

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO – UENF

CENTRO DE BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA – CBB

GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – HABILITAÇÃO LICENCIATURA

FILIPY ALVES SAID

**ANÁLISES CITOGENÉTICAS APLICADAS A IDENTIFICAÇÃO DE HAPLOIDES E
DUPLO-HAPLOIDES EM MILHO**

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

JUNHO – 2021

FILIPY ALVES SAID

**ANÁLISES CITOGENÉTICAS APLICADAS A IDENTIFICAÇÃO DE HAPLOIDES E
DUPLO-HAPLOIDES EM MILHO**

Monografia apresentada à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como parte das exigências para obtenção do título Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof^a Ph.D. Telma Nair Santana Pereira

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

JUNHO – 2021

FILIPY ALVES SAID

**ANÁLISES CITOGENÉTICAS APLICADAS A IDENTIFICAÇÃO DE HAPLOIDES E
DUPLO-HAPLOIDES EM MILHO**

Monografia apresentada à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como parte das exigências para obtenção do título Licenciado em Ciências Biológicas.

Aprovado em 23 de junho de 2021.

Comissão Examinadora:



Ph.D. Telma Nair Santana Pereira (orientadora)



Dra. Larissa Souza Viana (examinadora)



Dra. Maria Lorraine Fonseca de Oliveira (examinadora)

Aos meus pais Joilza Said e Edivaldo Said e
à minha irmã Helen Said,
pelo apoio incondicional,
dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Joilza e Edivaldo, por construírem junto a mim, de maneira direta e indireta a maior parte da minha formação enquanto pessoa, ensinando-me grande parte dos valores, ao qual, possuo e me orgulho. À minha mãe, por todo o apoio, carinho e amor que recebi durante toda a vida. Com a senhora, sempre, fazendo o que estava ao seu alcance para que eu pudesse na medida do possível chegar mais próximo dos meus sonhos e objetivos. Ao meu pai, por todo amor e apoio emocional durante essa longa jornada. Obrigado por acreditar em mim e pelos discursos motivacionais sempre que me senti triste ou sofri com pensamentos ruins, com palavras de ânimo e de vitória. Amém?

Em especial, à minha irmã Helen, por estar sempre presente e disposta a me ouvir nos momentos em que compartilhei as minhas experiências da graduação, sempre me motivando e me falando que eu sou capaz, mesmo quando eu mesmo não acreditava.

À minha orientadora, Telma, por tudo o que aprendi no laboratório, pelo amadurecimento científico e, especialmente, por acreditar no meu potencial e exprimir isso. Obrigado pela postura da senhora em manter um contato próximo a mim em toda a nossa jornada do relacionamento orientador-aluno. Saiba que a senhora é para mim um exemplo de orientadora, ao qual, me espelho e desejo ser para os meus (talvez) futuros (bem futuros) alunos orientados.

Aos meus colegas de laboratório, especialmente para Rodrigo Miranda pelos ensinamentos compartilhados e discussões científicas, além dos conselhos e condutas. Ao pesquisador Roberto dos Santos Trindade do Centro Nacional de Milho e Sorgo pela doação do material vegetal utilizado neste estudo.

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, pela infraestrutura concedida e pelo suporte financeiro para realização deste trabalho, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ, pela concessão da bolsa de estudos e a todos os professores que estiveram comigo durante a graduação e, de

alguma forma, contribuíram para a minha formação. Em especial ao professor Dr. Victor Martin Quintana Flores e a professora Dra. Ana Beatriz Garcia.

Por fim, aos meus colegas da graduação, por viverem comigo toda essa batalha e vontade de jogar bombas diariamente, além de sempre vibrarem comigo em minhas conquistas e me motivarem quando muitas vezes fui negativo quando ao meu desempenho ou a possibilidades futuras. Em especial a Caio Peres, a Everaldo Junior, a Gabriela Brazil, a Luíza Bramusse e a Maicley Ferreira.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Aspectos citogenéticos do milho	1
1.2. O potencial de uso da tecnologia duplo-haploide no melhoramento de milho	2
1.3. Obtenção de haploides de milho <i>in vivo</i> e suas complexidades	5
1.4 Identificação de haploides de milho via sistema R1-navajo e metodologias complementares.....	8
2. JUSTIFICATIVA	11
3. OBJETIVOS	12
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1. Material Vegetal	13
4.2. Contagem do número cromossômico mitótico dos haploides putativos.....	14
4.3. Análises meióticas	15
4.3.1 Determinação da ploidia meiótica dos possíveis duplo-haploides	17
4.3.2 Avaliação da estabilidade genética da meiose dos possíveis duplo-haploides	17
4.3.3 Índice de recombinação dos possíveis duplo-haploides.....	17
4.4. Índice meiótico dos possíveis duplo-haploides	18
4.5. Viabilidade polínica dos possíveis duplo-haploides	18
4.6. Fotomicrografias	19

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
5.1. Contagem do número cromossômico mitótico dos haploides putativos.....	20
5.2. Análises meióticas	23
5.2.1. Determinação da ploidia meiótica dos possíveis duplo-haploides	23
5.2.2. Anormalidades meióticas.....	25
5.2.3. Índice de recombinação	32
5.3. Índice meiótico	37
5.4. Viabilidade polínica	41
6. CONCLUSÕES	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

- ADMA2 – Assincronia durante a metáfase e a anáfase 2.
- CAA1 – Cromossomos adiantados na anáfase 1.
- CAA2 – Cromossomos adiantados na anáfase 2.
- CRA1 – Cromossomos retardatários na anáfase 1.
- CRA2 – Cromossomos retardatários na anáfase 2.
- CRM 1 – Cromossomos retardatários na metáfase 1.
- CUD – Cromossomos univalentes na subfase diacinese.
- DH – Duplo-haploides.
- H – Haploides.
- IM – Índice Meiótico.
- IR – Índice de Recombinação.
- MNT – Micronúcleos nas tétrades dos produtos pós-meióticos.
- MQA = Média de quiasmas em anel.
- MQB = Média de quiasmas em Bastão.
- MTQ = Média total de quiasmas.
- PCA1 – Pontes de cromatina na anáfase 1.
- PCA2 – Pontes de cromatina na anáfase 2.
- PFPM1 – Polaridade do fuso perturbada na metáfase 1.
- R1-nj – Gene R1-Navajo.
- RCMG – Referentes a cromossomos e ao material genético.
- Tail – *Tropically Adapted Inducer Lines*.
- TAU = Total de células analisadas.
- VP – Viabilidade polínica.
- W23 – Wisconsin-23.

RESUMO

Duplo-haploides (DH) são genótipos resultantes de indução a haploidia e posterior duplicação genômica. Essa técnica é de grande interesse agrônomo, pois permite a redução do tempo de obtenção de endogâmicos e o alcance de 100% da homozigidade dos genótipos, o que aprimora e agiliza o processo de obtenção de linhagens e híbridos. Entretanto, as metodologias de obtenção e identificação dos haploides (H) e DH nem sempre são eficientes. Deste modo, este estudo examinou 8 possíveis genótipos de milho H e DH: 1700345, 1700346, 1700347, 1700348, 1700349, 1700350, 1700351, 1700352, com o intuito de confirmar os seus níveis de ploidia, validando a metodologia de obtenção e identificação dos H e DH, e verificar a estabilidade meiótica do possível material DH. Para a contagem do número cromossômico dos H, lâminas foram preparadas utilizando pontas de raízes com bloqueio mitótico feito pela solução 19:1 de 8-hidroxicina 300ppm e cicloheximida 23ppm e coloração via método de Feulgen. Para verificar a ploidia, a regularidade das fases meióticas, o índice de recombinação (IR), o índice meiótico (IM) e a viabilidade dos pólenes (VP) dos DH, lâminas foram preparadas utilizando a técnica *squash*, com coloração via carmim acético 2% para as análises meióticas e solução de Alexander para VP. Dos 8 H analisados, 7 apresentaram 100% das metáfases com 20 cromossomos, configurando-se como diploides e 1, H1700349, apresentou 10% das metáfases com 10 cromossomos e 90% com 20, configurando-se como H e diploides. As análises meióticas mostraram que todos os 8 DH apresentaram 10 bivalentes, provando que continuam diploides e que a duplicação cromossômica falhou em todos os genótipos. As médias dos valores obtidos em IR, IM e VP, para todos os genótipos, foram, respectivamente, 28,39, 95,62% e 76,05%. As anormalidades meióticas se encontram nos padrões para o milho. Esses resultados revelam que apenas em H1700349 a obtenção de H mostrou eficiência, que a duplicação dos genótipos não foi eficiente e que todos os genótipos apresentam índices médios e altos de regularidade meiótica, IM, IR e VP. Logo, o protocolo de obtenção de H e DH não foi eficiente e o estresse causado pelo mesmo não afetou significativamente a regularidade meiótica dos genótipos analisados.

Palavras-chave: *Zea mays* L., Meiose, Mitose, Cromossomos.

ABSTRACT

Double haploids (DH) are genotypes resulting from haploid induction and subsequent genomic duplication. This technique is of great agronomic interest, as it allows for a reduction in the time to obtain inbreds and the achievement of 100% of the homozygosity of the genotypes, which improves and speeds up the process of obtaining inbred lines and hybrids. However, the methodologies for obtaining and identifying haploids (H) and DH are not always efficient. Thus, this study examined 8 possible genotypes of corn H and DH: 1700345, 1700346, 1700347, 1700348, 1700349, 1700350, 1700351, 1700352, in order to confirm their ploidy levels, validating the methodology for obtaining and identifying the H and DH, and verify the meiotic stability of the possible DH material. To count the chromosome number of H, slides were prepared using root tips with mitotic blockage made by a 19:1 solution of 8-hydroxyline 300ppm and cycloheximide 23ppm and staining via the Feulgen method. To verify ploidy, meiotic phase regularity, recombination index (RI), meiotic index (MI) and pollen viability (VP) of DH, slides were prepared using the squash technique, stained using acetic carmine 2 % for meiotic analysis and Alexander's solution for VP. Of the 8 H analyzed, 7 presented 100% of the metaphases with 20 chromosomes, configuring themselves as diploids and 1, H1700349, presented 10% of the metaphases with 10 chromosomes and 90% with 20, configuring themselves as H and diploids. Meiotic analyzes showed that all 8 DH had 10 bivalents, proving that they remain diploid and that chromosome duplication failed in all genotypes. The averages of the values obtained in IR, IM and VP, for all genotypes, were, respectively, 28.39, 95.62% and 76.05%. Meiotic abnormalities meet the standards for corn. These results reveal that only in H1700349 the obtaining of H showed efficiency, that the duplication of genotypes was not efficient and that all genotypes had medium and high indices of meiotic regularity, IM, IR and VP. Therefore, the protocol for obtaining H and DH was not efficient and the stress caused by it did not significantly affect the meiotic regularity of the analyzed genotypes.

Keywords: *Zea mays* L., Meiosis, Mitosis, Chromosomes.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos citogenéticos do milho

O milho (*Zea mays* ssp. *Mays*) é tradicionalmente caracterizado como uma planta diploide, $2n=2x=20$ cromossomos (McClintock, 1929; McClintock, 1933). Entretanto, evidências citomoleculares e mapeamentos das últimas décadas sugerem que o mesmo se originou de um evento alotetraploide segmentar $4x=5$ cromossomos (Gaut e Doebley, 1997; Gaut et al., 2000; Wei et al., 2007; Schnable, 2015). A hipótese diz que o milho $2x$ é um produto da hibridação de progenitores diploides com cromossomos parcialmente diferenciados, no qual, a prole sofreu um evento tetraploide e posteriormente uma diploidização através de numerosas quebras e fusões cromossômicas. Portanto, constituindo-se como uma planta alotetraploide, porém de comportamento genômico diploide e número gamético: $n=10$ cromossomos.

Os cromossomos haploides do milho são todos morfologicamente distinguíveis (McClintock, 1933), com o cromossomo um apresentando o maior comprimento cromossômico e o dez o menor (Rhoades, 1950; Rosado et al., 2009; Mondin et al., 2014). A maior disparidade na proporção de comprimento do braço longo para o curto está presente no cromossomo oito, com 3.2:1.0 μm , e a menor no cromossomo cinco, com 1.1:1.0 μm . No cariótipo do milho, em relação a posição dos centrômeros, os cromossomos são classificados da seguinte forma: três pares metacêntricos (1, 2 e 5), seis submetacêntricos (3, 4, 6, 7, 9 e 10) e apenas um acrocêntrico (8) (Sadler e Weber, 2001; Rosado et al., 2009).

Todo conjunto haploide possui pelo menos um cromossomo satélite, ao qual se localizam as regiões organizadoras do nucléolo (RON) que possuem genes com DNA ribossomal repetitivo e altamente reativo a nitrato de prata, devido a sua contínua associação a fatores de transcrição que se conserva até o final da metáfase (Guerra, 1988). No milho, o cromossomo satélite é o 6 e a sua RON está localizada na extremidade do seu braço curto (6s) (Mondin et al., 2014; Braz et al., 2020). Durante uma meiose regular, o mesmo permanece ligado ao nucléolo até o final da prófase I, quando o

nucléolo começa a se tornar menos evidente, desaparecendo ao longo da subfase diacinese à fase metáfase (Rhoades, 1950).

A meiose é uma divisão celular especializada de alta estabilidade evolutiva e necessária para produzir gametas com um conteúdo cromossômico haploide em todos os eucariotos com reprodução sexual (Cande et al., 2009) e a sua estabilidade, determinada pelo índice de anomalias, é diretamente proporcional a fertilidade ou total esterilidade dos genótipos (Kaur e Singhal, 2019). Os microsporócitos (meiócitos masculinos) do milho, geralmente utilizados para análises meióticas devido a fácil obtenção, se desenvolvem nas anteras e resultam na formação de quatro grãos de pólen após a meiose, cada um contendo um núcleo vegetativo e dois reprodutivos (espermáticos) (Cande et al., 2009).

No milho, as anomalias mais recorrentes durante a microsporogênese masculina são: cromossomos univalentes, cromossomos pegajosos, pontes cromossômicas, assincronia em microsporócitos, polaridade perturbada, micronúcleos, produtos pós meióticos desbalanceados e migração precoce e retardatária de cromossomos para os polos (Pagliarini et al., 2002; Utsunomiya et al., 2002; Ricci et al., 2007; Khah et al., 2018; Kaur e Singhal, 2019). Essas anormalidades tendem a diminuir a viabilidade do grão de pólen de milho, que se caracteriza como uma cultura de altos níveis de germinação.

1.2. O potencial de uso da tecnologia duplo-haploide no melhoramento de milho

O milho é o cereal mais importante do mundo, com um volume médio de produção mundial entre os anos de 2017 a 2019 superior a 1,12 bilhão de toneladas e uma estimativa de crescimento linear a cada novo ano (OCDE / FAO 2020). No Brasil, terceiro maior produtor mundial de milho, cultivaram-se 17,6 milhões de hectares de milho no ano agrícola 2016/2017, com a produção de grãos atingindo 97,8 mil toneladas e a estimativa da receita bruta total de 28,96 bilhões de reais (CONAB, 2018). Dentre os métodos de melhoramento aplicados a esse milho comercial, o principal é a obtenção de híbridos por cruzamento de linhagens contrastantes e complementares, pois este método permite maior vantagem no aumento de caracteres de interesse agrônômico e no aumento da

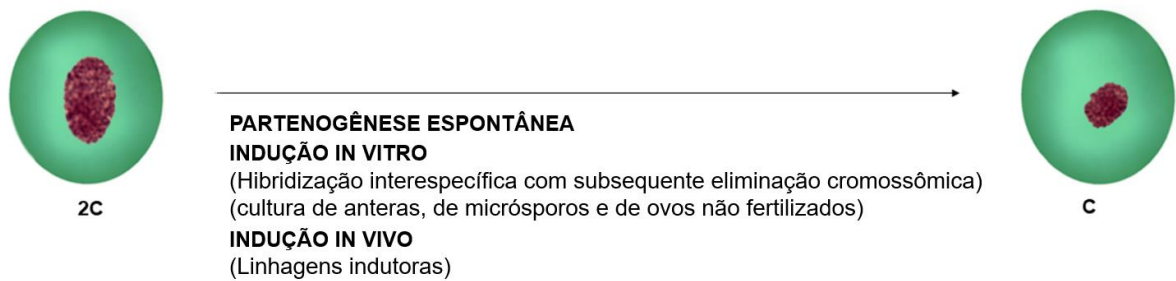
produtividade e do vigor. No entanto, o processo clássico de obtenção de linhagens endogâmicas é demorado, levando de seis a oito ciclos de autofecundação para obter até 99% de homozigose (Pierre et al., 2011; Prigge e Melchinger, 2012, Chaikam et al., 2019; Maqbool et al., 2020).

Diante desse cenário, uma alternativa que vem ganhando espaço como uma das metodologias para obtenção de linhagens endogâmicas e posterior produção de híbridos é a tecnologia de linhagens duplo-haploides (DH) (Trindade et al., 2017), que apresentou uma baixa representatividade de 6,2% no mercado brasileiro de cultivares de milho nos anos de 2017 e 2018 (CONAB, 2018), porém possui um grande potencial para os próximos anos (Trindade et al., 2015; Trindade et al., 2017; Trindade et al., 2019). Este potencial está relacionado a possibilidade de aumentar a eficiência e velocidade na obtenção de linhagens 100% homozigotas, garantindo total uniformidade e estabilidade genética das linhagens produzidas, para a obtenção de novas cultivares de milho híbrido (Pierre et al., 2011; Maqbool et al., 2020). A partir desta técnica, a obtenção de endogâmicos, de F1, é realizada em apenas duas gerações (Mayor e Bernardo, 2009; Melchinger et al., 2011; Pierre et al., 2011; Maqbool et al., 2020), reduzindo custos no plantio e acelerando a hibridação.

Duplo-haploides caracterizam-se por serem produzidos através de genótipos originalmente diploides “2x” induzidos a haploidia “n” e posteriormente duplicados, assim, restabelecendo o nível “2x” do genoma diploide (Said et al., 2018) (Figura 1). Existem três metodologias para a obtenção de linhagens duplo-haploides: partenogênese espontânea, indução *in vitro* e indução *in vivo*. A partenogênese espontânea implica o desenvolvimento de uma célula-ovo em um esporófito haploide naturalmente (Chang e Coe, 2009; Pierre et al., 2011). A indução *in vitro* pode ser feita por meio de hibridização interespecífica com subsequente eliminação cromossômica (Ishii et al., 2016) e cultura de anteras, de micrósporos (Germanà, 2011) e de óvulos não fertilizados (Tang et al., 2006). Dentre essas três, a metodologia *in vivo* é a mais utilizada para a produção de DH de milho em escala comercial, devido à sua eficiência e simplicidade de aplicação em comparação aos outros métodos (Prigge e Melchinger, 2012; Prassana et al., 2012), uma

vez que, não são necessários laboratórios muito equipados e desenvolvimento de metodologias específicas. Essa modalidade exige apenas o uso de linhas indutoras de haploidia; um sistema de identificação haploide e um protocolo de duplicação cromossômica (Chase, 1952; Belicuas et al., 2007; Geiger, 2009; Meng et al., 2021).

INDUÇÃO A HAPLOIDIA



DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA ARTIFICIAL

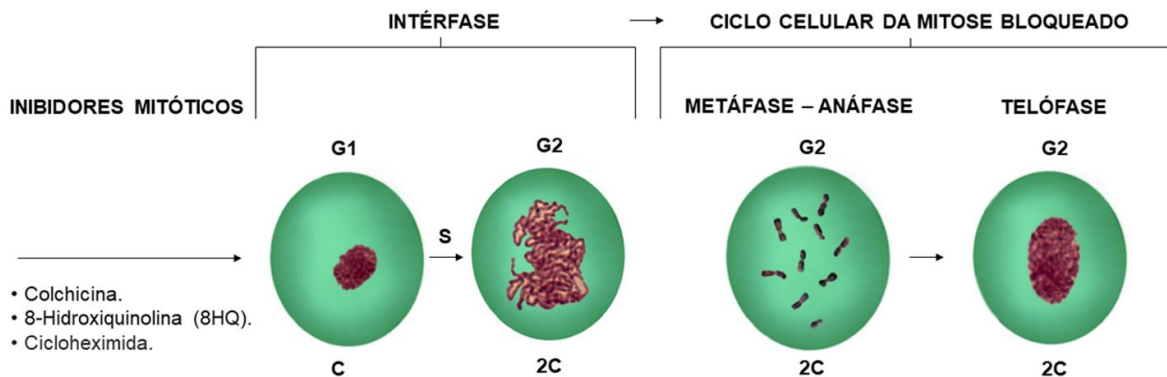


Figura 1 – Produção de Duplo-haploides. Na indução a haploidia, uma célula diploide é levada a haploidia por metodologias *in vitro*, *in vivo* e por partenogênese espontânea, reduzindo o conteúdo de DNA de 2C para C. O uso de agentes antimitóticos nas sementes desestabilizam o funcionamento do fuso celular e das proteínas envolvidas na segregação cromossômica, desta forma uma célula com quantidade C de DNA na G1, quando tratada com os agentes químicos durante a meiose, não forma a placa metafásica, e em consequência, não entra em anáfase. Logo, a célula se torna duplo-haploide com quantidade de DNA 2C, visto que o material duplicado na fase S não é levado para a célula filha. Fonte: o autor.

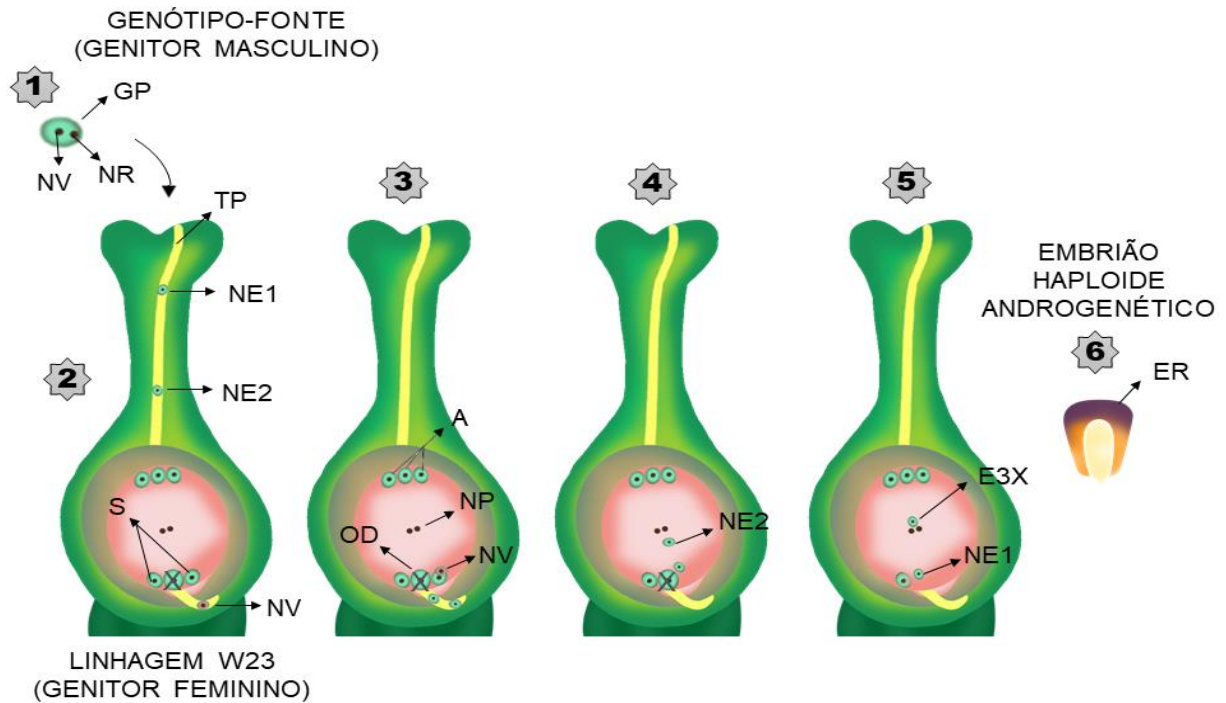
O uso de duplo-haploides não se limita a obtenção de linhagens para substituírem endogâmicos, o mesmo se aplica a uma série de outras atividades no melhoramento genético do milho como: introgressão de novos caracteres por métodos convencionais ou transgenia, geração de populações para seleção assistida por marcadores e para mapeamento genético, obtenção de populações de treinamento e validação e seleção genômica ampla para o uso em programas de seleção recorrente, permitindo a obtenção direta de novas variedades e híbridos nos ciclos de seleção (Gordillo e Geiger, 2008; Chang e Coe, 2009; Mayor e Bernardo, 2009; Strigens et al., 2013). Logo, caracterizam-se por uma tecnologia com grande potencial no melhoramento do milho.

1.3. Obtenção de haploides de milho *in vivo* e suas complexidades

A obtenção de genótipos haploides (H) de milho pelo método *in vivo*, é baseada principalmente a partir de cruzamentos de linhagens indutoras, genótipos com a capacidade de induzir, em certa proporção, a formação de sementes com embriões haploides, com um genótipo de interesse, chamado população-fonte ou genótipo-fonte, as quais, originam sementes H androgenéticas e gimnogenéticas (Chaikam et al., 2019; Meng et al., 2021).

Os H androgenéticos, são resultantes do desenvolvimento mitótico a partir do núcleo reprodutivo do grão de pólen da planta de milho de interesse e degeneração e eliminação cromossômica na oosfera não fecundada da linhagem indutora durante o cruzamento (Pierre et al., 2011; Maqbool et al., 2020; Meng et al., 2021) (Figura 2). Logo, em H androgenéticos, as sementes são constituídas por células com DNA de origem paterna e citoplasmas de origem materna. A principal linhagem indutora de H androgenéticos é a Wisconsin 23 (W23) (Pierre et al., 2011; Weber, 2014), que através do alelo mutante recessivo *ig1* (gametófito indeterminado 1) do gene *IG*, presente no braço longo do cromossomo três (Kermicle, 1994), prolonga as divisões nucleares livres do gametófito feminino, levando a uma variedade de anormalidades embrionárias, que afetam a integridade da oosfera (Kermicle, 1994; Evans, 2007). A linhagem W23 possui

uma taxa de aproximadamente 1-3% de indução de genótipos haploides (Kermicle, 1994; Silva et al., 2009).



Legendas:

GP – Grão de pólen	NV – Núcleo reprodutivo	NV – Núcleo vegetativo
TP – Túbo polínico	NE1 – Núcleo espermático 1	NE2 – Núcleo espermático 2
S – Sinérgidas	A – Antípodas	NP – Núcleos polares
OD – Oosfera degenerada	E3X – Endosperma triploide	ER – Endosperma roxo

Figura 2 – Indução de haploides androgênicos a partir da linhagem indutora W23. (1) Cruzamento utilizando grãos de pólen de um genótipo-fonte de interesse e ovários da linhagem indutora de haploidia W23; (2-3) Sobre o estigma, o grão de pólen inicia a germinação, com a formação do tubo polínico (TP) e viagem do núcleo vegetativo (NV) (a frente) e dos núcleos espermáticos (NE) pelo tubo polínico; (4) O TP penetra o saco embrionário e o NV se funde ao núcleo de uma das células sinérgicas degenerando-se, enquanto os NE são liberados no citoplasma do SE; (5) No saco embrionário, um dos NE se funde aos dois núcleos polares, formando o endosperma triploide e o outro permanece haploide (H) sem a fusão com a oosfera que se degenerou, dando origem ao embrião H; (6) Ocorre a formação da semente H androgênica, com coloração roxa no endosperma devido ao gene R1-Navajo. Fonte: o autor.

Os H gimnogenéticos, são resultantes do desenvolvimento mitótico a partir da oosfera não fecundada da planta de milho de interesse e degeneração de um dos núcleos espermáticos do grão de pólen da linhagem indutora durante o cruzamento (Pierre et al., 2011; Maqbool et al., 2020). A principal linhagem indutora de Hs gimnogenéticos é a *Stock6*, linhagem primogênita em milho que originou as demais linhagens indutoras e que induz a formação de haploides gimnogenéticos com 3% de frequência (Coe, 1959; Kermicle, 1994; Silva et al., 2009; Meng et al., 2021).

Entretanto, essas principais linhagens indutoras de H em milho, W23 e *Stock6*, foram obtidas, selecionadas e melhoradas em locais de clima temperado, logo apresentam dificuldades de adaptação em ambientes tropicais, consequentemente demonstrando características como baixo vigor, baixa produção polínica e alta suscetibilidade a doenças quando expostos a condições tropicais (Couto, 2017; Trindade et al., 2017). Desta maneira, os programas de melhoramento brasileiro, tem buscado adaptar essas linhagens indutoras, através de retrocruzamentos com genótipos tropicais de milho, para assim, obter linhas indutoras mais eficientes em clima tropical (Prasana et al., 2012; Trindade et al., 2015). Uma das mais recentes descrições dessas tentativas de obter linhagens indutoras tropicalizadas em programas brasileiros, foi com a utilização do híbrido simples BRS 1010 retrocruzado com uma linha indutora e posteriormente usado como linha indutora (Rabel et al., 2008; Prasana et al., 2012). Como resultado, foram obtidas 64 espigas, das quais, apenas três espigas produziram sementes H: a espiga 1 com indução de 0,6% e as espigas 15 e 17 com indução de 0,4% (Rabel et al., 2008).

Além disso, o Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo (CIMMYT) e a Universidade de Hohenheim iniciaram uma parceria para adaptação dos indutores de ambiente temperado, para ambientes tropicalizados, através do mesmo método que os programas de melhoramento brasileiro utilizam, gerando os chamados indutores TAILs (Tropically Adapted Inducer Lines), que expressaram taxas de indução de haploidia de 9 a 14% (Kebede et al., 2011). Recentemente, no ano de 2013, a empresa Embrapa Milho e Sorgo adquiriu a licença para uso destes indutores e iniciou os testes do desempenho

agronômico destes materiais em condições brasileiras (Trindade et al., 2015; Trindade et al., 2017; Trindade et al., 2019). Estes indutores possuem 75% de genoma tropical, apresentam os mesmos sistemas de genes de identificação de haploides via antocianina que os indutores originais possuem, o R1-nj, e são codificadas como Tail P1, Tail P2 e Tail P1 x Tail P2 (Trindade et al., 2017). Mesmo com a obtenção dessas linhagens tropicalizadas, a obtenção de haploides e o uso dos genótipos duplo-haploides em milho tropical encontra-se atrasada em relação ao clima temperado (Chaikam et al., 2019).

1.4 Identificação de haploides de milho via sistema R1-navajo e metodologias complementares

O método de obtenção de haploides de milho *in vivo* produz simultaneamente núcleos diploides e haploides (Meng et al., 2021), logo é necessário diferenciar os haploides dos diploides em suas fases de sementes para o prosseguimento da obtenção de DH com menores perdas. Desta forma, o uso de marcadores genéticos é uma das maneiras mais rápidas de realizar essa seleção.

Nas linhagens indutoras de milho, o sistema baseado em marcadores fenotípicos expressos pelo gene R1-navajo (R1-nj), presente no locus R do cromossomo 10, codifica a pigmentação do endosperma e do embrião de sementes de milho com antocianina (Coe e Sarkar, 1964; Nanda e Chase, 1966; Sarkar e Coe, 1996) e é o método de seleção mais utilizado, devido ao baixo custo e facilidade na seleção (Trindade et al., 2019; Meng et al., 2021). Nesta seleção visual, sementes com embrião branco e endosperma roxo são selecionadas como haploides (Figura 3) e os desvios são descartados. A pigmentação no endosperma, ocorre devido ao caráter dominante do gene R1-nj, assim, quando ocorre a junção dos núcleos polares com o núcleo espermático (Figura 2), basta que um dos parentais tenha o gene para que ocorra a expressão fenotípica da característica roxa. No embrião ocorre de maneira diferente, o parental linhagem indutora com o gene R1-nj, degenera o núcleo reprodutivo e apenas os genes do gameta do parental população-fonte são expressos. Logo, quando o embrião expressa a cor roxa,

significa que não houve degeneração da oosfera ou do núcleo espermático da linhagem indutora e ocorreu a fertilização com formação do zigoto diploide.



Figura 3 – Padrão de expressão do marcador morfológico controlado pelo sistema R1-nj para haploides putativos. Semente com endosperma roxo e embrião branco, demonstrando um padrão de possível indução eficiente a haploidia pelo sistema R1-nj (haploide putativo). Fonte: o autor.

Embora o sistema R1-nj seja utilizado devido à simplicidade, a metodologia não é totalmente precisa, devido aos vários graus de expressividade do seu fenótipo (Geiger e Gordillo, 2010; Chaikam et al., 2015) e dos problemas na degeneração dos núcleos reprodutivos das linhagens indutoras de H (Kermicle, 1994; Evans, 2007), que podem alterar a leitura dos resultados na seleção. Além disso, em genótipos tropicais tem sido descrita uma maior dificuldade na utilização desse sistema quando comparados a genótipos de clima temperado, uma vez que, a constituição genética dos genótipos tropicais tendem a apresentar naturalmente alelos alterados dos genes C1 e C2 (Coe e Sarkar, 1964), integrantes na rota metabólica da antocianina, como os alelos C1-I e C2-I_{df} que inibem a rota de biossíntese da antocianina (Belicuas et al., 2007; Prasana et al., 2012; Chaikam et al., 2015; Trindade et al., 2019). Desta forma, ocorre uma redução ou ausência das taxas de sementes marcadas com antocianina, prejudicando a seleção de

haploides e a obtenção dos DH. Assim, o sistema R1-nj constitui uma identificação primária que requer um exame secundário mais preciso.

Na literatura existem diversas metodologias complementares ao sistema R1-nj, que são utilizadas para aprimorar a identificação da natureza H dos genótipos em milho como, o número de raízes seminais laterais, que costuma ser menor em H (Prassana et al., 2012), a concentração do nível de óleo no embrião, que costuma ser baixa em H (Rotarenco et al., 2007), o comprimento da célula de guarda presentes nas folhas, que são menores em H (Silva et al., 2019), as características morfológicas das mudas (Tang et al., 2009) e a citometria de fluxo (Molenaar et al., 2019). Entretanto, algumas dessas metodologias estão associadas a análises após o crescimento da planta de milho, o que aumenta o custo e o tempo de espera da seleção, pois é necessário que haja cultivo e germinação (Chaikam et al., 2017), em contrapartida, outras como a citometria de fluxo requerem equipamentos de alto custo e mão de obra treinada. Desta forma, a maioria dos autores sugeriram que novas formas de identificação de haploides devem ser aplicadas, a fins de, acelerar o processo de obtenção de DH e aumentar a taxa de confiabilidade na identificação de haploides.

2. JUSTIFICATIVA

Dentre os métodos de melhoramento aplicados as variedades de milho, o principal é a obtenção de híbridos por cruzamento de linhagens contrastantes e complementares, pois permite vantagem no aumento de caracteres de interesse agrônomo, da produtividade e do vigor. No entanto, o processo clássico de obtenção de linhagens é demorado, levando de 6 a 8 ciclos de autofecundação para obter até 99% de homoziguidade. Uma alternativa é o uso de DH, pois o mesmo reduz o tempo de obtenção de linhagens para 2 ciclos, aumentando a eficiência e reduzindo o tempo de produção de novas cultivares de milho híbrido. Entretanto, um fator limitador da obtenção de DH, principalmente em genótipos tropicais, é a identificação de sementes H. Pois, essa etapa, geralmente, não apresenta uma metodologia com alta eficiência, o que permite que falsos genótipos H sejam levados a duplicação. Portanto, para o uso de DH em escala comercial, é necessária uma triagem das sementes H apresentando alto nível de confiabilidade e que não seja preciso o uso de equipamentos de alto custo e o plantio das sementes no campo. O uso de análises citogenéticas garante esses três requisitos, devido a confiabilidade da contagem cromossômica, pois a mesma mostra a real natureza genômica do genótipo, a dispensabilidade do cultivo e germinação das sementes no campo e a facilidade de manipulação laboratorial, uma vez que, as metodologias demandam apenas corantes e microscopia. Logo, trabalhos que auxiliem na redução do tempo de espera comercial por novas cultivares de milho são de extrema importância.

3. OBJETIVOS

No contexto apresentado, os objetivos do presente trabalho concentraram-se em três blocos:

1. Verificar a eficiência da metodologia de obtenção e seleção primária de haploides putativos através do sistema R1-nj, por meio da contagem do número cromossômico mitótico dos haploides putativos.

2. Verificar a eficiência da metodologia de duplicação genômica de haploides putativos para a obtenção de possíveis genótipos duplo-haploides, por meio da determinação da ploidia meiótica dos possíveis genótipos duplo-haploides.

3. Verificar a estabilidade meiótica dos possíveis genótipos duplo-haploides, por meio de análises citogenéticas via:
 - Avaliação da estabilidade genética das fases da meiose um e dois;
 - Cálculo do índice de recombinação, por meio da quantificação e classificação dos tipos de quiasmas na subfase da prófase: diacinese;
 - Estimativa do índice meiótico, por meio da análise da regularidade dos produtos pós-meióticos;
 - Estimativa da viabilidade polínica, por meio da análise da integridade do protoplasto dos grãos de pólen.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material Vegetal

Foram utilizados no presente estudo, oito genótipos haploides putativos e oito possíveis genótipos duplo-haploides, desenvolvidos pela empresa Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas, Minas Gerais, Brasil) (Tabela 1). Os genótipos H foram produzidos através do cruzamento de populações-fontes com o híbrido tropicalizado indutor de haploidia gimnogenética Tail P1 x Tail P2 (TAILs - Tropically Adapted Inducer Lines), que é descendente da linhagem indutora de haploidia Wisconsin-23 (W23) e possui o marcador fenotípico para identificação de genótipos haploides, baseado na pigmentação por antocianina expressa pelo gene R1-nj.

Tabela 1. Genótipos haploides putativos e possíveis duplo-haploides de milho.

Cruzamentos	H	DH
BR 106 x (Tail P1 x Tail P2)	H1700345	DH1700345
BR 106 x (Tail P1 x Tail P2)	H1700346	DH1700346
BR 106 x (Tail P1 x Tail P2)	H1700347	DH1700347
BRS Gorutuba x (Tail P1 x Tail P2)	H1700348	DH1700348
BRS Sol da Manhã x (Tail P1 x Tail P2)	H1700349	DH1700349
BRS Sol da Manhã x (Tail P1 x Tail P2)	H1700350	DH1700350
BRS Saracura x (Tail P1 x Tail P2)	H1700351	DH1700351
BRS Saracura x (Tail P1 x Tail P2)	H1700352	DH1700352

Fonte: Embrapa milho e Sorgo.

As sementes H putativas, foram obtidas pelo cruzamento das populações-fontes: BR 106, BRS Gorutuba, BRS Sol da Manhã e BRS Saracura com o indutor de H Tail P1 x Tail P2 e pela seleção primária de H a partir da expressão do sistema R1-nj, ou seja, foram selecionadas semente com endosperma roxo e embrião branco (Figura 3). Ao

passo que, as possíveis sementes DH foram obtidas pela duplicação cromossômica dessas sementes H putativas. Este material foi plantado na Escola Técnica Estadual Agrícola Antônio Sarlo, área de pesquisa agropecuária da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro — UENF, localizada na cidade de Campos dos Goytacazes, no Estado do Rio de Janeiro. Para o presente estudo, a UENF participou com o desenvolvimento da pesquisa e a empresa Embrapa Milho e Sorgo com o material para a mesma.

4.2. Contagem do número cromossômico mitótico dos haploides putativos

Sementes de milho com ausência de expressão fenotípica de antocianina (roxa) no embrião e presença de expressão no endosperma, do marcador R1-nj, foram germinadas em placas de petri fechadas na câmara de germinação a 25°C. Entre quatro e seis dias de germinação, pontas de raízes medindo aproximadamente 1,5 cm de comprimento foram coletadas e bloqueadas em solução antimitótica de 8-hidroxiquinolina 300 ppm, inibidor do fuso mitótico, e cicloheximida 25ppm, inibidor da síntese de proteínas, respectivamente na proporção 19:1 por 2:30 horas a temperatura ambiente (28°C). Posteriormente, essas pontas de raízes foram fixadas em solução de etanol e ácido acético respectivamente na proporção 3:1 e armazenados na geladeira a 4°C, sendo realizada a troca deste fixador para álcool 70% após 24h.

Para a coloração dos cromossomos dos meristemas das pontas de raízes, foi utilizado o método de Feulgen, de acordo com Aguiar-Perecin e Vossa (1985). No qual, as pontas de raízes foram submetidas a uma hidrólise ácida em ácido clorídrico (HCl) 1N a 60°C durante 8 minutos, lavadas em água corrente, submersas em tubos de ensaio contendo reativo de Schiff por 45 minutos em locais com ausência de iluminação e novamente lavadas em água corrente. Após o método é possível identificar os meristemas por uma coloração roxa (Figura 4).

Para o preparo das lâminas, os meristemas das pontas de raízes foram cortados e macerados sobre uma lâmina contendo aproximadamente uma gota de solução de ácido acético a 45%. Após a retirada dos *debris*, foi acrescentado ao tecido macerado,

aproximadamente uma gota do corante solução de carmim acético a 2% e a lâmina foi coberta por uma lamínula. O conjunto de lâmina e lamínula foi levemente aquecido sobre as chamas de uma lamparina a álcool e em seguida observado ao microscópio óptico nas objetivas de 60x e 100x.

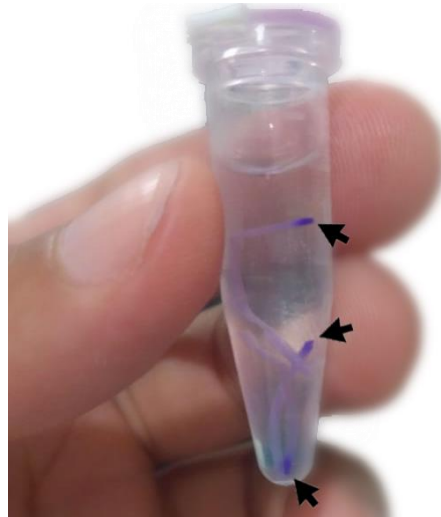


Figura 4. Meristemas coloridos em roxo após o método de Feulgen. Meristemas corados em roxo (setas), e embebidos em reativo de Schiff após 45 minutos. Fonte: o autor.

Foram preparadas dez lâminas por genótipo e para cada lâmina foi contado o número de cromossomos de duas placas metafásicas, totalizando vinte placas metafásicas por genótipo.

4.3. Análises meióticas

Foram coletados diversos *mixes* de botões florais masculinos em diferentes fases de desenvolvimento, para cada um dos possíveis oito genótipos DH. Os botões florais foram fixados em solução de etanol e ácido acético respectivamente na proporção 3:1 e armazenados na geladeira a 4°C, sendo realizada a troca deste fixador para álcool 70% após 24h.

Para o preparo das lâminas, as anteras foram cortadas transversalmente com o auxílio de um bisturi e, em seguida, maceradas com um escalpelo, visando à liberação dos meiócitos sobre aproximadamente uma gota do corante solução de carmim acético a 2% (Figura 5). Após a retirada dos *debris* sobre a lâmina, o material foi coberto com uma lamínula. O conjunto de lâmina e lamínula foi levemente aquecido sobre as chamas de uma lamparina a álcool e em seguida observado ao microscópio óptico nas objetivas de 40x, 60x e 100x.

Sob observação microscópica, foram realizadas as seguintes análises meióticas: determinação da ploidia meiótica, avaliação da estabilidade genética das fases da meiose um e dois e estimativa do índice de recombinação.

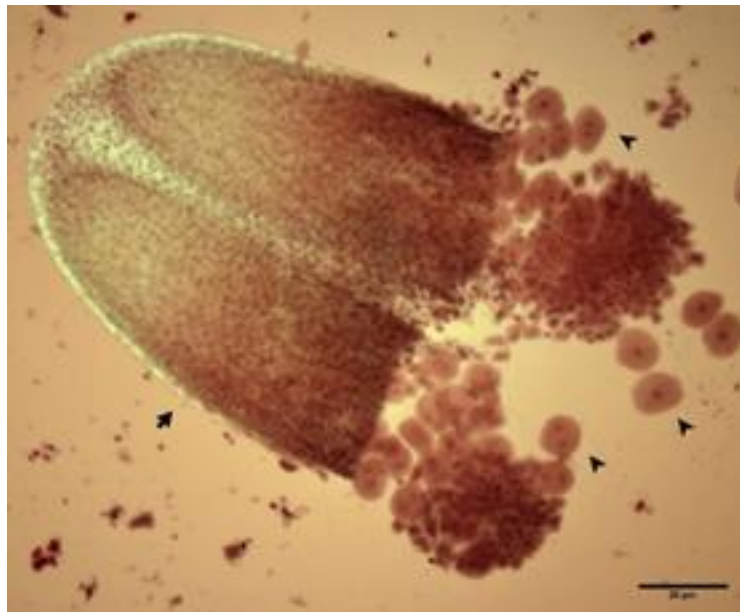


Figura 5. Meiócitos liberados durante o corte e maceração da antera corada com solução de carmim acético a 2%. Extremidade da antera que sofreu um corte transversal (seta) e meiócitos corados com solução de carmim acético a 2%, liberados após maceração, em diversas fases da meiose (cabeças de setas). (20x) Fonte: o autor.

4.3.1 Determinação da ploidia meiótica dos possíveis duplo-haploides

Foram contabilizadas as frequências das valências em que os cromossomos homólogos se encontravam pareados (univalentes, bivalentes, trivalente e polivalentes) em 50 células da última subfase da prófase: a diacinese, por genótipo. Além disso, foram contados quantos cromossomos homólogos pareados haviam em cada uma das 50 células, por genótipo, a fim de verificar a ocorrência de desvios no número de cromossomos padrão da espécie, 10 bivalentes, ou seja, 20 cromossomos.

4.3.2 Avaliação da estabilidade genética da meiose dos possíveis duplo-haploides

Foram monitoradas as seguintes fases dos dois ciclos da meiose: prófase I (apenas a subfase diacinese), metáfase I, anáfase I, telófase I, metáfase II, anáfase II e telófase II, a fim de verificar a possível ocorrência de anormalidades presentes em cada fase, para cada genótipo, e assim quantificar através de porcentagens as frequências das anormalidades.

4.3.3 Índice de recombinação dos possíveis duplo-haploides

Foram classificadas as configurações dos quiasmas presentes em 50 células da subfase da prófase: diacinese, para cada genótipo. A classificação da configuração dos quiasmas abrangeu duas variantes: configuração em anel e em bastão. Os quiasmas em configuração anel foram identificados pela presença de pontos de cruzamentos entre os cromossomos homólogos de forma intersticial e considerados como dois quiasmas, na medida que, os quiasmas em configuração bastão foram identificados pela presença de pontos de cruzamentos de forma terminal ou subterminal e considerados como um quiasma. Ainda, foram contabilizadas as frequências das configurações que os quiasmas se encontravam durante a diacinese e calculada a média de quiasmas em anel (MQA), bastão (MQB) e a média total de quiasmas (MTQ). Por fim, o índice de recombinação (IR) foi estimado conforme a equação de Darlington (1958).

$$IR = [\Sigma N^{\circ} \text{ total de quiasmas} \div N^{\circ} \text{ de células analisadas}] + \text{número haploide da espécie.}$$

4.4. Índice meiótico dos possíveis duplo-haploides

Foi coletado um *mix* de cinco botões florais masculinos na pré-antese (antes da maturação) de plantas diferentes, para cada um dos oito genótipos. Os botões florais foram fixados em solução de etanol e ácido acético respectivamente na proporção 3:1 e armazenados na geladeira a 4°C, sendo realizada a troca deste fixador para álcool 70% após 24h.

O preparo das lâminas seguiu o mesmo protocolo utilizado nas análises das fases meióticas. O método de observação das lâminas foi o de varredura. Foram preparadas cinco lâminas para cada genótipo. Em cada lâmina foram contabilizados e classificados 100 produtos pós-meióticos, perfazendo um total de 500 produtos pós-meióticos por genótipo. A classificação dos produtos pós-meióticos abrangeu duas variantes: produtos pós-meióticos normais e anormais. Os produtos pós-meióticos normais foram identificados pela presença de uma tétrade completa (quatro células haploides, cada uma com um nucléolo, juntas dentro do mesmo revestimento de parede celular composto de calose), na medida que, os produtos pós-meióticos anormais foram identificados pela presença de qualquer desvio das tétrades completas, como mônade, díade, tríade e tétrade com diversos micronúcleos. Por fim, o índice meiótico (IM) foi estimado conforme a equação de Love (1951).

$IM (\%) = N^{\circ} \text{ de tétrades normais} \times 100 \div N^{\circ} \text{ total de produtos pós-meióticos.}$

4.5. Viabilidade polínica dos possíveis duplo-haploides

Foi coletado um *mix* de cinco botões florais masculinos na antese (durante a maturação) de plantas diferentes, para cada um dos oito genótipos. Os botões florais foram coletados por volta das 9:00 horas, fixados em solução de etanol e ácido acético respectivamente na proporção 3:1 e armazenados na geladeira a 4°C, sendo realizada a troca deste fixador para álcool 70% após 24h.

Para o preparo das lâminas, anteras foram cortadas transversalmente com o auxílio de um bisturi e, em seguida, maceradas com um escalpelo, visando à liberação dos grãos de pólen sobre aproximadamente uma gota do corante solução de Alexander (Alexander, 1969). Após a retirada dos *debris* sobre a lâmina, o material foi coberto com uma lamínula e observado ao microscópio óptico nas objetivas de 40x e 60x.

O método de observação das lâminas foi o de varredura. Foram preparadas cinco lâminas para cada genótipo. Em cada lâmina foram contabilizados e classificados 500 grãos de pólen, perfazendo um total de 2.500 grãos de pólen por genótipo. A classificação polínica abrangeu duas variantes: grãos de pólen viáveis e inviáveis. Os grãos de pólen viáveis foram detectados pela presença da cor vermelha ou púrpura em seus protoplastos, na medida que, os grãos de pólen inviáveis foram detectados pela ausência de citoplasma, contração ou enrugamento do protoplasto. Desta forma, a viabilidade polínica foi estimada pela porcentagem de grãos de pólen viáveis em relação ao total de grãos analisados.

4.6. Fotomicrografias

Todas as lâminas do presente estudo foram examinadas com o microscópio óptico *Olympus BX60* e as fotomicrografias capturadas com o software *CellSens Standard Image* (versão 1.8). Para o preparo das figuras, foi utilizado o software *Microsoft PowerPoint*, presente no pacote *Microsoft Office Professional Plus 2019*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Contagem do número cromossômico mitótico dos haploides putativos

A utilização do método de Feulgen, de acordo com o descrito por Aguiar-Perecin e Vossa (1985), foi bem sucedido, sendo possível visualizar cromossomos metafásicos bem corados e assim realizar a contagem cromossômica para uma seleção de haploides 100% confiável. Conforme a tabela 2, apenas no genótipo H1700349, advindo da população-fonte BRS Sol da Manhã, foi possível visualizar células com ploidia “n”, ou seja, 10 cromossomos (Figura 6-I), nos demais genótipos foram visualizadas, a uma taxa de 100%, placas metafásicas com 20 cromossomos, ou seja, diploides (Figura 6). No total, o genótipo H1700349 apresentou 10% das placas metafásicas com 10 cromossomos e 90% com 20.

Tabela 2. Contagem do número cromossômico dos H putativos de milho via mitose.

Genótipos	População-fonte	Nº de placas metafásicas	
		2n	n
H1700345	BR 106	20	0
H1700346	BR 106	20	0
H1700347	BR 106	20	0
H1700348	BRS Gorutuba	20	0
H1700349	BRS Sol da Manhã	18	2
H1700350	BRS Sol da Manhã	20	0
H1700351	BRS Saracura	20	0
H1700352	BRS Saracura	20	0

Fonte: o autor.

Estes dados demonstram que a indução a H para a obtenção de genótipos DH falhou 100% em sete dos oito genótipos. Desta forma o método de indução de H realizado pela empresa Embrapa Milho e Sorgo mostrou eficiência de 10% no genótipo H1700349 e de 1,25% no total, quando analisados todos os genótipos juntos.

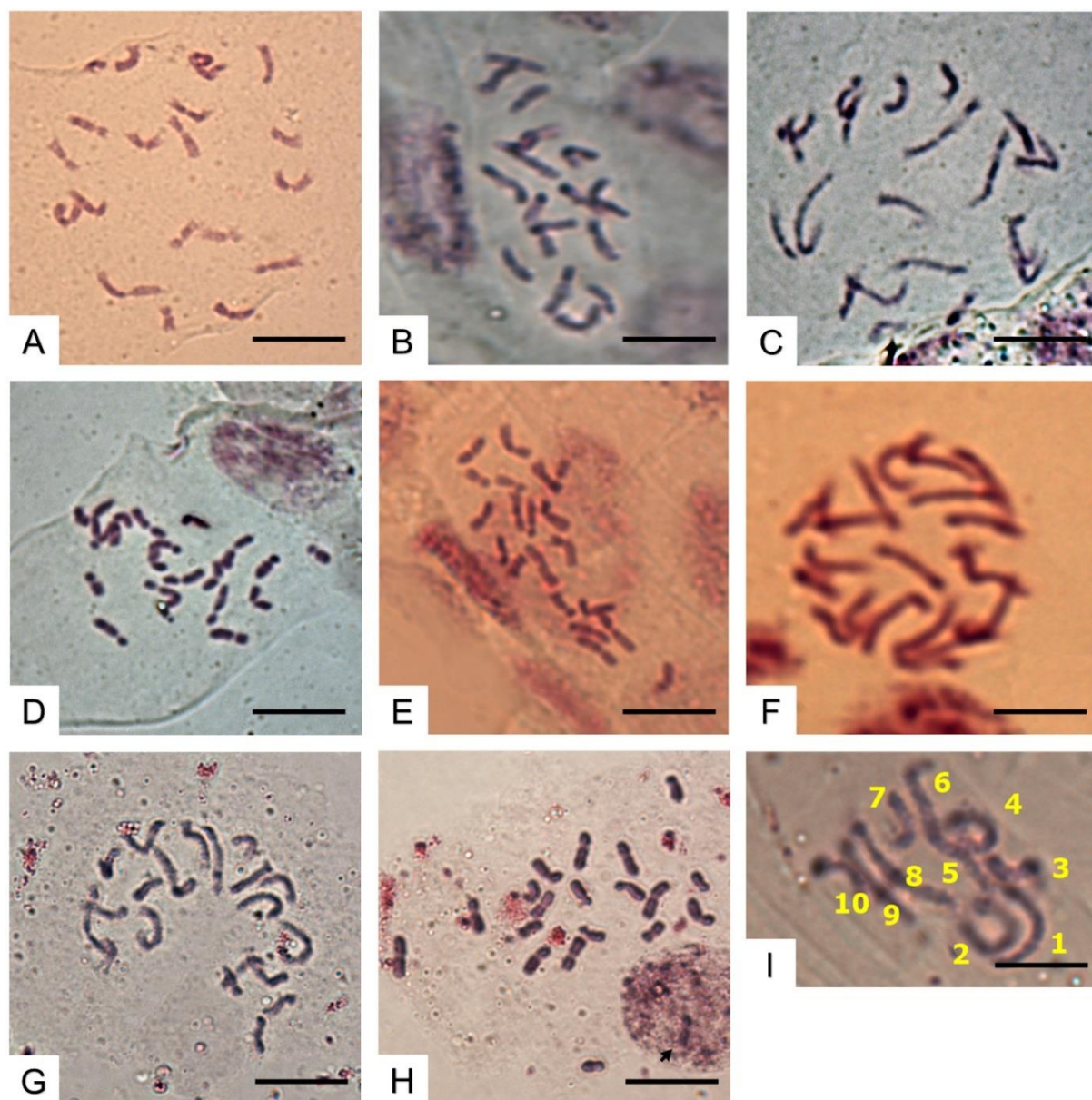


Figura 6. Placas metafásicas revelando o número cromossômico dos haploides putativos. A) Genótipo DH1700345, com 20 cromossomos; **B)** Genótipo DH1700346, com 20 cromossomos; **C)** Genótipo DH1700347, com 20 cromossomos; **D)** Genótipo DH1700348, com 20 cromossomos; **E)** Genótipo DH1700349, com 20 cromossomos; **F)** Genótipo DH1700350, com 20 cromossomos; **G)** Genótipo DH1700351, com 20 cromossomos; **H)** Genótipo DH1700352, com 20 cromossomos (com um cromossomo em cima do nucléolo (seta)); **I)** Genótipo DH1700349, com 10 cromossomos. (60x) Fonte: o autor.

Segundo os resultados de Prigge et al. (2012), linhas TAILs possuem taxas de indução entre 8% e 10% de eficiência. Ainda, também utilizando TAILs, Prassanna et al. (2012) e Kebede et al. (2011), obtiveram valores de indução H próximos de 8% a 14%. Desta forma, os valores obtidos no genótipo H1700349, foram correlacionados ao de Prigge et al. (2011), Prassanna et al. (2012) e Kebede et al. (2011). Entretanto, quando comparado aos resultados de Rabel et al. (2008), a indução foi maior, visto que este autor descreveu resultados de indução menor: em 64 espigas obtidas, apenas três espigas produziram sementes H: a espiga 1 com indução de 0,6% e as espigas 15 e 17 com indução de 0,4%. Desta forma, observa-se que a aplicação do protocolo *in vivo* apresenta bastante variação.

Quando relacionamos esses resultados aos outros sete genótipos deste estudo que apresentaram 0% de indução H, temos uma discrepância de valores enorme. Porém, esta falta de indução pode ter duas explicações: a primeira, onde pode ter ocorrido uma falha durante os cruzamentos, com as populações-fonte possuindo algum tipo de resistência genética a indução (Coe e Sarkar, 1964; Belicuas et al., 2007; Chaikam e Prassanna, 2012; Chaikam et al., 2015) e a segunda, onde fatores ambientais impediram a indução (Trindade et al., 2019).

O processo de obtenção de haploides, sofre influencias de diversos fatores como: características agronômicas do indutor; sincronia de florescimento com as populações-fonte; forma de polinização (manual ou livre) e condições climáticas e de manejo do campo (Trindade et al., 2019). Entretanto, mesmo com essa variação gerada através do ambiente e da técnica de cultivo, as taxas de indução de haploidia desses sete genótipos avaliados então bem abaixo dos valores relatado por Pierre et al. (2011) para genótipos descendentes do indutor haploide feminino Wisconsin-23, que é de 3% para cada genótipo. Logo, são necessárias maiores análises dos indutores de H, como cruzamento de Tail P1 x Tail P2 com outras populações-fonte já estabelecidas na produção de DH para verificar a taxa de indução de H, e das populações-fonte utilizadas neste trabalho, verificando se as mesmas possuem genes que reprimem a indução de H.

Segundo Prassanna et al. (2012), uma taxa de indução de H maior que 6% é esperada para que a metodologia seja considerada vantajosa para a implementação em um programa de desenvolvimento de linhagens duplo-haploides. Desta forma, apenas o genótipo H1700349 estaria apto para continuar neste processo, a fim de aprimorar a obtenção de H. Além disso, foi constatado que nesse estudo, o sistema de identificação de H via R1-nj mostrou sementes com endosperma roxo e embrião branco que não eram haploides verdadeiros. Entretanto, na literatura alguns autores relatam que mesmo que o sistema R1-nj ofereça uma maneira eficiente de identificar H, a sua expressão pode ser altamente influenciada pelo histórico genético do parental população-fonte (Chaikam e Prassanna, 2012; Chaikam et al., 2015). Desta forma, atribui-se uma possível influência dos genótipos das populações-fonte tropicais a falha do sistema R1-nj e a outros fatores desconhecidos. A produção de haploides utilizando linhagens indutoras tropicalizadas ainda não se encontra em um estágio de desenvolvimento aprimorado, sendo necessários mais estudos na área para melhores conclusões.

5.2. Análises meióticas

5.2.1. Determinação da ploidia meiótica dos possíveis duplo-haploides

Por meio da análise da subfase diacinese, observou-se que todos os genótipos apresentaram, predominantemente, dez bivalentes (Figura 7). Esses dados corroboram com os resultados encontrados para milho na literatura, referentes ao número de valência cromossômica regular da espécie, relatados por Rhoades (1950) e Chang e Neuffer (1989). Desta forma, o número cromossômico dos genótipos é equivalente a $2n=2x=20$, demonstrando que o nível de ploidia se configura como diploide e que a metodologia de duplicação cromossômica falhou, visto que não foi encontrada nenhuma célula com valência de tetraploides, poliploides ou desvios de bivalentes para o conjunto cromossômico como um todo. Desta forma, dentro do banco de sementes primariamente classificadas como DH, apenas dentro do genótipo DH1700349 existem possibilidades de se encontrar DH. Entretanto, mesmo em DH1700349 não foram encontradas células com conjunto cromossômico univalente.

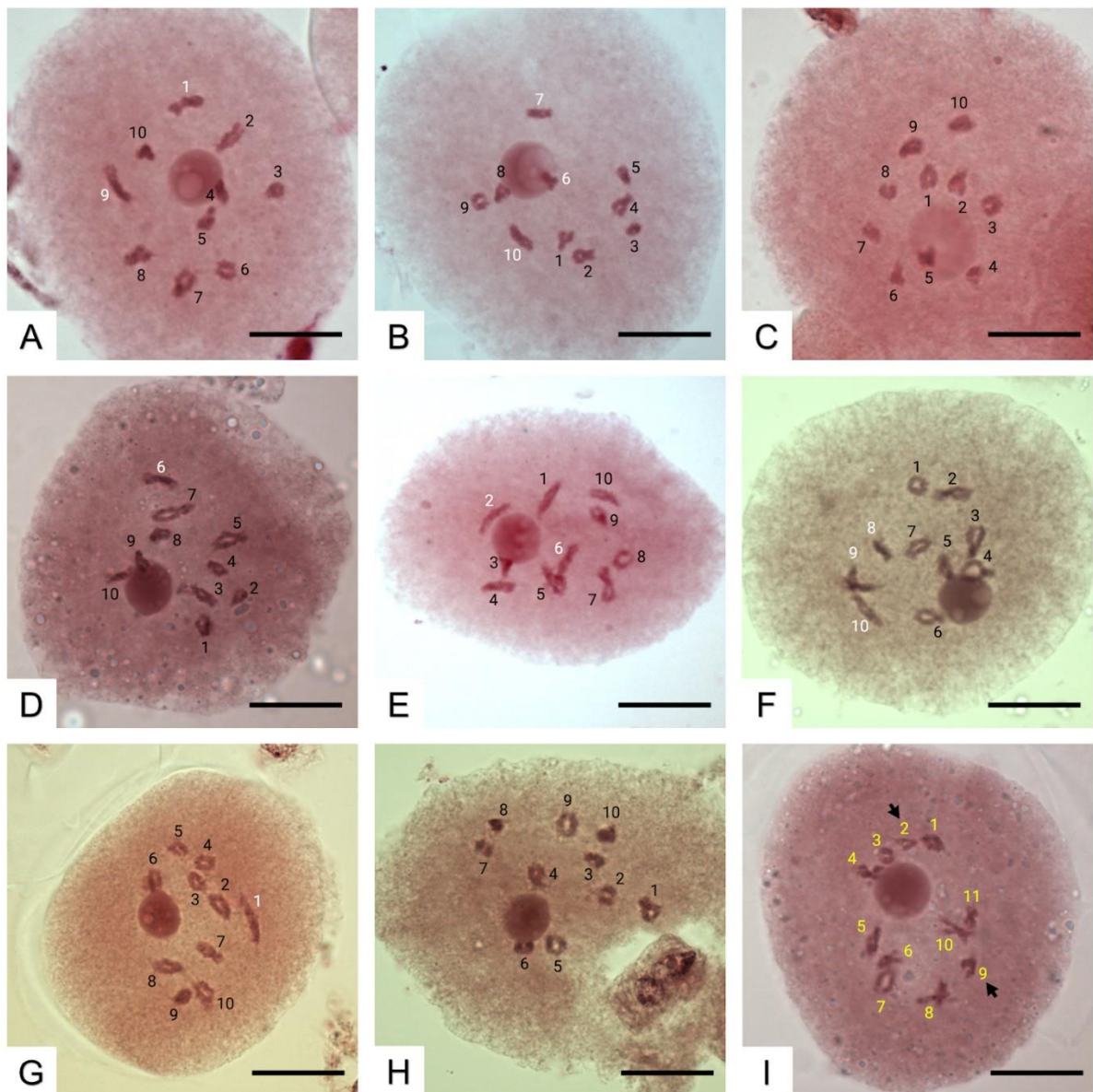


Figura 7. Diacineses. **A)** Genótipo DH1700345, com dez bivalentes e oito qiasmas em configuração anel (preto) e dois em bastão (branco); **B)** Genótipo DH1700346, com dez bivalentes e sete qiasmas em configuração anel (preto) e três em bastão (branco); **C)** Genótipo DH1700347, com dez bivalentes e dez qiasmas em configuração anel (preto); **D)** Genótipo DH1700348, com dez bivalentes e nove qiasmas em configuração anel (preto) e um em bastão (branco); **E)** Genótipo DH1700349, com dez bivalentes e oito qiasmas em configuração anel (preto) e dois em bastão (branco); **F)** Genótipo DH1700350, com dez bivalentes e sete qiasmas configuração em anel (preto) e três em bastão (branco); **G)** Genótipo DH1700351, com dez bivalentes e nove qiasmas em configuração anel (preto) e um em bastão (branco); **H)** Genótipo DH1700352, com dez bivalentes e dez qiasmas em configuração anel (preto); **I)** Genótipo DH1700345, com 9 bivalentes e dois univalentes apontados em 2 e 9 (seta). (60x) Fonte: o autor.

5.2.2. Anormalidades meióticas

O número de células analisadas durante a meiose variou de 702 a 1.258 por genótipo, com um total de 7.020 meiócitos analisados (Tabela 3). Os tipos de anormalidades meióticas encontradas foram: Cromossomos univalentes na subfase diacinese (CUD) (Figura 7), polaridade do fuso perturbada na metáfase 1 (PFPM1), cromossomos retardatários na metáfase 1 (CRM1), cromossomos adiantados na anáfase 1 (CAA1) (segregação precoce), cromossomos retardatários na anáfase 1 (CRA1), pontes de cromatina na anáfase 1 (PCA1), assincronia durante a metáfase e a anáfase 2 (ADMN2), cromossomos adiantados na anáfase 2 (CAA2), cromossomos retardatários na anáfase 2 (CRA2), pontes de cromatina na anáfase 2 (PCA2) e micronúcleos nas tétrades dos produtos pós-meióticos (MNT) (Figura 8). Todas as anormalidades relatadas no presente estudo estão de acordo com as anormalidades mais frequentes em milho encontradas na literatura e já foram analisadas por diversos autores (Pagliarini et al., 2002; Utsunomiya et al., 2002; Ricci et al., 2007; Khah et al., 2018; Kaur e Singhal, 2019).

As maiores frequências de anormalidades referentes a cromossomos e ao material genético (RCMG) foram encontradas na anáfase 1, com o genótipo DH1700345 apresentando o maior pico de anormalidade, com índice de 37% de CAA1 (Gráfico 1). Ao passo que, as menores frequências, dentro do espaço amostral que apresentou anormalidades, foram encontradas em MNT, com os genótipos DH1700345, DH1700346 e DH1700347 (os três oriundos da mesma população-fonte BR 106) apresentando frequência menor que 1% da anormalidade, e os demais apresentando frequência de 0%. Algumas dessas anormalidades descritas, como PFPM1, CRM1 e CAA1, foram encontradas em todos os genótipos, enquanto outras, como CUD, CRA1, PCA1, CAA2, CRA2, PCA2 e MNT, foram encontradas apenas em alguns genótipos (Gráfico 1). Essa elevada porcentagem de anormalidades relacionadas a movimentos precoces ou retardatários nos cromossomos também foi observada nos trabalhos de diversos autores (Pagliarini, 2000; Pagliarini et al., 2002; Ricci et al., 2007; Kaur e Singhal, 2019).

Tabela 3 — Frequências das anormalidades RCMG meióticas encontradas nos genótipos de milho.

Genótipos	Anormalidades RCMG									
	(Células afetadas) % (Total de células analisadas)									
	CUD	PFPM1	CRM1	CAA1	CRA1	PCA1	CAA2	CRA2	PCA2	MNT
DH1700345	(2) 4% (50)	(8) 1,9% (423)	(41) 9,6% (423)	(78) 37% (212)	(46) 22% (212)	(44) 21% (212)	(21) 29% (73)	(6) 8% (73)	(19) 14% (73)	(4) 0,8% (500)
DH1700346	(2) 4% (50)	(1) 1,25% (80)	(6) 7,5% (80)	(3) 4,4% (68)	(2) 2,9% (68)	(0) 0% (68)	(3) 8,5% (35)	(0) 0% (35)	(0) 0% (35)	(1) 0,2% (500)
DH1700347	(2) 4% (50)	(3) 5,3% (56)	(3) 5,3% (56)	(2) 4,3% (46)	(3) 6,5% (46)	(0) 0% (46)	(4) 8% (50)	(1) 2% (50)	(0) 0% (50)	(3) 0,6% (500)
DH1700348	(0) 0% (50)	(1) 0,8% (125)	(11) 8,8% (125)	(5) 4,1% (120)	(2) 1,6% (120)	(0) 0% (120)	(0) 0% (28)	(0) 0% (28)	(0) 0% (28)	(0) 0% (500)
DH1700349	(2) 4% (50)	(4) 2,2% (180)	(8) 4,4% (180)	(7) 10% (70)	(3) 4,2% (70)	(0) 0% (70)	(0) 0% (32)	(0) 0% (32)	(0) 0% (32)	(0) 0% (500)
DH1700350	(0) 0% (50)	(7) 1,9% (367)	(33) 8,9% (367)	(12) 6% (196)	(9) 4,5% (196)	(0) 0% (196)	(2) 2,9% (68)	(0) 0% (68)	(0) 0% (68)	(0) 0% (500)
DH1700351	(1) 2% (50)	(2) 2% (100)	(5) 5% (100)	(4) 6,6% (60)	(4) 6,6% (60)	(0) 0% (60)	(3) 6% (50)	(1) 2% (50)	(0) 0% (50)	(0) 0% (500)
DH1700352	(0) 0% (50)	(3) 3% (100)	(5) 5% (100)	(2) 4,3% (46)	(0) 0% (46)	(0) 0% (46)	(0) 0% (35)	(0) 0% (35)	(0) 0% (35)	(0) 0% (500)

CUD = Cromossomos univalentes na subfase diacinese. PFPM1 = Polaridade do fuso perturbada na metáfase 1. CRM 1 = Cromossomos retardatários na metáfase 1. CAA1 = Cromossomos adiantados na anáfase 1. CRA1 = Cromossomos retardatários na anáfase 1. PCA1 = Pontes cromossômicas na anáfase 1. CAA2 = Cromossomos adiantados na anáfase 2. CRA2 = Cromossomos retardatários na anáfase 2. PCA2 = Pontes cromossômicas na anáfase 2. MNT = Micronúcleos nas tétrades dos produtos pós-meióticos. Fonte: o autor.

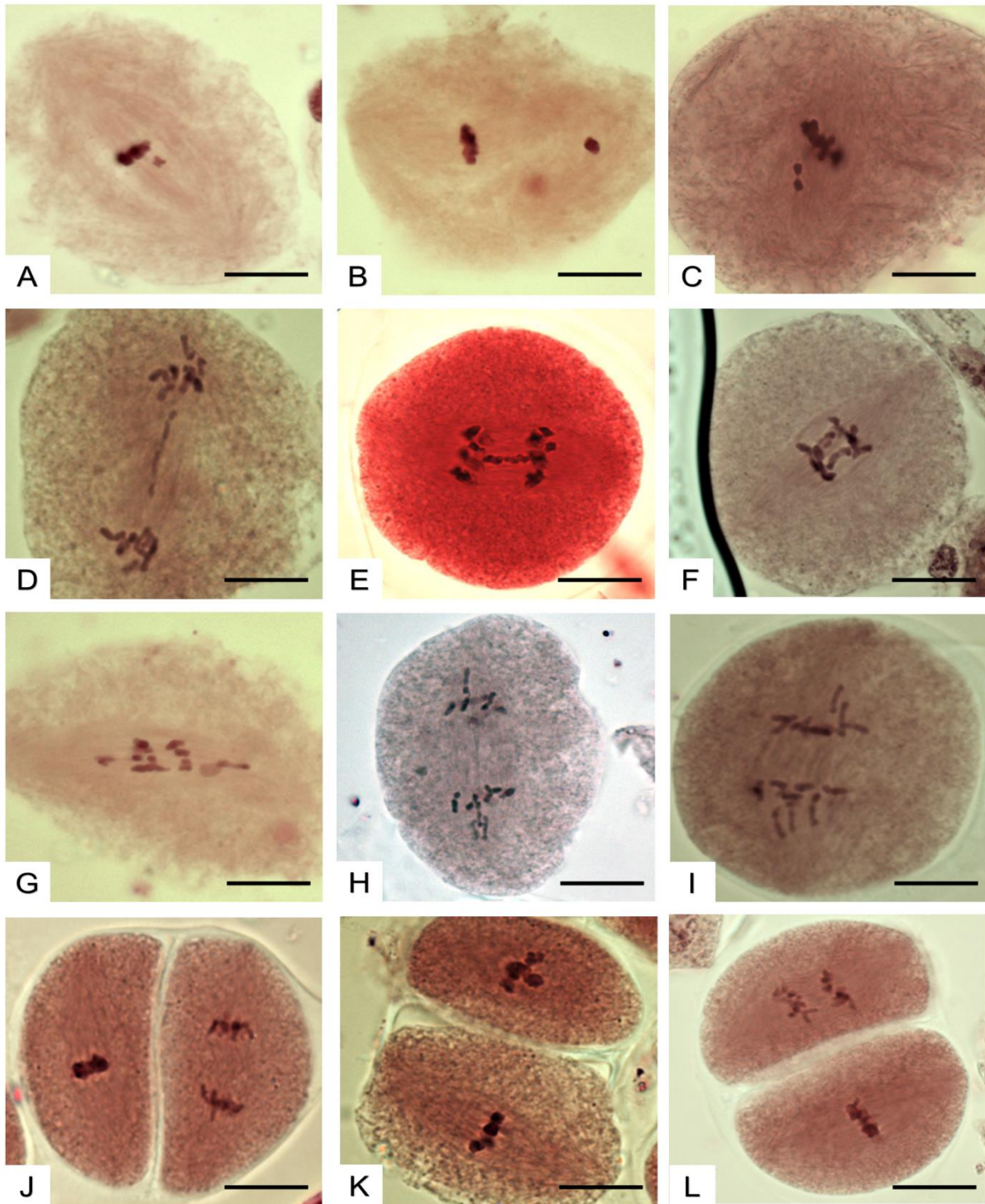
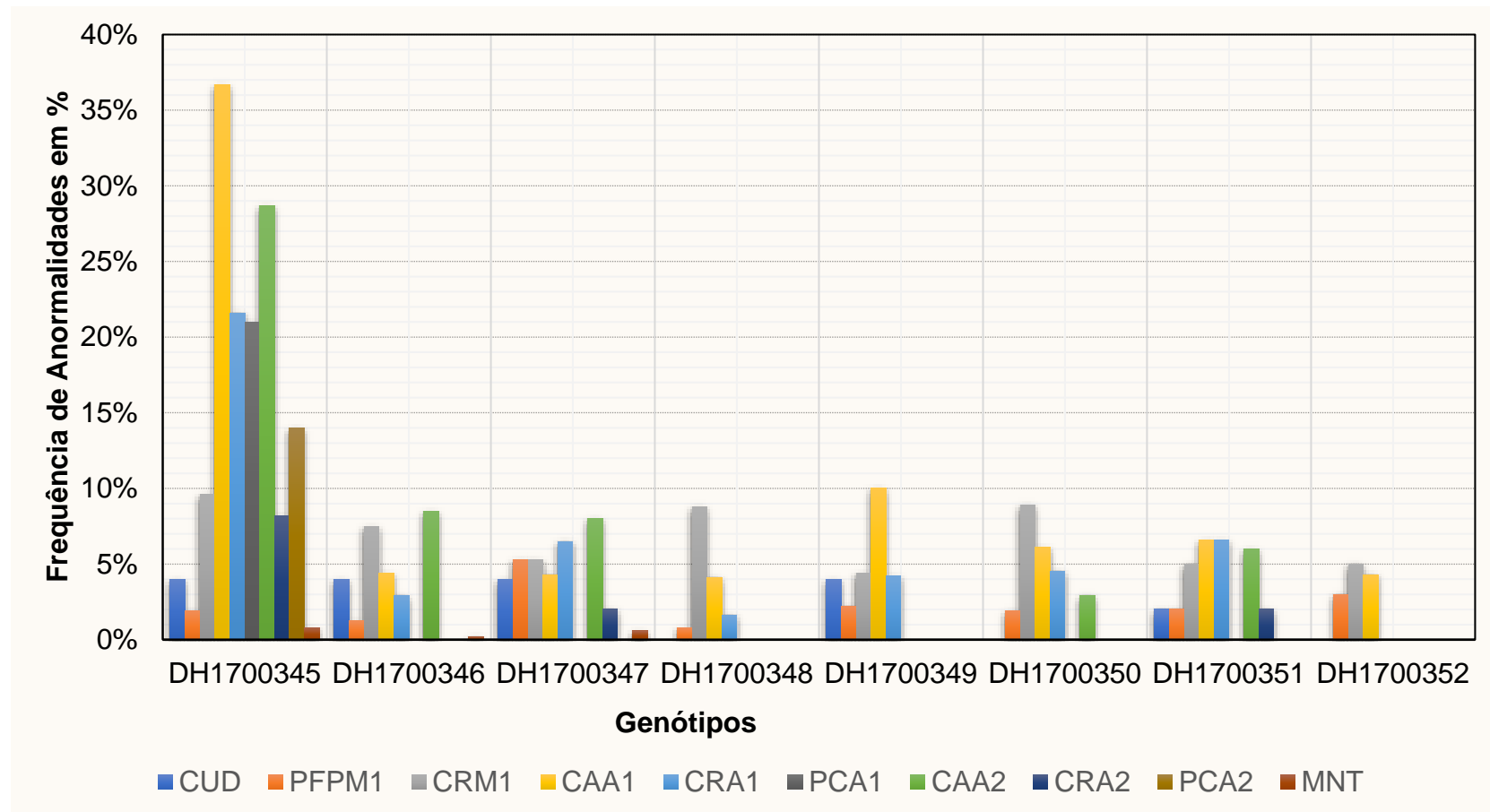


Figura 8. Anormalidades meióticas. A-C) Migração cromossômica retardatária para a placa metafásica e polaridade perturbada; D-F) Pontes cromossômicas simples e duplas durante a anáfase; G-I) Segregação cromossômica assíncrona e migração cromossômica precoce para os pólos; J-L) Assincronia das fases do segundo ciclo meiótico em microsporócitos. (60x) Fonte: o autor.

Gráfico 1 — Frequências das anormalidades meióticas encontradas nos genótipos de milho em barras.



CUD = Cromossomos univalentes na subfase diacinese. PFPM1 = Polaridade do fuso perturbada na meiose 1. CRM 1 = Cromossomos retardatários na meiose 1. CAA1 = Cromossomos adiantados na anáfase 1. CRA1 = Cromossomos retardatários na anáfase 1. PCA1 = Pontes cromossômicas na anáfase 1. CAA2 = Cromossomos adiantados na anáfase 2. CRA2 = Cromossomos retardatários na anáfase 2. PCA2 = Pontes cromossômicas na anáfase 2. MNT= Micronúcleos nas tétrades dos produtos pós-meióticos. Fonte: o autor.

Segundo Ricci et al. (2007), em geral, estes tipos de anormalidades são formados a partir de cromossomos univalentes, pois existe uma certa tendência de cromossomos univalentes apresentarem migração precoce ou retardatária para os polos. Uma vez que, cromossomos univalentes não se encontram pareados, eles podem se perder do seu conjunto cromossômico e migrarem para o polo onde já se encontra o seu homólogo, desta forma, criando duas células com aneuploidias.

Além disso, esse movimento anormal dos cromossomos não é uma exclusividade dos cromossomos univalentes, como observado na figura 8-C, no qual, visualiza-se um bivalente retardatário, mas também de fatores relacionados a perturbação do fuso meiótico. Gulfishan et al. (2012), verificaram e relacionaram as anormalidades CRM1, CAA1, CRA1, CAA2 e CRA2 como, também, uma consequência da perturbação no fuso meiótico. Desta forma, esse material que não consegue chegar até os polos forma micronúcleos. Cromossomos que não conseguem se reunir nas fibras do fuso durante a metáfase, que é uma propriedade essencial para sua segregação síncrona, se reúnem em micronúcleos de cromatina de tamanho diferentes durante e após a telófase (Pagliarini et al., 2002; Ricci et al., 2007; Pozzobon et al., 2011; Kaur e Singhal, 2019).

Entretanto, essa consequência pode não se aplicar tão efetivamente a anormalidades como CAA1 e CAA2, visto que os mesmos já se encontram a caminho do polo correto. Segundo Kaur e Singhal (2019), a disjunção precoce de bivalentes normalmente não afeta a distribuição normal de cromossomos. Logo, esta anormalidade não é tão prejudicial para o gameta final e, desta forma, o pico de CAA 1 do genótipo DH1700345 no gráfico 1, pode não afetar de maneira efetiva a sua viabilidade polínica.

As anormalidades PCA1 e PCA2, só foram encontradas no genótipo DH1700345, com uma taxa de 21% para PCA1 e 14% para PCA2. Segundo Saylor e Smith (1996), a formação de pontes de cromatina podem ser consequência decorrente da não terminação dos quiasmas dos bivalentes na diacinese e até na metáfase, visto que alguns quiasmas só são desfeitos na metáfase (Guerra, 1988), desta forma, durante a anáfase ocorre a formação de pontes, pois os cromossomos ainda estão ligados. Assim como os cromossomos retardatários, a consequência dessas anormalidades é a formação de

micronúcleos durante e após a telófase (Pagliarini et al., 2002; Ricci et al., 2007; Kaur e Singhal, 2019). Entretanto, se para cromossomos retardatários ocorrem aneuploidias, para as pontes de cromatina podem ocorrer deleções de partes importantes do genoma e conseqüentemente abortos ou infertilidades dos grãos de pólen (Pagliarini, 2000), uma vez que o material é distendido entre os polos ao longo da anáfase, como pode ser visto na figura 8 D, E e F. Logo, as duas anormalidades diminuem a fertilidade de uma população, quando encontradas em índices elevados.

As fases prófase 2 e telófase 1 e 2 não apresentaram nenhum índice de anormalidades. A anormalidade ADMA2 (Figura 8 J, K e L), representa uma possibilidade de formação de produtos pós-meióticos desbalanceados temporariamente, como tríades, pois, ao passo que um dos microsporócitos passou pela telófase 2 e atingiu a maturidade gerando dois gametas, o outro que não passou pela telófase 2 se encontra em seu estágio sem citocinese. Kaur e Singhal (2010), correlacionaram a anormalidade ADMA2 a formação de pólen estéril em *Vicia rigidula Royle*, entretanto, não mostraram de fato provas concretas para esta associação. Segundo Carrizo García et al. (2017), não existem provas de que ADMA2 reduz a viabilidade polínica de maneira efetiva, porém, o assincronismo meiótico promoveria diferenças metabólicas entre micrósporos em desenvolvimento e, portanto, grãos de pólen fisiologicamente heterogêneos dentro de um único microsporangium. Logo, este fato segundo os autores, está ligado a competitividade dos grãos de pólen pelos recursos e pela fertilização e não diretamente a germinação.

Em uma análise geral do Gráfico 1, é possível notar que o genótipo DH1700345 foi o único que apresentou taxas de anormalidades RCMG maiores que 10%, ao longo de toda a meiose. Os demais genótipos, apresentaram meiose regular (Figura 9) com poucas anormalidades RCMG pontuais durante todo o processo de divisão celular. Logo sugere-se, o que os processos de indução a H por linhagens indutora e duplicação cromossômica, não possuem muita relevância na regulação da meiose.

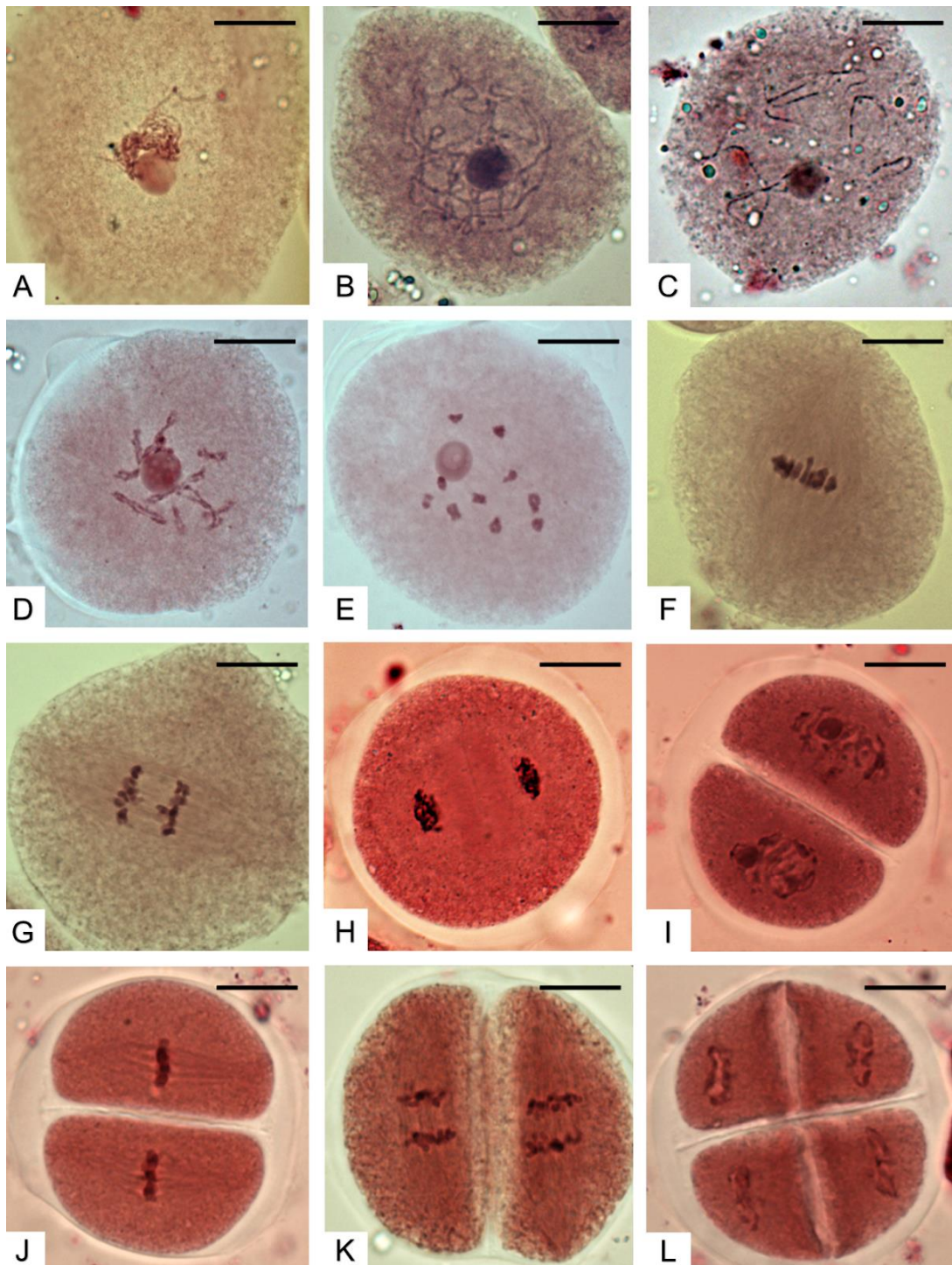


Figura 9. Meiose Regular. A-E) Prófase I; A) Leptóteno; B) Zigóteno; C) Paquíteno; D) Diplóteno; E) Diacinese; F) Metafase I; G) Anáfase I; H) Telófase I; I) Prófase II; J) Metafase II; K) Anáfase II; L) Telófase II. (60x) Fonte: o autor.

5.2.3. Índice de recombinação

A análise da terminação do crossing-over durante a diacinese na forma de quiasmas (Figura 7), permitiu caracterizar a integridade do pareamento cromossômico e assim estimar a frequência de bivalentes e univalentes (Tabela 4), observar as configurações de quiasmas mais frequentes nos genótipos e estimar os IR (Tabela 5).

Tabela 4. Frequência do número de cromossomos pareados em bivalentes durante a diacinese.

Genótipos	10 Bivalentes	9 Bivalentes	8 Bivalentes
DH1700345	48 células (96%)	2 células (4%)	0 células (0%)
DH1700346	48 células (96%)	1 célula (2%)	1 célula (2%)
DH1700347	48 células (96%)	2 células (4%)	0 células (0%)
DH1700348	50 células (100%)	0 células (0%)	0 células (0%)
DH1700349	48 células (96%)	2 células (4%)	0 células (0%)
DH1700350	50 células (100%)	0 células (0%)	0 células (0%)
DH1700351	49 células (98%)	1 célula (2%)	0 células (0%)
DH1700352	50 células (100%)	0 células (0%)	0 células (0%)

9 bivalentes demonstra a presença de 2 cromossomos univalentes. 8 bivalentes demonstra a presença de 4 cromossomos univalentes. Fonte: o autor.

Como observado na Figura 7-I e na Tabela 4, foram observadas pequenas taxas de cromossomos univalentes durante a diacinese, com uma frequência de 4% nos genótipos DH1700345, DH1700346, DH1700347 e DH1700349 e 2% no genótipo DH1700351. Os demais genótipos não apresentaram univalentes. Pagliarini (1980; 1983; 1989), demonstrou em milho que a frequência de cromossomos univalentes está diretamente relacionada a frequência de quiasmas, visto que, quanto maior o valor de IR, menor a taxa de cromossomos univalentes.

Tabela 5 — Quiasmas e índice de recombinação.

Genótipos	10 anéis	9 anéis	8 anéis	7 anéis	6 anéis	5 anéis	MQA	MQB	MTQ	IR	TAU
		e 1 bastão	e 2 bastão	e 3 bastão	e 4 bastão	e 5 bastão					
DH1700345	9 (18%)	18 (36%)	13 (26%)	6 (12%)	1 (2%)	1 (2%)	8.5	1.5	18.5	27.78	48
DH1700346	16 (32%)	23 (46%)	5 (10%)	4 (8%)	0 (0%)	0 (0%)	9	1	19	28.3	48
DH1700347	10 (20%)	19 (38%)	16 (32%)	2 (4%)	0 (0%)	1 (2%)	8.7	1.3	18.7	27.96	48
DH1700348	15 (30%)	20 (40%)	9 (18%)	2 (4%)	4 (8%)	0 (0%)	8.8	1.2	18.8	28.8	50
DH1700349	14 (28%)	24 (48%)	6 (12%)	3 (6%)	1 (2%)	0 (0%)	9	1	19	28.22	48
DH1700350	12 (24%)	21 (42%)	13 (26%)	2 (4%)	2 (4%)	0 (0%)	8.8	1.2	18.8	28.78	50
DH1700351	12 (24%)	26 (52%)	9 (18%)	2 (4%)	0 (0%)	0 (0%)	9	1	19	28.6	49
DH1700352	13 (26%)	19 (38%)	12 (24%)	4 (8%)	2 (4%)	0 (0%)	8.7	1.3	18.7	28.74	50

MQA = Média de quiasmas em anel. MQB = Média de quiasmas em Bastão. MTQ = Média total de quiasmas. IR = Índice de recombinação. TAU = Total de células analisadas não incluindo células anormais, como células com univalentes. Fonte: o autor.

Deste modo, a quantificação do número de quiasma é uma estimativa que auxilia inferir sobre a estabilidade meiótica, uma vez que, são eles que previnem os univalentes e asseguram que os bivalentes sejam orientados para polos opostos (Defani-Scoarize et al., 1996; Senda et al., 2005).

A formação de univalentes está associada, assim como a maioria das anormalidades meióticas, a parâmetros genéticos e ambientais. Em milho, mais de 58 mutantes descritos já foram relacionados a erros na formação de bivalentes (Golubovskaya et al., 2011). Esses mutantes representam em torno de 35 genes e estão relacionados a falhas no pareamento de homólogos, na segregação síncrona durante a anáfase, na sinapse, na permuta, no fuso e entre outros (Golubovskaya et al., 2011). Além disso, Sybenga (1971), também descreveu que, apesar, da frequência de quiasmas ser controlada geneticamente, está também pode sofrer alterações em função de condições ambientais, como temperatura, idade da planta, disponibilidade hídrica e exposição a agentes mutagênicos como a radiação ionizante e produtos químicos. A principal consequência de cromossomos univalentes é a formação de micronúcleos no citoplasma ao final da meiose (Ricci et al., 2007; Pozzobon et al., 2011). Por se tratarem de células com anormalidades, as diacineses com cromossomos univalentes não foram incluídas nos cálculos de IR. Todos os genótipos com cromossomos univalentes (DH1700345, DH1700347, DH1700349 e DH1700351) apresentaram apenas um par de cromossomos sem pareamento, ou seja, 9 bivalentes e dois cromossomos univalentes, o genótipo DH1700346, foi o único que apresentou mais de um par de cromossomos homólogos sem pareamento, com uma célula apresentando apenas oito bivalentes e quatro cromossomos univalentes.

Os dados obtidos na tabela de quiasmas e índice de recombinação (Tabela 5), mostram que os genótipos analisados apresentam com maior frequência quiasmas na conformação anel. Conforme Zarchi et al. (1972), quiasmas em bastão (terminais) possuem apenas uma função, assegurar que a próxima fase do ciclo de divisão celular ocorra de maneira regular, ou seja, ocorre a união dos bivalentes em bastão para que não haja problemas na segregação cromossômica, à medida que, quiasmas em anel

(intersticiais) representam o verdadeiro crossing-over, gerando uma maior variabilidade genética. Desta maneira, os oito genótipos em questão possuem altas taxas de variabilidade na composição dos genes dos seus gametas, visto que, o IR está perto do seu limite máximo para o milho, 30, conforme a equação de Darlington (1958). Desta forma, os altos valores de quiasmas em anel justificam as pequenas taxas de cromossomos univalentes nas diacineses analisadas.

Entretanto, não necessariamente, altos valores de quiasma significam total estabilidade genética, pois, durante o crossing-over podem ocorrer translocações (Peterson et al., 2020) e caso o nível de translocações esteja no limite (refere-se a taxa do IR em seu limite) podem ocorrer deleções (Liu et al., 2011), gerando segmentos de cromossomos soltos, principalmente telocêntricos, ou forçando a célula a uma apoptose. Ainda, deleções envolvendo grandes segmentos do cromossomo geralmente são deletérias e não são transmitidas através do gameta (Chang e Neuffer, 1989). Assim como, um nível muito baixo de crossing-over pode levar a cromossomos univalentes, a decadência na heterozigosidade e prejudicar a fertilidade do pólen (Aguiar-Perecin, 1985), segundo Darlington (1958), níveis baixos de crossing-over são ruins, pois não abrem a possibilidade de se obter as melhores combinações de genes em um cromossomo.

O maior IR, 28.8, foi encontrado no genótipo DH1700348, ao passo que, o menor IR, 27.78, foi encontrado no genótipo DH1700345. Observa-se um intervalo mínimo de 1.2 entre os valores do menor e maior IR. Segundo Neto (2010), espécies da mesma família não apresentam grandes variações no IR calculado segundo a equação de Darlington (1958), visto que, o cálculo soma o número haploide da espécie ao resultado final da divisão do número de quiasmas pelo número de células analisadas, ou seja, soma-se o mesmo valor para todos os genótipos analisados após a divisão, o que torna os resultados semelhantes.

Para os oito genótipos, em média, a configuração mais frequente de quiasmas observados na diacinese foi a de nove anéis e um bastão e a menos frequente foi a de cinco anéis e cinco bastões, com apenas dois genótipos apresentando esse arranjo:

DH1700345 e DH1700347. Não foi encontrada nenhuma célula em que o número de quiasmas em configuração anel fosse inferior aos quiasmas em configuração bastão. Os genótipos que apresentaram a maior MQA foram DH1700346, DH1700349 e DH1700351, os três com MQA em 9, e o genótipo que apresentou a menor foi DH1700345, com MQA em 8.5. A média da MQA para todos os genótipos foi de 8.81, ao passo que, a média da MQB foi de 1.19. Ainda, a média da MTQ para os oito genótipos foi igual a 18.81, resultado similar ao encontrado por Almeida (2003), no qual, a média total de quiasmas para todos os genótipos híbridos de milho foi de 18,73. Não foram encontrados na literatura dados de genótipos de milho duplo-haploides que passaram pela estimativa do IR segundo a equação de Darlington (1958).

Logo, o que se espera de bons resultados do IR é um equilíbrio, com células com ambas as configurações de quiasmas, anel e bastão. Desta maneira permitindo o pareamento e a segregação cromossômica e, portanto, assegurando as condições essenciais de reprodução sexual (Darlington, 1958), evolução dos organismos (Guerra, 1988), e uma estabilidade que não coloque os cromossomos em riscos de deleções. Assim, não ocorrendo a monopolização de uma configuração de quiasma, como encontrado nos genótipos analisados neste trabalho, que apresentaram $\frac{1}{4}$ (25,25%) das suas células em média com dez bivalentes em configuração anel.

Como os valores do IR foram muito próximos para os oito genótipos, não foi possível traçar uma relação entre as maiores taxas do IR com os menores índices de anormalidades RCMG, relacionadas a cromossomos adiantados ou retardatários durante a meiose, de maneira que fosse possível inferir que a alta taxa do IR possibilitou uma meiose com menores anormalidades. Ao contrário, no presente estudo as taxas do IR não foram um fator com grande efetividade para inferir sobre as discrepâncias dos valores da regularidade meiótica dos oito genótipos, principalmente quando comparados os genótipos DH1700346, DH1700347, DH1700348, DH1700349, DH1700350, DH1700351 e DH1700352 ao genótipo DH1700345 (genótipo com maiores taxas de anormalidades).

5.3. Índice meiótico

Todos os genótipos avaliados mostraram, sob análise de microscopia óptica, tétrades completas (Figura 10). Os IM apresentaram média de 95,62%, com variações de valores entre 84,2% e 99,2% (Tabela 6). Dos oito genótipos avaliados, dois apresentaram índices inferiores à média: DH1700345 e DH1700347 e seis apresentaram índices superiores à média: DH1700346, DH1700348, DH1700349, DH1700350, DH1700351 e DH1700352.

A análise do índice meiótico auxilia na verificação da estabilidade da meiose, dessa forma, quanto maior a porcentagem encontrada de tétrades completas (corretamente balanceadas), mais regular é o comportamento meiótico da espécie (Love 1951; Frizon et al., 2021). Entretanto, para Love (1951), apenas plantas com índices meióticos acima de 90% são estáveis geneticamente, sendo as mais indicadas para programas de melhoramento. O genótipo DH1700345 foi o único que apresentou IM inferior a 90%, logo, não se encontra em uma alta estabilidade meiótica, podendo vir a gerar dificuldades durante cruzamentos. Pois, produtos pós-meióticos formados a partir de células meióticas com irregularidades promovem um aumento da infertilidade da planta, uma vez que, as principais mutações que causam a esterilidade polínica são as dos produtos pós-meióticos anormais (Pagliarini, 2000). Ainda, pode-se relacionar o IM do genótipo DH1700345, inferior a 90%, ao índice de anormalidades meióticas acima de 10%, encontrado nas análises da estabilidade genética da meiose um e dois para o mesmo. Desta forma, quanto maior o valor das taxas de anormalidades meióticas, menor o valor encontrado em IM.

Para os demais genótipos, todos apresentaram IM maior que 90%, dessa forma, enquadram-se no título de genótipos com alta estabilidade meiótica e desejáveis em programas de melhoramento. A estimativa do IM é de suma importância, pois, a partir do mesmo, é possível reduzir o tempo necessário para a produção de novas cultivares híbridas, visto que, linhagens com baixos IM são descartadas, aprimorando a seleção de genótipos mais estáveis citologicamente.

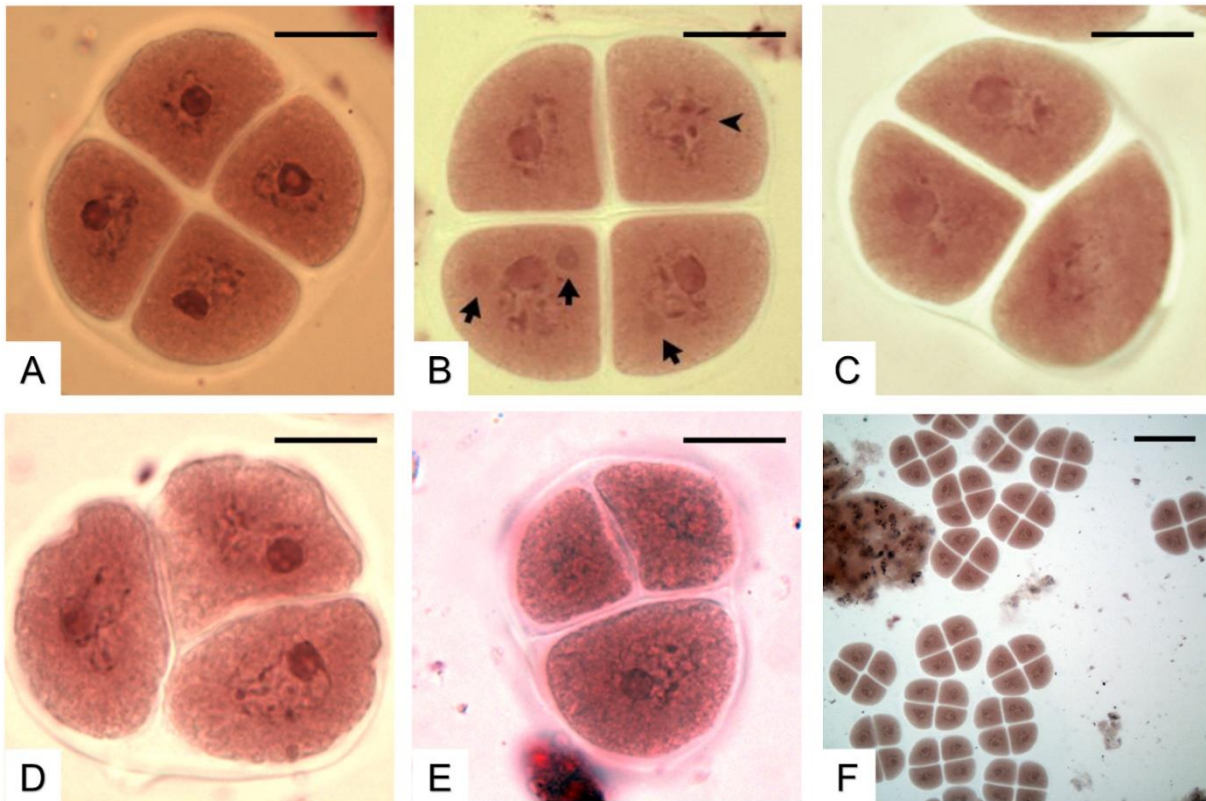


Figura 10. Produtos pós-meióticos. **A)** Tétrade completa com quatro micrósporos e cada micrósporo com um nucléolo. **B)** Tétrade completa com quatro micrósporos, porém com um micrósporo sem nucléolo (cabeça de seta) e outros dois com diversos micronúcleos (setas); **C-E)** Tríades, com um gameta (microsporócito) não reduzido e **F)** Aglomerado de tétrades completas visualizadas na objetiva de 20x. (60x) Fonte: o autor.

Tabela 6 — Índice Meiótico.

Genótipos	R	Tetradas Completas	IM %	Genótipo	R	Tétrades Completas	IM %
DH1700345	1	88	84,2	DH1700349	1	98	98,6
	2	72			2	99	
	3	99			3	100	
	4	83			4	96	
	5	79			5	100	
DH1700346	1	100	97,4	DH1700350	1	100	99,6
	2	100			2	100	
	3	94			3	100	
	4	93			4	100	
	5	100			5	98	
DH1700347	1	95	90,4	DH1700351	1	99	99,2
	2	94			2	97	
	3	87			3	100	
	4	85			4	100	
	5	91			5	100	
DH1700348	1	98	96,4	DH1700352	1	100	99,2
	2	100			2	100	
	3	100			3	96	
	4	92			4	100	
	5	92			5	100	

R = Repetições. IM = Índice meiótico final em porcentagem. Fonte: o autor.

A irregularidade do IM com maior observação dentro dos genótipos foi a tríade. As tríades são formadas por uma célula $2n$ (diploide), na qual não ocorreu uma redução do número cromossômico, e duas células n (haploides). Citologicamente, essa não redução cromossômica ocorre na meiose II, no qual, falhas na segregação das cromátides irmãs por meio de problemas na orientação do eixo meiótico (não ocorre uma localização da placa metafásica ou dos polos), orientações anormais de fuso, problemas na formação da placa metafásica e falhas na citocinese (Brownfield e Köhler, 2011) contribuem para a restituição de núcleos diploides $2n$, com formação de díades quando a falha ocorre nos dois microsporócitos ou tríades quando a falha ocorre em apenas um dos microsporócitos. Como consequência, a heterozigose do gameta não reduzido da tríade, é de zero, desde o centrômero até o locus do primeiro sobre cruzamento e somente em torno de 40-45% da heterozigose do progenitor é transmitida à progênie (Peloquin et al., 2008). Todos esses efeitos podem ser amplificados em casos de estresse ambiental (Mason e Piris, 2015).

O resultado abaixo de 90% do IM encontrado para o genótipo DH1700345 foi similar aos descritos por Santos et al. (2019), que mostrou IM de 85% para um híbrido simples de milho. E os resultados encontrados acima de 90% do IM encontrados nos demais genótipos, são similares aos descritos por Almeida (2013) e Terra (2004) em cultivares de milho. Logo, o estresse químico sofrido pelos genótipos não afetou de maneira efetiva os seus IM e conseqüentemente a estabilidade meiótica dos mesmos.

5.4. Viabilidade polínica

Todos os genótipos avaliados mostraram, sob análise de microscopia óptica, grãos de pólen viáveis (Figura 11).

Primeiramente, ao relacionar os dados do IM aos da VP, observa-se que a taxa do IM foi maior do que a da VP em todos genótipos examinados (Tabela 6 e 7). Uma vez observado que a frequência de produtos pós-meióticos irregulares é menor que a de pólen inviáveis, supõe-se que mesmo em tétrades completas, os micrósporos não sejam balanceados (Medina, 1969), como na figura 10-b. Assim, por mais que os resultados do IM sejam altos a garantia de altos índices de fertilidade polínica não está assegurada, pois células com anomalias também podem gerar grãos de pólen com protoplasto ativo. Na literatura não existe um método universal de determinação da viabilidade utilizando um corante específico, entretanto dentre os corantes mais utilizados para milho destaca-se: a coloração tripla de Alexander (González-Sánchez et al., 2004; Davide et al., 2009; Santos et al., 2019).

Entretanto, este mecanismo não fornece informações sobre a capacidade germinativa do grão de pólen e sim sobre a sua integridade citológica, quanto ao seu núcleo, citoplasma e membrana plasmática (Alexander, 1969; Báez et al., 2002). Por estes motivos, são encontrados maiores valores no IM quando relacionado a VP (Gráfico 2), utilizando testes colorimétricos. Logo, a relevância do uso desses métodos na literatura está associada a rapidez, simplicidade e baixo custo pra implementação que a técnica demanda, além da possibilidade de determinar se o protoplasto celular encontra-se em condições favoráveis para uma futura germinação, ou seja, ativo com um potencial de fertilização (Báez et al., 2002; Techio et al., 2006).

Os índices de viabilidade polínica apresentaram média de 76,04%, com variações de valores entre 63,84% e 86,16% (Tabela 7). Dos oito genótipos avaliados, três apresentaram índices inferiores à média: DH1700345, DH1700347 e DH1700349 e cinco apresentaram índices superiores à média: DH1700346, DH1700348, DH1700350, DH1700351 e DH1700352.

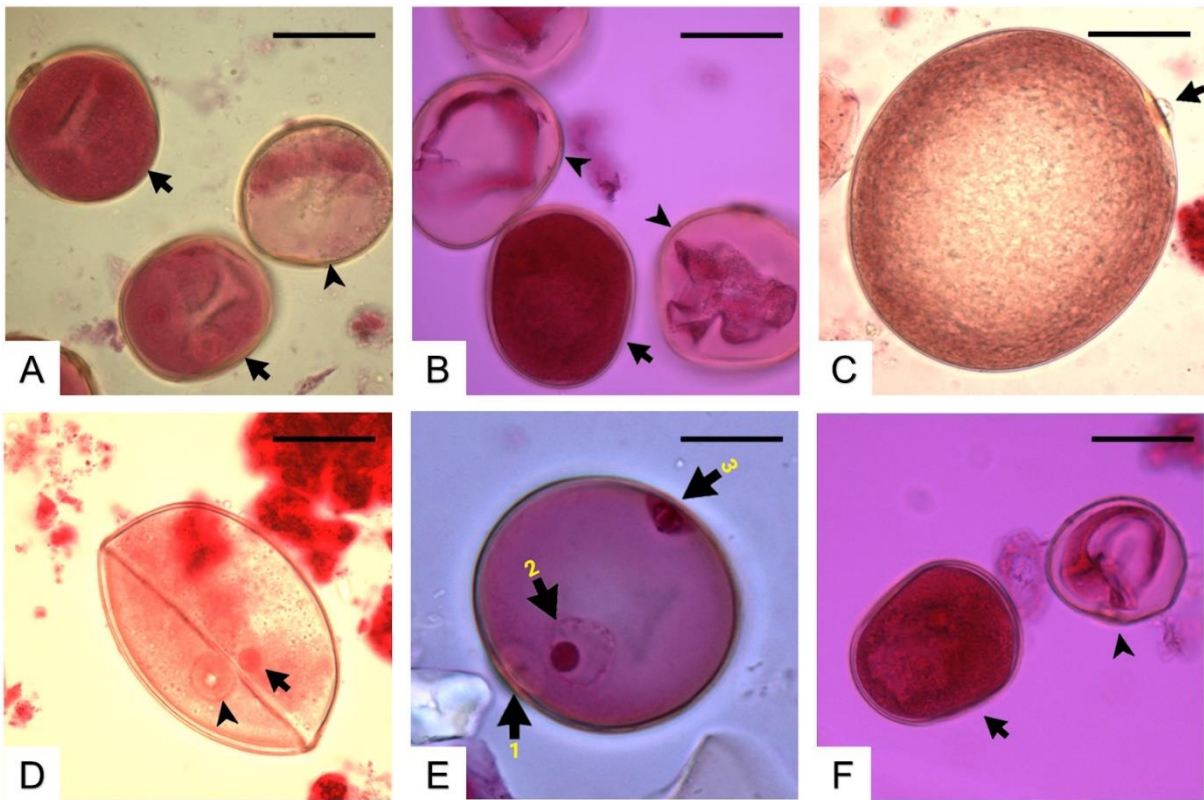


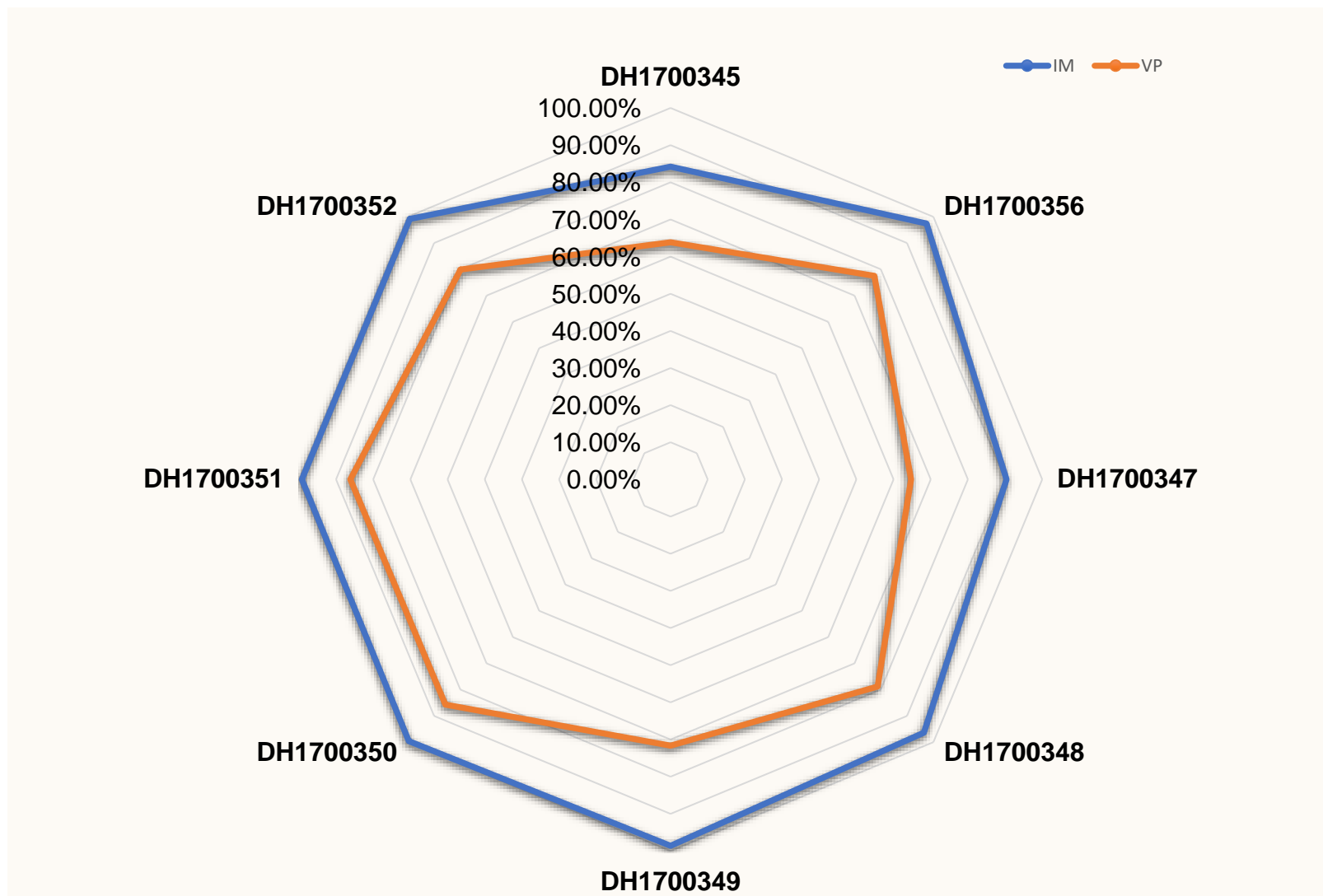
Figura 11. Grãos de pólen. **A)** Genótipo DH1700345, com dois grãos de pólen viáveis (seta) e um grão de pólen em estágio unicelular tardio com um grande vacúolo central comprimindo o citoplasma (cabeça de seta); **B)** Genótipo DH1700346, com um grão de pólen viável (seta) e dois grãos de pólen inviáveis com protoplasto totalmente enrugado e contraído (cabeça de seta); **C)** Genótipo DH1700348, com grão de pólen viável visualizado em lâmina sem cobertura da lamínula, mostrando a abertura germinativa (Seta; **D)** Genótipo DH1700347, com um grão de pólen apresentando um núcleo espermático (seta) e um poro germinativo (cabeça de seta); **E)** Genótipo DH1700351, com um grão de pólen binucleado apresentando um núcleo espermático (2) próximo ao poro germinativo (1) e um núcleo vegetativo (3) no pólo oposto ao do poro germinativo; **F)** Genótipo DH1700349, com um grão de pólen viável (seta) e com um grão de pólen inviável com citoplasma protoplasto retraído (cabeça de seta); (60x) Fonte: o autor.

Tabela 7 — Viabilidade polínica.

Genótipos	R	Viáveis	Inviáveis	VR %	VP %	Genótipo	R	Viáveis	Inviáveis	VR %	VP %
DH1700345	1	279	221	54,6	63,84	DH1700349	1	475	25	95	71,64
	2	340	160	68			2	420	80	84	
	3	474	26	94,8			3	208	293	41,6	
	4	180	320	36			4	485	15	97	
	5	323	177	64,6			5	203	297	40,6	
DH1700346	1	355	145	71	77,52	DH1700350	1	462	38	92,4	85,68
	2	455	45	91			2	482	18	96,4	
	3	318	182	63,6			3	241	258	48,2	
	4	354	246	70,8			4	476	24	95,2	
	5	456	44	91,2			5	481	19	96,2	
DH1700347	1	352	148	70,4	64,72	DH1700351	1	450	50	90	86,16
	2	327	173	65,4			2	409	91	81,8	
	3	300	200	60			3	444	56	88,8	
	4	270	230	54			4	458	42	91,6	
	5	369	131	73,8			5	393	107	78,6	
DH1700348	1	340	160	68	78,8	DH1700352	1	449	51	89,8	79,92
	2	385	115	77			2	332	168	66,4	
	3	325	175	65			3	363	137	72,6	
	4	454	46	90,8			4	383	117	76,6	
	5	466	34	93,2			5	471	29	94,2	

*R = Repetições. *VR = Viabilidade de cada repetição em porcentagem. *VP = Viabilidade polínica final em porcentagem. Fonte: o autor.

Gráfico 2 — Correlação dos valores de VP e IM através de um radar com marcadores em percentual.



*VP = Viabilidade polínica; IM = Índice meiótico. Fonte: o autor.

Bénard e Noiret (1970) descreveram que genótipos que apresentam taxas de VP maiores ou iguais a 60% são classificados como preservados, podendo ser armazenados e manter o seu poder de fertilização por um longo tempo à temperatura ambiente. Entretanto, Arnaud (1979), afirmou que os grãos de pólen apenas podem ser considerados conservados para armazenamento, quando possuírem VP superior a 70%, devendo sofrer descarte os que atingirem taxas de VP inferiores a 40%. Seguindo esta lógica, os percentuais obtidos na VP indicam que os genótipos DH1700346, DH1700348, DH1700349, DH1700350, DH1700351 e DH1700352 são considerados preservados e podem ser armazenados sem grandes riscos de perda de viabilidade. Enquanto, os genótipos DH1700345 e DH1700347 são apenas preservados.

Além disso, apesar de alguns genótipos compartilharem os mesmos parentais, populações-fonte e indutor (Tabela 1), como DH1700345, DH1700346 e DH1700347 que compartilham BR 106 e Tail P1 x Tail P2, os mesmos não demonstraram índices de VP semelhantes, com variações em seus resultados superiores a 10%. Este fato, entretanto, não já foi observado e estudado na literatura, visto que, conforme Loguercio e Battistin (2004) e Techio et al. (2006), são observadas diferenças na VP entre plantas da mesma variedade ou cultivares, e, ainda, essas são influenciadas principalmente por fatores genéticos e climáticos (Ferreira et al., 2007; França, 2011). Entretanto, não apenas fatores bióticos afetam a VP dos genótipos, pois fatores abióticos como altas e baixas temperatura, umidade relativa do ar, disponibilidade hídrica, nutrição do solo e estação do ano, também, podem impactar a gametogênese masculina em diferentes estágios de desenvolvimento, diminuindo a VP, mesmo em plantas irmãs (Ferreira et al., 2007; França, 2011).

Couto et al. (2015), utilizando a solução de Alexander, obteve VP de 0,4% em genótipos DH e VP de 84% em genótipos que passaram por processos de duplicação cromossômica e permaneceram diploides, ou seja, falha na duplicação. Logo, os resultados de VP obtidos no presente estudo, se assemelham em média, aos resultados de Couto et al. (2015).

Entretanto, os valores encontrados na VP dos falsos DH (Tabela 7) podem não ser considerados tão altos, quando comparados a VP de cultivares diploides de milho que não passaram por processo de indução a H e duplicação cromossômica, pois, segundo os resultados descritos por Almeida (2013) e Terra (2004) utilizando o carmim propiônico para VP, e David et al. (2009) e Santos et al. (2019) utilizando a solução de Alexander para VP, o menor percentual obtido foi de 95%. Os resultados da VP possuem influência direta sobre o sucesso na seleção de genótipos para a fertilização (Dafni, 1992), logo, bons índices asseguram a continuidade do genótipo no programa de melhoramento.

Love (1949) e Guerra (1988), descrevem que a análise de grãos de pólen é uma das maneiras mais simples de determinar se o comportamento meiótico dos cromossomos é regular. Desta forma, considerando que foram obtidos índices de VP em que os grãos de pólen são considerados conservados, segundo os parâmetros de Bénard e Noiret (1970) e Arnaud (1979), é possível afirmar que os genótipos avaliados possuem estabilidade meiótica regular. Desta forma, esses resultados demonstram que apesar do estresse sofrido por esses genótipos causados por uma indução a H e duplicação cromossômica, esses processos não afetaram diretamente a fertilidade do pólen dos oito genótipos.

6. CONCLUSÕES

A identificação de haploides putativos através do sistema R1-nj mostrou pouca eficácia neste estudo, pois, dos 8 presentes genótipos analisados, 7: H1700345, H1700346, H1700347, H1700348, H1700350, H1700351 e H1700351 não são haploides verdadeiros, uma vez que, pela contagem cromossômica, mostraram 20 cromossomos em suas placas metafásicas (diploides). Logo, nestes genótipos, a metodologia de indução a haploidia via linhagem indutora tropicalizada Tail P1 x Tail P2 falhou. Apenas o genótipo H1700349 apresentou 10% das suas placas metafásicas com 10 cromossomos, ou seja, haploides. Desta forma, dos 8 genótipos haploides putativos com genoma tropical analisados, apenas um obteve sucesso na indução a haploidia. Desta maneira, apenas o genótipo H1700349, é recomendado a continuar em programas de melhoramento que visem obter DH.

A duplicação cromossômica falhou em todos os falsos genótipos duplo-haploides analisados. Ainda, foi constatado que os processos de obtenção de DH (indução a haploidia e duplicação cromossômica), pelo qual, as plantas de milho foram submetidas, não influenciaram diretamente de forma significativa as suas regularidades meióticas e consequentemente a viabilidade polínica dos genótipos.

Todos os falsos genótipos DH apresentaram altas taxas de IM e IR e baixas anormalidade meióticas, exceto DH1700345, que apresentou anormalidades meióticas maiores a 10%, a menor viabilidade polínica e IM abaixo de 90%.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar-Perecin, M., Vosa, C. (1985) C-banding in maize II. Identification of somatic chromosomes. *Heredity* 54, 37–42. <https://doi.org/10.1038/hdy.1985.6>
- Aguiar-Perecin, M. L. R., (1985) Bandeamento C e tipos de heterocromatina em milho. In: M.L.R., AGUIAR-PERECIN, P.S. MARTINS e G. BANDEL eds. Tópicos de Citogenética e Evolução de Plantas. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, SP. p. 51-67.
- Alexander M. P. (1969) Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain Technol.* May;44(3):117-22. doi:10.3109/10520296909063335. PMID: 4181665.
- Almeida, C. C. S. (2003) Análise citogenética e molecular em milho (*Zea mays subsp.Mays*), teosinto (*Zea mays subsp.mexicana*) e em seus híbridos (Dissertação em Fitotecnia) – UFAL, Porto Alegre.
- Arnaud, F. (1979) La pollinisation assistée les plantations de palmier à huile. Récolte et conditionnement du pollen. *Oléagineux*, Paris: v. 34, n. 4, p. 175-176.
- Braz, G. T., do Vale Martins, L., Zhang, T., Albert, P. S., Birchler, J. A., & Jiang, J. (2020). A universal chromosome identification system for maize and wild *Zea* species. *BioRxiv*, 183–194. <https://doi.org/10.1101/2020.01.22.915942>
- Báez, P., Riveros, M., Lehnebach, C. (2002) Viability and longevity of pollen of *Nothofagus* species in South Chile. *New Zealand Journal of Botany*, 40: 671-678.
- Belicuas, P.R., Guimarães, C.T., Paiva, L.V. et al. Androgenetic haploids and SSR markers as tools for the development of tropical maize hybrids. *Euphytica* 156, 95–102 (2007). <https://doi.org/10.1007/s10681-007-9356-z>

- Bénard G., Noiret J. M. (1970) Le pollen de palmier à huile. Récolte, préparation, conditionnement et utilisation pour la fécondation artificielle. *Oléagineux*, 25 (2) : 67-73.
- Brownfield, L., & Köhler, C. (2011). Unreduced gamete formation in plants: Mechanisms and prospects. *Journal of Experimental Botany*, 62(5), 1659–1668. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq371>
- Cande W.Z., Golubovskaya I., Wang C.J.R., Harper L. (2009) Meiotic Genes and Meiosis in Maize. In: Bennetzen J.L., Hake S. (eds) Handbook of Maize. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-0-387-77863-1_18
- Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). (2018) Indicadores da Agropecuária. Observatório Agrícola, Ano XXVII, Nº 1, janeiro.
- Carrizo García, C., Nepi, M., & Pacini, E. (2017). It is a matter of timing: asynchrony during pollen development and its consequences on pollen performance in angiosperms—a review. *Protoplasma*, 254(1), 57–73. <https://doi.org/10.1007/s00709-016-0950-6>
- Chaikam, V., Molenaar, W., Melchinger, A. E., & Boddupalli, P. M. (2019). Doubled haploid technology for line development in maize: technical advances and prospects. *Theoretical and Applied Genetics*, 132(12), 3227–3243. <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03433-x>
- Chaikam, V., Nair, S. K., Babu, R., Martinez, L., Tejomurtula, J., & Boddupalli, P. M. (2015). Analysis of effectiveness of R1-nj anthocyanin marker for in vivo haploid identification in maize and molecular markers for predicting the inhibition of R1-nj expression. *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik*, 128(1), 159–171. <https://doi.org/10.1007/s00122-014-2419-3>

- Chaikam V, Lopez LA, Martinez L, Burgueño J, Boddupalli PM. (2017) Identification of in vivo induced maternal haploids in maize using seedling traits. *Euphytica*. 2017;213:177. doi: 10.1007/s10681-017-1968-3. PMID: 33408421; PMCID: PMC7734196.
- Chaikam, V.; Prassanna, B. M. Maternal haploid detection using anthocyanin markers. In: PRASSANA, B. M.; CHAIKAM, V.; MAHUKU, G. (2012). Doubled haploid technology in maize breeding: theory and practice. Mexico: CIMMYT. p. 20-24.
- Chang, M. T., & Coe, E. H. (2009). Doubled haploids. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 63, 127–142. https://doi.org/10.1007/978-3-540-68922-5_10
- Chang, M. T., & Neuffer, M. G. (1989). Maize microsporogenesis. *Genome*, 32(2), 232–244. <https://doi.org/doi.org/10.1139/g89-434>
- Chase, S. S. (1952). Production of Homozygous Diploids of Maize from Monoploids 1 . *Agronomy Journal*, 44(5), 263–267. <https://doi.org/10.2134/agronj1952.00021962004400050010x>
- Coe, E. H. (1959). A Line of Maize with High Haploid Frequency. *The American Naturalist*, 93(873), 381–382. <https://doi.org/10.1086/282098>
- Coe, E. H., & Sarkar, K. R. (1964). The detection of haploids in maize. *Journal of Heredity*, 55(5), 231–233. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a107340>
- Couto, E. G. O. (2017) Duplo-haploides em milho tropical: efeito das gerações F1 e F2 na expressão do R1-navajo, obtenção de linhagens e variabilidade genética (Tese em Genética e Melhoramento de Plantas) – USP, Piracicaba.

- Couto, E. G. O.; VON PINHO, E. V. R.; Von pinho, R. G.; Veija, A. D.; Carvalho, M. R.; Bustamante, F. O.; Nascimento, M. S. Verification and characterization of chromosome duplication in haploid maize. *Genetics and Molecular Research*, v. 14(2), p. 6999-7007, 2015.
- Dafni, A. (1992) *Pollination Ecology: A Practical Approach*. New York, Oxford: University press.
- Darlington, C. D. *Evolution of genetics systems*. 2^a. ed. Edinburgh: Oliver and Boyd, p. 256, 1958.
- Davide, L. M. C., Pereira, R. C., Abreu, G. B., Souza, J. C., & Pinho, É. V. R. V. (2009). Viabilidade de Pólen de Milho em Diferentes Períodos de Armazenamento em Baixa Temperatura. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, 8(2), 199–206. <https://doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v8n2p199-206>
- Defani-Scoarize, M. A. Pagliarini, M. S.; Aguiar, C.G. (1996) Meiotic Behavior of inbred lines of maize (*Zea mays L.*). *The Nucleus*, Calcutta, v. 39, p. 10-18.
- Evans, M. M. S. (2007). The indeterminate gametophyte1 gene of maize encodes a LOB domain protein required for embryo sac and leaf development. *Plant Cell*, 19(1), 46–62. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.047506>
- Ferreira, C. A., Pinho, É. V. R. V., Alvim, P. O., Andrade, V., Silva, T. T. A., & Cardoso, D. L. (2007). Conservação e Determinação da Viabilidade de Grão de Pólen de Milho. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, 6(2), 159–173. <https://doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v6n2p159-173>
- França, L.V. (2011). Fatores ambientais na produção de sementes de híbridos interespecíficos de *Brachiaria*. (Tese em Ciência e Tecnologia de Sementes) – UFP, Pelotas.

- Frizon, P., Brammer, S. P., Deuner, C. C., Chechi, A., Lima, M. I. P. M., & Scheeren, P. L. (2021). Genetic stability in interspecific hybridizations of wheat populations determined by meiotic index and pollen viability. *Biotemas*, *34*(2), 1–9. <https://doi.org/10.5007/2175-7925.2021.e79666>
- Gaut, B. S., D'Ennequin, M. L. T., Peek, A. S., & Sawkins, M. C. (2000). Maize as a model for the evolution of plant nuclear genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(13), 7008–7015. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.13.7008>
- Gaut, B. S., & Doebley, J. F. (1997). DNA sequence evidence for the segmental allotetraploid origin of maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(13), 6809–6814. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.13.6809>
- Germanà, M. A. (2011). Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *104*(3), 283–300. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9852-z>
- Geiger, H. H., & Gordillo, G. A. (2010). Doubled haploids in hybrid maize breeding. *Maydica*, *54*(4), 485–499. <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-77951881374&origin=inward&txGid=cde671aff85621809a96f6f9da34f138>
- Geiger H.H. (2009) Doubled Haploids. In: Bennetzen J.L., Hake S. (eds) Handbook of Maize. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-0-387-77863-1_32
- González-Sánchez M., Rosato M., Chiavarino M., Puertas M. J. (2004) Chromosome Instabilities and Programmed Cell Death in Tapetal Cells of Maize With B Chromosomes and Effects on Pollen Viability, *Genetics*, Volume 166, Issue 2, Pages 999–1009, <https://doi.org/10.1093/genetics/166.2.999>

- Golubovskaya, I. N., Wang, C. J. R., Timofejeva, L., & Cande, W. Z. (2011). Maize meiotic mutants with improper or non-homologous synapsis due to problems in pairing or synaptonemal complex formation. *Journal of Experimental Botany*, 62(5), 1533–1544. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq292>
- Gordillo, G. A., & Geiger, H. H. (2008). Optimization of DH-line based recurrent selection procedures in maize under a restricted annual loss of genetic variance. *Euphytica*, 161(1–2), 141–154. <https://doi.org/10.1007/s10681-007-9616-y>
- Gulfishan, M., Khan, A. H., Jafri, I. F., & Bhat, T. A. (2012). Assessment of mutagenicity induced by MMS and DES in *Capsicum annum* L. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(2), 251–255. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.01.008>
- Guerra, M. (1988) *Introdução a citogenética geral*. Rio de Janeiro: Guanabara.
- Ishii, T., Karimi-Ashtiyani, R., & Houben, A. (2016). Haploidization via Chromosome Elimination: Means and Mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, 67, 421–438. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-114714>
- Kaur, D., & Singhal, V. K. (2019). Meiotic abnormalities affect genetic constitution and pollen viability in dicots from Indian cold deserts. *BMC Plant Biology*, 19(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1596-7>
- Kaur, D., & Singhal, V. K. (2010). Chromosome Number, Meiosis and Pollen Fertility in *Vicia rigidula* Royle and *V. tenera* Grah. from Cold Desert Regions of India. *CYTOLOGIA*, 75(1), 9–14. <https://doi.org/10.1508/cytologia.75.9>
- Kebede, A.Z., Dhillon, B.S., Schipprack, W. et al. Effect of source germplasm and season on the in vivo haploid induction rate in tropical maize. *Euphytica* 180, 219–226 (2011). <https://doi.org/10.1007/s10681-011-0376-3>

- Kermicle, J. L. (1994). Indeterminate Gametophyte (ig): Biology and Use. In *The Maize Handbook* (pp. 388–393). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-2694-9_58
- Khah, M. A., Verma, R. C., & Purbiya, R. (2018). Assessment of meiotic abnormalities induced by gamma irradiations in *Zea mays* L. (Poaceae). *Chromosome Science*, 21(2–4), 75–80. <https://doi.org/10.11352/scr.21.75>
- Liu, P., Lacaria, M., Zhang, F., Withers, M., Hastings, P. J., & Lupski, J. R. (2011). Frequency of nonallelic homologous recombination is correlated with length of homology: Evidence that ectopic synapsis precedes ectopic crossing-over. *American Journal of Human Genetics*, 89(4), 580–588. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.09.009>
- Loguercio, Andrea & Battistin, Alice. (2004). Microsporogênese de nove acessos de *Syzygium cumini* (L.) Myrtaceae oriundos do Rio Grande do Sul – Brasil. 11.
- Love, R. M. (1949) La citología como ayuda práctica al mejoramiento de los cereales. *Revista Argentina Agronômica*, Buenos Aires, v. 16, p. 1-13.
- Love, R. M. Varietal differences in meiotic chromosomes behavior of Brazilian wheats. *Agronomy Journal*, v.43, p. 72 – 76, 1951.
- McClintock, B. (1929). Chromosome morphology in *Zea mays*. *Science*, 69(1798), 629. <https://doi.org/10.1126/science.69.1798.629>
- McClintock, B. (1933). The association of non-homologous parts of chromosomes in the mid-prophase of meiosis in *zea mays*. *Zeitschrift Für Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie*, 19(2), 191–237. <https://doi.org/10.1007/BF02462870>
- Mason A. S., Pires J. C. (2015) Unreduced gametes: meiotic mishap or evolutionary mechanism? *Trends Genet* 31:5–10

- Maqbool, M. A., Beshir, A. R., & Khokhar, E. S. (2020). Doubled haploids in maize: Development, deployment, and challenges. *Crop Science*, *May*, 1–26. <https://doi.org/10.1002/csc2.20261>
- Mayor, P. J., & Bernardo, R. (2009). Genomewide selection and marker-assisted recurrent selection in doubled haploid versus F2 populations. *Crop Science*, *49*(5), 1719–1725. <https://doi.org/10.2135/cropsci2008.10.0587>
- Medina, D. M., & Rijo, L. (1969). Microsporogênese em *Coffea stenophylla* G. Don e *C. salvatrix* Swynn et Phil. *Bragantia*, *28*(unico), 307–321. <https://doi.org/10.1590/S0006-87051969000100025>
- Melchinger, A. E., Technow, F., & Dhillon, B. S. (2011). Gene stacking strategies with doubled haploids derived from biparental crosses: Theory and simulations assuming a finite number of loci. *Theoretical and Applied Genetics*, *123*(8), 1269–1279. <https://doi.org/10.1007/s00122-011-1665-x>
- Meng, D., Liu, C., Chen, S., & Jin, W. (2021). Haploid induction and its application in maize breeding. *Molecular Breeding*, *41*(3). <https://doi.org/10.1007/s11032-021-01204-5>
- Mondin, M., Santos-Serejo, J. A., Bertão, M. R., Laborda, P., Pizzaia, D., & Aguiar-Perecin, M. L. R. (2014). Karyotype variability in tropical maize sister inbred lines and hybrids compared with KYS standard line. *Frontiers in Plant Science*, *5*(OCT), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00544>
- Molenaar, W. S., de Oliveira Couto, E. G., Piepho, H. P., & Melchinger, A. E. (2019). Early diagnosis of ploidy status in doubled haploid production of maize by stomata length and flow cytometry measurements. *Plant Breeding*, *138*(3), 266–276. <https://doi.org/10.1111/pbr.12694>

- Nanda, D. K., & Chase, S. S. (1966). An Embryo Marker for Detecting Monoploids Of Maize (Zea Mays L.) 1. *Crop Science*, 6(2), 213–215. <https://doi.org/10.2135/cropsci1966.0011183x000600020036x>
- Neto, M.F. (2010). Estudos citogenéticos em espécies caricáceas com uso potencial no melhoramento genético do mamoeiro. (Dissertação em Genética e Melhoramento de Plantas) – UENF, Campos dos Gooytacazes.
- OECD-FAO Agricultural Outlook 2020-2029. (2020). OECD. <https://doi.org/10.1787/1112c23b-en>
- Pagliarini, M.S. (1980). Controle genético da freqüência de quiasmas em milho (Zea mays L.). (Dissertação em Genética e Melhoramento de Plantas) – USP, Piracicaba.
- Pagliarini, M.S. (1983). Correlação entre freqüência de quiasmas e capacidade de combinação em linhagens autofecundadas de milho (Zea mays L.): uma análise prévia. *Rev. Unimar* 5: 37-46.
- Pagliarini, M.S. (1989). Avaliação da freqüência de quiasmas em milho (Zea mays L.) e suas implicações com a capacidade de combinação para a produção de grãos. (Tese em Genética e Melhoramento de Plantas) – USP, Piracicaba.
- Pagliarini, M. S. (2000). Meiotic behavior of economically important plant species: The relationship between fertility and male sterility. *Genetics and Molecular Biology*, 23(4), 997–1002. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572000000400045>
- Pagliarini, M.S., Defani, M.A., Meirelles, W.F., & Erivaldo, J. (2002). Recurrence of multiple meiotic abnormalities in maize genotypes from the same origin and their influence on productivity. *Cropp Breeding and Applied Biotechnology*, 2, 355-360.

- Peterson, S. E., Keeney, S., & Jasin, M. (2020). Mechanistic Insight into Crossing over during Mouse Meiosis. *Molecular Cell*, 78(6), 1252-1263.e3. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.04.009>
- Peloquin, S. J., Boiteux, L. S., Simon, P. W., & Jansky, S. H. (2008). A chromosome-specific estimate of transmission of heterozygosity by 2n gametes in potato. *Journal of Heredity*, 99(2), 177–181. <https://doi.org/10.1093/jhered/esm110>
- Pierre, P. M. O., Davide, L. M. C., Couto, E. G. D. O., Silva, T. N., Ramalho, M. A. P., & SANTOS, J. B. DOS. (2011). Doubled haploids: importance in the genetic breeding of maize. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, 10(1), 1–16. <https://doi.org/doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v10n1p1-16>
- Prasanna B. M., Chaikam V., Mahuku G. (2012) Doubled haploid technology in maize breeding: theory and practice. CIMMYT, Mexico.
- Prigge, V., & Melchinger, A. E. (2012). Production of haploids and doubled haploids in maize. *Methods in Molecular Biology*, 877, 161–172. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-818-4_13
- Pozzobon, M. T.; Souza, K. R. R.; Carvalho, S. I. C.; Reifschneider, F. J. B. (2011) Meiosis and pollen viability in advanced pepper strains. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 29, n. 2, p. 212-216.
- Rabel, M.; GUIMARÃES, C. T.; PARENTONI, S. N.; Lana, U. G. de P.; MAGALHÃES, P. C.; PAIVA, E. (2008) Obtenção de genótipos de milho tropicais indutores de haploidia. In: Congresso Nacional de Milho e Sorgo, Londrina. Agroenergia, Embrapa Milho e Sorgo.
- Rotarenco V. A., Kirtoca I. H., Jacota A. G. (2007) The possibility of identifying kernels with haploid embryos using oil content. *Maize Gen Coop News Lett* 81:11.

- Rhoades, M. M. (1950). MEIOSIS IN MAIZE. *Journal of Heredity*, 41(3), 59–67. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a106089>
- Ricci, G. C. L., Silva, N., Pagliarini, M. S., & Scapim, C. A. (2007). Microsporogenesis in inbred line of popcorn (*Zea mays* L.). *Genetics and Molecular Research*, 6(4), 1013–1018.
- Rosado, T. B., Clarindo, W. R., & Carvalho, C. R. (2009). An integrated cytogenetic, flow and image cytometry procedure used to measure the DNA content of *Zea mays* A and B chromosomes. *Plant Science*, 176(1), 154–158. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.10.007>
- Said, F. A., Perreira, T. N. S., Barbosa, R. M. (2018) Identificação e fertilidade de duplo-haploides de milho via determinação do nível de ploidia e viabilidade polínica. INIC-Univap.
- Santos, G., Pedri, E., Rodrigues, A., Pena, G., & Rossi, A. (2019). ASPECTOS REPRODUTIVOS DO MILHO HÍBRIDO SIMPLES 2B810 PW (Dow) (*Zea mays* L.) CULTIVADO EM ALTA FLORESTA, MATO GROSSO. *Enciclopédia Biosfera*, 16(29), 292–301. https://doi.org/10.18677/EnciBio_2019A20
- Sarkar, K. R., & Coe, E. H. (1966). a Genetic Analysis of the Origin of Maternal Haploids in Maize. *Genetics*, 54(2), 453–464. <https://doi.org/10.1093/genetics/54.2.453>
- Sadder, M. T., & Weber, G. (2001). Karyotype of Maize (*Zea mays* L.) Mitotic Metaphase Chromosomes as Revealed by Fluorescence in situ Hybridization (FISH) with Cytogenetic DNA Markers. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19(2), 117–123. <https://doi.org/10.1007/BF02772153>
- Saylor, L. C., & Smith, B. W. (1966). MEIOTIC IRREGULARITY IN SPECIES AND INTERSPECIFIC HYBRIDS OF PINUS. *American Journal of Botany*, 53(5), 453–468. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1966.tb07358.x>

- Utsunomiya, K. S., Pires Bione, N. C., & Suely Pagliarini, M. (2002). How many different kinds of meiotic abnormalities could be found in a unique endogamous maize plant? In *Cytologia* (Vol. 67, Issue 2, pp. 169–176). <https://doi.org/10.1508/cytologia.67.169>
- Senda, T., Hiraoka, Y., & Tominaga, T. (2005). Cytological affinities and interfertilities between *Lolium temulentum* and *L. persicum* (Poaceae) accessions. *Hereditas*, *142*(2005), 45–50. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.2005.01908.x>
- Schnable, J. C. (2015). Genome Evolution in Maize: From Genomes Back to Genes. *Annual Review of Plant Biology*, *66*(1), 329–343. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-115604>
- Silva, G. J. da S.; Guimarães, C. T.; Parentoni, S. N.; Rabel, M.; Lana, U. G. de P.; Paiva, E. (2009) Produção de haploides androgenéticos em milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 17 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Documentos, 81).
- Silva, H. A., Scapim, C. A., Vivas, J. M. S., do Amaral, A. T., Pinto, R. J. B., Mourão, K. S. M., Rossi, R. M., & Baleroni, A. G. (2020). Effect of ploidy level on guard cell length and use of stomata to discard diploids among putative haploids in maize. *Crop Science*, *60*(3), 1199–1209. <https://doi.org/10.1002/csc2.20004>
- Strigens, A.; Schipprack, W.; Reif, J.C.; Melchiger, A.E. (2013) Unlocking the Genetic Diversity of Maize Landraces with Doubled Haploids Opens New Avenues for Breeding. *Plos One*, v.8(2), p. 1-11.
- Sybenga, J. (1971). Gedrag en vlijt der cromosomen. O Veenman. <https://edepot.wur.nl/246371>
- Tang, F., Tao, Y., Zhao, T., & Wang, G. (2006). In vitro production of haploid and doubled haploid plants from pollinated ovaries of maize (*Zea mays*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *84*(2), 233–237. <https://doi.org/10.1007/s11240-005-9017-7>

- Tang, Q. lin, Feng, Y. chao, Han, X. li, Zheng, M. min, & Rong, T. zhao. (2009). Study on Haploid Inducing and Its Meiotic Abnormality in Maize. *Agricultural Sciences in China*, 8(10), 1159–1165. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(08\)60325-9](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(08)60325-9)
- Techio, V. H., Davide, L. C., Pedrozo, C. Â., & Pereira, A. Vander. (2006). Viabilidade do grão de pólen de acessos de capim-elefante, milheto. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 28(1). <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v28i1.1052>
- Terra, T. F. (2004) Análises citogenéticas e moleculares em populações de milho (*Zea mays subsp.Mays*), teosinto (*Zea mexicana L.*) e em seus híbridos entre duas espécies. (Dissertação em Fitotecnia) – UFAL, Porto Alegre.
- Trindade, R. dos S.; Guimaraes, L. J. M.; Souza, I. R. P. de; Guimaraes, P. E. de O.; Silva, A. C. A. da; Mariz, B. L.; Ribeiro, M. R. (2019) Efeito do avanço de gerações na indução de haploidia em populações-fonte de milho. Embrapa Milho e Sorgo.
- Trindade, R. dos S.; Guimaraes, L. J. M.; Netto, D. A. M.; Souza, I. R. P. de; Guimaraes, P. E. de O.; Silva, A. C. A. da; Guimarães, S. A.; Mariz, B. L. (2017) Características agronômicas de indutores de haploidia adaptados ao ambiente tropical. Embrapa Milho e Sorgo.
- Trindade, R. dos S.; Silva, A. C. A. da; Mariz, B. L.; Guimaraes, L. J. M.; Souza, I. R. P. de; Guimaraes, P. E. de O.; Netto, D. A. M. (2015) Características agronômicas de indutores de haploidia androgenéticos e gimnogenéticos adaptados ao ambiente tropical. Embrapa Milho e Sorgo.
- Weber, D. F. (2014). Today's Use of Haploids in Corn Plant Breeding. In *Advances in Agronomy* (1st ed., Vol. 123). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420225-2.00003-0>

Wei, F., Coe, E., Nelson, W., Bharti, A. K., Engler, F., Butler, E., Kim, H. R., Goicoechea, J. L., Chen, M., Lee, S., Fuks, G., Sanchez-Villeda, H., Schroeder, S., Fang, Z., McMullen, M., Davis, G., Bowers, J. E., Paterson, A. H., Schaeffer, M., ... Wing, R. A. (2007). Physical and genetic structure of the maize genome reflects its complex evolutionary history. *PLoS Genetics*, 3(7), 1254–1263. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030123>

Zarchi, Y., Simchen, G., Hillel, J., & Schaap, T. (1972). Chiasmata and the breeding system in wild populations of diploid wheats. *Chromosoma*, 38(1), 77–94. <https://doi.org/10.1007/BF00319956>