

## DUPLO-HAPLOIDES: ESTRATÉGIAS PARA OBTENÇÃO E IMPORTÂNCIA NO MELHORAMENTO GENÉTICO DO MILHO

PATRÍCIA MARIA OLIVEIRA PIERRE<sup>1</sup>, LIVIA MARIA CHAMMA DAVIDE<sup>2</sup>,  
EVELLYN GISELLY DE OLIVEIRA COUTO<sup>3</sup>, TALLYTA NAYARA SILVA<sup>4</sup>,  
MAGNO ANTÔNIO PATTO RAMALHO<sup>5</sup> e JOÃO BOSCO DOS SANTOS<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Professora, Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brasil, [patgenpierre@yahoo.com.br](mailto:patgenpierre@yahoo.com.br)

<sup>2</sup>Professora, Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, Brasil, [lmcdavide@yahoo.com.br](mailto:lmcdavide@yahoo.com.br)

<sup>3</sup>Mestranda em Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil, [evellyn.couto@yahoo.com.br](mailto:evellyn.couto@yahoo.com.br)

<sup>4</sup>Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil, [tallytans@yahoo.com.br](mailto:tallytans@yahoo.com.br)

<sup>5</sup>Professores, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil, [magnoapr@ufla.br](mailto:magnoapr@ufla.br); [jbsantos@ufla.br](mailto:jbsantos@ufla.br)

---

*Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v.10, n.1, p.1-16, 2011*

**RESUMO** - A produção de indivíduos haploides e posterior duplicação para obter os duplo-haploides em milho têm despertado grande interesse da comunidade científica. A técnica pode reduzir o tempo e o custo de obtenção de linhagens melhorando a eficiência na produção de novas cultivares híbridas. Ao que tudo indica a tecnologia é dominada pelas multinacionais do setor, mas para as pequenas empresas de sementes e no setor público ainda existem alguns entraves para torná-la viável a todos os programas de melhoramento. Essa revisão procura mostrar como ocorre a obtenção de duplo-haploides, as dificuldades encontradas nesse processo e os desafios a serem superados.

**Palavras-chave:** indutores de haploidia, duplo-haploide, duplicação cromossômica, *Zea mays*.

## DOUBLED HAPLOIDS: IMPORTANCE IN THE GENETIC BREEDING OF MAIZE

**ABSTRACT** - The production of haploid individuals and subsequent chromosome doubling to obtain double haploids (DH) in maize has created great interest in the scientific community. The technique can reduce the time and costs to obtain pure lines, and improve the efficiency on the production of new hybrid cultivars. Apparently the technique is dominated by multinational seed corporations, but for small seed companies and public sector there are still some obstacles to make it viable for all breeding program. This review attempts to show up how to obtain double haploids, the difficulties of the process and the challenges to be overcome.

**Key words:** haploidy inducers, double-haploid, chromosome doubling, *Zea mays*.

O aproveitamento da heterose, superioridade da geração  $F_1$  em relação aos pais, foi uma das maiores conquistas da ciência. A cultura do milho foi a pioneira em utilizar os conhecimentos a respeito da heterose, possibilitando a criação e o desenvolvimento da indústria sementeira. No Brasil, cultivaram-se, no ano agrícola 2009/2010, 12 milhões de hectares de milho (Conab, 2010). Desses, 80% são formados por sementes de milho híbrido, isto é, aproximadamente 9,6 milhões de sacos de sementes, o que movimentou em torno de 1,4 bilhão de reais. Na obtenção do milho híbrido, há três etapas distintas: a obtenção das linhagens endogâmicas, o teste de capacidade de combinação das mesmas, identificando as melhores combinações, e a produção e comercialização das cultivares híbridas. Dentre as etapas citadas, a obtenção de linhagens é a mais demorada e, normalmente, de custo elevado. Isto porque, para atingir a homozigose, são necessárias de seis a oito gerações de endogamia (Paterniani & Campos, 1999).

Em função da demora e do custo para obtenção das linhagens, os melhoristas há longo tempo, têm procurado alternativas que agilizem e barateiem esse processo. Uma delas é o emprego da tecnologia de duplo-haploides. Isto é, a geração de plântulas a partir de células haploides e posterior duplicação. O trabalho pioneiro a esse respeito foi publicado por Chase (1952). Embora o processo apresentasse grande potencial, a sua implementação em maior escala não foi realizada. Até a década de 90, a baixa eficiência das diferentes técnicas de obtenção de duplo-haploides limitava essa ferramenta para uso em grande escala, em programas convencionais de melhoramento. A partir de então, a tecnologia de obtenção de duplo-haploides recebeu a atenção de pesquisadores em todo o mundo.

As empresas multinacionais de sementes, por apresentarem mais recursos, pensarem economicamente e serem mais visionárias, têm sido as mais interessadas no uso dessa tecnologia. Com isso, elas têm aplicado grandes investimentos, e ao que tudo indica, estão tendo sucesso no emprego de duplo-haploides em grande escala. Contudo, ainda há alguns problemas a serem resolvidos. Grande parte das informações está em poder das empresas de sementes e não são de domínio público. Essa revisão propõe avaliar o que é conhecido e discutir os problemas que ainda necessitam ser pesquisados para disseminar ainda mais o emprego de duplo-haploides na cultura do milho.

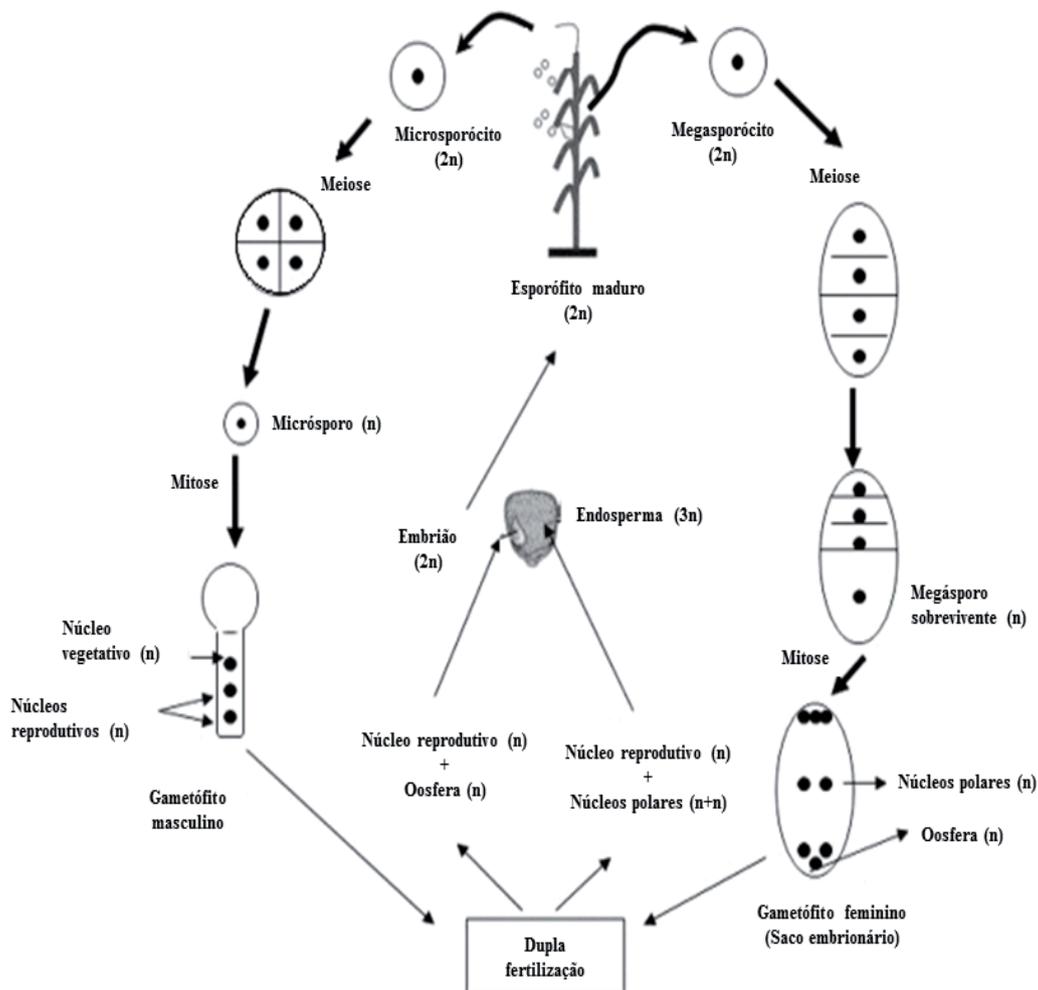
### **Gametogênese e fertilização na cultura do milho**

O ciclo da planta de milho é conhecido como haplodiplobionte, ocorrendo alternância de gerações de esporófitos e gametófitos (Figura 1). Desses, a geração esporófitica é a mais duradoura e inicia-se com a fusão dos gametas masculino e feminino. Antes da fertilização, ocorre a antese, quando os grãos de pólen são liberados pelo pendão, recaindo sobre estiletos receptivos de outras plantas. O estilete é o filamento de conexão entre o estilo-estigma e o ovário. Após o contato dos grãos de pólen com os pêlos viscosos do estilo-estigma, esses germinam, emitindo o tubo polínico, até atingir o saco embrionário. Nesse instante, ocorre a dupla fertilização. Isso porque um dos núcleos reprodutivos do grão de pólen se funde com a oosfera, gerando a célula ovo ou zigoto. Esta, por crescimento e diferenciação, origina o embrião. O outro núcleo reprodutivo se funde com os núcleos polares, formando uma célula triploide, que, após se dividir mitoticamente, origina o endosperma, tecido de reserva da semente (Kiesselbach, 1980).

Para a produção de sementes haploides, há mecanismos alternativos ao processo citado acima, que são capazes de gerar esporófitos com um complemento cromossômico reduzido, ou seja, com um número gamético de cromossomos ( $n$ ). Quando o crescimento esporofítico ocorre a partir da célula gamética masculina, ou micrósporo, denomina-se androgênese e o haploide assim produzido é considerado androgênético. Caso o desenvolvimento

esporofítico seja induzido na célula-ovo não fertilizada (gameta feminino), o processo é denominado gimnogênese, gerando um haploide gimnogênético. Tais mecanismos podem ser espontâneos ou induzidos e serão detalhados posteriormente.

Os esporófitos haploides produzidos por esses mecanismos podem passar por um evento de duplicação cromossômica, originando linhagens duplo-haploides (DH), totalmente homozigotas.



**FIGURA 1.** Esquema do ciclo da planta de milho, mostrando a alternância de gerações esporofítica ( $2n$ , diploides) e gametofítica ( $n$ , haploides). Elaboração da figura: Patrícia M. O. Pierre.

## Histórico do emprego dos duplo-haploides

Em plantas, os haploides naturais foram descritos em aproximadamente 100 espécies de angiospermas. No entanto, a ocorrência natural da haploidia é considerada rara (Vasil, 1996). A ocorrência natural de haploides foi descrita primeiramente em 1922, por Dorothy Bergner em *Datura stramonium*. Relatos similares em outras espécies de importância econômica, como *Nicotiana tabacum* (tabaco), por Clausen & Mann, em 1924 (Forster et al., 2007), *Triticum compactum* (trigo), por Gains & Aase, em 1926 (Wedzony et al., 2009), *Solanum* (batata), por Hougas & Pelouquim, em 1958 (Rokka, 2009), *Oryza sativa* (arroz), por Niizeki & Oono, em 1968 (Pauk et al., 2009), *Hordeum vulgare* (cevada), por Kasha & Kao, em 1970 (Devaux e Kasha, 2009), e *Brassica* (canola), por Thomas & Wenzel, em 1975 (Gil-Humanes & Barro, 2009), surgiram em seguida.

A primeira planta haploide de milho foi descrita por Stadler & Randolph, em 1929 (Röber et al., 2005). Chase (1952) foi o pioneiro a propor o emprego de haploides de milho com o intuito de acelerar a obtenção de linhagens. O autor identificou haploides naturais e duplicou seu número cromossômico, para a obtenção de duplo-haploides.

Entre 1964 e 1966, o primeiro haploide gerado por meio de cultura de anteras foi obtido por Guha & Maheshwari, em *Datura stramonium*. Isso correspondeu a um grande avanço na produção artificial de duplo-haploides (Wedzony et al., 2009). Entre 1974 e 1980, ocorreu o lançamento das primeiras cultivares DH, Maris Haplona, de canola, e Mingo, de cevada, embora linhagens DH tenham sido previamente produzidas a partir de haploides espontâneos. Nos anos 80 do século passado, diversos

protocolos e inovações tecnológicas para a obtenção de linhagens DH, em mais de 200 espécies vegetais, foram divulgados (Forster et al., 2007), contudo, foi somente nos últimos vinte anos que se mostrou viável na produção de sementes melhoradas.

## Obtenção de haploides em milho

### Partenogênese espontânea

A partenogênese espontânea é o desenvolvimento de uma célula-ovo não fertilizada, em um esporófito haploide, tratando-se, portanto, de um fenômeno gimnogenético. A ocorrência de haploides naturais em milho já foi verificada, porém, em uma taxa extremamente baixa. Segundo Chase (1963), essa taxa é de uma em cada mil, ou seja, insuficiente para ser utilizada em programas de melhoramento de milho. Além disso, esse percentual pode ser influenciado pelos genótipos materno e paterno e por fatores ambientais.

Para separar haploides naturais de diploides resultantes de uma fertilização normal, marcadores fenotípicos podem ser utilizados. O principal marcador empregado é a coloração da lígula.

A duplicação cromossômica espontânea do número cromossômico ocorre em aproximadamente 10% das plântulas haploides. Em um esforço para melhorar essa frequência, Chase injetou 0,5 ml de uma solução de colchicina (0,05%) e glicerina (10%) no nó escutelar das plântulas haploides, mas a eficiência foi baixa (Genovesi, 1990).

### Indução *in vivo*

A indução *in vivo* tem sido preferida em relação aos outros métodos e baseia-se na utilização de linhagens indutoras. Tais linhagens podem gerar haploides androgenéticos ou gimnogenéticos. No

caso dos androgenéticos, após a fertilização, um dos núcleos reprodutivos do grão de pólen se desenvolve em um “pseudo-embrião”, ao passo que, no sistema gimnogenético, é a oosfera que se desenvolve.

Inicialmente, duas linhagens indutoras de haploidia se destacaram. A primeira delas foi desenvolvida a partir de uma linhagem denominada Stock6 (Coe, 1959), que, quando autofecundada, produziu uma frequência de haploides em torno de 3,2%. A linhagem indutora Stock6 gera haploides de origem materna ou gimnogenéticos. O mecanismo de indução de haploidia dessa linhagem não é bem conhecido (Rotarencu et al., 2009). Acredita-se que os haploides resultem de uma falha na fertilização, devido ao gameta masculino ou feminino. Não ocorrendo a fertilização, por um mecanismo também não elucidado, a oosfera cresce e se diferencia em um “embrião” (Sarkar & Coe, 1966). No caso do sistema gimnogenético, a linhagem indutora é utilizada como genitor masculino (doadora de pólen) (Figura 2A). Assim, o haploide resultante é de origem materna.

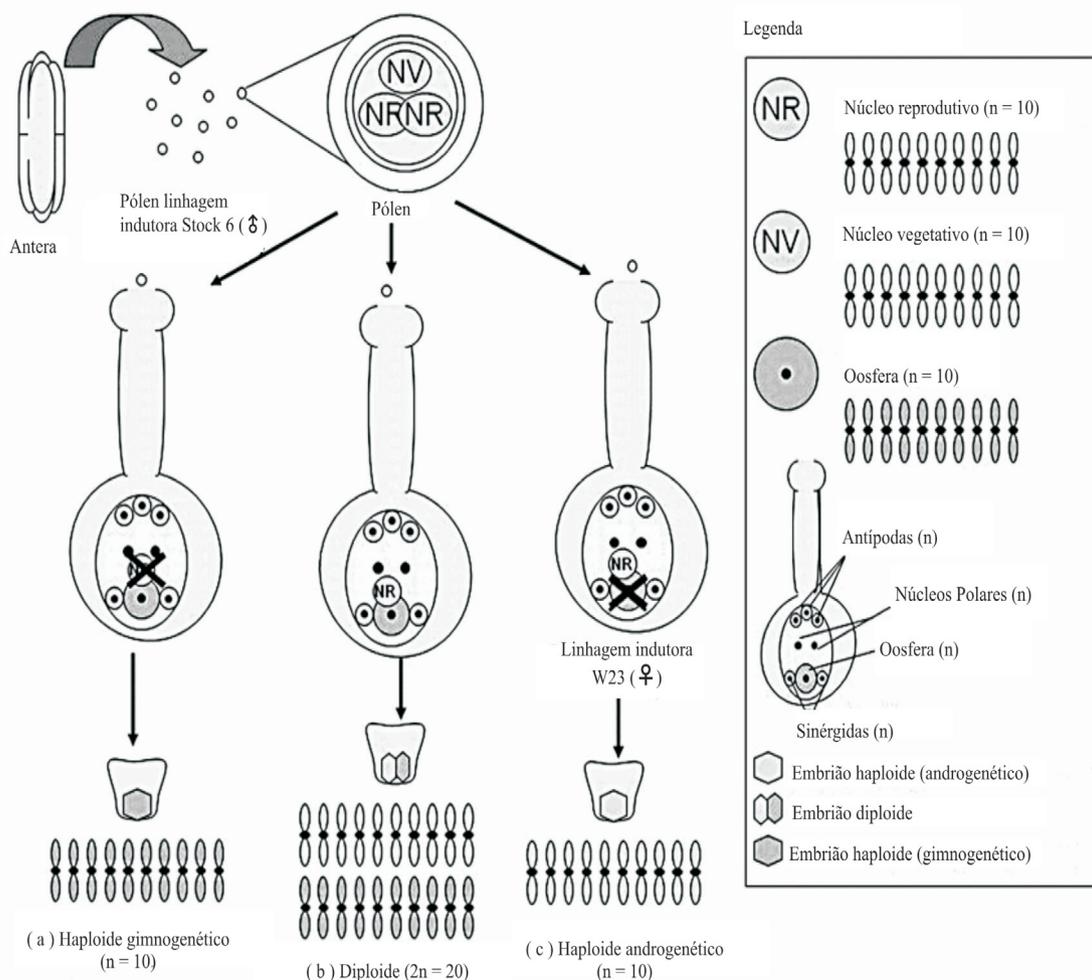
A outra linhagem, conhecida como Wisconsin 23 (W23), gera haploides androgenéticos. A taxa de indução é relativamente menor, variando de 1 a 3% (Kermicle, 1969, 1973). Pelo exposto, ela é utilizada como genitor feminino (receptor de pólen) nos cruzamentos (Figura 2B). Desse modo, a “semente” haploide se desenvolve a partir do núcleo reprodutivo do grão de pólen.

O controle genético do sistema androgenético tem sido estudado. Um gene (*ig*), denominado gametófito indeterminado, é responsável pelo caráter. O alelo recessivo desse gene induz a produção de haploides a partir do gameta masculino (Kermicle, 1969). Esse alelo está localizado no braço longo do cromossomo três, a 90 cM do loco envolvido na produção de lígula ( $lg^2$ ), o mais distal do braço

curto (Kermicle & Demopulos-Rodrigues, 1980). Enquanto que, em uma megasporogênese normal, ocorrem três mitoses sucessivas, resultando em um saco embrionário com oito núcleos, sob a ação do alelo *ig recessivo*, algumas megasporogêneses sofrem quatro ou mais mitoses, resultando em um saco embrionário com 16 núcleos ou mais (Lin, 1981). Como resultado dessas divisões mitóticas adicionais, o indivíduo que apresenta o alelo *ig recessivo* exibe heterofertilização, poliembrião e variação no nível de ploidia do endosperma, depois da fertilização. De acordo com Lin (1981), os sacos embrionários com oosferas degeneradas provavelmente favorecem o desenvolvimento de um núcleo reprodutivo de grão de pólen sem a ocorrência de fertilização, dando origem a um embrião androgenético haploide.

Várias iniciativas foram realizadas no intuito de aumentar as frequências de indução de haploides das linhagens Stock6 e W23. Em condições temperadas, a partir dessas duas linhagens, foram geradas inúmeras outras. Lashermes & Beckert (1988) obtiveram a linhagem indutora WS14, com uma taxa de indução de 3 a 5%. Já Sarkar et al. (1994) relataram taxa de indução de 6% nas linhagens obtidas. As linhagens indutoras ZMS e KMS também foram derivadas da Stock6 e o cruzamento delas deu origem à linhagem MHI, que induz, em média, 6,5% de haploides (Chalyk, 1999; Eder & Chalyk, 2002). A linhagem indutora RWS, obtida pelo cruzamento entre WS14 e KMS, mostrou de 8 a 10% de haploides gimnogenéticos (Röber et al., 2005).

Para a identificação precoce dos haploides gerados por meio do uso de linhagens indutoras, Chase & Nanda (1965) descreveram um sistema de marcador fenotípico baseado na pigmentação

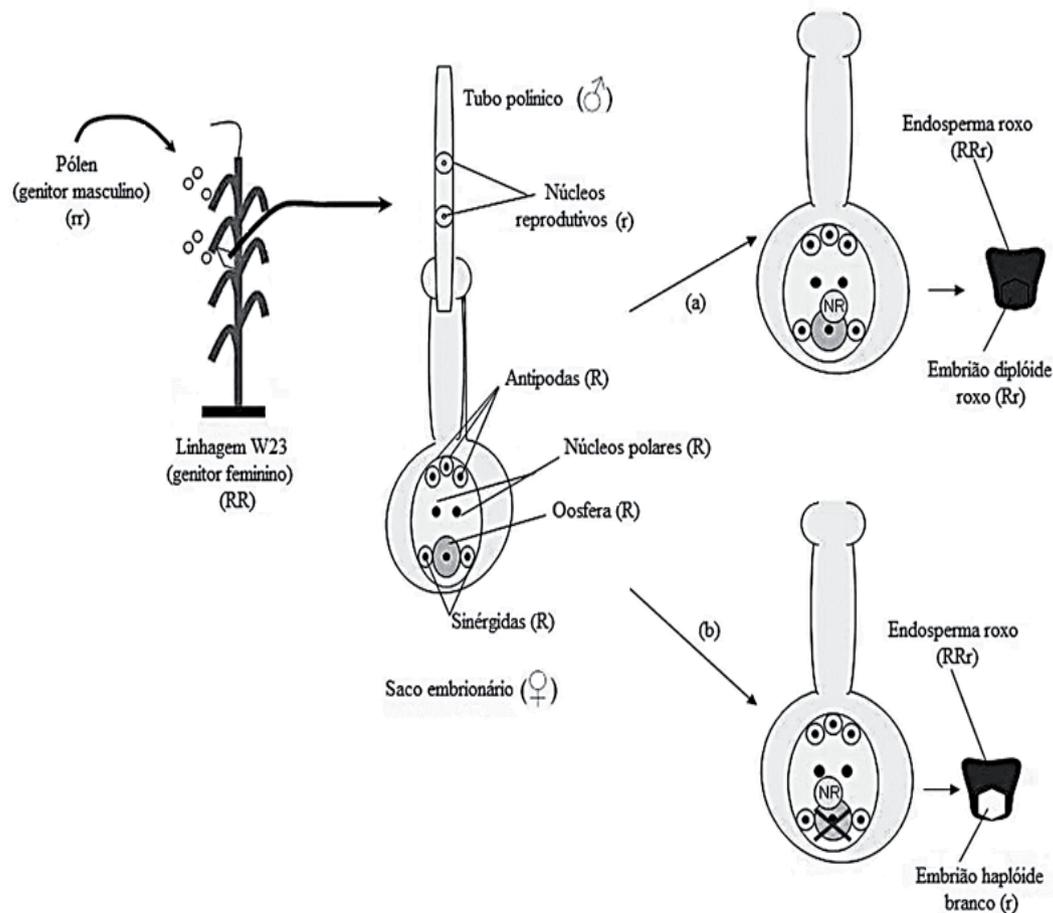


**FIGURA 2.** Tipos de indução *in vivo* de haploidia. (A) Cruzamento envolvendo a linhagem indutora Stock6, gerando um indivíduo haploide ginogenético (n=10), resultante do desenvolvimento mitótico da oosfera não fecundada. Nesse caso, ocorre a degeneração do núcleo reprodutivo do grão de pólen. (B) Cruzamento normal, gerando um indivíduo diploide (2n=20), oriundo da fecundação normal do núcleo reprodutivo e oosfera. (C) Cruzamento envolvendo a linhagem indutora de haploidia W23, gerando um indivíduo haploide androgenético (n=10), resultante do desenvolvimento mitótico do núcleo reprodutivo do grão de pólen. Nesse caso, ocorre degeneração da oosfera. Elaboração da figura: Patrícia M. O. Pierre.

por antocianina, determinado pelo gene R-navajo (*RI-nj*). O alelo dominante promove a pigmentação com antocianina no endosperma e no embrião das sementes diploides, sendo que as sementes haploides

apresentam pigmentação somente no endosperma, ficando com o embrião branco (Figura 3).

Infelizmente, o alelo marcador *RI-nj* tem penetrância incompleta e expressividade variável,



**FIGURA 3.** Mecanismo de funcionamento do marcador fenotípico R-navajo, em linhagens indutoras androgenéticas. Nesse caso, a linhagem indutora é utilizada como genitor feminino. (A) Embrião diplóide ( $Rr$ ) de coloração roxa, oriundo da fecundação normal da oosfera ( $R$ ) pelo núcleo reprodutivo ( $r$ ). (B) Embrião haploide androgenético ( $r$ ), oriundo de divisões mitóticas. Este apresenta coloração branca, devido à ausência do alelo  $R$  (exclusivo do saco embrionário da linhagem indutora), que confere pigmentação com antocianina. Elaboração da figura: Patrícia M. O. Pierre.

não fornecendo uma indicação precisa das sementes haploides (Rabel, 2008). Nos cruzamentos do híbrido Chuandan13 com pólen da linhagem indutora Stock6, foram obtidas 13399 sementes. Dessas, foram identificadas 303 prováveis haploides (com base

no marcador R-navajo). Após a análise citológica, verificaram que, das 253 sementes que germinaram, somente 71 apresentavam  $n=10$  cromossomos (Tang et al., 2009). Por essa razão, outros marcadores têm sido avaliados para identificar os haploides. Os alelos

para ausência de lígula e glossy (*lg1*, *lg2* e *gll*) também têm sido utilizados com sucesso relativo (Lashermes & Beckert, 1988, citados por Barbosa, 2009).

### **Indução *in vitro***

Três métodos para a obtenção de DH *in vitro* têm sido utilizados: cultura de anteras/pólen; cultura de ovários/oosferas; eliminação de cromossomos, pela técnica bulbosum. Desses procedimentos, a cultura de anteras e pólen tem sido mais empregada na cultura do milho. O primeiro relato de um experimento bem sucedido ocorreu em 1975, na China (Genovesi, 1990).

A cultura de anteras/pólen baseia-se na inoculação desses em meio de cultura apropriado. Este, por sua vez, contém substâncias que favorecerão o desenvolvimento de calos ou embrioides (embriogênese somática indireta), que, após estímulos adequados, poderão regenerar em plântulas haploides ou duplo-haploides. Em outros casos, os micrósporos oriundos das anteras podem ser diretamente regenerados em plântulas, sem a formação de calos ou embrioides (embriogênese somática direta). O primeiro processo é o mais empregado.

Para a indução, é necessário que as anteras sejam pré-tratadas a baixas temperaturas. Para isso, elas são incubadas a 8 °C, por 14 dias (Genovesi & Collins, 1982; Willadino et al., 1995) ou a 7 °C, por dez dias (Barnabás et al., 1999, He et al., 2006). Acredita-se que esses pré-tratamentos favoreçam o desenvolvimento de micrósporos uninucleados, que consistem no estágio mais responsivo para a cultura. A responsividade é definida como a proliferação anormal de um ou mais embrioides ou calos, a partir dos micrósporos presentes no interior das anteras (Genovesi, 1990).

Vários meios nutritivos têm sido empregados para a indução de calos/embrioides, a partir de anteras/

pólen de milho, como: meio MS (Murashige & Skoog, 1962), meio YU-PEI ou YP (Ku et al., 1978), meio N6 (Chu, 1981), e variações desses. Os meios de cultura, além de conterem seus componentes básicos, podem ser suplementados com carvão ativado, cuja função é criar uma fina rede de poros, capazes de absorver substâncias tóxicas excretadas pela parede das anteras ou componentes tóxicos do meio de cultura (Genovesi, 1990; Thomas, 2008); sacarose, que é fonte de carboidratos; nitrogênio orgânico; vitaminas; reguladores de crescimento, como o ácido 2,4-diclorofenoxiacético ou 2,4D e ácido 2,4,5-triidobenzoico ou TIBA, cuja composição e concentração são determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento da cultura, e agentes gelificantes, como ágar- um polissacarídeo, extraído de algas marinhas, ou gelrite-polissacarídeos, de ácido glucurônico. Os meios nutritivos contendo as anteras são incubados a 25-28 °C, no escuro, e respondem em aproximadamente quatro a seis semanas (Genovesi, 1990; Caldas et al., 1998).

A regeneração das plântulas (prováveis haploides) ocorre a partir de embrioides ou calos embriogênicos, que apresentam totipotência celular, ou seja, são capazes de se diferenciar em uma plântula. O sistema de regeneração consiste na transferência dos embrioides ou calos embriogênicos do meio de indução para o meio de regeneração (meio similar ao de indução, com modificações na concentração de açúcares e na composição ou concentração dos reguladores de crescimento). Para o milho, frequentemente tem sido utilizada a sacarose, em menores concentrações (2 g L<sup>-1</sup> em vez de 20-30 g L<sup>-1</sup>). Em relação aos reguladores de crescimento, o 2,4D e o TIBA têm sido substituídos pela cinetina ou o ácido naftalenoacético (ANA). Nesse caso, o meio é incubado a 25-28 °C, na presença de luz (Barnabás et al., 1999).

A responsividade da cultura de anteras em milho é genótipo-dependente. De acordo com Genovesi (1990), dos 159 genótipos testados em 1975, por Miao, somente nove responderam positivamente. Willadino et al. (1995) verificaram que, das seis plantas utilizadas para o cultivo de anteras, somente uma apresentou resposta androgenética positiva. Desta, foi possível regenerar duas plantas, uma delas apresentou deficiência de clorofila nas folhas e a outra apresentou características fenotípicas normais, possuindo 20 cromossomos (duplo-haploide) sem a utilização de colchicina ou qualquer outro bloqueador mitótico.

Acredita-se, também, que, no controle genético do caráter, a ação alélica predominante é de dominância parcial. Na tentativa de realizar o melhoramento genético da responsividade da cultura de anteras em milho, Marhic et al. (1998) avaliaram indivíduos DH oriundos de gerações C0, C1 e C2 de uma população sintética de milho e verificaram que houve aumento no nível de resposta androgenética *in vitro* e na regeneração de plântulas DH, com a seleção. Foi observada, também, melhora na frequência de duplicação cromossômica espontânea, porém em menor magnitude.

A fisiologia e o vigor da planta doadora de anteras exerce grande efeito sobre a responsividade do cultivo *in vitro*. Plantas doadoras fracas produzem poucos embrioides ou calos. Isso indica que fatores endógenos exercem grande efeito sobre a responsividade, na cultura de anteras. Fatores externos, como fotoperíodo, intensidade de luz, temperatura e nutrição, também exercem influência (Genovesi, 1990) na responsividade *in vitro*.

No Brasil, relatos sobre a avaliação da responsividade de genótipos de milho à androgênese são escassos. Em um estudo sobre a viabilidade da

produção de linhagens de milho por meio de cultura de anteras, Carvalho et al. (1995) testaram 37 genótipos de origem tropical e subtropical. Verificou-se que, dos 37 materiais testados, apenas os genótipos 677 e 696 (população CMS 03) e o genótipo 712 (da população CMS 04) foram responsivos, formando calos. No entanto, o percentual de calos formados em relação ao número de anteras plaqueadas foi menor que 1%. Além disso, a regeneração de plantas ocorreu em apenas 5% dos calos formados. Esses resultados indicaram que a capacidade androgenética dos materiais utilizados foi muito baixa.

Tendo em vista o pequeno sucesso obtido, a cultura de anteras ainda não pode ser empregada em programas de melhoramento de milho como uma metodologia rotineira. Novos germoplasmas e protocolos devem ser testados. Após a identificação de genótipos responsivos, uma excelente alternativa seria a transferência das características de responsividade para materiais elite não responsivos. No entanto, não foram encontrados trabalhos dessa natureza para genótipos do Brasil.

Em relação à gimnogênese *in vitro*, trabalhos são escassos e informações têm sido obtidas em trigo, cevada e arroz (Wedzony et al., 2009). No milho, Tang et al. (2006) estabeleceram, pela primeira vez, um protocolo de gimnogênese *in vitro* a partir de ovários polinizados de milho. Nesse trabalho, os autores obtiveram haploides e DH espontâneos. No entanto, a frequência variou entre 0,06 e 0,17%, inferior à obtida a partir da gimnogênese *in vivo*.

### **Duplicação cromossômica e linhagens DH instantâneas, em milho**

A duplicação cromossômica espontânea pode ser causada pela endomitose, endoreduplicação ou fusão

entre os núcleos vegetativos e reprodutivos do grão de pólen, durante a cultura de anteras (Seguí-Simarro & Nuez, 2008). Em haploides induzidos *in vivo*, a taxa da duplicação cromossômica espontânea é de 0 a 10% (Chase, 1969; Kato, 2002). Avaliando plantas haploides obtidas em cruzamentos com o indutor ZMK, foram verificadas taxas de diploidização espontânea entre 3,3 e 3,6% (Chalyk, 1994).

A partir da cultura de anteras, há relatos de taxas de duplicação espontânea de 20 a 40% das plântulas regeneradas de milho (Martin & Widholm, 1996; Antoine-Michard & Beckert, 1997). Tais taxas podem ser alteradas de acordo com condições de estresse ou condições do cultivo *in vitro* (Seguí-Simarro & Nuez, 2008). Analisando o processo de duplicação cromossômica espontânea, durante o cultivo *in vitro* de micrósporos de milho, Testillano et al. (2004) observaram, a partir de análises de microscopia eletrônica, a ocorrência de fusão nuclear entre o 5º e o 7º dia de cultivo, o que foi confirmado por meio de análises de citometria de fluxo, que quantifica o DNA nuclear. Para esses autores, a ocorrência da fusão nuclear é determinante para os eventos de duplicação espontânea.

Como a duplicação espontânea ocorre inconsistentemente, é comum o desenvolvimento de protocolos de indução de duplicação utilizando agentes antimitóticos. Diversos agentes têm sido empregados: colchicina (o mais utilizado, inclusive para o milho) e herbicidas (amiprofosfo-metil, orizalina e trifluralina). Todos esses compostos inibem a formação do fuso mitótico, por se ligarem à tubulina (Figura 4), resultando na não-segregação das cromátides irmãs e, conseqüentemente, na duplicação cromossômica (Castillo et al., 2009).

A indução da duplicação pode ser realizada *in vitro*, com os agentes antimitóticos sendo adicionados

ao meio nutritivo, ou *in vivo*, aplicando os agentes diretamente nas plântulas ou por imersão das mesmas em soluções antimitóticas.

O desenvolvimento de um protocolo eficiente de duplicação cromossômica é essencial para a obtenção de plantas DH, em programas de melhoramento, uma vez que, em geral, a frequência de duplicação cromossômica espontânea em haploides de milho tem sido baixa e extremamente incerta (Wan et al., 1991).

Trabalhos relacionados à indução de duplicação cromossômica, em milho, são escassos na literatura e os protocolos relatados, ao serem testados, não possibilitam alcançar os resultados esperados. Um desses protocolos foi proposto por Barnabás et al. (1999), que adicionaram ao meio de indução soluções de colchicina em diferentes concentrações (0,02 e 0,03%). As anteras foram incubadas nesse meio, por três dias, a 29 °C, no escuro. Posteriormente, elas foram transferidas para meio nutritivo, sem o bloqueador mitótico, para a continuação do seu desenvolvimento. Para a indução *in vivo*, Tang et al. (2006), aplicaram no ápice de cada planta haploide, 2 µL de solução contendo colchicina (0,1%) e dimetilsulfoxide (DMSO) a 2%. De acordo com Castillo et al. (2009), a indução *in vivo*, em plântulas de milho, é dificultada pela inacessibilidade ao meristema. Além disso, a aplicação de bloqueadores mitóticos em plântulas é desvantajosa, uma vez que é necessário utilizar altas concentrações e volume do agente antimitótico. Por isso, ocorre alta taxa de mortalidade e a produção de plantas mixoplóides e quiméricas é frequente (Röber et al., 2005).

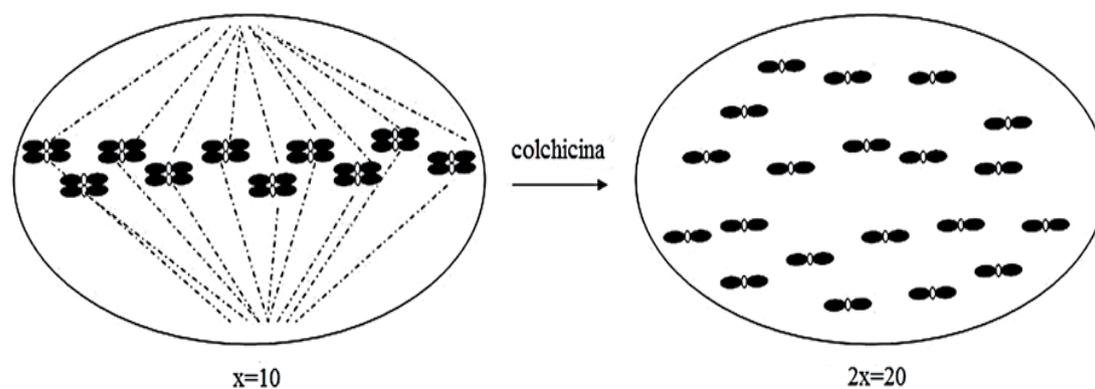
Empresas produtoras de sementes dominam essa tecnologia e relatam conseguir percentuais satisfatórios de plantas duplicadas. No entanto, as metodologias empregadas por essas empresas não estão disponíveis à comunidade científica.

### Vantagens do uso dos DH

Pelo menos teoricamente, os duplo-haploides podem aumentar a eficiência no melhoramento do milho. A principal vantagem é que, com os DH, obtêm-se linhagens com todos os locos em homozigose. Quando se utiliza o processo tradicional, mesmo após seis a oito gerações de autofecundação, ainda ocorrem locos em heterozigose. É esperado que, a partir do cruzamento de duas linhagens obtidas após oito autofecundações, a frequência dos locos em heterozigose seja igual a  $(1/2)^8$ , ou seja, um em cada 256 locos deve ser heterozigoto. Essa proporção é pequena, porém, se for considerada que uma planta de milho possui mais de 30 mil genes, esse número é significativo. Não se deve esquecer, contudo, que a linhagem DH, após poucas gerações, certamente não será mais completamente homozigótica. Mesmo considerando baixa taxa de mutação, de acordo com o número de genes já comentado, a manutenção da

homozigose completa é uma utopia.

Outra grande vantagem, que é pouco explorada, é que, com as autofecundações sucessivas, há um aumento da ocorrência de recombinações entre os genes ligados. Dessa forma, a possibilidade de manter combinações favoráveis existentes nas linhagens genitoras é pequena, ou seja, na geração  $F_{\infty}$ , todas as linhagens resultantes serão virtualmente recombinantes, inclusive nos genes ligados. Com os DH, a recombinação de genes ligados ocorre somente em uma meiose, a que originou o gameta responsável pela formação da planta DH. Desse modo, grande parte dos locos ligados não serão recombinados. Portanto, a chance de manter combinações existentes em linhagens parentais aumenta. Assim, se uma empresa de milho utilizar como germoplasma sementes  $F_1$  de um híbrido de outra empresa concorrente, a chance de recuperar linhagens com a maioria dos locos com a mesma constituição dos genitores é alta. Até certo ponto, resultados obtidos com simulação



**FIGURA 4.** Ação da colchicina sobre o fuso mitótico de uma célula haploide de milho hipotética. Uma célula haploide ( $x=10$  cromossomos) em mitose sob ação da colchicina. Esse composto se liga à tubulina, resultando em sua despolimerização, o que impede a segregação cromatídica para pólos opostos e a ocorrência de citocinese, gerando uma célula duplo-haploide com  $2x = 20$  cromossomos. Elaboração da figura: Patrícia M. O. Pierre.

realizada por Bernardo (2009), para mostrar qual geração seria melhor para obter os DH se  $F_1$  ou  $F_2$  realçam esse fato. O referido autor constatou que os DH de  $F_2$ , foram mais eficientes, devido à maior recombinação. Contudo, não foi avaliada a chance de se recuperar a maioria dos locos das linhagens parentais, que é o objetivo de algumas empresas. Esse fato, inclusive, tem impulsionado a publicação de artigos que discutem a questão da manutenção da paternidade das linhagens que originaram o híbrido comercial (Smith et al., 2008).

No processo de obtenção de linhagens DH, assim como no sistema de autofecundações tradicionais, é feita a seleção *per se* dos melhores genótipos. No entanto, essa seleção é realizada em uma etapa posterior, após a obtenção e duplicação do indivíduo haploide. E, por não haver a necessidade de autofecundações sucessivas, no sistema DH, é possível avaliar um número bem maior de plantas. Estima-se que qualquer empresa de sementes de milho de porte médio realize mais de cem mil autofecundações por ano, gerando despesas com o operador das autofecundações, bem como com materiais necessários para a realização dessa tarefa.

Outra vantagem dos DH é a possibilidade de obter milhares de linhagens de cada população. No momento, essa vantagem é ainda potencial, porque o percentual de indução de haploides tem sido baixo e, mais ainda, a taxa de duplicação dos haploides, como já comentado, é muito pequena. Adicionalmente, de nada adianta apresentar milhões de linhagens no final do processo, pois a etapa mais difícil é a de identificação das linhagens com melhor desempenho *per se* e em combinações híbridas. Não há, ainda, como realizar essa atividade eficientemente sem o teste de campo.

Também tem sido colocada como vantagem da tecnologia a melhor qualidade nos experimentos de avaliações dos híbridos, uma vez que todas as plantas geradas de uma semente haploide serão idênticas (Milach, 2007). Essa é uma vantagem relacionada à melhoria na precisão experimental. No entanto, não existem informações que possibilitem quantificar esses dados.

## Conclusões

A utilização de técnicas de indução de haploidia *in vivo* e *in vitro*, aliada a metodologias de duplicação cromossômica, constitui uma estratégia para a obtenção de linhagens duplo-haploides em milho. Embora a técnica seja teoricamente viável, espera-se que progressos metodológicos adicionais ocorram para aumentar a taxa de indução de haploidia (*in vivo* e *in vitro*) e a eficiência da duplicação cromossômica, para que linhagens haploides instantâneas sejam obtidas e efetivamente utilizadas para a obtenção de híbridos de milho com alto desempenho. Considerando que a etapa de duplicação cromossômica é essencial à obtenção de duplo-haploides, a falta dessas informações constitui um entrave para programas de melhoramento de milho que almejam a utilização dessa tecnologia. Assim, protocolos eficientes de duplicação de cromossomos em milho devem ser testados, sobretudo por instituições públicas, para que essas informações possam estar disponíveis à comunidade científica e às pequenas empresas produtoras de sementes.

Além disso, informações do comportamento e da eficiência na produção de linhagens DH ainda são escassas, sobretudo para germoplasmas tropicais, evidenciando a necessidade de que se intensifiquem as pesquisas a esse respeito.

## Referências

- ANTOINE-MICHARD, S.; BECKERT, M. Spontaneous versus colchicine-induced chromosome doubling in maize anther culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 48, p. 203-207, 1997.
- BARBOSA, M. P. M. **Avaliação do desequilíbrio de ligação e da origem genética em duplo-haploides de milho**. 2009. 62 f. Tese (Doutorado em Agronomia - Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- BARNABÁS, B.; OBERT, B.; KOVÁCS, G. Colchicine, an efficient genome doubling agent for maize (*Zea mays*) microspores cultured in anthero. **Plant Cell Reports**, New York, v. 18, p. 858-862, 1999.
- BERNARDO, R. Should maize doubled haploids be induced among F1 or F2 plants? **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 119, p. 255-262, 2009.
- CALDAS, L. S.; HARIDASSAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. M. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Serviço de Produção de Informação, 1998. cap. 5, p. 87-132.
- CARVALHO, C. H. S.; ANGELO, P. C. da S.; MAGNAVACA, R.; GOMES E GAMA, E. E. Estudo sobre a viabilidade da produção de linhagens de milho por meio de cultura de anteras. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 42, n. 242, p. 353-361, 1995.
- CASTILLO, A. M.; CISTUÉ, L.; VALLÉS, M. P.; SORIANO, M. Chromosome doubling in monocots. In: TOURAEV, A.; FORSTER, B. P.; JAIN, S. M. (Ed.). **Advances in haploid production in higher plants**. New York: Springer, 2009. cap. 27, p. 329-338.
- CHALYK, S. T. Creating new haploid-inducing lines of maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Columbia, v. 73, p. 53-54, 1999.
- CHALYK, S. T. Properties of maternal haploid maize plants and potential application to maize breeding, **Euphytica**, Wageningen, v. 79, p. 13-18, 1994.
- CHASE, S. S. Androgenesis, its use for transfer of maize cytoplasm. **Heredity**, Edinburgh, v. 54, p. 152-158, 1963.
- CHASE, S. S. Monoploids and monoploid derivatives of maize (*Zea mays* L.). **Botanical Review**, Bronx, v. 35, p. 117-167, 1969.
- CHASE, S. S. Production of homozygous diploids of maize from monoploids. **Agronomy Journal**, Madison, v. 44, p. 263-267, 1952.
- CHASE, S. S.; NANDA, D. K. Comparison of variability in inbred lines and monoploid-derived lines of maize (*Zea mays* L.). **Crop Science**, Madison, v. 5, p. 275-276, 1965.
- CHU, C. C. The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. In: SYMPOSIUM ON PLANT TISSUE CULTURE, 1978, Beijing, **Proceedings...** Beijing: Science Press, 1978. p. 43-50.
- MILACH, S. 2007. O melhoramento de milho. PIONEER SEMENTES. Disponível em <<http://phi.co.za/PopVersaoImpressaoArtigo.aspx?id=90>>. Acesso em 10/05/2010.
- COE, E. H. A line of maize with high haploid frequency. **American Naturalist**, Chicago, v. 93, p. 381-382, 1959.
- COMPANIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Projeção safra brasileira 2009/2010. 2010. Disponível em <[www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/3graos\\_09.12.pdf](http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/3graos_09.12.pdf)>. Acesso em 20/01/2010.
- DEVAUX, P.; KASHA, K. J. Overview of barley

- doubled haploid production. In: TOURAEV, A.; FORSTER, B. P.; JAIN, S. M. (Ed.). **Advances in haploid production in higher plants**. New York: Springer, 2009. cap. 3, p. 47-63.
- EDER, J.; CHALYK, S. *In vivo* haploid induction in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 104, p. 703-708, 2002.
- FORSTER, B. P.; HEBERLE-BORS, E.; KASHA, K.; TOURAEV, A. The resurgence of haploids in higher plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 12, n. 8, p. 368-375, 2007.
- GENOVESI, A. D. Maize (*Zea mays* L.): *In vitro* production of haploids. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry 12: Haploids in crop improvement I**. New York: Springer-Verlag. 1990. cap. II3, p.176-203.
- GENOVESI, A. D.; COLLINS, G. B. *In vitro* production of haploid plants of corn via anther culture. **Crop Science**, Madison, v. 22, p. 1137-1144, 1982.
- GIL-HUMANES, J.; BARRO, F. Production of doubled haploids in *Brassica*. In: TOURAEV, A.; FORSTER, B. P.; JAIN, S. M. (Ed.). **Advances in haploid production in higher plants**. New York: Springer, 2009. cap. 4, p. 65-73.
- HE, G.; ZHANG, J.; LI, K.; XIONG, Z.; CHEN, M.; CHANG, J.; WANG, Y.; YAHG, G.; BARNABAS, B. An improved system to stablish highly embryogenic haploid cell protoplast cultures from pollen calluses of maize (*Zea mays*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 86, p.15-25, 2006.
- KATO, A. Chromosome doubling of haploid maize seedlings using nitrous oxide gas at the flower primordial stage. **Plant Breeding**, Berlin, v. 121, p. 370-377, 2002.
- KERMICLE, J. L. Androgenesis conditioned by a mutation in maize. **Science**, Washington, v. 166, p. 1422-1424, 1969.
- KERMICLE, J. L. Androgenesis and the *indeterminate gametophyte(ig)* mutation: influence of pollen parent on androgenese frequency. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 47, p. 207-208, 1973.
- KERMICLE, J. L.; DEMOPULOS-RODRIGUEZ, J. Location of *indeterminate gametophyte (ig)* on chromosome 3. **Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 54, p. 84-85, 1980.
- KIESSELBACH, T. A. **The structure and reproduction of corn**. 2. ed. Lincoln: University of Nebraska, 1980. 96 p.
- KU, M. K.; CHENG, W. C.; KUO, L. C.; KUAN, H. P.; HUANG, C. H. Induction factors and morphocytological characteristics of pollen-derived plants in maize(*Zeamays*). In: SYMPOSIUM ON PLANT TISSUE CULTURE, 1978, Beijing, **Proceedings...** Beijing: Science Press, 1978. p. 25-30.
- LASHERMES, P.; BECKERT, M. A genetic control of maternal haploidy in maize (*Zea mays* L.) and selection of haploid inducing lines, **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 76, p. 405-410, 1988.
- LIN, B. Megametogenetic alterations associated with the indeterminate gametophyte (ig) mutation in maize. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 3, p. 557-563, 1981.
- MARHIC, A.; ANTOINE-MICHARD, S.; BORDES, J.; POLLACSEK, A.; MURIGNEUX, A.; BECKERT, M. Genetic improvement of anther culture response in maize: relationships with molecular, mendelian and agronomic traits. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 97, p. 520-525, 1998.
- MARTIN, B.; WIDHOLM, J. M. Ploidy of small individual embryo-like structures from maize anther cultures treated with chromosome doubling agents and calli derived from them. **Plant Cell**

- Reports**, New York, v. 15, n. 10, p. 781-785, 1996.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p. 473, 1962.
- PATERNIANI, E.; CAMPOS, M. S. Melhoria do milho. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa, MG: UFV, 1999. p. 429-486.
- PAUK, J.; JANCÓS, M.; SIMON-KISS, I. Rice doubled haploids and breeding. In: TOURAEV, A.; FORSTER, B. P.; JAIN, S. M. (Ed.). **Advances in haploid production in higher plants**. New York: Springer, 2009. cap. 16, p. 189-197.
- MILACH, S. 2007. O melhoramento de milho. PIONEER SEMENTES. Disponível em <<http://phi.co.za/PopVersaoImpressaoArtigo.aspx?id=90>>. Acesso em 10/05/2010.
- RABEL, M. **Haploides androgenéticos em milho tropical**. 2008. 57 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- ROBER, F. K.; GORDILLO, G. A.; GEIGER, H. H. In vivo haploid induction in maize-Performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding. **Maydica**, Bergamo, v. 50, p. 275-283, 2005.
- ROKKA, V. M. Potato haploids and breeding. In: TOURAEV, A.; FORSTER, B. P.; JAIN, S. M. (Ed.). **Advances in haploid production in higher plants**. New York: Springer, 2009. cap. 17, p. 199-208.
- ROTARENCO, V.; GEORGETA, D.; MARIANA, S. Induction of maternal haploids in maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Columbia, v. 83, p. 1-9. 2009.
- SARKAR, K. R.; COE, E. H. A genetic analysis of the origin of maternal haploids in maize, **Genetics**, Austin, v. 54, p. 453-464, 1966.
- SARKAR, K. R.; PANDEY, A.; GAYEN, P.; MADAN, J. K.; KUMAR, R.; SACHAM, J. K. S. Stabilization of high haploid inducer lines. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Columbia, v. 68, p. 64-65, 1994.
- SMITH, J. S. C.; HUSSAIN, T.; JONES, E. S. et al. Use of doubled haploids in maize breeding: implications for intellectual property protection and genetic diversity in hybrid crops. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 22, p. 51-59, 2008.
- SEGUÍ-SIMARRO, J. M.; NUEZ, F. Pathways to doubled haploidy: chromosome doubling during androgenesis. **Cytogenetics Genome Research**, Basel, v. 120, p. 358-369, 2008.
- TANG, F.; TAO, Y.; ZHAO, T.; WANG, G. *In vitro* production of haploid and doubled haploid plants from pollinated ovaries of maize (*Zea mays*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 84, p. 233-237, 2006.
- TANG, Q. L.; FENG, Y. C.; HAN, X. L. ZHENG, M.; RONG, T. Z. Study on haploidy inducing and its meiotic abnormality in maize. **Agricultural Sciences in China**, Beijing, v. 8, n. 10, p. 1159-1165, 2009.
- TESTILLANO, P.; GEORGIEV, S.; MORGENSEN, H. L.; CORONADO, M. J.; DUMAS, C.; RISUENO, M. C.; MATTHYS-ROCGON, E. Spontaneous chromosome doubling results from nuclear fusion during *in vitro* maize induced microspore embryogenesis. **Chromosoma**, Berlin, v. 112, p. 342-349, 2004.
- THOMAS, T. D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances**, New York, v. 26, p. 618-631, 2008.
- VASIL, I. K. Haploid production in higher plants. A dedication. In: JAIN, S. M.; SOPORY, S.

- K.; VEILLEUX, R. E. (Ed.). ***In vitro* haploid production in higher plants**. Dordrecht: Kluwer, 1996. p. ix-x.
- WAN, Y.; DUNCAN, D. R.; RAYBURN, A. L.; PETOLINO, J. F.; WIDHOLM, J. M. The use of antimicrotubule herbicides for the production of doubled-haploid plants from anther derived maize callus. **Theoretical Applied and Genetics**, Berlin, v. 81, p. 205-211, 1991.
- WEDZONY, M.; FORSTER, B. P.; ZUR, I.; GOLEMIEC, M.; SZECHYNSKA-HEBDA, E.; GOTEBIOWSKA, D. G. Progress in doubled haploid technology in higher plants. In: TOURAEV, A.; FORSTER, B. P.; JAIN, S. M. (Ed.). **Advances in haploid production in higher plants**. New York: Springer, 2009. cap. 1, p. 1-18.
- WILLADINO, L.; CAMARA, T. R.; SANTOS, M. A.; TORNE, J. M. Obtenção de uma linhagem de milho tolerante ao estresse salino mediante a cultura de anteras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 30, n. 11, p. 1313-1318, 1995.