total de sementes obtidas por espiga; ii) nº de sementes haploides, identificadas por presença de antocianina no endosperma e ausência de pigmentação no embrião; iii) nº de sementes diploides, identificadas pela presença de antocianina no endosperma e no embrião; iv) nº de sementes com inibição do gene R1-nj, identificadas

por ausência de pigmentação com antocianina em toda a semente; v) taxa de indução de haploidia (%) =  $(n^{\circ} \text{ de sementes haploides} / n^{\circ} \text{ total de sementes}) \times 100$ , e; vi) Expressão do gene R1-nj, dada pela razão entre o número de sementes com presença de antocianina e o número total de sementes.

Para análise dos dados obtidos, considerando a natureza dos dados coletados (contagem de sementes em diferentes categorias) e a ausência de delineamento formal para coleta dos dados, optou-se por utilizar estatísticas descritivas e métodos não paramétricos. Foram estimadas medidas de posição, frequência e de dispersão considerando cada grupo heterótico. A comparação da taxa de indução de haploidia entre as diferentes populações-fonte dos grupos Flint e Dent, nas gerações F1 e F2 foi realizada por meio do teste de Wilcoxon. O teste de Wilcoxon é o equivalente não paramétrico ao teste t para duas amostras, podendo ser utilizado para dados ordinais, e considera a existência de relação ou dependência entre as amostras, como no presente caso. Todas as análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software SAS (SAS Institute, 2000).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com exceção da expressão do gene R1-nj, para todas as características avaliadas observaram-se maiores valores de média para os genótipos do grupo heterótico Dent, em comparação com os genótipos do grupo Flint (Tabela 1). A ocorrência de valores iguais à zero com maior frequência, conforme indicado pelo parâmetro moda (Tabela 1), denota uma maior ocorrência de inibição da expressão do gene R1-nj nos genótipos do tipo Flint em comparação com o grupo Dent. Chaikam et al. (2015), avaliando a expressão do gene R1-nj em milho, observaram maior inibição deste gene em genótipos tropicais em comparação com germoplasma temperado, mas não observaram diferenciação em função do tipo de grão para este caráter.

Os maiores valores de desvio padrão foram observados para as características total de sementes, número de sementes diploides, número de sementes com inibição e expressão do gene R1-nj (Tabela 1). A maior dispersão dos dados para essas características pode ser devida a maior quantidade de sementes compondo a amostragem para estas características, fato corroborado pelos valores de limite superior obtidos para as mesmas (Tabela 1). Com exceção das características número de sementes diploides e expressão do gene R1-nj, os valores do limite superior para os genótipos do tipo Dent superaram o dobro do

observado para os genótipos do tipo Flint. Este resultado denota que para as populações-fonte em estudo, genótipos com grãos do tipo dentado teriam maior facilidade para expressar o gene R1-nj, o que facilitaria a identificação de haploides positivos.

As taxas de indução de haploidia variaram entre 5,24% para o grupo Flint e 8,01% para o grupo Dent, com valores máximos de indução de 51,25% (Tabela 1). Essa variação nas taxas de indução de haploidia está de acordo com o relatado por Prigge et al. (2012), avaliando o cruzamento destes mesmos indutores com germoplasma tropical, nas condições do México.

As taxas de indução de haploidia apresentaram diferenças significativas entre gerações somente para o genótipo 91500205 no grupo Flint, com redução da taxa de indução entre as gerações F1 e F2 (Figura 1). Para genótipos Dent, foi observada redução estatisticamente significativa do total de haploides entre F1 e F2 para o genótipo 91500215 e aumento estatisticamente significativo no número de haploides entre as gerações para os genótipos 91500216 e 91500219 (Figura 1).

O processo de indução de haploidia é influenciado por fatores como: características agrônomicas do indutor; sincronia de florescimento com as populações-fonte; forma de polinização (manual ou livre); condições climáticas e de manejo do campo, dentre outros. Tendo em vista que o processo de polinização foi efetuado manualmente, boa parte dos fatores interferentes na indução de haploidia são minimizados, restando principalmente interações relativas a constituição genética da população-fonte e a eficiência do indutor na geração de haploides positivos e identificáveis. Assim, pode-se inferir que a variação na identificação de sementes haploides observado em alguns genótipos avaliados com o avanço de gerações pode estar relacionada a segregação de genes para inibição da expressão de antocianina, mas também a uma maior propensão a indução de haploides nestas populações-fonte.

Tendo em vista que a indução de haploidia em milho pode ser efetuada em qualquer tipo de população, a prática mais utilizada tem sido a obtenção de linhagens a partir de híbridos F1, em que os parentais são devidamente selecionados de acordo com os interesses do programa. Contudo, Bernardo (2009) aponta que, em gerações segregantes, como F2 e S1, as possibilidades de recombinação de genes seriam maiores, o que compensaria o investimento de recursos em avanço de populações por gerações adicionais pela chance de se obter indivíduos com combinações superiores de genes. Porém, para adoção deste procedimento, é necessário averiguar se o avanço de gerações interfere na geração e identificação de haploides

positivos. Para as populações-fonte em estudo neste trabalho, observaram-se efeitos do avanço de gerações para alguns genótipos na identificação de haploides, mas é necessário ampliar este estudo para mais populações e locais de amostragem, a fim de se definir com segurança o efeito de endogamia na identificação de indivíduos haploides.

### CONCLUSÕES

Observaram-se maiores taxas de identificação de haploides em genótipos do grupo heterótico Dent, em comparação com genótipos do grupo Flint.

Houve diferenças significativas para taxa de indução de haploidia entre gerações para o genótipo 91500205 no grupo Flint, e para os genótipos 91500215, 91500216 e 91500219 no grupo heterótico Dent.

Não foi possível determinar um padrão de redução ou aumento das taxas de indução de haploides entre gerações, havendo variação em função da população-fonte em estudo, do grupo heterótico e avanço de gerações.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Embrapa Milho e Sorgo e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo financiamento a este trabalho (Processo 445607/2014-9).

### REFERÊNCIAS

BERNARDO, R. (2009). Should maize doubled haploids be induced among F1 or F2 plants? *Theoretical and Applied Genetics*, v. 119, p:255–262.

CHAIKAM V, NAIR SK, BABU R, MARTINEZ L, TEJOMURTULA J, BODDUPALLI PM (2015) 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. *Theor Appl Genet* 128:159–171

PRIGGE, V., W. SCHIPPRACK, G. MAHUKU, G.N. ATLIN, AND A.E. MELCHINGER (2012) Development of in vivo haploid inducers for tropical maize breeding programs. *Euphytica* 185:481–490

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

PRIGGE, V.; MELCHINGER, A.E. (2012). Production of haploids and doubled haploids in maize. *Plant cell culture protocols*, 3rd edition. Humana Press - Springer Verlag, Totowa, New Jersey.



## XXXI CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO

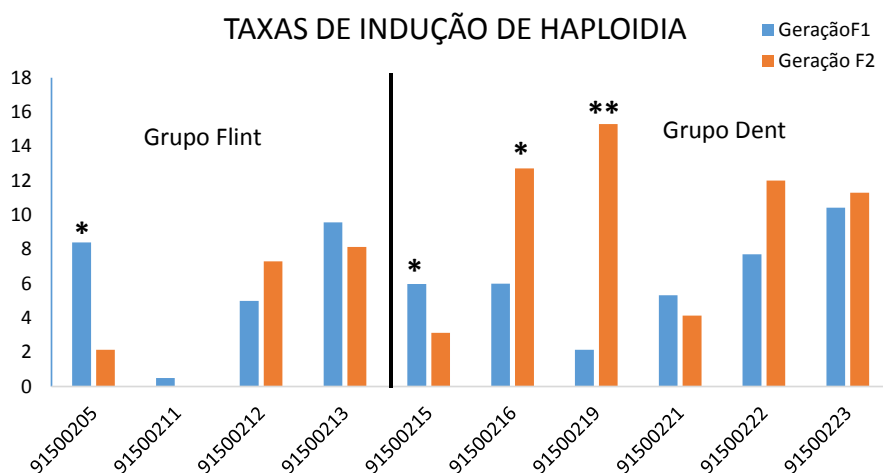
“Milho e Sorgo: inovações,  
mercados e segurança alimentar”

---

SAS Institute (2000) SAS STAT: user's guide. SAS  
Institute, Cary, 1028p.

**Tabela 1** – Estatísticas descritivas para seis características avaliadas em sementes de quatro progênies do grupo Flint e seis progênies do grupo Dent, em duas gerações de endogamia, cruzadas com indutores de haploidia tropicalizados. Sete Lagoas, setembro de 2015.

FLINT						
	Total de sementes por Espiga	Número de sementes Haploides	Número de sementes Diploides	Número de sementes com Inibição	Taxa de indução	Expressão do gene <i>R1nj</i>
Média	108,67	5,27	45,57	57,84	5,24	47,08
Mediana	84,00	3,00	33,00	38,00	3,57	48,58
Moda	102,00	0,00	0,00	80,00	0,00	0,00
Limite superior	329,00	32,00	205,00	256,00	21,43	97,06
Limite inferior	18,00	0,00	0,00	3,00	0,00	0,00
Desvio padrão	76,57	6,76	46,31	53,75	5,56	30,86
DENT						
	Total de sementes por Espiga	Número de sementes Haploides	Número de sementes Diploides	Número de sementes com Inibição	Taxa de indução	Expressão do gene <i>R1nj</i>
Média	199,63	13,89	73,68	112,06	8,01	46,74
Mediana	177,00	10,00	50,00	89,00	5,76	44,92
Moda	99,00	2,00	21,00	103,00	2,82	50,00
Limite superior	585,00	107,00	252,00	457,00	51,25	97,38
Limite inferior	20,00	0,00	0,00	5,00	0,00	1,37
Desvio padrão	143,64	15,36	64,74	110,11	8,05	25,58



**Figura 1** – Comparação entre médias nas gerações F1 e F2 para as taxas de indução de haploidia em sementes de quatro progênies do grupo Flint e seis progênies do grupo Dent cruzadas com indutores



de haploidia tropicalizados, em Sete Lagoas, setembro de 2015. \*, \*\* diferença significativa pelo teste de Wilcoxon para duas médias aos níveis de 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.