



**HAPLÓIDES ANDROGENÉTICOS EM MILHO
TROPICAL**

MARCELO RABEL

2008

MARCELO RABEL

HAPLÓIDES ANDROGENÉTICOS EM MILHO TROPICAL

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de "Mestre".

BIBLIOTECA CENTRAL

UFLA

Nº CLAS T633.153

RAB

hap

Nº REGISTRO 234089

DATA 16 07 2008

Orientador

Dr. Edilson Paiva

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2008

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos
da Biblioteca Central da UFLA**

Rabel, Marcelo.

Haplóides androgenéticos em milho tropical / Marcelo Rabel. – Lavras :
UFLA, 2008.

57 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: Edilson Paiva.

Bibliografia.

1. Milho. 2. Linhagem indutora de haploidia. 3. Haplóide
androgenético. 4. Gametófito indeterminado (*ig*). 5. Marcadores
moleculares SSR. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.153

MARCELO RABEL

HAPLÓIDES ANDROGENÉTICOS EM MILHO TROPICAL

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 7 de março de 2008

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva

UFLA

Dra. Claudia Teixeira Guimarães

Embrapa Milho e Sorgo



Dr. Edilson Paiva
Embrapa Milho e Sorgo
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

DEDICO

Aos meus pais, Celso Rabel e Neide Galliciani Rabel, por todo apoio e por estarem sempre ao meu lado, em todos os momentos da minha vida.
Amo vocês.

A minha esposa, Adriana, por todo o amor.

OFEREÇO

Aos meus pais Celso e Neide, a minha esposa, Adriana e a minha irmã,
Cristiane.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por todas as oportunidades.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, pela oportunidade.

À Embrapa Milho e Sorgo, pela possibilidade de desenvolver este trabalho.

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

Ao meu orientador, Dr. Edilson Paiva, pelos ensinamentos transmitidos, pela total liberdade, oportunidade e confiança.

Aos professores Luciano Vilela Paiva, Antônio Chalfun Junior e demais professores, pelo aprendizado e convivência amigável.

A todos os colegas do curso de Biotecnologia Vegetal, pela enriquecedora convivência.

À Dra. Claudia Teixeira Guimarães, pelos ensinamentos relacionados a marcadores moleculares.

Ao pesquisador Sidney Netto Parentoni, pelo fornecimento das linhagens utilizadas e informações relacionadas a elas.

Ao Dr. Paulo César Magalhães, pelas valiosas sugestões e fornecimento das áreas experimentais.

A toda equipe de pesquisadores do NBA da Embrapa Milho e Sorgo, pelo companheirismo e agradável convivência.

Aos amigos e colegas do NBA, Bira, Lili, Silvia, Edna, Célio, Fernando, Miguel, Nate, Martineli, Lívia, Ramon, Edgard, Carlos, Edmar, Denise e Raquel. Ao Miguel e ao Bira que, foram essenciais na realização dos trabalhos de laboratório.

Ao pessoal do galpão de melhoramento e campos experimentais, Fábio, Celso, Orlando e Rodrigo, pelo apoio nos trabalhos de campo.

À Dra. e amiga Elisa Serra Negra Vieira, pelo incentivo e apoio para a realização do mestrado.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1 O milho híbrido.....	4
2.2 Obtenção de linhagens endogâmicas.....	5
2.3 Gene gametófito indeterminado (<i>ig</i>) na indução de haplóides.....	8
2.4 Marcadores moleculares no melhoramento vegetal	10
2.4.1 Marcadores moleculares SSR	12
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
CAPÍTULO 1 - OBTENÇÃO DE LINHAGENS DE MILHO TROPICAL INDUTORAS DE HAPLOIDIA	19
RESUMO.....	20
ABSTRACT	21
1 INTRODUÇÃO	22
2 MATERIAL E MÉTODOS	24
2.1 Material genético.....	24
2.2 Obtenção do DNA genômico.....	26
2.3 Marcadores SSR na identificação de haplóides	27
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
3.1 Marcadores moleculares SSR na identificação de haplóides.....	31
4 CONCLUSÕES	36
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
CAPÍTULO 2 - INDUÇÃO DE HAPLÓIDES ANDROGENÉTICOS EM MILHO TROPICAL.....	39
RESUMO.....	40
ABSTRACT.....	41
1 INTRODUÇÃO	42
2 MATERIAL E MÉTODOS	44
2.1 Material genético.....	44
2.2 Marcadores SSR na identificação de haplóides	46
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
3.1 Seleção de prováveis haplóides pela coloração do coleóptilo.....	50
3.2 Marcadores moleculares SSR na identificação de haplóides.....	51
4 CONCLUSÕES	54
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXOS.....	56

RESUMO

RABEL, M. **Haplóides androgenéticos em milho tropical**. 2008. 57p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

O presente trabalho foi realizado com os objetivos de fazer a transferência do gene indutor de haploidia *ig* e do marcador *R1-nj* da linhagem temperada W23 para genótipos de milho tropicais e verificar a capacidade de indução de haploidia dessa linhagem em cruzamentos com 10 linhagens elite e um híbrido simples comercial da Embrapa Milho e Sorgo. Para atingir o primeiro objetivo, foram avaliadas seis famílias nas gerações F₂ e F₃ obtidas do cruzamento entre a linhagem W23 ♀ e o híbrido simples BRS1010 ♂. As plantas dessas famílias foram autofecundadas e cruzadas simultaneamente. O cruzamento foi realizado na primeira espiga com a linhagem elite L512388 e a autofecundação foi realizada na segunda espiga. As sementes obtidas dos cruzamentos foram separadas conforme o marcador morfológico indicador de haploidia R-navajo (endosperma roxo e embrião branco). O teste de identificação de haplóides foi realizado com marcadores moleculares microssatélites (SSR) previamente selecionados como polimórficos entre os parentais das famílias. Mil novecentas e quinze sementes foram selecionadas como possíveis haplóides pelo marcador morfológico R-navajo, as quais foram plantadas em campo. Das plantas geradas, 74 apresentaram tamanho reduzido, entre essas, quatro indivíduos, em uma das famílias, foram confirmados pelo marcador molecular SSR bnlg1828, como haplóides androgenéticos. Dois desses haplóides foram identificados em uma única espiga e os outros dois em espigas diferentes. As quatro plantas haplóides apresentaram tamanho reduzido, entretanto, algumas plantas diplóides também apresentaram fenótipo semelhante ao dos haplóides, o que demonstra que tanto o marcador morfológico R-navajo quanto o tamanho reduzido de plantas não foram eficientes na identificação precisa de indivíduos haplóides. O gene indutor *ig* e o marcador *R1-nj* foram transferidos para três genótipos tropicais, induzindo uma taxa de 0,4% a 0,6% de haplóides androgenéticos no cruzamento com a linhagem elite tropical L512388. Para atingir o segundo objetivo, a linhagem temperada indutora de haploidia W23♀, portadora dos genes indutor *ig* e marcador *R1-nj*, foi cruzada com as linhagens L228-3, L2842, L3, L37, L420, L514040, L57, L64, 98CIM-2-46, TR6DM-25 e com o híbrido simples BRS1010. As sementes obtidas de cinco espigas de cada cruzamento foram separadas conforme o marcador morfológico

* Comitê Orientador: Edilson Paiva – Embrapa Milho e Sorgo (Orientador)

indicador de haploidia R-navajo e germinadas em condições controladas. As plântulas que apresentaram coleóptilo verde foram selecionadas como prováveis haplóides e avaliadas com marcadores moleculares SSR previamente selecionados como polimórficos, entre os genitores. Nos cruzamentos realizados com as linhagens L2841, L37, L57, 98-CIM-2-46 e TR6DM-25, o gene *R1-nj* não expressou coloração no endosperma e nem no embrião. Nos outros cruzamentos, foi constatada coloração resultante da ação do gene *R1-nj* na maioria das sementes. A presença de indivíduos haplóides foi confirmada somente no cruzamento realizado com a linhagem L57, por meio do marcador molecular SSR phi026. Os marcadores morfológicos R-navajo e a coloração verde do coleóptilo não foram eficientes na identificação precisa dos indivíduos haplóides. A taxa reduzida de haplóides obtida pode estar relacionada com a baixa frequência do gene *ig* na linhagem indutora W23.

ABSTRACT

RABEL, M. **Androgenetic haploids in tropical maize**. 2008. 57p. Dissertation (Master in Vegetal Biotechnology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

The present work was carried out with the objectives of making the transfer of the *ig* haploid inducer gene and the *R1-nj* marker gene from the W23 temperate inbred line to tropical genotypes of maize as well as to check the haploid inducing capacity from this line in crossings with 10 elite inbred lines and a simple commercial maize hybrids from the Embrapa Maize and Sorghum breeding program. To reach the first objective six families in the F2 and F3 generations, obtained from the cross between the W23 ♀ inbred line and the simple hybrid BRS1010 ♂ were evaluated. The plants from these families were selfed and crossed simultaneously. The cross was made in the first ear with the L512388 elite inbred line and the selfing was performed in the second ear. The resulting seeds from the crosses were selected according to the R-navajo haploids morphological marker indicator (purple-colored endosperm and white embryo). The haploids identification test was carried out with microsatellite molecular markers (SSR) previously selected as polymorphic among the crossing parents of the families. One thousand nine hundred and fifteen seeds were selected as putative haploids by the R-navajo morphologic marker and were planted in field. From the generated plants, 74 showed reduced size, among these ones, four individuals in one of the families were confirmed by the SSR bnlgl228 molecular marker as androgenetic haploids. Two of these haploids were identified in the same ear and the other ones in different ears. The four haploid plants showed reduced size, nevertheless, diploid plants also showed a similar phenotype as that found in the haploid ones, which shows that the R-navajo morphological marker as well the reduced size of the plants were not effective in the identification of haploid individuals. The *ig* inducing gene and the *R1-nj* marker were transferred to three tropical genotypes inducing a 0,4% - 0,6% level of androgenetic haploids in the cross with the L512388 tropical inbred line. To reach the second objective, the W23 ♀ temperate line haploid inducer, bearer of the of the *ig* inducer and *R1-nj* marker genes, was crossed with the L228-3, L3, L37, L420, L514040, L57, L64, 98CIM-2-46, TR6DM-25 lines and the simple hybrid BRS1010. The resulting seeds from five ears in each cross were selected according to the R-navajo morphological marker haploid indicator and germinated under controlled conditions. The seedlings that presented green-colored coleoptiles were selected as putative haploids and evaluated with SSR molecular markers, previously selected as polymorphic

* Adviser: Edilson Paiva – Embrapa Milho e Sorgo

among the crossing parents. In the crosses made with the L2841, L37, L57, 98CIM-2-46 and TR6DM-25, the *R1-nj* gene did not express its purple pigmentation neither in the endosperm nor in the embryo. There was resulting coloring from the action of the *R1-nj* gene in most seeds of the other crosses. The presence of haploid individuals was confirmed through the SSR phi026 molecular marker only in the cross made with the L57 inbred line. The R-navajo morphological expression and the green color in the coleoptiles markers were not effective in the precise identification of haploid individuals. The reduced haploid level obtained may be linked to the low frequency of the *ig* gene in the W23 inducing inbred line.

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os melhoristas de plantas têm, entre os seus principais objetivos, o aumento de produtividade das culturas. Nessa busca, uma das metodologias mais utilizadas é o emprego da superioridade dos genótipos heterozigóticos em relação aos demais, ou seja, o aproveitamento do vigor híbrido.

A cultura do milho exemplifica bem este fato. A partir da descoberta do milho híbrido, no início do século, sua adoção pelos agricultores americanos foi bastante rápida, sendo atualmente plantado em praticamente 100% das áreas cultivadas com milho. O ganho em produtividade obtido com a substituição das variedades tradicionais pelos híbridos nos EUA foi extraordinário (Hallauer, 1990). No Brasil, segundo país a adotar híbridos de milho, a história é a mesma (Paterniani & Campos, 1999).

A despeito do grande sucesso no emprego dos híbridos, algumas etapas de sua obtenção são bastante onerosas. O processo tradicional de produção de híbridos envolve a geração de linhagens endogâmicas, em que são realizadas autofecundações sucessivas. Uma alternativa disponível para a cultura do milho é a técnica de obtenção de linhagens homozigóticas instantâneas, pelo uso de haplóides duplicados (duplo-haplóides). Kermicle (1969) relatou a ocorrência de uma mutação espontânea que ele chamou de gametófito indeterminado (*ig*), na linhagem temperada Wisconsin-23 (W23). Os haplóides gerados por influência deste alelo *ig* são de origem paterna, ou seja, são androgenéticos. No processo de fecundação ocorre degeneração do núcleo do óvulo e o núcleo espermático inicia o processo de divisão celular, no citoplasma da célula ovo, formando um embrião haplóide.

A tecnologia de haplóides duplicados tem sido estudada, pois ela representa uma forma de reduzir o tempo de obtenção de linhagens endogâmicas

em duas a três vezes em relação aos métodos tradicionais. Além do ganho de tempo, outra vantagem significativa é a necessidade de menor área experimental nos campos de melhoramento e, conseqüentemente, uma economia de recursos. Com a utilização desta tecnologia, é possível garantir a pureza genética das linhagens desenvolvidas, uma vez que todas as plantas geradas são obtidas de uma única semente haplóide duplicada (linha pura), o que proporciona um ganho significativo na qualidade das avaliações iniciais dos híbridos.

A identificação dos haplóides e duplo-haplóides é um processo fundamental. Esta pode ser realizada por meio de marcadores morfológicos de coloração, na semente e, nas plantas, por apresentarem menor vigor. Contudo, esses marcadores são fortemente afetados pelo ambiente. Os marcadores moleculares microssatélites (SSR) apresentam-se como uma importante alternativa para a identificação exata de haplóides, uma vez que são co-dominantes, podendo separar o homocigoto do heterocigoto. A técnica de microssatélite é caracterizada pela simplicidade, rapidez e precisão na geração dos perfis genéticos, além de requerer pequena quantidade de DNA. Para o milho, já existe elevado número de marcadores moleculares SSR, não havendo necessidade de altos investimentos para utilizar esta técnica.

A linhagem W23 induz haplóides androgenéticos nas condições tropicais de cultivo, mas ela é susceptível ao ataque de doenças, mostrando sensibilidade ao calor e ao fotoperíodo. Por este motivo, a produção de sementes a partir desta linhagem torna-se um fator limitante na produção de haplóides androgenéticos (Belicuas et al., 2007). Os resultados comprovam que é viável produzir haplóides por meio de linhagens indutoras, nas condições tropicais, contudo, a solução para estes problemas seria a transferência do gene indutor *ig* e do gene marcador *R1-nj* um genótipo adaptado às condições tropicais de cultivo.

Assim, o presente trabalho foi realizado com os seguintes objetivos: fazer a transferência do gene indutor de haploidia *ig* e marcador *R1-nj* da linhagem temperada W23 para genótipos de milho tropicais e verificar a capacidade de indução de haploidia dessa linhagem em cruzamentos com 10 linhagens elite e um híbrido simples comercial do programa de melhoramento de milho da Embrapa Milho e Sorgo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O milho híbrido

O milho híbrido ocupa lugar de destaque entre as contribuições da ciência para a sociedade, tendo sido responsável por expressivos aumentos na produtividade dessa importante cultura em todo o mundo. A superioridade dos genótipos heterozigotos em relação aos demais foi descoberta, na cultura do milho, no início do século XX. A partir de então, vários estudos foram conduzidos, viabilizando a produção e a utilização comercial de sementes híbridas de milho (Sprague & Dudley, 1988; Hallauer, 1990).

Nos EUA, onde existe o maior número de relatos sobre a estimativa da contribuição dos híbridos para a cultura do milho, o aumento de produção observado foi extraordinário, passando de 25 milhões de toneladas, em 1870, para 75 milhões, em 1906 e alcançando cerca de 150 milhões de toneladas, já em 1976. No final da década de 1990, os EUA produziram mais de 220 milhões de toneladas de milho, gerando renda anual de 20 bilhões de dólares (Troyer & Mascia, 1999). Hoje a produção americana já passa de 280 milhões de toneladas.

Em termos de produtividade, a média americana, antes de 1930, era de, aproximadamente, 2.000 kg/ha, passando para cerca de 6.200 kg/ha, nos 50 anos seguintes. Desse aumento, 58% foi devido ao melhoramento genético do milho (Cardwell, 1982). No Brasil, os resultados a respeito da contribuição do melhoramento genético do milho não são menos expressivos, mostrando ganhos superiores a 1% ao ano (Fernandes & Franzon, 1997; Arias & Ramalho, 1998).

A despeito do grande sucesso no emprego dos híbridos, algumas etapas de sua obtenção são bastante trabalhosas e onerosas, podendo, em alguns casos, inviabilizar o seu emprego, especialmente no caso de pequenas empresas. Inicialmente, é preciso enfatizar que, em uma população de plantas alógamas, como é o caso do milho, todos os indivíduos são híbridos, pois são oriundos da

união ao acaso de dois gametas diferentes. Assim, se for medida a produção de cada planta, isto é, dos diferentes híbridos, tem-se uma distribuição normal. A idéia é perpetuar as combinações que se situam na extremidade direita da distribuição. Para esta perpetuação, uma possibilidade seria a utilização da propagação vegetativa. Entretanto, no caso específico do milho, não é uma opção viável, em virtude do grande número de plantas requeridas por área a ser cultivada. Desse modo, uma alternativa é produzir linhagens endogâmicas complementares que permitam a produção contínua da combinação híbrida desejada (Belicuas, 2004).

2.2 Obtenção de linhagens endogâmicas

O sucesso dos programas de melhoramento de milho depende do desenvolvimento de linhagens endogâmicas elites utilizadas para a obtenção de híbridos com alto desempenho produtivo. Para a obtenção dessas linhagens, vários métodos podem ser empregados (Miranda Filho & Viégas, 1987).

O método mais utilizado é o denominado padrão, e os demais são variações deste (Paterniani & Campos, 1999). Nesse método, são realizadas sucessivas autofecundações na população fonte de linhagens, os descendentes de cada planta são semeados em linhas, formando famílias e selecionam-se individualmente as melhores famílias e os melhores indivíduos, dentro de cada família, para serem novamente autofecundados. O processo se repete até que a homozigose virtualmente completa seja atingida em S_6 ou em gerações mais avançadas de autofecundações.

Outro método bastante empregado é o da cova única, sugerido em 1934, nos Estados Unidos. Esse método difere do padrão pelo fato de cada progênie ser representada por uma única cova com três plantas, em vez de uma linha com várias plantas. A vantagem consiste na redução de área plantada, permitindo aumentar o número de progênies a serem avaliadas, aplicando-se uma maior

intensidade de seleção. Outro método utilizado é o genealógico, empregado nos casos em que a seleção é efetuada dentro de uma população derivada de duas linhagens previamente selecionadas, de acordo com a capacidade combinatória, seguida da aplicação do método padrão.

O híbrido crítico é um método que consiste na avaliação de famílias de irmãos germanos, obtidos pelo cruzamento entre plantas prolíficas e não endogâmicas. Simultaneamente ao cruzamento, a segunda espiga é autofecundada. As famílias de irmãos germanos são avaliadas em ensaios com repetição, para identificar os melhores cruzamentos. As progêneses S_1 correspondentes às melhores combinações são plantadas aos pares e cruzadas para se obter a nova geração. Esse processo é repetido até que se obtenha a homozigose desejada nas linhagens a serem usadas na síntese de híbridos.

Uma alternativa disponível para a cultura do milho é a técnica de obtenção de linhagens homozigóticas instantâneas, pelo uso de haplóides duplicados (duplo-haplóides). A duplicação dos haplóides baseia-se, normalmente, na utilização de inibidores mitóticos, como a colchicina (Eder & Chalyk, 2002). A tecnologia de haplóides duplicados tem sido estudada, pois ela representa uma forma de reduzir o tempo na obtenção de linhagens, em duas a três vezes, em relação aos métodos tradicionais. Além do ganho de tempo, outra vantagem significativa é a necessidade de menor área experimental nos campos de melhoramento e, conseqüentemente, uma economia de recursos. Com a utilização desta tecnologia é possível garantir a pureza genética das linhagens desenvolvidas, uma vez que todas as plantas geradas são obtidas de uma única semente haplóide duplicada (linha pura), o que proporciona um ganho significativo na qualidade das avaliações iniciais dos híbridos (Milach, 2007).

Os haplóides em milho ocorrem naturalmente a uma taxa menor que um para cada mil sementes formadas (Chase, 1963), contudo, alguns métodos podem ser utilizados para aumentar essa freqüência. Um desses métodos baseia-

se no uso de linhagens indutoras, que podem gerar haplóides maternos ou paternos, dependendo do tipo de linhagem indutora empregada.

A maioria das linhagens indutoras de haploidia conhecidas atualmente é derivada de duas linhagens temperadas, a Stock 6, que gera haplóides de origem materna, gimnogenéticos (Coe, 1959) e a W23, que gera haplóides de origem paterna, ou seja, androgenéticos (Kermicle, 1969). Para a identificação prévia dos haplóides, é utilizado o marcador morfológico dominante do sistema R-navajo (*RI-nj*), gene que promove a pigmentação com antocianina no endosperma e no embrião (Figura 1A), nas sementes diplóides. Nas sementes haplóides, a pigmentação está presente somente no endosperma (Figura 1B), ficando essas com o embrião branco (Nanda & Chase, 1966). O endosperma é formado por um tecido triplóide, sendo um conjunto haplóide do parental masculino e dois do parental feminino. O embrião é formado por um tecido diplóide. Como o marcador morfológico R-navajo é dominante em um cruzamento, ele será expresso no endosperma e, no caso de um embrião haplóide, o marcador não será expresso, pois o embrião não contém o genoma da linhagem indutora que carrega o alelo marcador (Nanda & Chase, 1966).

Alguns estudos foram realizados para se obter linhagens capazes de induzir haploidia em taxas maiores, entre eles os de Shatskaya et al. (1994), Deimling, et al. (1997), Chalyk (1999) e Eder & Chalyk (2002). Estes autores relatam ter conseguido linhagens que induzem até 10% de haplóides, porém, com grande variação de acordo com o genótipo empregado. Por meio de uma modificação na linhagem W23, Kindiger & Hamann (1993) aumentaram a frequência de indução de haplóides para até 8%.

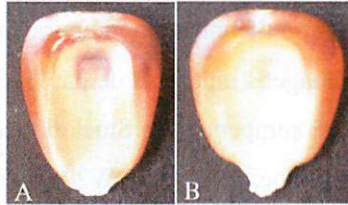


FIGURA 1. Padrão de coloração do marcador morfológico controlado pelo sistema R-navajo (*R1-nj*). (A) endosperma e embrião roxo (B) endosperma roxo e embrião branco, indicando haploidia.

2.3 Gene gametófito indeterminado (*ig*) na indução de haplóides

Kermicle (1969) relatou uma mutação espontânea na linhagem W23, que ele chamou de gametófito indeterminado (*ig*). Os haplóides gerados por influência deste alelo *ig* são de origem paterna, ou seja, são androgenéticos. Esse gene está localizado no braço longo do cromossomo três (Kermicle & Demopulos-Rodriguez, 1980) e é responsável por algumas alterações no desenvolvimento do saco embrionário.

Em uma megasporogênese normal, ocorrem três mitoses sucessivas, resultando em um órgão reprodutivo com oito núcleos chamado de saco embrionário. Sob ação do gene *ig*, algumas megasporogêneses sofrem quatro ou mais mitoses, resultando em um saco embrionário com dezesseis núcleos ou mais, em vez de oito núcleos observados normalmente (Lin, 1981). Outro efeito causado pelo gene *ig*, e que pode estar relacionado com a ocorrência de haplóides androgenéticos, é a degeneração de 31% dos núcleos polares e dos núcleos da região micropilar, que inclui as oosferas (Lin, 1981).

O mutante *ig* não condiciona um processo em particular. Sua interferência ocorre anteriormente à formação do saco embrionário e altera a atividade de outros genes durante a formação deste. Portanto, seus efeitos parecem ser independentes, não tendo relações uns com os outros (Lin, 1981; Huang & Sheridan, 1996).

Huang & Sheridan (1996), utilizando microscopia eletrônica de transmissão, relataram que a divisão dos núcleos na formação do saco embrionário sob a ação do *ig* é assíncrona e confirmaram o resultado que indica a ocorrência, em alguns casos, de divisões além da terceira mitose. Essas mitoses adicionais causam modificação no nível de ploidia do endosperma em desenvolvimento, confirmando a observação feita por Kermicle (1971). Este último autor também já tinha relatado o elevado nível de ploidia com a formação de endospermas defeituosos.

Como conseqüência do comportamento anormal durante a divisão dos núcleos e de migrações desordenadas destes dentro do saco embrionário, as células da região micropilar mostram grande similaridade, ficando as sinérgidas e as oosferas indistinguíveis em dois terços dos sacos embrionários sob a ação do *ig* (Huang & Sheridan, 1996). Entre as várias células dessa região, a maioria funciona como sinérgida na recuperação do tubo polínico e do gameta masculino, porém, uma ou mais células da região micropilar podem ter a função de oosfera (Huang & Sheridan, 1996), resultando em mais de 6% de casos de poliembriõnia (Kermicle, 1969). Embora essas células micropilares percam a estrutura característica que distinguem em sinérgidas de oosferas, elas, aparentemente, podem funcionar como ambos os tipos de células (Huang & Sheridan, 1996). A formação de sementes poliembriônicas e com endospermas defeituosos sofre influência apenas da constituição *ig* do parental feminino (Kermicle, 1971).

A formação de sacos embrionários sob a ação do gene *ig* tem sido alvo de amplos estudos, contudo, existe pouca informação sobre o mecanismo de indução de haplóides androgenéticos sob o efeito desse gene. Kindiger & Hamann (1993) acreditam que ocorre degeneração da oosfera e o conseqüente desenvolvimento do núcleo espermático do grão de pólen no citoplasma da

célula ovo, formando, assim, um embrião haplóide androgenético, porém, ainda não há estudo aprofundado a esse respeito.

A linhagem W23 produz cerca de 1% a 3% de grãos haplóides (Kermicle, 1969), o que, teoricamente, resulta em 2 a 6 haplóides numa espiga contendo 200 grãos. Em condições tropicais de cultivo, Belicuas et al. (2007) relataram que esta linhagem produz haplóides androgenéticos, mas é susceptível ao ataque de doenças e sensível ao calor e ao fotoperíodo. Diante dessas condições, a produção de sementes torna-se um fator limitante na produção de haplóides androgenéticos. Esses resultados comprovam que é viável gerar haplóides por meio de linhagens indutoras, contudo, a solução para estes problemas seria a transferência do gene *ig* e do gene marcador *R1-nj* para um genótipo adaptado às condições tropicais de cultivo.

Nos últimos anos, de forma independente, grandes companhias multinacionais, produtoras de sementes híbridas de milho, como a Pioneer, estão aperfeiçoando esta tecnologia de produção de linhagens duplo-haplóides, utilizando-as em seus programas de melhoramento genético (Milach, 2007).

2.4 Marcadores moleculares no melhoramento vegetal

O melhoramento vegetal pode contar, atualmente, com o auxílio dos marcadores moleculares, os quais constituem uma importante ferramenta que fornece grande quantidade de polimorfismo e não são afetados pelos efeitos ambientais e nem pelo estágio de desenvolvimento da planta. Assim, permite a identificação precoce e precisa das características de interesse. Esses marcadores são utilizados em análises genéticas com as mais diversas finalidades, tais como avaliação da diversidade genética, proteção de cultivares, pureza genética, seleção de genótipos em programas de melhoramento e construção de mapas genéticos (Lanza et al., 2000).

Para Milach (1998), os marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, os de hibridação e os de amplificação do DNA. Entre os identificados por hibridação estão *Restriction fragment length polymorphism* (RFLP) e minissatélites ou locos *Variable number of tandem repeats* (VNTR). Já os revelados por amplificação incluem os marcadores tipo *Random amplified of polymorphic DNA* (RAPD), *Sequence characterized amplified regions* (SCAR), *Sequence tagged sites* (STS) ou *Amplified specific amplifcon* (ASA), microssatélites ou *Simple sequence repeats* (SSR) e *Amplified fragment length polymorphism* (AFLP).

O primeiro marcador de DNA utilizado em plantas foi o RFLP. O polimorfismo é obtido por diferenças no tamanho molecular dos fragmentos de DNA genômico digeridos com enzimas de restrição e observado por hibridização destes fragmentos com seqüências homólogas de DNA marcadas com radioatividade ou com compostos que desencadeiam uma reação de luminescência (Ferreira & Grattapaglia, 1998). O polimorfismo obtido com esse marcador deve-se a mutações nos sítios de restrição, tais como inserções, deleções e substituições de bases (Beckman & Soller, 1986).

Um grande impulso para a biologia molecular foi dado em meados da década de 1980, quando Karl Mullis divulgou a técnica denominada *Polymerase chain reaction* (PCR). Essa técnica envolve a síntese in vitro de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. A reação baseia-se no anelamento e na extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos utilizados como iniciadores (*primers*), que delimitam a seqüência de DNA alvo da amplificação. Os *primers* são pequenas moléculas de DNA de fita simples sintetizadas artificialmente, de maneira que suas seqüências de nucleotídeos sejam complementares às seqüências específicas que flanqueiam a região alvo (Ferreira & Grattapaglia, 1998). A partir daí, várias foram as técnicas de marcadores moleculares derivadas da PCR, permitindo avanços significativos

das pesquisas nas áreas de genética e de biologia molecular. Dentre essas técnicas, pode ser destacada a de SSR e AFLP que, segundo McGregor et al. (2000), são caracterizadas pela confiabilidade, precisão e reprodutibilidade em prover um perfil genético molecular detalhado, além de apresentarem a possibilidade de automação.

2.4.1 Marcadores moleculares SSR

Os SSR são seqüências curtas de um a seis nucleotídeos repetidos de 10 a 60 vezes em *tandem* ao longo da molécula de DNA (Rafalski et al., 1996). As seqüências de DNA que flanqueiam os microssatélites são, geralmente, conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie (Caixeta et al., 2006).

A identificação dos SSR é um processo trabalhoso e de elevado custo, envolvendo a construção de bibliotecas genômicas, a seleção de clones contendo os microssatélites, o seqüenciamento em larga escala desses clones, o desenho dos *primers* específicos e a sua confirmação por PCR (Rafalski et al., 1996). Para o milho, um grande número de seqüências de *primers* SSR encontra-se publicamente disponível no *Maize Genome Database* (www.maizgdb.org/SSR), estando bem caracterizados e mapeados ao longo de todo o genoma do milho, não havendo a necessidade de altos investimentos para utilizar esta técnica.

Os marcadores SSR caracterizam-se por serem co-dominantes, podendo distinguir o homocigoto do heterocigoto. Mesmo em genótipos de milho simples, que possuem base genética estreita, esses podem detectar alto número de alelos por loco. Vários trabalhos têm apresentado a aplicação desses marcadores na caracterização e no monitoramento da pureza genética em sementes (Salgado, 2001; Padilha, 2002). Outra vantagem dos microssatélites é que eles requerem uma pequena quantidade de DNA e o mesmo pode ser extraído de qualquer material biológico, sementes ou plântulas em diferentes

fases de desenvolvimento, permitindo uma avaliação precoce de lotes de sementes (Buso et al., 2003).

No processo de manutenção do estoque de linhagens elite de milho, utilizadas nos programas de melhoramento, é necessário que essas linhagens sejam mantidas com elevado grau de homozigose e de pureza. Da mesma forma, os marcadores SSR permitem monitorar o nível de homozigose das linhagens e acelerar o processo de obtenção das mesmas, identificando os indivíduos que apresentam maior número de locos em homozigose (Senior et al., 1998; Prasad et al., 2000; Gethi et al., 2002; Padilha, 2002). Uma vez identificada heterozigosidade residual em uma linhagem, elas podem ser submetidas a um avanço na geração de autofecundação, a partir de indivíduos que apresentem níveis elevados de homozigose entre os locos avaliados. A combinação de um conjunto de locos microssatélites permite o acompanhamento do nível de homozigose dessas linhagens.

Adaptação e incorporação da tecnologia de marcadores microssatélites às atividades do programa de melhoramento são estratégias precisas e eficientes que podem ser utilizadas para garantir elevados padrões de pureza genética das linhagens elite e das sementes híbridas de milho. Além das características fenotípicas, o melhorista terá acesso às informações sobre a variabilidade genética, diretamente do DNA, sendo um grande diferencial na seleção de plantas que serão utilizadas como fonte das sementes genéticas. Por exemplo, Vaz Patto et al. (2004) utilizaram marcadores SSR em seu trabalho, com o objetivo de estudar a diversidade do germoplasma de milhos portugueses para formar grupos heteróticos e, posteriormente, promover cruzamentos entre populações mais divergentes.

Smith et al. (1997), ao avaliarem 131 locos SSR em 13 conjuntos de parentais e seus respectivos híbridos de milho, observaram a incidência de somente 2,2% desses locos com herança não mendeliana, ou seja, ausência de

uma banda parental ou presença de uma banda não parental presente no híbrido. Os marcadores SSR são úteis na detecção da heterozigosidade de um loco específico, que é importante no acompanhamento da pureza genética.

Belicuas et al. (2007), utilizando marcadores SSR, identificaram haplóides em milho, sendo posteriormente confirmado o potencial desta técnica por meio de contagem cromossômica e citometria de fluxo.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARIAS, E.R.A.; RAMALHO, M.A.P. Maize genetic progress in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil, from 1986/87 to 1993/94. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.33, n.9, p.1549-1554, 1998.

BECKMAN, J.S.; SOLLER, M. Restriction fragment length polymorphism in plant genetic improvement. **Oxford Surveys of Plant Molecular; Cell Biology**, Oxford, v.3, p.196-250, 1986.

BELICUAS, P.R. **Obtenção, identificação e caracterização de haplóides androgenéticos em milho**. 2004. 52p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica/ Agrobioquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BELICUAS, P.R.; GUIMARÃES, C.T.; PAIVA, L.V.; DUARTE, J.M.; MALUF, W.R.; PAIVA, E. Androgenetic haploids and SSR markers as tools for the development of tropical maize hybrids. **Euphytica**, v.156, p.95-102, 2007.

BUSO, G.S.C.; CIAMPI, A.Y.; AMARAL, Z.P.S.; BRONDONI, R.V. Desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites em espécies vegetais tropicais. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v.30, p.46-50, Jan./Jun. 2003.

CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG: UFV, 2006. Cap. 1, p.9-78.

CARDWELL, V.B. Fifty years of Minnesota corns production: sources of yield increase. **Agronomy Journal**, Madison, v.74, n.6, p.984-990, Nov. 1982.

CHALYK, S.T. Creating new haploid – inducing lines of maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v.73, 1999.

CHASE, S.S. Monoploids and monoploids derivatives of maize (*Zea mays* L.). **The Botanical Review**; interpreting botanical progress, New York, v.35, p.117-167, 1963.

COE, E.H. A line of maize with high haploid frequency. **The American Naturalist**, Chicago, v.93, p.381-382, 1959.

DEIMLING, S.; ROBER, F.; GEIGER, H.H. Methodik und genetik der in-vivo haploideninduktion bei mais. **Vortr Pflanzenzüchtung**, v.38, p.203-204, 1997.

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

FERNANDES, J.S.C.; FRANZON, J.F. Thirty years of genetic progress in maize (*Zea mays* L.) in a tropical environment. **Maydica**, Bergamo, v.42, n.1, p.21-27, 1997.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.

GETHI, J.G.; LABATE, J.A.; LAMKEY, K.R.; SMITH, M.E.; KRESOVICH, S. SSR variation in important U. S. maize inbred lines. **Crop Science**, Madison, v.42, n.4, p.952-957, July/Aug. 2002.

HALLAUER, A.R. Methods used in developing maize inbred lines. **Maydica**, Bergamo, v.35, n.1, p.1-16, 1990.

HUANG B.; SHERIDAN, W.F. Embryo sac development in the maize *indeterminate gametophyte 1* mutant: abnormal nuclear behavior and defective microtubule organization. **The Plant Cell**, Rockville, v.8, p.1391-1407, 1996.

KERMICLE, J.L. Androgenesis conditioned by a mutation in maize. **Science**, Washington, v.166, p.1422-1424, 1969.

KERMICLE, J.L. Pleiotropic effects on seed development of the indeterminate gametophyte gene in maize. **American Journal of Botany**, Baltimore, v.58, n.1, p.1-7, 1971.

KERMICLE, J.L.; DEMOPULOS-RODRIGUEZ, J. Location of *indeterminate gametophyte (ig)* on chromosome 3. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v.54, p.84-85, 1980.

KINDIGER, B.; HAMANN, S. Generation of haploids in maize: a modification of the indeterminate gametophyte (*ig*) system. **Crop Science**, Madison, v.33, p.342-344, 1993.

LANZA, M.A.; GUIMARÃES, C.T.; SCHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.21, n.204, p.97-108, 2000.

LIN, B. Megagametogenetic alterations associated with the indeterminate gametophyte (*ig*) mutation in maize. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v.41, n.3, p.557-563, 1981.

McGREGOR, C.E.; LAMBERT, C.A.; GREYLING, M.M.; LOUW, J.H.; WARNICH, L. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germoplasm. **Euphytica**, Dordrecht, v.113, n.2, p.135-144, 2000.

MILACH, S.C.K. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: MILACH, S.C.K. (Ed.). **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p.17-28.

MILACK, S.C.K. O melhoramento de milho. **Informativo Pioneer**, Santa Cruz do Sul, RS, n.25, p.16-17, 2007.

MIRANDA FILHO, J.B.; VIÉGAS, G.P. Milho híbrido. In: PATERNIANI, E.; VIÉGAS, G.P. **Melhoramento e produção do milho**. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p.277-340.

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

PADILHA, L. **Marcadores moleculares semi-automatizados na caracterização e determinação da diversidade genética entre linhagens de milho tropical**. 2002. 85p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PATERNIANI, E.; CAMPOS, M.S. Melhoramento do milho. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. P.429-486.

PRASAD, M.; VARSHNEY, R.K.; ROY, J.K.; BALYA, H.S.; GUPTA, P.K. The use of microsatellites for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.100, n.3/4, p.584-592, 2000.

RAFALSKI, D.J.A.; VOGEL, J.M.; MORGANTE, M.; POWELL, W.; ANDRE, C.; TINGEY, S.V. Generating and using DNA markers in plants. In: BIRREN, B.; LAI, E. **Nonmammalian genomic analysis: a practical guide**. New York: 1996. p.75-134.

SALGADO, K.C.C. **Certificação da pureza genética em sementes híbridas de milho por meio de marcadores morfológicos e moleculares**. 2001. 67p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SENIOR, M.L.; MURPHY, J.P.; GOODMAN, M.M.; STUBER, C.W. Utility of SSRs for determining genetic similarities and relationship in maize using an agarose gel system. **Crop Science**, Madison, v.38, n.4, p.1088-1098, July/Aug. 1998.

SHATSKAYA, O.A.; ZABIROVA, E.R.; SHCHERBAK, V.S.; CHUMAK, M.V. Mass induction of maternal haploids in corn. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v.68, p.51, 1994.

SMITH, J.S.C.; CHIN, E.C.L.; SHU, H.; SMITH, O.S.; WALL, S.J.; SENIOR, M.L.; MITCHEL, S.E.; KRESOVICH, S.; ZIEGLE, J. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparisons with data from RFLPs and pedigree. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.95, n.1/2. p.163-173, 1997.

SPRAGUE, G.F.; DUDLEY, J.W. **Corn and corn improvement**. Madison: American Society of Agronomy, 1988. 986p.

TROYER, A.F.; MASCIA, P.N. Key technologies impacting corn genetic improvement – past, present and future. **Maydica**, Bergamo, v.44, n.1, p.55-68, 1999.

VAZ PATTO, M.C.; SATOVIC, Z.; PEGO, S.; FEVEREIRO, P. Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germplasm using microsatellite markers. **Euphytica**, Dordrecht, v.137, n.1, p.63-72, 2004.

CAPÍTULO 1

OBTENÇÃO DE LINHAGENS DE MILHO TROPICAL INDUTORAS DE HAPLOIDIA

RESUMO

RABEL, M. Obtenção de linhagens de milho tropical indutoras de haploidia. In: _____. **Haplóides androgenéticos em milho tropical**. 2008. Cap.1, p.19-38. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

O processo tradicional de obtenção de híbridos de milho envolve a geração de linhagens endogâmicas que são obtidas por autofecundações sucessivas. Uma alternativa disponível para este processo na cultura do milho é a técnica de obtenção de linhagens homocigotas instantâneas pelo uso de haplóides duplicados. Esses haplóides são obtidos por meio de linhagens indutoras de haploidia, contudo, estas linhagens não são adaptadas às condições tropicais de cultivo, como é o caso da linhagem temperada W23. Com o objetivo de fazer a transferência do gene indutor de haploidia *ig* e do marcador *RI-nj* da linhagem W23 para genótipos de milho tropicais, foram avaliadas seis famílias nas gerações F₂ e F₃ obtidas do cruzamento entre a linhagem W23 ♀ e o híbrido simples BRS1010 ♂. As plantas dessas famílias foram autofecundadas e cruzadas simultaneamente. O cruzamento foi realizado na primeira espiga com a linhagem elite L512388 e a autofecundação foi realizada na segunda espiga. As sementes obtidas dos cruzamentos foram separadas conforme o marcador morfológico indicador de haploidia R-navajo (endosperma roxo e embrião branco). O teste de identificação de haplóides foi realizado com marcadores moleculares microssatélites (SSR) previamente selecionados como polimórficos entre os parentais das famílias. Mil novecentos e quinze sementes foram selecionadas como possíveis haplóides pelo marcador morfológico R-navajo, as quais foram plantadas em campo. Das plantas geradas, 74 apresentaram tamanho reduzido, entre essas, quatro indivíduos, em uma das famílias, foram confirmados pelo marcador molecular SSR *bnlg1828*, como haplóides androgenéticos. Dois desses haplóides foram identificados em uma única espiga e os outros dois em espigas diferentes. As quatro plantas haplóides apresentaram tamanho reduzido, entretanto, algumas plantas diplóides também apresentaram fenótipo semelhante ao dos haplóides, o que demonstra que tanto o marcador morfológico R-navajo quanto o tamanho reduzido de plantas não foram eficientes na identificação precisa de indivíduos haplóides. Os genes indutor *ig* e marcador *RI-nj* foram transferidos para três genótipos tropicais, induzindo uma taxa de 0,4% a 0,6% de haplóides androgenéticos no cruzamento com a linhagem elite tropical L512388.

* Comitê Orientador: Edilson Paiva – Embrapa Milho e Sorgo (Orientador)

ABSTRACT

RABEL, M. Production of haploid inducing tropical maize inbred lines. In: _____. **Androgenetic haploids in tropical maize**. 2008. Cap.1, p.19-38. Dissertation (Master in Vegetal Biotechnology) - Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

The traditional process of obtaining maize hybrids involves the generation of inbred lines through successive generations of selfing. An available alternative to this process in the maize culture is the technique of obtaining homozygous inbred lines through the use of doubled haploids. These haploids are obtained through haploid inducing lines, such as the W23 temperate. However, these temperate lines are not adapted to the tropical environment. With the objective of making the transfer of the *ig* haploid inducer and the *R1-nj* marker genes from the W23 inbred line to tropical genotypes of maize, six families in the F₂ and F₃ generations obtained from the cross between the W23 ♀ inbred line and the simple hybrid BRS1010 ♂ were evaluated. The plants from these families were selfed and crossed simultaneously. The cross was made in the first ear with the L512388 elite inbred line and the selfing was performed in the second ear. The resulting seeds from the crosses were selected according to the R-navajo morphological marker haploid indicator (purple-colored endosperm and white embryo). The haploids identification test was carried out with microsatellite molecular markers (SSR) previously selected as polymorphic among the crossing parents of the families. One thousand nine hundred and fifteen seeds were selected as putative haploids by the R-navajo morphological marker and were planted in field. From the generated plants, 74 showed reduced size, among these ones four individuals in one of the families were confirmed by the SSR bnlg1228 molecular marker as androgenetic haploids. Two of these haploids were identified in the same ear and the other ones in different ears. The four haploid plants showed reduced size, nevertheless, diploid plants also showed a similar phenotype as that found in the haploid ones, which shows that the R-navajo morphological marker as well the reduced size of the plants were not effective in the identification of haploid individuals. The *ig* inducing gene and the *R1-nj* marker were transferred to three tropical genotypes inducing a 0,4% - 0,6% level of androgenetic haploids in the cross with the L512388 tropical elite inbred line.

* Adviser: Edilson Paiva – Embrapa Milho e Sorgo

1 INTRODUÇÃO

O processo tradicional para a obtenção de híbridos envolve a geração de linhagens endogâmicas obtidas por sucessivas autofecundações. Uma alternativa para acelerar a produção de linhagens endogâmicas na cultura do milho é o uso da tecnologia de haplóides duplicados (duplo-haplóides), técnica que permite a obtenção de linhagens instantâneas após o cruzamento de híbridos ou variedades com uma linhagem indutora de haploidia. Além do ganho de tempo, outra vantagem significativa é a necessidade de menor área experimental nos campos de melhoramento e, conseqüentemente, uma economia de recursos.

Com a utilização desta tecnologia é possível garantir a pureza genética das linhagens desenvolvidas, uma vez que todas as plantas geradas são obtidas de uma única semente haplóide duplicada (linha pura), o que proporciona um ganho na qualidade das avaliações iniciais dos híbridos.

A maioria das linhagens indutoras de haploidia conhecidas atualmente é derivada de duas linhagens temperadas, a Stock 6, que gera haplóides de origem materna gimnogenéticos (Coe, 1959) e a Wisconsin-23 (W23), que gera haplóides de origem paterna, ou seja, androgenéticos (Kermicle, 1969). Este último autor relatou que a linhagem temperada indutora de haploidia W23 desenvolvida pela Universidade de Wisconsin é portadora de uma mutação espontânea conhecida como gametófito indeterminado (*ig*) e também do marcador morfológico dominante sistema R-navajo (*RI-nj*), descrito por Nanda & Chase (1966).

O gene *ig* está localizado no braço longo do cromossomo três (Kermicle & Demopulos-Rodriguez, 1980). Este gene não condiciona um processo em particular e sua interferência ocorre anteriormente à formação do saco embrionário, alterando a atividade de outros genes durante a formação deste.

Seus efeitos parecem ser independentes, não tendo relações uns com os outros (Lin, 1981; Huang & Sheridan, 1996). Acredita-se que, na formação de haplóides androgenéticos sob a ação do gene *ig*, ocorra uma degeneração da oosfera e o conseqüente desenvolvimento do núcleo espermático do grão de pólen no citoplasma da célula ovo, formando um embrião haplóide. A linhagem W23 pode induzir de 1% a 3% de haplóides androgenéticos (Kermicle, 1969) dependendo do *background* genético a que é submetida.

Para a identificação prévia dos haplóides é utilizado o marcador morfológico R-navajo. Este promove a pigmentação com antocianina no endosperma e no embrião das sementes diplóides e as haplóides apresentam pigmentação somente no endosperma, ficando com o embrião branco. Entretanto, esse marcador é fortemente influenciado pelo ambiente, fazendo com que o uso de marcadores moleculares microssatélites (SSR) constitua-se em uma valiosa ferramenta para a identificação exata de haplóides, conforme demonstrado em trabalho realizado por Belicuas et al. (2007).

A linhagem W23 induz haplóides androgenéticos nas condições tropicais de cultivo, mas ela é susceptível ao ataque de doenças, mostrando sensibilidade ao calor e ao fotoperíodo. Por este motivo, a produção de sementes a partir desta linhagem torna-se um fator limitante na produção de haplóides androgenéticos. Os resultados obtidos comprovam que é viável produzir haplóides por meio de linhagens indutoras, nas condições tropicais. Contudo, a solução para estes problemas seria a transferência do gene indutor *ig* e do gene marcador *RI-nj* para um genótipo adaptado às condições tropicais de cultivo (Belicuas et al., 2007).

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de fazer a transferência do gene indutor de haploidia *ig* e do gene marcador *RI-nj* da linhagem temperada W23 para genótipos de milho tropicais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida nos laboratórios do Núcleo de Biologia Aplicada (NBA) e na área de campos experimentais da Embrapa Milho e Sorgo, cujas coordenadas são 44°15' latitude oeste, 19°28' de longitude sul e altitude média de 732 metros, localizada em Sete Lagoas, MG.

2.1 Material genético

Foram utilizadas seis famílias extraídas do cruzamento da linhagem temperada indutora de haploidia Wisconsin-23 (W23) com o híbrido simples BRS 1010 desenvolvido pelo programa de melhoramento de milho da Embrapa Milho e Sorgo. Essas famílias foram obtidas de uma espiga na qual foram identificados indivíduos haplóides, confirmados por Belicuas et al. (2007). As plantas F_1 provenientes das sementes dessa espiga foram intercruzadas. Deste intercruzamento foram selecionadas espigas com base na boa expressão de antocianina do marcador morfológico R-navajo no endosperma e no embrião das sementes, conforme descrito por Nanda & Chase (1966). As sementes dessas espigas foram plantadas no campo e autofecundadas visando à obtenção das famílias na geração F_3 .

Foram plantadas 300 sementes de cada família, com espaçamento de 25 cm entre plantas e 90 cm entre linhas, visando estimular a prolificidade das mesmas. As plantas prolíficas foram autofecundadas e cruzadas simultaneamente. O cruzamento foi realizado com a linhagem elite L512388, selecionada por apresentar arquitetura com folhas eretas de fácil identificação no campo. Para que ocorresse sincronia no florescimento, a linhagem fornecedora de pólen foi plantada em três datas, uma e duas semanas antes do plantio das famílias e no dia do plantio das mesmas. O cruzamento foi realizado na primeira

espiga e a autofecundação na segunda espiga. Esse procedimento foi realizado empregando-se o método da hibridização artificial, que consiste em uma prévia proteção das espigas jovens com saco plástico, antes da emissão dos estigmas. Para os cruzamentos, foi coletado pólen de várias plantas da linhagem L512388, o qual foi misturado formando *bulks* e distribuído sobre os estigmas das plantas.

Ao atingir a maturidade fisiológica, as espigas foram colhidas, secas e debulhadas manualmente para evitar perdas. Em seguida, as sementes dos cruzamentos foram selecionadas conforme o marcador morfológico indicador de haploidia R-navajo, ou seja, marcação roxa apenas no endosperma, indicando a ocorrência de possíveis sementes haplóides. Isso porque, nestas, apenas um núcleo gamético do grão de pólen se fundiu com os dois núcleos polares do megásporo, resultando em um endosperma triplóide e um embrião haplóide.

A marcação roxa no endosperma e no embrião das sementes indica que os dois núcleos gaméticos do grão de pólen conseguiram se fundir com o gametófito feminino, resultando em um F₁ normal. Esse tipo de semente foi descartado. As sementes das autofecundações de cada espiga foram armazenadas em câmara fria. Nas plantas em cujas espigas cruzadas foram identificados indivíduos haplóides, a espiga autofecundada correspondente foi considerada como possível fonte tropical indutora de haploidia.

As sementes das espigas cruzadas selecionadas como possíveis haplóides, utilizando-se o marcador morfológico R-navajo, foram plantadas no campo, em uma disposição espacial de 20 cm entre plantas e 80 cm entre linhas. A cada duas linhas de 20 cm por 80 cm, deixou-se um espaço de 1,6 m. Esse esquema foi utilizado para minimizar a competição das plantas, para que as menos vigorosas fossem favorecidas e também para facilitar a localização de prováveis haplóides no campo. As plantas que apresentaram menor vigor foram identificadas como prováveis haplóides. O tecido foliar dessas plantas foi

coletado aos 40 dias após a germinação, congelado em nitrogênio líquido para posterior análise molecular, utilizando-se marcadores SSR.

2.2 Obtenção do DNA genômico

A extração do DNA genômico foi realizada utilizando-se o protocolo descrito por Saghai-Marroof et al. (1984), com modificações. Para isso, 500 mg de material vegetal foram moídos em nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino. Esse pó foi transferido para microtubos de 1,5 mL, nos quais foram adicionados 600µL de tampão CTAB (2% (m/v) CTAB; 0,2 mM Tris-HCl pH 7,5; 1,4 mM NaCl; 0,02 mM EDTA pH 8,0 e 2% (v/v) β-mercaptoetanol). A mistura foi mantida em banho-maria, a 65°C, por 1 hora, com homogeneizações a cada 15 minutos. Posteriormente, foi realizada lavagem com mesmo volume com solução de clorofórmio-octanol (24:1 v/v), com homogeneizações constantes por 20 minutos. O material foi centrifugado a 16.000 x g, por 10 minutos e o sobrenadante transferido para novo microtubo, ao qual foram adicionados 800 µL de isopropanol. Os microtubos foram mantidos a -20°C, por 60 minutos. Posteriormente, os microtubos foram novamente centrifugados a 16.000 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 800 µL de etanol 70% (v/v) gelado. Os tubos foram novamente centrifugados à mesma velocidade por cinco minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco em centrífuga a vácuo, por 5 minutos e ressuspenso em 100 µL de tampão TE contendo RNase A (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA pH 8,0; 0,1µg/µL RNase A).

As amostras de DNA foram quantificadas em gel de agarose 0,8% (m/v) em tampão TAE (40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA pH 8,0), comparando-se com um padrão de DNA de concentração conhecida. Posteriormente, foi realizada a eletroforese a 100V, durante 1 hora, o gel foi incubado em solução de brometo de etídio (1µg/mL), por 15 minutos, visualizado sob luz ultravioleta e

fotografado no equipamento Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA). O DNA estoque foi diluído em água ultrapura na concentração de trabalho de 10 ng/μL e armazenado a -20°C.

A extração do DNA dos genitores também foi realizada segundo o protocolo de Saghai-Marooft et al. (1984), como descrito acima. Foi coletado material vegetal de seis plantas de cada genitor, tendo a extração sido realizada em maior quantidade de tecido vegetal, 5 gramas. Os volumes foram ajustados à quantidade de tecido foliar. Foram realizadas duas lavagens com solução de clorofórmio-octanol (24:1).

2.3 Marcadores SSR na identificação de haplóides

Foram testados 20 marcadores SSR entre os genitores das famílias (W23 e BRS1010) e a linhagem utilizada para o cruzamento L512388, com o objetivo de selecionar aqueles polimórficos entre os genitores. Os 20 marcadores utilizados haviam sido previamente selecionados por apresentarem polimorfismo entre linhagens elite de milho tropical do programa de melhoramento genético de milho da Embrapa Milho e Sorgo.

As reações de amplificação foram realizadas em um termociclador modelo 9600 (Applied Biosystems®), em volume final de 10 μL, contendo 30 ng de DNA, solução tampão (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM KCl; 0,01% m/v gelatina; 2,0 mM MgCl₂); 125 μM de cada um dos dNTPs; 0,6 μM de cada *primer* e uma unidade da enzima Taq DNA polimerase. Os ciclos de PCR consistiram de uma desnaturação inicial a 95°C por dois minutos, nove ciclos de 94°C por 20 segundos, 68°C com redução de 1°C a cada ciclo e 72°C por 20 segundos, seguidos de 25 ciclos de amplificação a 94°C por 20 segundos, 60°C por 20 segundos e 72°C por 20 segundos. Finalmente, a reação foi submetida a um período de extensão a 72°C por cinco minutos. Os fragmentos amplificados foram resolvidos em gel de poliacrilamida 10% (m/v) com eletroforese a 200V

por 2 horas. O gel foi corado em solução de prata, visualizado em luz fluorescente e fotografado pelo Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA). Os géis foram avaliados considerando-se o grau de polimorfismo dos alelos amplificados, a qualidade da amplificação e, no caso de heterozigotos, a não coincidência de bandas com o mesmo peso molecular entre os parentais. Os marcadores selecionados nessa etapa foram utilizados nos testes de identificação de haplóides e os indivíduos que apresentaram somente alelos do genitor masculino foram identificados como haplóides androgenéticos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As seis famílias avaliadas mostraram-se superiores à linhagem temperada W23 quanto ao seu potencial agronômico, apresentando-se mais resistentes ao ataque de pragas e doenças, espigas e grãos maiores e em maior número. Foram polinizadas, em média, 80 plantas dentro de cada família. Em algumas plantas, não foi possível realizar a autofecundação, pois não houve sincronia do pólen com a emissão dos estigmas da segunda espiga. Nessas plantas e em plantas macho-estéreis, a polinização foi realizada com pólen de uma planta irmã da mesma família (SIB). Segundo Kermicle (1969), plantas que apresentam macho-esterilidade podem conter o gene *ig* em homozigose recessiva e normalmente são macho-estéreis.

A melhor sincronia no florescimento ocorreu quando a linhagem doadora de pólen foi plantada duas semanas antes do plantio das famílias. Belicuas (2004) observou diferença de 25 dias no florescimento entre a linhagem temperada W23 e um híbrido simples comercial, nas condições tropicais de cultivo. Das plantas polinizadas, foram obtidas 115 plantas que possuíam simultaneamente espigas autofecundadas e cruzadas com grãos viáveis. A porcentagem de sementes identificadas por meio do marcador morfológico R-navajo como possíveis haplóides, ou seja, aquelas que apresentaram endosperma roxo e embrião branco, variaram de 0% a 82%. A alta porcentagem de possíveis sementes haplóides encontradas em algumas espigas não deve corresponder à realidade. Segundo Kermicle (1969), a porcentagem máxima não deveria ultrapassar 3%. Das 115 espigas cruzadas, foram selecionadas 64 que apresentavam, simultaneamente, sementes bem desenvolvidas, boa expressão do marcador morfológico R-navajo e as menores porcentagens de possíveis haplóides (Tabela 1).

TABELA 1. Porcentagem de sementes selecionadas como possíveis haplóides pelo marcador morfológico R-navajo indicador de haploidia (endosperma roxo e embrião branco), em 64 espigas obtidas do cruzamento de seis famílias nas gerações F₂ e F₃ com a linhagem L512388.

Genótipo família/espiga	Total de grãos	Possíveis haplóides	% de possíveis haplóides	Genótipo família/espiga	Total de grãos	Possíveis haplóides	% de possíveis haplóides
FAM 01/01	81	8	9,88	FAM 05/09	94	10	10,64
FAM 01/02	220	4	1,82	FAM 05/10	135	4	2,96
FAM 01/03	48	24	50,00	FAM 05/11	86	11	12,79
FAM 01/04	120	3	2,50	FAM 07/01	259	40	15,44
FAM 04/01	149	49	32,89	FAM 07/ 02	131	14	10,69
FAM 04/02	50	13	26,00	FAM 07/03	291	18	6,19
FAM 04/03	157	50	31,85	FAM 07/04	277	101	36,46
FAM 04/04	70	31	44,29	FAM 07/05	244	7	2,87
FAM 04/05	178	53	29,78	FAM 07/06	264	20	7,58
FAM 04/06	67	18	26,87	FAM 07/07	192	35	18,23
FAM 04/07	152	35	23,03	FAM 07/08	230	30	13,04
FAM 04/08	260	127	48,85	FAM 08/01	83	20	24,10
FAM 04/09	162	32	19,75	FAM 08/02	244	19	7,79
FAM 04/10	93	49	52,69	FAM 09/01	288	101	35,07
FAM 04/11	100	4	4,00	FAM 09/02	306	76	24,84
FAM 04/12	201	19	9,45	FAM 09/03	268	8	2,99
FAM 04/13	153	29	18,95	FAM 09/04	368	32	8,70
FAM 04/14	62	29	46,77	FAM 09/05	100	12	12,00
FAM 04/15	89	31	34,83	FAM 09/06	79	18	22,78
FAM 04/16	136	25	18,38	FAM 09/07	154	30	19,48
FAM 04/17	111	11	9,91	FAM 09/08	314	5	1,59
FAM 04/18	141	17	12,06	FAM 09/09	299	93	31,10
FAM 04/19	224	9	4,02	FAM 09/10	104	18	17,31
FAM 04/20	244	38	15,57	FAM 09/11	142	64	45,07
FAM 05/01	46	15	32,61	FAM 09/12	286	9	3,15
FAM 05/02	182	37	20,33	FAM 09/13	196	10	5,10
FAM 05/03	141	26	18,44	FAM 09/14	177	33	18,64
FAM 05/04	211	37	17,54	FAM 09/15	235	5	2,13
FAM 05/05	176	14	7,95	FAM 09/16	155	6	3,87
FAM 05/06	264	37	14,02	FAM 09/17	231	44	19,05
FAM 05/07	138	41	29,71	FAM 09/18	332	12	3,61
FAM 05/08	172	66	38,37	FAM 09/19	163	19	11,66

Como pode ser observado na Tabela 1, a porcentagem de possíveis haplóides variou de 1,59% a 52,69%. Considerando as 6 famílias, foram obtidas 1.905 sementes, classificadas como possíveis haplóides, as quais foram plantadas no campo, onde se obteve um estande final de 1.630 plantas. Dessas, foram identificadas 60 plantas provenientes de sementes poliembriônicas, sendo a maioria dupla e algumas plantas com poliembrionia tripla. Segundo Kermicle (1969), esta é uma característica causada pelo efeito do gene *ig*, indicando sua presença. A presença de plantas com poliembrionia só foi observada nas famílias 5, 8 e 9 (Tabela 2).

Do total de 1.630 plantas cultivadas no campo originadas de sementes identificadas como possíveis haplóides, foram selecionadas 74 plantas com tamanho reduzido para serem submetidas à análise molecular, utilizando dois marcadores moleculares SSR que apresentaram polimorfismo entre os genitores. Esta seleção foi feita com base na informação de que plantas haplóides, em geral, possuem porte reduzido em comparação com plantas diplóides (Chase, 1964; Rotarencu, 2000; Belicuas et al., 2007).

3.1 Marcadores moleculares SSR na identificação de haplóides

Dos 20 marcadores moleculares SSR testados entre os genitores, dois foram selecionados por apresentarem polimorfismo e boa resolução entre os mesmos. Um foi o marcador *bnlg1828*, localizado no cromossomo 8 e o outro foi o marcador *umc1002*, localizado no cromossomo 6.

Entre as 74 plantas de porte reduzido analisadas com os marcadores *bnlg1828* e *umc1002*, foram identificadas 4 plantas haplóides com o marcador *bnlg1828*, das quais 3 são apresentadas na Figura 2. Nenhum haplóide foi identificado com o marcador *umc1002* devido a baixa resolução no gel quanto testado entre os descendentes.

TABELA 2. Número de plantas poliembrionicas e número de plantas selecionadas como prováveis haplóides no campo, por apresentarem porte reduzido.

Genótipo família/espiga	Nº de plantas	Nº plantas poliembrionicas	Nº plantas porte reduzido	Genótipo família/espiga	Nº de plantas	Nº plantas poliembrionicas	Nº plantas porte reduzido
FAM 01/01	08	0	0	FAM 05/09	08	0	0
FAM 01/02	04	0	0	FAM 05/10	02	0	1
FAM 01/03	24	0	1	FAM 05/11	09	0	0
FAM 01/04	02	0	1	FAM 07/01	38	0	0
FAM 04/01	45	0	1	FAM 07/02	06	0	0
FAM 04/02	08	0	0	FAM 07/03	17	0	2
FAM 04/03	44	0	0	FAM 07/04	98	0	4
FAM 04/04	30	0	1	FAM 07/05	03	0	0
FAM 04/05	41	0	2	FAM 07/06	05	0	0
FAM 04/06	16	0	4	FAM 07/07	35	0	1
FAM 04/07	31	0	2	FAM 07/08	27	0	1
FAM 04/08	111	0	6	FAM 08/01	19	1	2
FAM 04/09	26	0	1	FAM 08/02	17	0	0
FAM 04/10	44	0	0	FAM 09/01	71	6	6
FAM 04/11	03	0	0	FAM 09/02	66	10	4
FAM 04/12	16	0	0	FAM 09/03	06	1	1
FAM 04/13	23	0	2	FAM 09/04	28	2	0
FAM 04/14	24	0	0	FAM 09/05	11	0	2
FAM 04/15	26	0	3	FAM 09/06	18	2	2
FAM 04/16	20	0	0	FAM 09/07	26	0	1
FAM 04/17	08	0	0	FAM 09/08	04	1	0
FAM 04/18	17	0	1	FAM 09/09	88	11	5
FAM 04/19	03	0	0	FAM 09/10	15	2	0
FAM 04/20	35	0	0	FAM 09/11	45	2	1
FAM 05/01	11	1	1	FAM 09/12	9	2	0
FAM 05/02	30	3	1	FAM 09/13	09	0	0
FAM 05/03	26	0	1	FAM 09/14	25	1	1
FAM 05/04	36	4	0	FAM 09/15	04	1	1
FAM 05/05	14	0	1	FAM 09/16	05	0	1
FAM 05/06	27	2	3	FAM 09/17	41	5	1
FAM 05/07	37	0	1	FAM 09/18	10	0	1
FAM 05/08	60	1	1	FAM 09/19	15	2	2

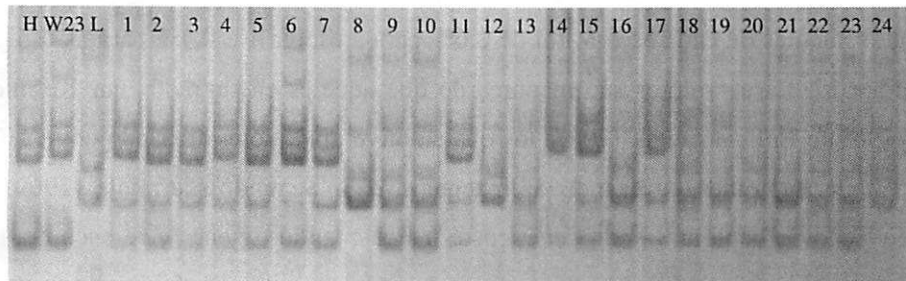


FIGURA 2. Perfil molecular de indivíduos descendentes do cruzamento das famílias nas gerações F_2 e F_3 (H x W23) ♀ com a linhagem L512388 (L) ♂. Canaletas: 8, 12 e 24 são indivíduos identificados como haplóides androgenéticos, pelo marcador molecular SSR bnlg1828.

Como pode ser observado na Figura 2, somente as plantas nas canaletas 8, 12 e 24 apresentam o perfil molecular da linhagem L512388 (Canaleta L), portanto, são haplóides androgenéticos. As demais canaletas apresentam perfil molecular padrão dos cruzamentos entre os genitores.

As plantas haplóides foram identificadas somente em espigas da família 9, sendo duas provenientes da espiga 1, na qual seis sementes apresentaram poliembrião quando plantadas no campo (Tabela 2). Os outros dois haplóides foram identificados nas espigas 15 e 17, como pode ser observado na Tabela 2. Também, nas duas espigas foi observada presença de plantas poliembriônicas, sugerindo uma possível correlação positiva entre a poliembrião e a presença do gene gametófito indeterminado (*ig*). Entretanto, Kindiger & Hamann (1993) afirmaram que, por meio da seleção para linhagens com baixos níveis de poliembrião, ocorreu um acréscimo da frequência global de haplóides androgenéticos gerados, mostrando haver uma incompatibilidade entre poliembrião e indução de haploidia, sendo as duas características controladas pelo gene *ig*.

A frequência de indução nas espigas da família 9, considerando o total de sementes de cada espiga, foi de 0,6% para a espiga 1 e 0,4% para as espigas 15 e 17. Esses valores são menores do que aqueles encontrados por Kermicle (1969) e Belicuas et al. (2007), os quais obtiveram valores variando entre 1% a 3% de haplóides, utilizando a linhagem W23. Segundo Kermicle (1969), a indução de haplóides androgenéticos é maior quando o gene *ig* se encontra em homozigose recessiva. Assim, considerando que o *background* genético utilizado pode também ser um fator limitante no processo de indução e que o gene *ig* nessas famílias F₂ e F₃ não está em homozigose recessiva, as baixas taxas de indução podem ser devido a estes fatores.

Entre as 74 plantas de porte reduzido analisadas, cinco eram provenientes de plantas poliembriônicas. No entanto, nenhuma foi identificada como haplóide androgenético pelos dois marcadores moleculares SSR utilizados. Estes resultados corroboram com aqueles encontrados por Belicuas et al. (2007) que também não identificaram haplóides em plantas derivadas de sementes poliembriônicas. Kermicle (1969) relata que, ao contrário das angiospermas, os indivíduos provenientes de sementes poliembriônicas em milho não estão associadas à ocorrência de haplóides.

A seleção das sementes identificadas como possíveis haplóides pelo marcador morfológico R-navajo não foi precisa. Das 1.905 sementes selecionadas como possíveis haplóides, somente quatro foram confirmadas como haplóides androgenéticos por meio do uso do marcador molecular bnlg1828. Analisando-se as porcentagens das sementes classificadas como possíveis haplóides pelo marcador morfológico R-navajo nas três espigas em que foram identificados os verdadeiros haplóides que foram de 2,1%, 19% e 35% (Tabela 1), a porcentagem de 2,1% pode ser considerada dentro do esperado, o que não é verdade para as outras duas.

Todas as plantas identificadas como haplóides apresentaram-se como miniaturas das plantas F_1 normais (Figura 3), fato este também observado por Belicuas et al. (2007) e por Rotarengo (2000) em um trabalho comparativo entre características de milho haplóides e diplóides. Também foi verificado que plantas de pequeno porte, que aparentemente poderiam ser classificadas como haplóides, não são necessariamente haplóides, resultado este também observado por Belicuas et al. (2007). Observou-se, alguns dias antes do florescimento, que muitas plantas que apresentaram porte reduzido, classificadas inicialmente como prováveis haplóides, já haviam atingido porte e desenvolvimento semelhantes aos das plantas F_1 normais.

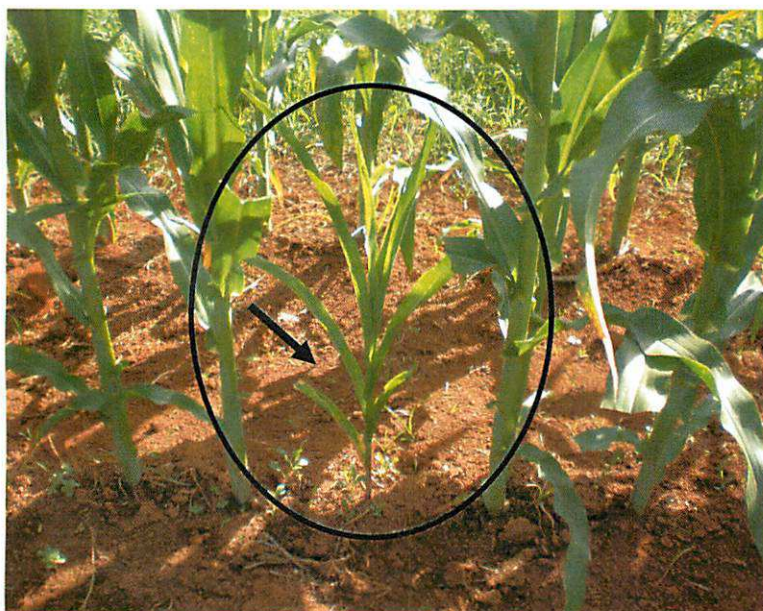


FIGURA 3. Planta haplóide androgenética obtida do cruzamento de uma família F_3 ♀ e da linhagem L512388 ♂. EMBRAPA, Sete Lagoas, MG, fevereiro de 2008.

4 CONCLUSÕES

O gene indutor *ig* e marcador *R1-nj* foram transferidos para três genótipos tropicais, induzindo uma taxa de 0,4% a 0,6% de haplóides androgenéticos no cruzamento com a linhagem tropical L512388.

Todas as plantas identificadas como haplóides apresentaram porte reduzido. No entanto, algumas plantas diplóides heterozigóticas também apresentaram a mesma característica.

O sistema de identificação de haplóides por meio de marcadores morfológicos não se mostrou preciso.

O marcador molecular *bnlg1828* foi eficiente na identificação de haplóides androgenéticos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELICUAS, P.R. **Obtenção, identificação e caracterização de haplóides androgenéticos em milho**. 2004. 52p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica/Agrobioquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BELICUAS, P.R.; GUIMARÃES, C.T.; PAIVA, L.V.; DUARTE, J.M.; MALUF, W.R.; PAIVA, E. Androgenetic haploids and SSR markers as tools for the development of tropical maize hybrids. *Euphytica*, v.156, p.95-102, 2007.

CHASE, S.S. Monoploids and diploids of maize: a comparison of genotypic equivalents. *American Journal of Botany*, Baltimore, v.51, n.9, p.928-933, 1964.

COE, E.H. A line of maize with high haploid frequency. *The American Naturalist*, Chicago, v.93, p.381-382, 1959.

HUANG B.; SHERIDAN, W.F. Embryo sac development in the maize *indeterminate gametophyte 1* mutant: abnormal nuclear behavior and defective microtubule organization. *The Plant Cell*, Rockville, v.8, p.1391-1407, 1996.

KERMICLE, J.L. Androgenesis conditioned by a mutation in maize. *Science*, Washington, v.166, p.1422-1424, 1969.

KERMICLE, J.L.; DEMOPULOS-RODRIGUEZ, J. Location of *indeterminate gametophyte (ig)* on chromosome 3. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*, Urbana, v.54, p.84-85, 1980.

KINDIGER, B.; HAMANN, S. Generation of haploids in maize: a modification of the indeterminate gametophyte (*ig*) system. *Crop Science*, Madison, v.33, p.342-344, 1993.

LIN, B. Megagametogenetic alterations associated with the indeterminate gametophyte (*ig*) mutation in maize. *Revista Brasileira de Biologia*, Rio de Janeiro, v.41, n.3, p.557-563, 1981.

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

ROTARENCO, V.A. The comparative characteristic of the correlation between the traits of maize diploids and haploids. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v.74, p.14-15, 2000.

SAGHAI-MAROOF, M.A.; SOLIMAN, K.M.; JORGENSEN, R.A.; ALLARD, R.W. Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **Proceeding of National Academic Science of the United States of America Biological Science**, New York, v.81, n.24, p.8014-8018, 1984.

CAPÍTULO 2

INDUÇÃO DE HAPLÓIDES ANDROGENÉTICOS EM MILHO TROPICAL

RESUMO

RABEL, M. Indução de haplóides androgenéticos em milho tropical. In: _____. **Haplóides androgenéticos em milho tropical**. 2008. Cap.2, p.39-55. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Na busca de novas alternativas para a obtenção de linhagens endogâmicas, foi conduzido o presente trabalho, com o objetivo de verificar a capacidade de indução de haploidia da linhagem temperada W23 em cruzamentos com as linhagens elite L228-3, L2842, L3, L37, L420, L514040, L57, L64, 98CIM-2-46, TR6DM-25 e com o híbrido simples comercial BRS1010. As sementes obtidas de cinco espigas de cada cruzamento foram separadas conforme o marcador morfológico indicador de haploidia R-navajo (endosperma roxo e embrião branco) e germinadas em condições controladas. As plântulas que apresentaram coleótilo verde foram selecionadas como prováveis haplóides e avaliadas com marcadores moleculares microssatélites (SSR) previamente selecionados como polimórficos, entre os genitores. Nos cruzamentos realizados com as linhagens L2841, L37, L57, 98-CIM-2-46 e TR6DM-25, o gene *R1-nj* não expressou coloração no endosperma e nem no embrião. Nos outros cruzamentos, foi constatada coloração resultante da ação do gene *R1-nj*, na maioria das sementes. A presença de indivíduos haplóides foi confirmada somente no cruzamento realizado com a linhagem L57, por meio do marcador molecular SSR phi026. Os marcadores morfológicos R-navajo e a coloração verde do coleótilo não foram eficientes na identificação precisa dos indivíduos haplóides. A taxa reduzida de haplóides obtida pode estar relacionada com a baixa frequência do gene *ig* na linhagem indutora W23.

* Comitê Orientador: Edilson Paiva – Embrapa Milho e Sorgo (Orientador)

ABSTRACT

RABEL, M. Androgenetic haploid induction in tropical maize. In: _____. **Androgenetic haploids in tropical maize**. 2008. Cap.2, p.39-55. Dissertation (Master in Vegetal Biotechnology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

While searching for new alternatives to obtain homozygous inbred lines the present work was conducted with the objective to verify the haploid inducing capacity of the W23 temperate inbred lines in crossings with the L228-3, L3, L37, L420, L514040, L57, L64, 98CIM-2-46, TR6DM-25 elite inbred lines and simple maize commercial hybrid BRS1010. The resulting seeds from five ears in each cross were selected according to the R-navajo morphological marker haploid indicator (purple-colored endosperm and white embryo) and germinated under controlled conditions. The seedlings that presented green-colored coleoptiles were selected as putative haploids and evaluated with SSR microsatellite molecular markers, previously selected as polymorphic among crossing parents. In the crosses made with the L2841, L37, L57, 98CIM-2-46 and TR6DM-25, the *R1-nj* gene did not express its purple pigmentation neither in the endosperm nor in the embryo. There was resulting coloring from the action of the *R1-nj* gene in most seeds of the other crosses. The presence of haploid individuals was confirmed through the SSR phi026 molecular marker only in the cross made with the L57 inbred line. The R-navajo morphological expression and the green color in the coleoptile markers were not effective in the precise identification of haploid individuals. The reduced haploid level obtained may be linked to the low frequency of the *ig* gene in the W23 inducing inbred line.

* Adviser: Edilson Paiva – Embrapa Milho e Sorgo

1 INTRODUÇÃO

Uma alternativa para acelerar o processo de obtenção de linhagens endogâmicas na cultura do milho é o uso da tecnologia de haplóides duplicados (duplo-haplóides). Essa técnica permite a obtenção de linhagens instantâneas após o cruzamento de um híbrido ou variedade com uma linhagem indutora de haploidia. Além do ganho de tempo, outra vantagem significativa é a utilização de menor área experimental nos campos de melhoramento e, conseqüentemente, economia de recursos. Com a utilização desta tecnologia é possível garantir a pureza genética das linhagens desenvolvidas, uma vez que todas as plantas geradas são obtidas de uma única semente haplóide duplicada (linha pura), o que proporciona um ganho na qualidade das avaliações iniciais dos híbridos.

A linhagem temperada indutora de haploidia Wisconsin-23 (W23), desenvolvida pela Universidade de Wisconsin, é portadora de uma mutação espontânea conhecida como gametófito indeterminado (*ig*) e também do marcador morfológico dominante, sistema R-navajo (*RI-nj*), descrito por Nanda & Chase (1966). De acordo com Kermicle (1969), essa linhagem gera haplóides de origem paterna, ou seja, androgenéticos, podendo induzir de 1% a 3%, dependendo do *background* genético a que é submetida. Outro efeito causado pela ação do gene *ig* é a presença de sementes defeituosas e algumas sementes poliembriônicas. Este mesmo autor também descreveu que as plantas que contêm o gene *ig* em homozigose recessiva normalmente são macho-estéreis.

Para a identificação prévia dos haplóides, é utilizado o marcador R-navajo. Este promove a pigmentação com antocianina no endosperma e no embrião das sementes diplóides, enquanto as haplóides apresentam pigmentação somente no endosperma, ficando com o embrião branco. Entretanto, esse marcador é fortemente influenciado pelo ambiente, fazendo com que o uso de

marcadores moleculares microssatélites (SSR) constitua-se em uma valiosa ferramenta para a exata identificação de haplóides, conforme demonstrado em trabalho realizado por Belicuas et al. (2007). Como reportado por estes autores, a linhagem W23 induz haplóides androgenéticos nas condições tropicais de cultivo, mas ela é susceptível ao ataque de doenças, mostrando sensibilidade ao calor e ao fotoperíodo.

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de verificar a capacidade de indução de haploidia da linhagem temperada W23, em cruzamentos com genótipos tropicais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material genético

A linhagem temperada indutora de haploidia W23 foi cruzada com 10 linhagens elites, L228-3, L2841, L420, L514040 (endosperma tipo dentado) e L3, L37, L57, L64, 98-CIM-2-46 e TR6DM-25 (endosperma tipo duro) e com híbrido simples comercial BRS1010 (endosperma tipo semi-duro), pertencentes ao programa de melhoramento de milho da Embrapa Milho e Sorgo. Esses genótipos foram selecionados dentro de um universo de 36 linhagens e 4 híbridos comerciais. Os critérios de seleção foram baseados no potencial agrônomo e na coloração do coleóptilo das plântulas obtidas de sementes germinadas em condições controladas.

Para determinar o tipo de coloração do coleóptilo, cinquenta sementes de cada genótipo foram submetidas a um processo de germinação em papel germitest umedecido, por um período de três dias, à temperatura de 25°C e fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, de acordo com normas do Ministério da Agricultura (Brasil, 1992). As linhagens e os híbridos que apresentaram coleóptilo verde (Figura 4A) foram selecionados para os cruzamentos e os que apresentaram coleóptilo roxo (Figura 4B) não foram selecionados. Dez linhagens e um híbrido apresentaram coloração verde no coleóptilo. O objetivo, ao utilizar somente parentais masculinos que apresentavam coleóptilo verde, foi o de possibilitar o uso desta técnica para identificar falsos haplóides selecionados pelo marcador morfológico R-navajo.

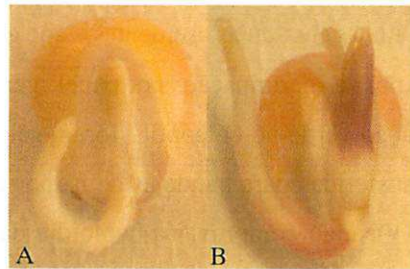


FIGURA 4. (A) semente/plântula da linhagem L514040 selecionada para o cruzamento por apresentar coleóptilo verde. (B) semente/plântula da linhagem L512388 não selecionada por apresentar coleóptilo roxo.

Os genótipos fornecedores de pólen, utilizados para os cruzamentos, foram plantados 12, 16 e 20 dias antes do plantio da linhagem indutora W23, para facilitar a sincronia dos cruzamentos. A linhagem W23 é muito precoce em condições tropicais de cultivo, conforme relatado por Belicuas (2004). Cada genótipo utilizado para os cruzamentos foi plantado em linhas de cinco metros, com espaçamento de 20 cm entre plantas e 80 cm entre linhas. A linhagem W23 foi plantada com espaçamento de 25 cm entre plantas e 80 cm entre linhas, num total de 150 plantas por linha.

As espigas obtidas dos cruzamentos foram colhidas, secas e debulhadas individualmente. Foram selecionadas cinco espigas de cada cruzamento e as sementes dessas, que foram identificadas pelo marcador morfológico R-navajo como possíveis sementes haplóides, foram separadas e germinadas em papel germitest, conforme descrito anteriormente. Nos cruzamentos em cujas espigas não foi observada nenhuma semente com marcação no endosperma e nem no embrião, foram separadas 100 sementes de cada espiga para serem germinadas. Como o número de possíveis haplóides (endosperma roxo e embrião branco) é muito grande em alguns cruzamentos, indicando que o marcador morfológico R-navajo sofre influência do ambiente e do *background* genético do parental

masculino, procurou-se diminuir o efeito genético do parental masculino, descartando-se as linhagens cujas sementes, ao germinarem, apresentaram coleóptilo roxo. Após a germinação no papel germitest, as plântulas que apresentaram coloração verde no coleóptilo foram selecionadas como prováveis haplóides, sendo transferidas para bandejas de isopor com 128 células contendo substrato orgânico. Visando comprovar a haploidia das mesmas, o tecido foliar foi coletado, dez dias após a transferência, congelado em nitrogênio líquido e, posteriormente, submetido à análise molecular com marcadores SSR previamente selecionados como polimórficos entre os diferentes parentais. Das plântulas provenientes dos cruzamentos que não expressaram marcação no endosperma e nem no embrião, foram submetidos à análise molecular até 50 indivíduos, selecionados por possuírem coleóptilo verde.

2.2 Marcadores SSR na identificação de haplóides

A extração do DNA genômico foi realizada conforme o protocolo descrito por Saghai-Marooft et al. (1984). Para a identificação de marcadores moleculares polimórficos entre os parentais, foram avaliados 52 *primers* SSR. As etapas de amplificação e de visualização obedeceram aos mesmos critérios citados no capítulo 1.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como discutido no capítulo 1, a linhagem temperada indutora de haploidia W23 apresentou-se pouco adaptada às condições tropicais de cultivo, mostrando-se susceptível ao ataque de pragas e doenças, sensível ao calor e ao fotoperíodo. O mesmo foi constatado por Belicuas (2004), utilizando esta mesma linhagem na indução de haplóides em condições tropicais.

A melhor sincronia no florescimento ocorreu quando os genótipos fornecedores de pólen foram plantados 16 dias antes do plantio da linhagem indutora W23. Foram cruzadas 80 plantas da linhagem W23 com cada um dos genótipos, obtendo-se o total de 498 espigas viáveis.

Nos cruzamentos realizados com as linhagens L2841, L37, L57, 98-CIM-2-46 e TR6-DM-25, o marcador morfológico R-navajo não foi expresso no embrião e nem no endosperma das sementes (Tabela 3). A linhagem L2841 possui endosperma do tipo dentado e as demais possuem endosperma do tipo duro. Segundo Coe (1994), os grãos de milho com endosperma do tipo duro possuem alguns genes dominantes, *C1-I*, *C2-Idf* e *In1-D*, que inibem a síntese de antocianina, mascarando a expressão do marcador morfológico R-navajo. Contudo, Eder & Chalyk (2002), trabalhando com a indução de haplóides maternos, constataram que a expressão do gene *RI-nj* em embriões de grãos tipo duro foi maior do que em grãos do tipo dentado e do que em híbridos provenientes de genótipos com grãos dos tipos duro e dentado.

Como pode ser observado na Tabela 3, as espigas obtidas dos cruzamentos em que não foi observada nenhuma expressão do marcador morfológico R-navajo, apresentaram bom desenvolvimento, número grande de sementes e a presença de sementes defeituosas e sementes com poliembrionia visível.

TABELA 3. Cruzamento nos quais o marcador morfológico R-navajo não foi expresso no endosperma e nem no embrião das sementes. Média do número de sementes de 5 espigas e porcentagem de sementes defeituosas e poliembriônicas.

Cruzamentos	Média nº de sementes	% sementes defeituosas	% sementes poliembriônicas
W23 x L2841	295,4	4,0	3,0
W23 x L37	318,4	5,2	4,3
W23 x L57	321	4,3	3,6
W23 x 98-CIM-2-46	339,4	4,4	4,1
W23 x TR6DM-25	263,2	4,3	2,2

Segundo Kermicle (1969), sob ação do gene *ig*, as espigas apresentam sementes com cerca de 6% de poliembriõnia. Outra observação feita pelo autor é a de que metade das sementes de uma espiga provenientes de plantas que contêm o gene *ig* em homozigose recessiva são defeituosas e um quarto das sementes de uma espiga proveniente de uma planta que apresenta o gene *ig* em heterozigose também são defeituosas. Assim, os resultados apresentados na Tabela 3 indicam uma possível presença do gene *ig*.

Nos cruzamentos realizados com as linhagens L228-3, L3, L420, L514040, L64 e o híbrido simples BRS1010, foi constatada a expressão do gene *R1-nj*. A porcentagem média de possíveis haplóides nesses cruzamentos variou de 18,0% a 60,1% (Tabela 4). Também foi observada alta porcentagem de sementes sem marcação, variando de 1,9% a 53,8%. Uma parte das sementes sem marcação apresentou tamanho reduzido, o que pode ser atribuído à não adaptação da linhagem W23 às condições tropicais de cultivo. Muitas plantas dessa linhagem apresentaram doenças de final de ciclo, morrendo antes de encher completamente os grãos, prejudicando o desenvolvimento das espigas, produzindo sementes pequenas e sem marcação, principalmente na ponta das mesmas.

TABELA 4. Cruzamento nos quais o marcador morfológico R-navajo foi expresso. Total de sementes de 5 espigas e porcentagem de sementes sem marcação no endosperma e no embrião e de possíveis haplóides.

Cruzamentos	Total sementes	Sementes sem marcação	Possíveis haplóides	% sementes sem marcação	% possíveis haplóides
W23 x L228-3	1352	105	771	7,8	57,0
W23 x L3	782	421	141	53,8	18,0
W23 x L420	479	9	288	1,9	60,1
W23 x L514040	1297	53	402	4,1	31,0
W23 x L64	1422	44	491	3,1	34,5
W23 x BRS1010	757	191	193	25,2	25,5

No entanto, também foi observado, nas espigas desses cruzamentos, que algumas sementes sem nenhuma marcação fenotípica eram visualmente bem desenvolvidas e vigorosas. Uma explicação para estes resultados é que, além do efeito ambiental e do *background* genético, pode ter ocorrido uma interação do genótipo com o ambiente, interferindo na expressão do gene *RI-nj* em algumas sementes. Descartou-se a hipótese de ter ocorrido a fertilização por pólen não controlado, pois, neste caso, o número de sementes seria menor.

Nos cruzamentos em que o marcador morfológico R-navajo foi expresso, as sementes selecionadas como possíveis haplóides por este marcador foram todas geminadas no papel germitest. Considerando todos os cruzamentos, obteve-se 2.286 sementes identificadas como possíveis haplóides. Este alto número de possíveis haplóides selecionados mais uma vez indica que o marcador morfológico R-navajo não se mostrou eficiente.

3.1 Seleção de prováveis haplóides pela coloração do coleóptilo

Dos cruzamentos que não expressaram o marcador morfológico R-navajo (Tabela 3), foram germinadas, no papel germitest, 500 sementes por cruzamento, 100 sementes de cada espiga, totalizando 2.500 sementes. A porcentagem média de prováveis haplóides pela cor do coleóptilo variou de 2,6% a 27,8% (Tabela 5).

Nas sementes dos cruzamentos, selecionadas como possíveis haplóides pelo marcador morfológico R-navajo, a porcentagem de prováveis haplóides selecionados, baseando-se na cor do coleóptilo, variou de 0% a 3,6% (Tabela 6).

Pelos dados da Tabela 5, observa-se que a seleção de possíveis haplóides, realizada utilizando-se somente a cor do coleóptilo, variou de 2,6%, no cruzamento W23 com a linhagem 98CIM-2-46 a 27,8%, no cruzamento com a linhagem TR6DM-25. Embora a porcentagem de 2,6% esteja dentro dos valores encontrados por Kermicle (1969) que obteve até 3% de haplóides, os outros valores obtidos nos demais cruzamentos são considerados altos. Nos cruzamentos nos quais se realizou uma seleção prévia das possíveis sementes haplóides com o auxílio do marcador morfológico R-navajo, a porcentagem de prováveis haplóides pela cor do coleóptilo aproximou-se do esperado para os seis cruzamentos realizados (Tabela 6).

A seleção de prováveis haplóides pela coloração do coleóptilo foi de difícil discriminação, devido à baixa expressão de antocianina no coleóptilo das plântulas, principalmente nas sementes nas quais o marcador R-navajo não apresentou nenhuma expressão.

TABELA 5. Porcentagem de prováveis haplóides pela coloração do coleóptilo, nos quais o marcador morfológico não foi expresso no endosperma e nem no embrião.

Cruzamentos	N° sementes avaliadas	N° prováveis haplóides coleóptilo verde	% de prováveis haplóides coleóptilo verde
W23 x L2841	500	123	24,6
W23 x L37	500	130	26
W23 x L57	500	46	9,2
W23 x 98-CIM-2-46	500	13	2,6
W23 x TR6DM-25	500	139	27,8

TABELA 6. Porcentagem de prováveis haplóides pelo marcador R-navajo (endosperma roxo e embrião branco) e pela coloração do coleóptilo em cinco espigas dos cruzamentos, nos quais houve expressão do marcador morfológico R-navajo.

Cruzamentos	Total sementes	N° possíveis haplóides R-navajo	N° prováveis haplóides coleóptilo verde	% de possíveis haplóides R-navajo	% de prováveis haplóides coleóptilo verde
W23 x L228-3	1352	771	48	57,0	3,6
W23 x L3	782	141	5	18,0	0,6
W23 x L420	479	288	15	60,1	3,1
W23 x L514040	1297	402	5	31,0	0,4
W23 x L64	1422	491	0	34,5	0,0
W23 x BRS1010	757	193	5	25,5	0,7

3.2 Marcadores moleculares SSR na identificação de haplóides

Na identificação de marcadores SSR polimórficos, específicos para cada um dos cruzamentos, feita a partir de 52 *primers* SSR entre a linhagem W23 com as linhagens L228-3, L2841, L3, L37, L514040, L57, L64, 98CIM-2-46, TR6DM-25 e o híbrido simples BRS1010, foram selecionados 8 marcadores moleculares capazes de, individualmente, apresentar polimorfismo entre os genitores (Tabela 7).

TABELA 7. Cruzamentos entre a linhagem indutora de haploidia W23 versus 10 linhagens e um híbrido simples de milho tropical. Marcadores moleculares SSR selecionados como polimórficos entre os parentais. Número de possíveis haplóides selecionados pela coloração do coleóptilo e indivíduos haplóides confirmados pelos marcadores moleculares SSR.

Cruzamento	Marcadores SSR polimórficos	Nº de prováveis haplóides/ coleóptilo verde	Nº haplóides confirmados/ marcador molecular SSR
W23 x L2841	mmc0022	50	?
W23 x L37	umc1016	50	0
W23 x L57	phi026	46	3
W23 x 98-CIM-2-46	bnlg1811	13	?
W23 x TR6DM-25	bnlg1031	50	0
W23 x L228-3	mmc0081	48	0
W23 x L3	mmc0081	5	0
W23 x L420	mmc2109	15	0
W23 x L514040	bnlg1144	5	0
W23 x L64	umc1016	0	0
W23 x BRS1010	umc2109	5	?

? – Baixa de resolução no gel.

Nos cruzamentos realizados com a linhagem L57, em que não houve nenhuma expressão do marcador morfológico R-navajo, foram selecionadas 46 plantas como prováveis haplóides pela coloração do coleóptilo (Tabela 7). Após serem genotipadas com o marcador molecular SSR phi026, três plantas foram confirmadas como haplóides. Essas três plantas apresentavam bandas no gel que coincidiam em tamanho apenas com o genitor masculino, ou seja, apresentavam somente o alelo correspondente à linhagem L57, caracterizando-se assim como um haplóide androgenético (Figura 5).

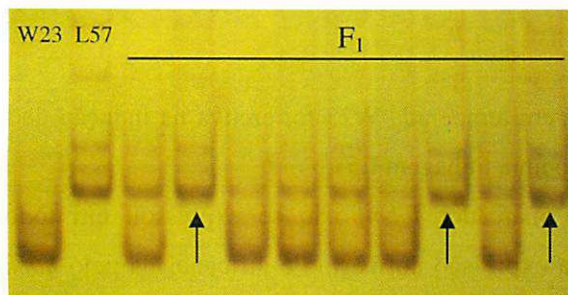


FIGURA 5. Identificação de haplóides androgenéticos, realizada com indivíduos descendentes do cruzamento entre a linhagem indutora de haploidia W23 ♀ e a linhagem elite tropical L57 ♂, utilizando o marcador molecular SSR phi026.

A frequência de indução de haploidia para esse cruzamento foi de 0,6%, considerando as 500 sementes iniciais, o que é considerado uma frequência baixa, pois, segundo Kermicle (1969), o esperado seria uma frequência entre 1% a 3% de haplóides androgenéticos. Esta pequena taxa de indução pode estar relacionada com a baixa frequência do gene *ig* na linhagem indutora W23. Belicuas (2004), trabalhando com a mesma linhagem indutora em condições tropicais, obteve cerca de 1% de indução.

Como pode ser observado na Tabela 7, para os cruzamentos (W23 x L37, W23 x TR6DM-25, W23 x L228-3, W23 x L3, W23 x L420 e W23 x L514040), não foi confirmada a presença de nenhum haplóide pelos marcadores moleculares SSR. Para os cruzamentos (W23 x L2841, W23 x 98-CIM-2-46 e W23 x BRS1010), os resultados das análises moleculares utilizando os marcadores SSR mmc0022, bnlg1811 e umc2109 não foram conclusivos, pelas baixas resoluções obtidas nos géis (Tabela 7).

4 CONCLUSÕES

A linhagem temperada W23 foi efetiva na indução de haplóides apenas no cruzamento com a linhagem L57.

O gene marcador *RI-nj* não se expressou em todos os genótipos, indicando que a expressão do mesmo é influenciada pelo *background* genético do parental masculino.

A baixa taxa de indução de haplóides obtida pode estar relacionada com uma baixa frequência do gene *ig* na linhagem indutora W23.

Os marcadores morfológicos R-navajo e a coloração verde do coleóptilo não foram eficientes na discriminação dos indivíduos haplóides.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELICUAS, P.R. **Obtenção, identificação e caracterização de haplóides androgenéticos em milho**. 2004. 52p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica/Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BELICUAS, P.R.; GUIMARÃES, C.T.; PAIVA, L.V.; DUARTE, J.M.; MALUF, W.R.; PAIVA, E. Androgenetic haploids and SSR markers as tools for the development of tropical maize hybrids. *Euphytica*, v.156, p.95-102, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNAD/DNDV/CLAV, 1992. 365p.

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

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

KERMICLE, J.L. Androgenesis conditioned by a mutation in maize. *Science*, Washington, v.166, p.1422-1424, 1969.

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

SAGHAI-MAROOF, M.A.; SOLIMAN, K.M.; JORGENSEN, R.A.; ALLARD, R.W. Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **Proceeding of National Academic Science of the United States of America Biological Science**, New York, v.81, n.24, p.8014-8018, 1984.

ANEXOS

	Página
TABELA 1. Marcadores moleculares SSR utilizados neste trabalho com suas respectivas seqüências e localização no genoma do milho.....	57

TABELA 1. Marcadores moleculares SSR utilizados neste trabalho com suas respectivas seqüências e localização no genoma do milho.

Primers	Bin	Seqüência 5'-3' senso	seqüência 5'-3' anti-senso
phi097	1.01	TGCTTCACATTCAGTCACCGTCAG	CCACGACAGATGATTACCGACC
bnlg1627	1.02	CGGACGGGGTTATTTAAAT	TGTGTTCCGAGAATCTCTCG
bnlg176	1.03	AGTTCACGTCCAGCTGAATGACAG	CGCGCATCGCATGCTTATCCTA
bnlg182	1.03	AGACCATATTCAGGCTTTACAG	ACAACATAGCAGCAGCAAAGG
bnlg1811	1.04	ACACAAGCCGACCAAAAAAC	GTAGTAGGAACGGGGCATGA
umc2025	1.05	CGCCGTAGTATTTGGTAGCAGAAG	TCTACCGCTCCTCGTCCAGTA
umc1035	1.06	CTGGCATGATCACGCTATGTATG	TAAACATCAGCAGGTTTGCTCATT
umc1013	1.08	TAATGTGTCCATACGGTGGTGG	AGCTGGTGTAGTCTCAGGCACTC
umc1419	2.00	CTCATCACAACTAGCGCCACTCTA	ATAGTGCAGAGGTCATCGTGGC
bnlg1092	2.01	TATTCTGGTCAAGTTGGGGC	GCTTGATCTCCAATCCTTGC
bnlg1017	2.02	ATTGGAAGGATCTCGCTGAC	CAGCTGGTGGACTGCATCTA
bnlg166	2.04	GCCAACGTTTCCAGCCTGA	CTCCGTTTGGCCGAGTCC
bnlg180	2.05	CTAGAGCCTTCGTCGCAGAG	AACGGCGGGAGATAAAAT
bnlg198	2.08	GTTTGGTCTTGCTGAAAAATAAAA	GCTGGAGGCCTACATTATTATCTC
umc2109	3.00	TGCACGCATTATTGTGTACTGA	CCATGGTTCCTAAAACATCTCC
bnlg1144	3.02	TACTCGTCTGTTGGCGTTAG	AGCCGAGGCTATCTAACGGT
umc1012	3.04	TTCTTGGGACCTCAAATCTGT	CTCCATCACCACTCAGAATGTCA
umc0022	3.05	AGGTGTTGTTTTGTTCCGT	TGCTTGTAAAGCTATTATT
umc0081	3.05/3.10	TTACGGACAAGACCTACTAC	ATACGTTTCCGGCAATCTCCT
phi088	3.08	GATTGCGATAAGCATTGCGGCAGTT	CTTCTGTTCCGCCATCCAGTATGT
Nc004	4.03	TGCGAAGAAGCAGTAGCAAA	TGGAGGTAGAAGACGCACG
phi074	4.04	CCCAATTGCAACAACAATCCTTGCCA	GTGGCTCAGTGATGGCAGAACT
phi026	4.05	TAATTCTCTCGTCCCGGATTACG	GTGCATGAGGGAGCAGGAGTGTG
MAG B01	4.06	TTCTTTAACTATTGGAAGCCCA	GCGCAATATCTCTCTATATTGAA
phi086	4.08	TACGTGACGAGATCACTGGTC	CCACCATGATGCACCCACT
bnlg105	5.02	GACCCCGGGGACTGTAAGT	AGGAAAGAAGGTGACCGCTTTTC
bnlg1208	5.04	GCTGTGATGGTGAGACGAGA	GCAGGCCTACTAAAACCCG
phi128	5.07	TTGCTCGGTATGAAGAAAATAGTCTTCC	ATCTTGCAACTAGACTGAGGCAACCA
phi126	6	TCCTGCTTATTGCTTTCGTCAT	GAGCTTGCAATTTTCTGTGGACA
umc1002	6	AGCTAGCTATACACCCGACAGG	TCAGTTTGGAACAGGGAAAAGTA
bnlg161	6	GCTTTCGTCATACACACATTCA	ATGGAGCATGAGCTTGCATATTT
bnlg2151	6.02	GGAAAGCTCAGGGCTCCTAAT	TTAGCTGGCATGCATCATT
umc1014	6.04	GAAAGTCCGATCGAGAGACCCTG	CCCTCTTCCACCCCTTCTTT
Nc010	6.04	TGAGCTGACGACGAGCAG	CATTATCTGTTCCGGCCG
umc0241	6.05	TATATCCGTGCATTTACGTTT	CATCGCTTGTCTGTCGA
phi089	6.08	GAATTTGGGAACCCAGACCACCCAA	ATTTCCATGGACCATGCCTCGTG
bnlg2132	7	GGCGAGAGAGGCAAAAGTTAA	GTCCGACAAGGGGATCAC
umc1016	7.02	GTGATACCGGGTAATCTGGTGC	GATGATGGGTGATCATCGGTT
bnlg1022	7.02	GTGTTGTCGATCCACTCCCT	GCAAAGATCTGTGAGGGGAC
Mac_E01F07	7.04	TCGTTCCGTCCATGAAAT	CAAATATCTCTATCTTTGCTGAC
phi082	7.05	CACAGCACAGGCGTTCG	CGCGGCAAAAGATCTTGAACACT
phi420701	8.00	GATGTTTCAAACCCACCCAGA	ATGGCACGAATAGCAACAGG
umc2004	8.02	TTCTTGGTGAGCCACTATTATTGC	AGGCGCTCAGCACTACTACACAT
phi115	8.03	GCTCCGTGTTTTCGCTGAA	ACCATCACCTGAATCCATCACA
phi014	8.05	AGATGACCAAGGCGGTC AACGAC	CCAGCTTACCAGCTTGTCTTCTG
bnlg1031	8.06	AATCGGTGAGGCTTCAACAAC	ATGCCTACCTACCACCATGC
bnlg1828	8.07	TTGTGTACGATGCGATCGAT	RACAACGGACAGGAACAGGAC
umc1005	8.08	TTTGATCACAGACTTATCCCTGTT	CTAATGACGAACCCCTAAAAGGT
umc1032	8.08	ACATTAGTTGCGTCTTACCGAAG	GAAGCGACCATAACATGTGAGAGA
umc1279	9.00	GATGAGCTTGACGACGCTG	CAATCCAATCCGTTGACGGT
phi065	9.03	AGGGACAATACGTGGAGACACAG	CGATCTGCACAAAAGTGGAGTAGTC
phi016	9.04	TTCCATCATTTGATCCGGGTGTCG	AAGGAGCAACATCCCATCCAGGAA
bnlg292	9.06	TGGTAGGACCTTACAATGGGA	CGGGAGTACTGCTACACACGA
phi117	10.00	ATCGGATCGGCTGCGTCAAA	AGACACGACGGTGTGCTCCATC
phi063	10.02	GGCGGCGGTGCTGGTAG	CAGCTAGCCGCTAGATATACGCT
phi050	10.03	TAACATGCCAGACACATACGGACAG	ATGGCTTAGCGAAGCGTAGAG
phi084	10.04	AGAAGGAATCCGATCCATCCAAGC	CACCCGTAAGTGGAGAAAACCC
bnlg594	10.06	CGTGCAAGCAGTCTCCAG	CTCCCTGATGATGAGTAGAAAGG