

ANEXO I

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL

TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA:

OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DE DUPLO-HAPLOIDES EM MILHO PELO DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS E ADEQUAÇÃO DO USO DE SUBSTÂNCIAS ALTERNATIVAS À COLCHICINA

PROPONENTE: Prof. Dr. Josué Maldonado Ferreira
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA - UEL

COORDENADOR:
Prof. Dr. Josué Maldonado Ferreira (Docente do Depto. Biologia Geral/CCB/UEL)

PARTICIPANTES:

Juliana Moraes Machado de Oliveira (Mestranda em Agronomia/UEL)
Vitor Joaquim de Lucena (Mestrando em Agronomia/UEL)
Alesson Felipe Movio Lovison (Discente em Agronomia/UEL)
Guilherme Cunha Do Carmo (Discente em Agronomia/UEL)
Helton Silva Alves Ferreira (Discente em Agronomia/UEL)
João Otavio Goncalves dos Santos (Discente em Agronomia/UEL)
Lucas Alves Camilo (Discente em Agronomia/UEL)
Maria Eduarda Alves de Oliveira (Discente em Agronomia/UEL)
Ricky Lorrán Medeiros (Discente em Agronomia/UEL)

Londrina - PR
2024

TÍTULO DO PROJETO: OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DE DUPLO-HAPLOIDES EM MILHO PELO DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS E ADEQUAÇÃO DO USO DE SUBSTÂNCIAS ALTERNATIVAS À COLCHICINA

COORDENADOR (A) DO PROJETO: Prof. Dr. Josué Maldonado Ferreira

Resumo (até 1 página)

A tecnologia de duplo-haploides (DH) permite obter linhagens completamente homozigóticas em dois a três ciclos de cultivo, sendo mais vantajosa que processo tradicional de autofecundação, que demanda de seis a oito ciclos e ainda não atinge 100% de homozigose. A obtenção de DHs envolve as etapas de indução à haploidia por meio de cruzamento de linhagens indutoras; identificação dos indivíduos haploides; duplicação cromossômica para restauração da fertilidade; autofecundação das plantas duplicadas e multiplicação de sementes. As duas etapas iniciais demandam a ação de linhagens indutoras adaptadas ao ambiente de cultivo; com taxas de indução elevadas; florescimento sincronizado com populações doadoras tropicais; homozigóticas para diferentes genes marcadores fenotípicos, que auxiliem na identificação de haploides. Os programas de melhoramento de milho em ambientes tropicais têm tido dificuldade de adotar a tecnologia de DHs devido ao: a) alto custo das licenças de uso de linhagens indutores, com elevada taxa de indução; b) estas licenças de uso, normalmente, não permitem que os indutores sejam empregadas para o melhoramento de novos indutores mais adaptados; c) as linhagens indutoras de acesso livre tem baixa adaptação à ambientes tropicais e reduzida taxa de indução; d) carência de divulgação de estudos relacionados aos procedimentos eficientes de duplicação cromossômica em ambiente tropical. A terceira etapa da obtenção dos DHs envolve a duplicação cromossômica de haploides, normalmente, empregando a solução de colchicina, que tem se demonstrado eficiente para a obtenção de DHs em milho, mas é muito cara, altamente tóxica ao ser humano e meio ambiente, exigindo cuidados extremos no manuseio e descarte. Assim, é importante identificar substâncias alternativas em substituição ao uso da colchicina e desenvolver protocolos que ofereçam menores riscos e que apresentem eficácia semelhante ao da colchicina. Dessa forma, os objetivos deste projeto são: a) introduzir e multiplicar sementes de indutores de livre acesso, sem restrições para uso em melhoramento, e que possuam diferentes genes marcadores de sementes, raiz e plantas, úteis para identificação de haploides; b) desenvolver novos indutores de haploidia adaptados à ambientes tropicais, com adequadas taxas de indução, com diferentes genes marcadores de identificação de haploides, a partir do cruzamento de um indutor temperado introduzido e linhagens com elevado desempenho e adaptadas à ambientes tropicais; c) adequação de métodos de duplicação cromossômica com emprego de substâncias antimitóticas alternativas ao uso de colchicina, empregando diferentes tempos de exposição e concentrações; d) elaborar e avaliar ferramentas auxiliares para o tratamento das plântulas de milho haploides com agentes antimitóticos, visando aumentar a eficiência e a segurança do processo de duplicação cromossômica em milho, com maior segurança dos trabalhos.

Palavras-chave: *Zea mays* L.; amiprofos metil, indutores de haploidia; pronamide; duplicação espontânea

Objetivos (até ½ página)

- a) introduzir e multiplicar sementes de indutores de haploidia em milho, que tem origem temperada e os genes marcadores de sementes, raiz e plantas, utilizados para identificação de haploides;
- b) a partir do cruzamento de um indutor de clima temperado introduzido e genótipos adaptados à ambientes tropicais, desenvolver novas linhagens de indutores com adequadas taxas de indução à haploidia e adaptação à ambientes tropicais, fixados para genes marcadores de sementes, raiz e plantas, empregados na identificação de indivíduos haploides;

- c) adequação de métodos de duplicação cromossômica com emprego de substâncias antimitóticas alternativas ao uso de colchicina, empregando diferentes tempos de exposição e concentrações;
- d) elaborar e avaliar ferramentas auxiliares para o tratamento das plântulas de milho haploides com agentes antimitóticos, visando aumentar a eficiência e a segurança do processo de duplicação cromossômica em milho, com maior segurança dos trabalhos.

1. Identificação e caracterização do problema

No método tradicional de obtenção de linhagens são necessários de seis a oito ciclos de autofecundação, para gerar indivíduos com alto grau de homozigose. Com o surgimento da tecnologia de duplo-haploides (DH), linhagens completamente homozigóticas são obtidas com dois a três ciclos de cultivo, aumentando a velocidade de síntese de linhagens em programas de melhoramento de milho, visando a obtenção de híbridos. Normalmente, as linhagens DHs de milho são obtidas *in vivo*, por meio da polinização das gerações F1 ou F2 de populações doadoras, empregando pólen de linhagens indutoras de haploidia gimnogenéticas, também chamado de indutor maternal. Os descendentes destes cruzamentos serão classificados em diploides e haploides na fase de sementes ou de plântulas, por meio de genes marcadores expresso na coloração púrpura nas sementes e/ou plântulas e suas raízes. Os indivíduos haploides identificados passam por tratamento com algum agente inibidor da formação das fibras do fuso para separação dos cromossomos duplicados na mitose. Isto resulta na duplicação cromossômica e restauração da fertilidade, permitindo a autofecundação e obtenção de linhagens DHs com sementes completamente homozigotas (Prasanna et al., 2012). Assim, o crescente uso da tecnologia de DHs resultou em pesquisas que visam aumentar o sucesso das seguintes etapas da produção de linhagens DHs: a indução à haploidia, identificação de sementes haploides putativas (SHP's), duplicação cromossômica e a multiplicação de sementes duplo haploides (DH's).

Atualmente, a tecnologia de DH é amplamente adotada por grandes empresas de programas de melhoramento de milho. Contudo, os programas de melhoramento de média e pequena escala tem dificuldades de utilizar esta tecnologia, devido ao alto custo das licenças de uso de indutores com elevadas taxas de indução; os indutores de acesso livre apresentam baixas taxas de indução à haploidia; os principais indutores têm origem em clima temperado e não são adaptados à ambientes tropicais. A falta de indutores adaptados é especialmente sentida em países tropicais, onde os esforços de melhoramento de indutores são mais recentes (Prasanna et al., 2012; Trentin et al., 2020). Além disto, há a necessidade de estudos que promovam o aumento da eficiência da identificação assertiva de haploides e instrumentos que auxiliem e aumentem a eficiência e o sucesso do processo de duplicação cromossômica, com maior segurança do trabalho.

Historicamente, o trabalho de Chase (1952) revelou a possibilidade da utilização de plantas haploides como aceleradores para a obtenção de linhagens endogâmicas em milho, mas a reduzida ocorrência de haploidia espontânea inviabilizava a exploração DHs em escala comercial. A partir do trabalho de Coe (1959) foi construída a estratégia de indução à haploidia *in vivo*, por meio do genótipo indutor conhecido como Stock 6, que possuía uma taxa de indução à haploidia (TIH) igual a 2,3%. A TIH é estimada pela proporção de sementes com embriões haplóides detectadas entre o total de sementes colhidas no germoplasma fonte (população doadora).

Os indutores à haploidia *in vivo* são classificados como androgenéticos (paternal) e gimnogenéticos (maternal), sendo utilizados nos cruzamentos como fêmea e macho, respectivamente. Os indutores androgenéticos são resultantes de uma mutação no gene *ig1* (*indeterminate gametophyte*) (Kermicle et al., 1971; Evans et al., 2007), mas são pouco utilizados devido a sua baixa taxa TIH, com valores entre 1% e 2% (Kermicle, 1994). Além disso, os indivíduos haploides resultantes do cruzamento com indutores androgenéticos possuem características citoplasmáticas diferentes da população doadora, pois mantem o citoplasma do genótipo indutor (Kermicle et al., 1973). Outro fator limitante é que, indutores androgenéticos, limitam a indução à haploidia via lotes isolados, pois atuam como receptores do pólen das diferentes populações doadoras. Os genótipos indutores gimnogenéticos são os mais utilizados,

pois atuam como fornecedores de pólen para as populações doadoras, que produzirão indivíduos haploides com os seus respectivos citoplasmas. Além disto, permitem a indução em lotes isolados e apresentam maior TIH.

A linhagem gimnogenética Stock 6 (Coe, 1959) e androgenética Wisconsin 23 (Kermicle, 1969) foram as primeiras indutoras. O Stock 6 foi o precursor de diversas linhagens indutoras com as maiores TIHs (Prasanna et al., 2012), que viabilizaram a exploração da tecnologia DH em escala comercial. Dentre estas, pode-se destacar as TIHs de 3% a 5% para o WS14 (Lashermes & Beckert, 1988); 6,5% para o MHI (Chalyk, 1999); 8% a 12% para o RWS (Prigge et al., 2011); acima de 10 % para UH400 e de 12% a 15% para os indutores PK6, HZI1, CAUHOI e PHI (Barret et al., 2008; Li et al., 2009; Rotarenco et al., 2010; Zhang et al., 2008), todos indutores produzidos com germoplasma temperado e avaliados para condições de climas temperados.

Quando os indutores temperados são cultivados em ambientes tropicais, eles mantem suas taxas de indução de haploidia, mas apresentam fraca adaptação, baixo vigor da planta, floração muito precoce, resultando em não sincronia com o florescimento de plantas tropicais, baixa produtividade de sementes e extrema suscetibilidade a doenças tropicais e podridão das espigas. Isto resulta em dificuldades na manutenção destas linhagens e as torna ineficientes para obtenção de indivíduos haploides em grande escala e em lotes isolados (Prigge et al., 2012). Assim, a importância de se desenvolver indutores com elevadas TIHs e bem adaptados ao seu ambiente de uso está diretamente relacionada com: a) redução do número de cruzamentos necessários para obter a quantidade desejada de sementes haploides de cada população doadora; b) redução dos custos relacionados ao plantio, manejo agrônômico, polinizações e colheita de campos de indução; c) redução dos custos com processamento das espigas induzidas e com a identificação dos haploides.

Para o desenvolvimento de linhagens indutoras maternas adaptadas à ambiente tropical e com elevada TIH, Trentin et al. (2020) sugeriu o cruzamento entre linhagens elites adaptadas à ambientes tropicais e pelo menos uma linhagem indutora de origem temperada, com elevada TIH e homocigótica para os genes *R1-nj*, *PI1*, *mtl* e *zmdmp*, sendo feita a seleção visando: a) melhorar a expressão de antocianina nas sementes, raízes de plântulas, palhas da espiga, colmo, folhas e pendão, que servem para diferenciação de indivíduos haploides e diploides; b) desenvolver linhagens e híbridos de indutores com altura adequada e menor acamamento; c) obter plantas com pendões e haste principal grandes, com maior número de ramificações laterais e produção de pólen; d) obter pendões com liberação de pólen por um número maior de dias; e) aumentar a produtividade de sementes; f) obter linhagens com resistência à doenças de plantas e de espiga.

A maneira mais econômica de separar haplóides de diplóides é a seleção visual em nível de sementes e de plântulas recém germinadas (Vanous et al., 2017; Dermail et al., 2023). Genes estruturais da biossíntese de antocianina, como *A1*, *A2*, *C2*, *Bz1*, *Bz2* e *Pr1*, são regulados pelas famílias de genes MYB *C1* (aleurona1 colorido)/*PI1* (planta1 roxa) e bHLH *R1* (cor1)/*B1* (cor1 da planta). Uma vez que cada membro destas famílias tem uma expressão específica de tecido ou desenvolvimento, o padrão de pigmentação de antocianina de uma planta e grão de milho depende da constituição alélica nos locos *C1/PI1* e *R1/B1*. Por exemplo, o gene *C1* é responsável pelo desenvolvimento de antocianinas na camada de aleurona do grão de milho, enquanto o gene *PI1* está associado à pigmentação de antocianina independente do sol nos tecidos vegetais e no pericarpo do grão de milho. Da mesma forma, o gene *R1* ativa a pigmentação da antocianina dos tecidos vegetais e a camada de aleurona no grão de milho, mas *B1* regula de forma independente a cor da planta e é expresso no pericarpo do grão de milho (Walker et al., 1995; Petroni et al., 2014). O marcador de identificação de haploide mais comum é a coloração roxa da coroa do endosperma e coleótilos roxos de embriões codificados pelo alelo mutante dominante *R1-nj* do gene de cor vermelha *R1* (Nanda & Chase, 1966). Os indutores atuais contêm o gene *R1-nj* para identificar haploides de populações doadores na fase de semente. Na aleurona, na qual as células possuem uma cópia do alelo *R1-nj*, os pigmentos antocianínicos são expressos e permitem a identificação de contaminações ou autopolinizações sem coloração. Dentro da fração de grãos com uma coroa de semente roxa (geralmente a maioria em cruzamentos de indução controlados), os haplóides são identificados pela ausência de coloração roxa do embrião (Prigge & Melchinger, 2012).

A intensidade e a extensão da pigmentação podem variar dependendo da origem genética do doador e do indutor. Por exemplo, na presença dos genes de cor *B1* e *PI1*, *R1-nj* afeta positivamente a pigmentação do coleóptilo, a cor da raiz e a cor da planta. As mutações em genes que influenciam a biossíntese de antocianinas, como *C1* (*C1-l*) e *C2* (*C2-ldf*), afetam negativamente a expressão de *R1-nj* (Paz-Ares et al., 1990; Della Vedova et al., 2005). Neste sentido, se o gene *C1-l* estiver presente no doador ou no indutor, a pigmentação do coleóptilo e da camada de aleurona dos grãos de milho desaparece, porque o gene *C1-l* inibe epistaticamente a função *R1-nj* na biossíntese de antocianina nos grãos de milho. Embora isto seja um impedimento em cruzamentos de indução regulares, a inibição de *R1-nj* por *C1-l* pode ser explorada para permitir a identificação de haploides em origens genéticas que transportam o gene *R1-nj*, tais como indutores. Se os indutores convencionais forem cruzados com indutores portadores do gene *C1-l*, espera-se que o F1 resultante (cruzamento do indutor *R1-nj* x *C1-l*) não tenha pigmentação antocianina do embrião, a menos que o embrião tenha o genótipo haplóide materno. Também, para que haja a produção de antocianina, é necessário que os alelos dominantes *C2* (*Whp1*), *A1* e *A2* estejam presentes, não ocorrendo a síntese antocianina se os genótipos forem homocigotos recessivos para qualquer um desses genes.

O gene *PI1* promove a produção de antocianina nas raízes das plântulas nos primeiros dias da germinação, mesmo sem terem sido expostas à luz, enquanto as plântulas de genótipos homocigotos recessivos não apresentam raízes roxas na ausência de luz. Assim, o gene *PI1* fornece um mecanismo adicional para discriminar haplóides e diplóides, que foram classificados incorretamente com base na marcação das sementes pelo gene *R1-nj*. Contudo, alguns genótipos recessivos *pl1 pl1* também podem apresentar raízes roxas quando expostos à luz, atrapalhando a correta identificação dos haploides. Em conjunto com *PI1*, os genes *B1* e *R1-r* promovem a produção de antocianinas em coleóptilos das plântulas, margens e pontas de folhas e bainhas. As plantas homocigotas dominantes para *B1* e *PI1* desenvolvem uma pigmentação roxa escura nas palhas e no colmo (Coe, 1994).

Estudos genéticos revelaram que a TIH é controlada por alguns locos de efeito principal e locos de características quantitativas (QTLs) com efeitos menores e acumulativos (Barret et al., 2008; Prigge et al., 2012). Um estudo de QTLs envolvendo quatro populações, que tiveram a linhagem indutora UH400 como genitor comum, identificou oito QTLs relacionados com a TIH. Dentre estes, *qhir1* e *qhir8* foram os principais QTLs, localizados nos cromossomos 1 e 9, explicando 66% e 20% da variância genética, respectivamente (Prigge et al., 2012). A região *qhir1* no compartimento 1.04 desempenha papéis fundamentais para a indução de haploidia, na distorção da segregação gametofítica e no aborto embrionário (Barret et al., 2008; Prigge et al., 2012; Xu et al., 2013). Uma inserção de 4 pares de bases no último éxon do gene GRMZM2G471240, que codifica uma fosfolipase específica do pólen, é necessária para a formação de sementes com embriões haplóides em cruzamentos com indutores gimnogenéticos. Este gene recebeu nomes diferentes: *MATRILINEAL* (*MTL*) (Kelliher et al., 2017), *ZEA MAYS PHOSPHOLIPASE A1* (*ZmPLA1*) (Liu et al., 2017) e *NOT LIKE DAD* (*NLD*) (Gilles et al., 2017). Estudos revelaram que a mutação do gene *MTL/ZmPLA1/NLD* em *qhir1* é responsável por produzir uma TIH de até 6,7% (Gilles et al., 2017; Kelliher et al., 2017; Liu et al., 2017). O gene RMZM2G465053 (denominado *ZmDMP*), que codifica uma proteína de membrana do domínio DUF679, é o alelo causador subjacente de *qhir8* (Zhong et al., 2019) e promove o aumento 2 a 3 vezes na TIH. É importante notar que tanto *MTL/ZmPLA1/NLD* quanto *ZmDMP* atuam sinergicamente, indicando um potencial de aumento substancial de 5 a 6 vezes no TIH, quando ambas as mutações estão presentes (Zhong et al., 2019). No entanto, genótipo com apenas a mutação de *ZmDMP* apresenta uma TIH muito baixa, sendo aproximadamente igual a 0,15% (Zhong et al., 2019). O efeito sinérgico das mutações *mtl* e *zmdmp* sugere que as interações das funções genéticas após a polinização contribuem para uma elevada TIH em indutores modernos (Jacquier et al., 2020). Khammona et al. (2024) apresenta que apenas o *qhir1* isoladamente não é suficiente para produzir indutores com TIH adequada para exploração comercial de linhagens DHs, indicando que a TIH média dos indutores haplóides modernos deve ultrapassar 10%. Além disso, recentemente outros genes com efeito importante para a indução a haploidia foram descobertos, sendo estes: *DUF679* (Zhong et al., 2019); *ZmPLD3* (Li et al., 2021); *ZmPOD65* (Jiang et al., 2022). Mutações do gene *ZmPLD3* resultaram em uma taxa de indução haplóide (HIR) comparável à do gene *MTL* homocigoto recessivo. Esta mutação mostrou efeitos

sinérgicos em vez de redundância funcional na triplicação do HIR na presença do gene *MTL* homocigoto recessivo.

O trabalho de Chaikam et al. (2018) revelou que a extensão do efeito positivo de *qhir1* no TIH é influenciado tanto pelo não indutor quanto pelos genitores indutores. Entre os genitores não indutores tropicais, progênies *qhir1+* envolvendo a linhagem CML269 apresentaram maior média de taxa de indução, seguido por progênies *qhir1+* envolvendo a linhagem CML495. Estes autores também apresentam que, se houver disponibilidade de múltiplos indutores, sem diferenças significativas na taxa de indução, seria melhor escolher indutores com melhor desempenho agrônomico e adaptação ao ambiente alvo. Assim, o esforço inicial de tropicalização de indutores de haploidia abre caminho para o melhoramento de indutores com elevada adaptação à ambientes tropicais e taxas de indução, sendo úteis para o melhoramento e inserção de novas características.

As plantas que sofrem o processo de indução a haploidia apresentam diversas anomalias reprodutivas, como o abortamento de grãos, heterofertilização, plantas com embriões duplos, características que podem ser associadas com o processo de indução gimnogenético, sendo a taxa de abortamento do endosperma e do embrião maior em plantas que foram polinizadas com pólen de genótipos indutores, em relação às polinizadas por pólen comum (Tian et al., 2018). Assim como Xu et al. (2013) e Nair et al. (2017b), Chaikam et al. (2018) verificaram que o aborto do endosperma e o aborto do embrião ocorrem em alta frequência nas espigas dos genótipos indutores, em relação as espigas de genótipos não indutores. Dentre estes, o aborto embrionário apresentou diferenças significativas entre os indutores com níveis de TIH diferentes, indicando que a identificação de plantas/progênies com alto nível de aborto embrionário pode levar à identificação de indutores com alto TIH. Contudo, a frequência de aborto de endosperma não esteve associada à maiores taxas de indução, mas servindo para indicar genótipos que tem ou não a habilidade de produzir haploides. Estes autores ainda mostraram que o aborto do embrião está positivamente associado ao TIH mesmo em famílias *qhir1-*. Isto pode ser devido a outros locos, além do *qhir1*, que influenciam positivamente a TIH e causam o aborto. Assim, estes autores indicam o uso da característica aborto do endosperma como um dos critérios úteis, além da seleção assistida para *qhir1*, para eliminar a maioria das plantas, progênies ou linhagens que podem ter TIH muito baixo ou zero. Apesar das características aborto do embrião ou endosperma não serem desejadas pelos programas de melhoramento de milho, pois afetam negativamente a produtividade de sementes e dificultam a manutenção da linhagem, deve-se evitar alta pressão de seleção contra estas características para não levar à seleção de linhagens com baixo ou nenhum TIH.

As TIHs das gerações avançadas dos candidatos a indutores pode ser inicialmente realizada com base nas frequências de aborto do embrião, mas necessita ser confirmada por meio do cruzamento dos supostos candidatos a indutores com populações doadoras homocigóticas para alelos recessivos *liguleless 2 (lg2)* (Lashermes e Beckert, 1988; Röber et al., 2005; Prigge et al., 2012a), que condicionam a ausência de lígulas na folha; resistência a herbicidas (Melchinger et al., 2016) ou pela coloração verde da primeira bainha foliar das plântulas (Sekiya et al, 2020). No entanto, a realização de tais cruzamentos testes e a avaliação dos fenótipos recessivos consomem muito tempo e recursos (Prigge et al., 2012b), limitando o número de famílias que podem ser avaliadas para taxas de indução.

Plantas adultas haploides e diploides podem ser diferenciadas com base no vigor, em nível de estrutura ereta das folhas e na fertilidade masculina, características que fazem parte do chamado teste “padrão ouro” (Chaikam et al., 2016). Como a maioria dos indutores desenvolvidos até o momento são linhagens endogâmicas, alta heterose é geralmente observada na progênie diploide originada do cruzamento de uma linhagem indutora com uma população doadora segregante. A progênie diploide resultante tende a ser mais vigorosa do que a progênie haploide, tanto para altura da planta com altura da espiga (Wu et al., 2014). As plantas haploides têm folhas mais estreitas, mais curtas e mais eretas do que as plantas diplóides. As plantas haploides também têm estômatos e células guardas significativamente menores do que as plantas diploides cruzadas (Molenaar et al., 2020; Sekiya et al, 2020). A haploidização também está associada à esterilidade masculina e, portanto, a presença ou ausência de anteras extrusadas é outro indicador do nível de ploidia de uma planta. Embora as diferenças entre haploides e as plantas diploides tornam-se mais claras na fase adulta, é benéfico descartar as

plantas diploides o mais rápido possível, a fim de economizar tempo e recursos durante o tratamento e transplante de duplicação do genoma.

A maioria dos indutores atualmente utilizados são linhagens endogâmicas, que foram desenvolvidas por sucessivas gerações de autofecundação, associadas com a contínua seleção fenotípica para a capacidade de indução à haploidia, tamanho do pendão e a intensidade da expressão dos genes marcadores de antocianina. Apesar das características práticas e não destrutivas, a eficácia das expressões *R1-nj* pode ser limitada pela presença de inibidores dominantes da antocianina *C1-I* (Chaikam et al., 2015), antocianinas que ocorrem naturalmente no germoplasma do doador (Chaikam et al., 2016), propriedades morfofisiológicas do embrião (Prigge et al., 2011; Trentin et al., 2022) e ambientes (Sintanaparadee et al., 2022; Demail et al., 2023; Thawarorit et al., 2023). Esses fatores contribuem para altas taxas de erros de classificação, dificultando os ganhos de seleção para TIH e enfatizam a necessidade de marcadores alternativos para a seleção haplóide. O uso de marcadores moleculares para o desenvolvimento de indutores foi relatado apenas recentemente (Dong et al. 2014), apesar de seu baixo custo e potencial para o melhoramento genético da taxa de indução (Almeida et al. 2020). No entanto, a seleção fenotípica ainda pode ser a abordagem mais econômica para selecionar características qualitativas como as de marcadores associadas a expressão da cor roxa nas sementes, plântulas e plantas.

A seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) para *qhir1* foi aplicada para melhorar o TIH de indutores haplóides maternos em diferentes germoplasmas de milho. Chaikam et al. (2018) conseguiram obter linhas indutoras tropicalmente adaptadas de segunda geração (2GTAILS) promissoras com um TIH médio de 13,1%, uma melhoria de 48,9% em relação aos TAILS. Liu et al. (2022) desenvolveram um indutor haplóide (CHOI4) com elevado teor de óleo, um marcador fenotípico para auxiliar a seleção automatizada de haploides, com um TIH médio de 15,8%, um aumento de 58,0% em relação ao genitor que lhe deu origem (CAU2). Apesar destes dois exemplos de sucesso com o uso de SAM para *qhir1*, ganhos maiores poderão ser obtidos empregando a SAM conjuntamente para *qhir1* e *qhir8*, como sugerido por Khammona et al. (2024).

Por meio da implementação da SAM simultânea para *qhir1* (*MTL / ZmPLA1 / NLD*) e *qhir8* (*ZmDMP*), usando o teste de TaqMan® na geração F2, em quatro famílias de indutores tropicais x temperados derivados de BHI306, Khammona et al. (2024) obtiveram aumentos expressivos da TIH de cada família de indutores, sendo verificado que os genótipos portadores de *qhir1* e *qhir8* exibiram frequência de haploides cerca de 1 a 3 vezes maior do que aqueles portadores apenas de *qhir1*. O marcador para o gene *MTL* (GRMZM2G471240) foi desenvolvido na inserção de 4 pb (CGAG) no 4º éxon do gene que levou ao códon de parada prematuro (Gilles tal., 2017; Kelliher et al., 2017; Liu et al., 2017; Liu et al., 2017). O gene *ZmDMP* (GRMZM2G465053) foi desenvolvido na substituição de um único nucleotídeo de T para C em 131 pb na sequência de codificação que levou à mudança de aminoácidos de metionina para treonina (Zhong et al., 2019). O DNA genômico de alta qualidade (gDNA) foi isolado de folhas de milho aos 14 dias após a germinação usando o DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN, Alemanha). A genotipagem dos marcadores *qhir1* e *qhir8* foi realizada com ensaios TaqMan® prontos para encomenda (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA EUA) (Figura 1). No processo de amplificação, foram utilizados 20 ng de gDNA. Para a reação de PCR, o volume total foi de 5 µl composto por 2 µl de DNA molde, 1,5 µl de 2X TaqMan® Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA EUA), 0,0375 µl de ensaio TaqMan e 1,4625 µl de dH₂O. As condições de ciclagem da PCR foram ajustadas a 95°C por 5 min, seguidas de 36 ciclos a 94°C por 30 s, 60 °C por 1 min e 60°C por 2 min. Para o produto de PCR, os amplicons foram fundidos a 60 °C usando sistemas de PCR em tempo real QuantStudio 6 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA EUA) por 30 s para detectar polimorfismo de nucleotídeo único (SNP).

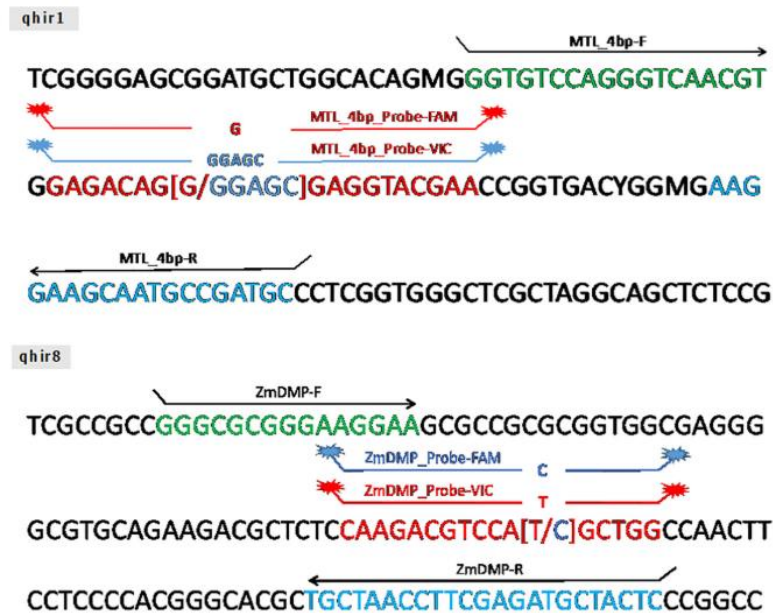


FIGURA 1. O esquema do desenho da sonda TaqMan® no gene *MATRILINEAL* (GRMZM2G471240) e no gene *ZmDMP* (GRMZM2G465053) (Fonte: Khammona et al, 2024).

Trentin et al. (2020) sugeriram uma abordagem de SAM estratificada com ênfase para o alelo *mtl* e *qhir1* na F2 em populações grandes e o alelo *zmdmp* ou *qhir8* na geração F3 para plantas portadoras do alelo *mtl* ou *qhir1*. Estes autores, verificaram que a SAM simultâneo para *qhir1* e *qhir8* em populações segregantes da geração F2 promoveu um aumento de 1 a 3 vezes na HIR dos genótipos F3. Eles também verificaram que o genótipo *qhir1*-/*qhir8*+ e o heterozigoto *qhir1*/*qhir8*+ apresentaram TIH menor que os genótipos com *qhir1*+. Zhong et al. (2019) observaram que os genótipos *qhir1*+/*qhir8*+ exibiram TIH de 5 a 6 vezes maiores em comparação com *qhir1*+/*qhir8*- e que a implementação do SAM nas primeiras gerações mostra-se benéfica, reduzindo significativamente o número de plantas F3 que necessitam de avaliação para o TIH real por meio da indução haplóide em populações testadoras recessivas. Chen et al. (2020) também relataram a eficácia do SAM simultâneo para *qhir1* e *qhir8*, resultando em um aumento substancial no TIH em 3 a 14% e na eliminação de aproximadamente 90% dos genótipos com baixo TIH. Chen et al. (2020) relataram que o TIH das plantas com *qhir8* variou apenas de 0,70% a 1,04%, o que foi significativamente menor do que aquelas que carregavam um alelo *qhir1* heterozigoto ou aquelas que carregavam um *qhir1* homozigoto, com TIHs de 3,77% a 5,27%. e 10,02% a 14,42%, respectivamente.

Quando se busca desenvolver novos indutores adaptados à ambientes tropicais, por meio do cruzamento de indutores temperados e populações doadoras, juntando marcadores morfológicos relacionados à cor de sementes e de raiz, é recomendado: a) o emprego de um conjunto de linhagens endogâmicas adaptadas, em vez de apenas uma, pois reduz a chance de desenvolver indutores com baixa pigmentação de *R1-nj*, devido os genes que dificultam a expressão de *R1-nj* ocorrem com maior frequência no germoplasma tropical (Chaikam et al., 2015); b) descartar as sementes homozigotos recessivos *r1-nj r1-nj* das espigas da geração F2, pois não apresentarão pigmentação de antocianina; c) selecionar as plantas F2 autofecundadas e homozigotas para *R1-nj*, pois não apresentarão espigas com grãos segregando para presença ou ausência pigmentação por antocianina; d) selecionar visualmente os indivíduos portadores do gene *PI1* na geração F2 e transplantá-los para campo ou vaso, pois vão apresentar raiz roxa mesmo sem a presença de luz, enquanto os homozigotos recessivos não apresentam raízes com pigmentação roxa; e) identificar a presença dos alelos *mtl* e *zmdmp* responsáveis por aumentam da taxa de indução, por meio de testes de progênie ou SAM, sendo esta última a forma mais fácil e rápida de fazer a identificação de indivíduos com estes alelos recessivos, permitindo aumentar a intensidade de seleção e economizar tempo e recursos envolvidos na fenotipagem para identificação de plantas ou famílias com taxa de indução potencialmente elevada (Prigge et al., 2012b; Dong et al., 2014). Trentin et al. (2020) compartilham suas experiências de que apenas de 12% a 15% das plantas F2 são fixadas para o alelo *mtl*, pois

ocorre forte seleção gamética e zigótica contra *mtl* (Prigge et al., 2012b; Xu et al., 2013) e a autofecundação de genótipos heterozigotos nestes locos não produzirão a frequência esperada de indivíduos homozigotos recessivos. Portanto, a fixação rápida do alelo *mtl* é desejável para simplificar o processo de seleção.

Dentre todos os indivíduos da geração F2, resultante de cruzamentos de indutores e genótipos comuns, cerca de 0,4% serão homozigóticos para *R1-nj*, *PI1*, *mtl* e *zmdmp* (Trentin et al., 2020). Estes pesquisadores apresentam que uma população extremamente grande de plantas F2 teria que ser semeada para se ter um número razoável de genótipos fixados nesses loci. Como o *mtl* é necessário para a indução haplóide e o *R1-nj* pode ser selecionado de forma barata, a SAM na geração F2 pode ser usado para garantir a fixação do alelo *mtl* e a eliminação de genótipos homozigotos para os alelos *pl1* ou *ZmDMP*, aumentando a chance de obtenção de genótipos F3 fixos para *R1-nj*, *PI1* e *zmdmp*. Na geração F3, a seleção fenotípica pode ser usada para fixar o alelo *R1-nj*, enquanto a seleção assistida por marcadores moleculares pode ser usada para fixar *PI1* e *zmdmp*.

Com base na experiência obtida pelo Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo para o desenvolvimento da segunda geração de linhagens indutoras adaptadas à ambientes tropicais e sub-tropicais (CIM2GTAILs), Chaikam et al. (2018) sugeriram o seguinte:

- a) escolha de indutores com melhor desempenho agrônômico para o local alvo e TIH maior ou igual a 6%;
- b) selecionar vários genitores não-indutores de grupos heteróticos distintos para fazer cruzamentos com a(s) linhagem(s) indutora(s), pois os genitores não-indutores podem ter um efeito pronunciado na TIH das progênies derivadas deste(s) cruzamento(s);
- c) os genitores não indutores devem apresentar elevado vigor da planta, pendões grandes, resistência às doenças chaves na agroecologia alvo e maior produtividade de grãos;
- d) indutores haplóides adaptados com elevada TIH e bom desempenho agrônômico podem ser desenvolvidos a partir das estratégias de melhoramento a partir da geração F2 ou BC1F1, resultante do retrocruzamento da geração F1 com o genitor não-indutor adaptado. Se o genitor indutor apresentar fraca adaptação ao ambiente alvo, recomendamos a utilização da estratégia BC1F1. Se o objetivo é identificar segregantes transgressivos para alta HIR, recomendamos a utilização da estratégia F2. Em qualquer destas estratégias, a seleção assistida por marcadores para *qhir1* pode ser implementado em uma geração inicial, como em plantas F2 ou plantas BC1F1, com seleção de espigas apenas de plantas *qhir1+*;
- e) a partir das plantas *qhir1+*, múltiplas famílias podem ser desenvolvidas enquanto se seleciona excelente expressão do marcador *R1-nj* e desempenho agrônômico. Na geração F3 ou BC1F2, uma amostra de igual número de famílias *qhir1+* (10 a 15 famílias) de cruzamentos envolvendo diferentes genitores não indutores pode ser testada com um testador carregando uma característica recessiva, como exemplo gene *liguleless*, para avaliar HIR. Cruzamentos envolvendo os pais não indutores que apresentaram maior média de HIR nas famílias *qhir1+* podem ser escolhidos para avanço, selecionando a expressão do marcador *R1-nj* e o desempenho agrônômico;
- f) Nas gerações F5 ou BC1F4, a maioria das famílias com fraco desempenho agronomicamente são eliminadas e as famílias selecionadas podem ser fixadas para expressão do marcador *R1-nj*. Assim, a seleção para TIH pode ser iniciada nessas gerações através do cruzamento de testes das famílias com testadores recessivos. Estes autores relatam que, menos de 20% das famílias *qhir1+* apresentaram TIH semelhante ou superior aos indutores parentais. Portanto, sugerem testar em pelo menos 50 famílias envolvendo um progenitor não indutor para identificar cerca de 10 famílias com TIH semelhante ou superior às linhas indutoras parentais;
- g) Como o TIH nas famílias segregadas pode diminuir ou aumentar com o aumento da endogamia, recomenda-se testar o TIH durante pelo menos três estações/ambientes para avaliar a estabilidade. Entre as 10 linhagens com maior TIH, podem-se selecionar algumas linhagens que combinam TIH suficientemente alto e desempenho agrônômico. Uma vez identificadas as linhagens indutoras finais, combinações híbridas podem ser formadas usando linhas de grupos heteróticos opostos, que podem ser avaliadas posteriormente juntamente com as linhagens indutoras parentais para avaliar seu vigor híbrido e TIH, em comparação com os respectivos genitores.

Uma vez obtidos e identificados os indivíduos haploides, o processo de duplicação cromossômica é necessário para restaurar a fertilidade dos indivíduos haploides, permitindo a

obtenção de sementes DH's. Este processo pode ocorrer de forma espontânea ou incrementado via utilização de métodos artificiais de duplicação cromossômica (Chaikam et al., 2012). A taxa de duplicação cromossômica espontânea na inflorescência masculina de milho varia de 2,8% a 46%, enquanto na inflorescência feminina varia de 25% a 94% (Chaikam et al., 2019). Para a exploração em escala comercial da duplicação cromossômica espontânea no milho é conveniente uma taxa mínima de 8% a 10%, para eliminar a necessidade de tratamento com colchicina ou outros agentes antimitóticos (Maqbool et al., 2020).

Na maioria dos casos, faz-se necessária a utilização da duplicação cromossômica artificial que é realizada por meio do tratamento dos haploides com substâncias antimitóticas. Diferentes fatores, como a base genética do germoplasma, a natureza e o tipo de agente antimitótico, concentração e duração do tratamento, podem afetar a eficiência da duplicação cromossômica artificial (Soriano et al., 2007).

A colchicina (C₂₂H₂₅N) é uma substância amplamente utilizada na produção de linhagens DHs em milho (Chaikam et al., 2012; Melchinguer et al., 2016). Ela atua na *β-tubulina*, e inibe a formação de dímeros de tubulina evitando assim a formação de microtúbulos. A falta de microtúbulos durante a mitose impede a separação dos cromossomos duplicados, resultando em células com o dobro de cromossomos (Chaikam et al., 2019).

No trabalho realizado por Melchinguer et al. (2016) foram propostos indicadores para sucesso na produção de linhagens e da duplicação cromossômica em haploides de milho, sendo estes: taxa de sobrevivência (número de plantas sobreviventes até o florescimento dividido pelo número de plântulas tratadas com agentes antimitóticos); taxa de reprodução (número de espigas D0 dividido pelo número de plantas sobreviventes até o florescimento) e taxa de sucesso geral (número de espigas D0 produzidas dividido pelo número de plântulas tratadas). Estes autores salientam que um dos elementos que dificultavam a comparação dos diferentes métodos de duplicação cromossômica é a falta de padronização nas medidas de sucesso da duplicação cromossômica e da produção de linhagens DH's.

Diferentes métodos são empregados na duplicação cromossômica utilizando soluções de colchicina com diferentes concentrações e tempo de exposição, dentre elas: imersão de sementes (Ren et al., 2018); imersão de plântulas recém germinadas (Gayen et al., 1994), injeção direta no tecido meristemático basal (Eder e Chalyk, 2002) e submersão de raízes (Chaikam et al., 2020), sendo este último método um dos mais empregados.

A metodologia de duplicação cromossômica apresentada por Chaikam et al. (2020) envolve a imersão de raízes nuas de plantas em estágio fenológico V2 em uma solução de colchicina. Neste método, as sementes haploides putativas (SHP) são semeadas em substrato a base de cinza vulcânica até atingirem o estágio V2. Posteriormente, as plantas são cuidadosamente retiradas do substrato e as raízes passam por um processo de lavagem em água corrente de torneira. Já com as raízes nuas, as plantas são agrupadas em conjuntos de 120 a 130 mudas e inseridas em recipientes com a capacidade volumétrica de 2 litros. Posteriormente, adiciona-se a solução de colchicina (0,07% a 0,1% de colchicina e 0,5% de dimetilsulfóxido (DMSO)) no recipiente até que a coroa da planta esteja coberta, 2 a 3 cm acima do nível da coroa das plântulas, que são mantidas na solução por 5 horas. Posteriormente, a solução de colchicina é descartada de maneira segura, as raízes das plantas são lavadas em abundância utilizando água corrente e são transplantadas diretamente em vasos ou a campo. O trabalho de Chaikam et al. (2020) revelou que este método foi mais eficiente na obtenção de DH's em relação ao método de imersão de plântulas, alcançando uma taxa de sucesso geral médio de 36%, aproximadamente.

Ainda que muito utilizada em diferentes protocolos de duplicação cromossômica, a colchicina é uma substância extremamente tóxica e cara, necessitando de muitos cuidados ao ser manuseada e descartada (Chaikam et al., 2012), sendo uma substância altamente cancerígena (Melchinguer et al., 2016). Diferentes alternativas ao uso da colchicina para a duplicação cromossômica em milho foram apresentadas na literatura e envolvem o emprego de: óxido nítrico (N₂O) (Kato et al., 2002); cafeína e paclitaxel (Arshad et al., 2023); herbicidas antimitóticos (Melchinguer et al., 2016) e estresses físicos, envolvendo temperatura, altas pressões, correntes elétricas (Häntzschel et al., 2010).

O uso do óxido nítrico (N₂O) na forma gasosa foi uma das primeiras alternativas avaliadas para a duplicação cromossômica de haploides em milho (Kato et al., 2002). Contudo, a aplicação de óxido nítrico na planta adulta não é viável em larga escala (Melchinguer et al., 2016).

A utilização de estresses físicos (temperatura, altas pressões, correntes elétricas) foram utilizados para bloquear a mitose nas raízes de milho, mas não obtiveram sucesso (Häntzschel et al., 2010).

Em estudos recentes, Arshad et al. (2023) revelam os efeitos potenciais da cafeína e paclitaxel no aumento da fertilidade de plântulas haploides de milho, mas sem evidências de seu real potencial na produção de linhagens DH's.

A literatura apresenta resultados promissores para o emprego de herbicidas antimicrotúbulos com a capacidade de duplicar cromossomos, dentre estes: a trifluralina (Kato, 1997), orizalina (Bartels & Hilton, 1973), pendimetalina (Zhou al., 2009), Amiprofós-metil (APM) (Wan et al., 1991) e o pronamide (Bartels & Hilton, 1973). Contudo, estes trabalhos não demonstram a capacidade destas substâncias em restaurar a fertilidade de indivíduos haploides, para a produção de linhagens em milho.

Posteriormente Melchinguer et al. (2016) estudou a eficiência de uma solução contendo APM (20 mg L⁻¹) e pronamide (4 mg L⁻¹), empregando o método de submersão de raízes por 8 horas. Como resultado foi observada uma taxa de sucesso geral (16,1%) que não difere em relação ao tratamento com colchicina (22,1%). Contudo, ainda que a solução herbicida apresente taxas de sucesso geral satisfatórias, a mortalidade resultante da alta concentração dos herbicidas foi um ponto negativo da utilização das diluições e tempo de exposição apresentados, resultando em uma taxa de sobrevivência de 46,5%. Estes resultados indicam a necessidade de estudos envolvendo a utilização destes herbicidas, para atingir um método mais ajustado e que se aproxime à eficácia da colchicina na duplicação cromossômica de haploides em milho.

Normalmente, as plântulas originadas das sementes haploides e que passaram pelo tratamento de duplicação cromossômica têm baixo vigor e são muito suscetíveis a estresses (Mahuku et al., 2012), pois o processo de duplicação cromossômica pode não ter ocorrido em todas as células da planta, sendo observado um elevado nível de quimerismo. A exposição aos tratamentos de duplicação cromossômica aumenta a mortalidade de plântulas, e os haploides, tratados com substância antimitóticas, precisam de um manejo cuidadoso para que possam completar seu ciclo (Chaikam et al., 2019). Desta forma, o cultivo de plântulas haploides tratadas para duplicação cromossômica deve ser realizado em condições ambientais ideais para o desenvolvimento da cultura do milho, com água suficiente para evitar o déficit hídrico. Além disto, todos os manejos relacionados a proteção de plantas, controle de plantas daninhas, insetos pragas e doenças, devem ser realizados cuidadosamente para minimizar a perda do estande de plantas haploides tratadas e obter um maior número de sementes por planta DH (Maqbool et al., 2020).

As plantas DHs na geração inicial (DH0) possuem a produção de pólen como fator limitante para a obtenção de sementes. Os pendões apresentam diferentes padrões de fertilidade de acordo com o sucesso na duplicação, tendo-se pendões estéreis, com apenas uma ramificação fértil ou normais. As plantas DH0 necessitam de acompanhamento diário e autofecundações repetidas para assegurar o sucesso na produção de sementes, que é atingido quando a planta produz pólen viável com uma espiga receptiva produzindo ao menos uma semente DH.

Com base no exposto anteriormente, para o avanço e sucesso do uso da tecnologia de DHs em ambientes tropicais é fundamental o melhoramento de genótipos indutores de haploidia adaptados à ambientes tropicais e que apresentem elevada THI e genes marcadores de sementes, raiz e plantas que auxiliem na correta identificação de indivíduos haploides. Acompanhado a melhoramento de indutores adaptados, é necessário elaborar e avaliar ferramentas auxiliares para o tratamento das plântulas de milho haploides com agentes antimitóticos alternativos à colchicina, visando aumentar a eficiência e a segurança do processo de duplicação cromossômica em milho, com maior segurança dos trabalhadores envolvidos. O ajuste dos tempos de exposição e concentrações de substâncias antimitóticas alternativas ao uso de colchicina, também serão fundamentais para aumentar a eficácia da obtenção de DHs.

3. Metodologia

3.1. Desenvolvimento de Indutores de haploidia tropicalizados

No ano de 2024, a empresa Tropical Melhoramento e Genética (TMG) solicitou junto ao Maize Genetics Cooperation Stock Center, a partir das informações contidas no Maize Genetics and Genomic DATABASE (MaizeGDB), United States Department of Agriculture (USDA), a licença de uso das seguintes linhagens indutoras de haploidia de milho de origem temperada:

a) linhagem M741B - originada da linhagem Stock 6 e possui os seguintes genes marcadores fenotípicos que auxiliam na identificação de haploides: *A1*, *A2*, *B1*, *C1*, *C2*, *PI1* e *R1-r*;

b) linhagem M741H - originada da linhagem Stock 6, com os seguintes genes marcadores: *A1*, *A2*, *B1*, *C1*, *C2*, *PI1* e *R1-nj*;

c) linhagem M741J - desenvolvida por Ming-Tang Chang, a partir do cruzamento de plantas de milho de endosperma amarelo, com folhas e colmo verdes, com a linhagem M741H Stock 6. As progênies obtidas deste cruzamento foram autofecundadas e passaram por 11 ciclos de seleção, visando o melhoramento da TIH e para características fenotípicas marcadoras expressas pelos genes *R1-nj*, *B1* e *PI1*, que auxiliam na identificação de haploides. Este indutor apresenta taxa de indução média de 6% a 8%; coleóptilo e raízes de plântulas roxas; cor roxa da planta; embrião e coroa da semente púrpuros; pendão roxo; palha da espiga roxas e estiloestigma vermelhos.

A TMG recebeu 20 sementes da linhagem M741J e, durante a 1ª safra 2024/25, foi realizado o primeiro esforço de multiplicação destas sementes, sendo obtida apenas 1 planta à campo na TMG-Rondonópolis e 10 plantas na TMG-Cambé, que serão colhidas até fim de março de 2025.

Entre março e abril de 2025, as sementes obtidas da linhagem M741J serão semeadas em um maior número de vasos possível. Os vasos serão alocados em uma casa de vegetação da TMG em Cambé, com a finalidade inicial de multiplicação das sementes e como fonte de pólen para a polinização de dez genótipos adaptados à ambiente tropical. Na fase inicial do desenvolvimento das plântulas será realizada a genotipagem das plantas das linhagens introduzidas, visando a confirmação da presença dos genes e QTLs associados à indução à haploidia e treinamento para uso dos marcadores na SAM.

Os dez genótipos tropicais serão constituídos por: a) oito linhagens de endosperma amarelo e pertencentes à diferentes grupos heteróticos do Programa de Melhoramento Genético de Milho da TMG, originadas de populações que sofreram elevada TIH e boa marcação de sementes; b) uma amostra de linhagens da população indutora PI4003 tropicalizada, mantida pelo Laboratório de Melhoramento Genético da UEL (LMG/UEL); c) a linhagem CML269, desenvolvida pelo CIMMYT e mantida pelo LMG/UEL, por ter se destacado com fonte para a obtenção de indutores tropicais e possuir endosperma branco. As oito linhagens da TMG/UEL e a CML269 não são indutoras e não possuem os genes marcadores para expressão de antocianina nas sementes ou raízes. As linhagens obtidas por autofecundação do indutor tropicalizado PI4003 possuem o gene *R1-nj* e TIH variando de 1% a 3%, mas não possuem os genes para marcação roxa da raiz.

A semeadura dos genótipos tropicais em vasos, em uma casa de vegetação da TMG em Cambé, será escalonada em 15, 10 e 5 dias antes da semeadura das linhagens de origem temperada. Este escalonamento visa promover a coincidência da floração com a linhagem indutora M741J, que fornecerá pólen para obtenção da geração F1 destes cruzamentos. Em cada dia de semeadura serão semeados 20 vasos por genótipo adaptado, empregando duas sementes por vaso, dando um total de 600 vasos contendo genótipos adaptados. Após a germinação será feito o raleio deixando uma planta por vaso, objetivando obter 20 plantas por período por genótipo adaptado. No florescimento deverão ser realizado o máximo de cruzamentos possível por combinação, visando obter de 10 a 15 espigas F1's bem marcadas por combinação, que serão colhidas e debulhadas em bulk.

Durante a safra em 2025/26, na Fazenda Escola da UEL (FAZESC), as sementes F1's de cada combinação deverão ser semeadas a campo, em blocos de 6 fileiras de 4m por combinação, empregando duas sementes por cova, procurando manter uma planta por cova, após o raleio. Na época do florescimento deverão ser realizadas cerca de 80 autofecundações

por combinação. Durante o desenvolvimento das plantas F1 e demais gerações será dada especial atenção para selecionar e autofecundar plantas superiores quanto ao acamamento e quebramento, vigor da planta, tamanho do pendão, resistência a doenças e sincronia na floração com germoplasma tropical. As espigas F2 de cada combinação serão colhidas separadamente, sendo selecionadas pelo menos 50 espigas melhores/combinação, descartando as sementes F2 de cada espiga que não apresentarem pigmentação roxa no endosperma e no embrião ou que estiverem mal marcadas.

Com base na marcação das sementes das espigas F2, sanidade de espigas, desempenho agrônomico dos F1's a campo e nos grupos heteróticos, serão selecionadas quatro combinações para continuarem o melhoramento visando a obtenção de novos indutores tropicalizados.

Na 2ª Safra 2026, entre fevereiro e março de 2026, na casa de vegetação da TMG serão semeadas 2400 sementes de cada uma das quatro combinações, empregando amostras formadas por cerca de 40 sementes/espiga F2, alocadas em 12 bandejas de 200 células contendo substrato. Após a germinação, serão eliminadas as plântulas que não apresentarem raízes roxas. Com isto, espera-se obter cerca de 1000 plântulas com raízes roxas de cada combinação, que passarão por genotipagem pelo Laboratório da TMG-Cambé, para identificar e selecionar cerca de 190 indivíduos homozigotos para o gene *mtl* e descartar os genótipos que não são portadores do alelo *zmdmp*. As plântulas F2 selecionadas serão transplantadas para vasos em estufas, visando a obtenção de espigas F3. Dentre estas 190 plantas F2 de cada combinação, espera-se obter cerca de 60 espigas F3 que não segregam para o gene *R1-nj* e serão selecionadas para seguir no melhoramento.

A amostragem dos tecidos vegetais para extração de DNA e procedimentos para obtenção das marcas moleculares serão segundo apresentado por Khammona et al. (2024) e os protocolos adotados pelo Laboratório da TMG-Cambé.

Na safra em 2026/27, na casa de vegetação do LMG/UEL serão semeadas seis bandejas de 200 células para cada combinação, empregando uma amostra de 20 sementes/progênes F3 selecionada, visando identificar cerca de 20 progênes/combinação sem plântulas segregando para o gene *Pl1*, ou seja, 100% das plântulas com raízes roxas. A partir destes resultados serão selecionadas as progênes F3 que serão semeadas na FAZESC, nesta mesma safra. Cada progênie será semeada em duas fileiras de fileiras de 4,00m, sendo autofecundadas apenas as plantas com melhor desempenho agrônomico e características desejáveis para um genótipo indutor, procurando se obter cerca de 10 espigas F4/progênie. As espigas F4 obtidas serão selecionadas quanto à marcação das sementes pelo gene *R1-nj*, produtividade e sanidade de grãos, levando em consideração o acamamento e quebramento, vigor da planta, tamanho do pendão, resistência a doenças foliares e sincronia na floração com germoplasma tropical.

Antes do início da 2ª safra 2027, amostras das 10 sementes de cada uma das espigas individualizadas das progênes F4 selecionadas de cada combinação serão semeadas em bandejas plásticas em casa de vegetação na TMG-Cambé, para extração de DNA e fazer a SAM visando a identificação de progênes homozigotos para os genes *mtl* e *zmdmp*.

Ainda na 2ª safra 2027, as progênes selecionadas na SAM serão conduzidas para avanço de gerações por meio da autofecundação à campo na TMG-Sorriso e na FAZESC, em duas fileiras de 4m, visando obter a geração F5 com quantidade de sementes para avaliação experimentos de desempenho agrônomico *per se* e cruzamentos testes para determinar a TIH.

Na safra de 2027/28, na TMG Sorriso e LMG/UEL e FAZESC/UEL, as linhagens F5 serão avaliadas em experimentos *per se*, em blocos completamente casualizados com 3 repetições. As parcelas serão constituídas por fileiras duplas de 4 m, no espaçamento 0,80 x 0,20 m. Neste mesmo período e locais será realizado o avanço da geração F5 para F6 em fileiras duplas de 4 m, para posterior seleção das melhores linhagens F6 com base nos experimentos de F5.

Durante o avanço das gerações de autofecundação serão contabilizadas e categorizadas as espigas de cada progênie quanto: a) grãos normais com formação adequada de endosperma e embrião; b) presença de grãos abortados pelo endosperma; c) grãos abortados pelo embrião. Será contado o número de grãos normais em cada espiga; a contagem incluirá até mesmo sementes infectadas por podridões de espigas ou gorgulhos com embrião e endosperma adequados.

Durante a condução dos experimentos de campo serão avaliadas as seguintes características agrônomicas: a) dias para o florescimento feminino; b) dias para o início da

emissão de pólen dos pendões; c) dias para o término da emissão de pólen dos pendões; d) tamanho da haste principal do pendão (THP, em cm); e) tamanho do pendão (TP, nota 1 - representa pendão muito grande com muitos ramos e nota 5 - pendão muito pequenas com poucos ramos); f) número de ramificações do pendão (NRP); g) altura da planta (AP, em cm); h) altura da espiga (AE, em cm); i) estande de plantas (ST); j) número de plantas acamadas (AC); k) número de plantas quebradas (QUE); l) produtividade de grãos corrigidos para estande (PGC, em t ha⁻¹) e 13,5% de umidade; m) avaliar resistência à doenças utilizadas e escala de severidade proposta pelo Guia de Sanidade Agroceres.

Concomitantemente, na safra em 2027/28 e na FAZESC/UDEL, as progênies F5 serão cruzadas com genótipos de milho superdoce, que apresentam primeira bainha foliar verde, visando avaliar TIH das progênies, precocemente na fase de sementes e de plântulas em bandejas. Para isto, serão semeados blocos do genótipo de milho superdoce 5 e 10 dias antes das progênies candidatas a indutores, respectivamente. Cada progênie F5 candidata a indutora fornecerão pólen para cinco plantas, visando obter pelo menos 200 sementes por cruzamento teste.

A TIH será estimada como base na frequência de haploides sementes por cruzamento de indução, conforme segue: $TIH (\%) = 100(\text{número de sementes haploides putativas/conjunto de sementes com marcação pelo gene } R1-\eta)$. Cerca de 10 supostas sementes haploides por genótipo em cada família de indutores serão amostradas para posterior confirmação haploide verdadeira por meio da coloração das raízes e da primeira bainha foliar. Somente, as progênies com as melhores TIH serão utilizadas para avanço de gerações.

Nas gerações futuras, as linhagens candidatas deverão ser avaliadas quanto a TIH em cruzamentos com diferentes populações doadoras e pelos seus respectivos desempenhos, *per se* e em cruzamentos híbridos, em diferentes ambientes.

As análises de variâncias individuais serão realizadas com base nos totais de tratamentos segundo o modelo de blocos casualizados a seguir: $Y_{ij} = m + B_j + G_i + e_{ij}$, onde: m = média geral do experimento; B_j = efeito aleatório do j -ésimo bloco ($j = 1, 2, \dots, J$); G_i = efeito fixo do i -ésimo genótipo ($i = 1, 2, \dots, I$); e_{ij} = erro aleatório da observação do i -ésimo genótipo no j -ésimo bloco. Após constatada a existência de homogeneidade das variâncias dos erros entre os diferentes experimentos, por meio do teste de F, as análises de variâncias conjuntas dos experimentos serão realizadas com base nos totais de tratamentos segundo o modelo a seguir: $Y_{ijk} = m + G_i + A_k + (GA)_{ik} + (B/A)_{jk} + e_{ijk}$, onde: m = média geral dos experimentos; G_i = efeito fixo do i -ésimo genótipo ($i = 1, 2, \dots, I$); A_k = efeito aleatória do k -ésimo ambiente ($k = 1, 2, \dots, K$); $(GA)_{ik}$ = efeito aleatório da interação do i -ésimo genótipo com o k -ésimo ambiente; $(B/A)_{jk}$ = efeito aleatório do j -ésimo bloco dentro do k -ésimo ambiente; e_{ijk} = erro aleatório da observação do i -ésimo genótipo no j -ésimo bloco.

As médias dos genótipos dentro de cada época de semeadura serão agrupadas pelo teste de Scott & Knott, em nível de 5% de probabilidade.

3.2. Otimização de métodos alternativos de duplicação cromossômica

Neste estudo será utilizado como indutor de haploidia materna o híbrido resultante do cruzamento das linhagens CIM2GTAIL-P1 x CIM2GTAIL-P2, desenvolvidas pelo CIMMYT. Como populações doadoras serão utilizadas oito populações de milho branco (PB01, PB10, PB15, PB20, PB25, PB30, PB35, PB40), desenvolvidos pelo Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná (IDR-PR), e oito populações de milho superdoce (PD2004, PD2005, PD2006, SD3001, SD3002, SD3003, SD3005 e SD3006), desenvolvidos pelo Programa de Melhoramento Genético do LMG/UDEL.

Durante a safra 2023/2024, as 16 populações doadoras foram polinizadas pelo genótipo indutor, por meio de polinizações manuais na FAZESC, com o objetivo de obter cerca de 60 espigas induzidas/população e produzir sementes haploides putativas (SHP) em quantidades suficientes para os estudos pretendidos. Cada população doadora foi semeada em blocos de 4 fileiras de 16 m de comprimento, no espaçamento de 0,80 x 0,20 m. O indutor foi semeado em dois blocos de 17 fileiras de 10 m de comprimento, no mesmo espaçamento citado anteriormente. Estes dois blocos do indutor foram semeados, respectivamente, 5 e 10 dias após a semeadura

das populações doadoras, visando sincronizar o florescimento. A condução agrônômica deste campo de polinização foi realizada seguindo as recomendações técnicas para a cultura do milho.

As sementes obtidas pelos cruzamento de indução serão classificadas de acordo com a marcação conferida pelo gene *R1-nj*, pela presença ou ausência da marcação de antocianina nas sementes, em três categorias: a) diploides (sementes com a pigmentação púrpura no endosperma e no embrião); b) haploides putativos (sementes com pigmentação púrpura somente no endosperma, mantendo o embrião sem antocianina); c) diploides resultantes de contaminação ou da inibição da expressão do gene *R1-nj* (sementes sem qualquer marcação).

As TIH do indutor em cada população serão estimadas como descrito anteriormente.

3.2.1. Avaliação do método de imersão de raízes empregando diferentes tempos de exposição às concentrações específicas de agentes antimutagênicos em amostras de 16 populações de milho

Amostras de 400 SHP's obtidas de cada uma das 16 populações doadoras serão embebidas em água de torneira, separadamente, por seis horas para homogeneizar a germinação. Posteriormente, será realizada a semeadura das SHP's para germinação em duas bandejas plásticas de 200 células contendo substrato turfa Sphagnum, em casa de vegetação do LMG/UEL.

Entre 9 e 10 dias após a semeadura, as plântulas no estágio V2 terão suas raízes lavadas em água para remoção completa do substrato das raízes, para depois serem depositadas em bandejas plásticas contendo duas folhas de papel germitest umedecido com água filtrada, uma folha no fundo da bandeja e outra sobre as plântulas lavadas de cada população doadora individualizada, visando reduzir o estresse.

De cada uma das 16 populações doadoras serão amostradas oito plântulas haploides, para a formação de maços de 100 plântulas, que serão agrupadas e alinhadas no nível da semente e presos por uma fita de papel alumínio e elástico. Serão preparados 24 maços de amostras de plântulas para receberem 24 tratamentos, resultantes da combinação de quatro tipos de soluções e diferentes tempos de exposição (Tabela 1).

Cada maço de 100 plântulas será acondicionado em um becker de 1 litro, para receber a solução específica e permanecer no escuro e em temperatura de 17 °C dentro da BOD, pelo período determinado para cada tratamento. As seguintes soluções serão utilizadas na imersão das raízes (IR) para a duplicação cromossômica: a) IR-COL = solução contendo 0,07% de colchicina e 0,5% de DMSO; b) IR-PRO = solução de 10 mg L⁻¹ de pronamide, 0,1% de Tween-20 e 0,1% de DMSO; c) IR-APM+PRO = solução de 4,56 mg L⁻¹ de APM, 3 mg L⁻¹ de pronamide, 0,1% de Tween-20 e 0,5% de DMSO; d) IR-CN = controle negativo com apenas água. Em cada becker será adicionada solução suficiente para atingir o nível de 2 a 3 cm acima da região da coroa das plântulas. Os tratamentos seguirão a estrutura básica do método proposto por Chaikam et al. (2020), que envolve a imersão de raízes em solução de colchicina, mas com as devidas modificações. Assim, o IR-COL será utilizado como tratamento controle positivo para efeito de comparação com os demais tratamentos antimutagênicos alternativos e a água como controle negativo, buscando identificar as taxas de duplicação espontânea.

Tabela 1. Tratamentos de duplicação cromossômica (T01 a T24) por imersão de raízes (IR) constituídos pela combinação de quatro soluções (COL=colchicina; PRO = pronamide; APM+PRO = Amiprofós-metil e pronamide; CN = controle negativo utilizando apenas água) e diferentes tempos de exposição.

Soluções para duplicação	Tempos de exposição (horas)								
	5	6	7	8	9	10	12	14	16
IR-COL	T01	T02	T03	T04	T05	T06	T07	---	---
IR-PRO	T08	T09	T10	T11	T12	T13	T14	---	---
IR-APM+PRO	T15	T16	T17	T18	T19	T20	T21	T22	T23
IR-CN	---	---	---	---	---	---	T24	---	---

Após cada tempo de exposição aos tratamentos, os maços de plântulas serão retirados dos beakers e as raízes serão lavadas abundantemente por 30 minutos em água corrente, a fim de eliminar resíduos das soluções. A seguir, as plântulas de cada maço serão divididas em quatro amostras e transplantadas seguindo o delineamento em blocos completamente casualizados, com quatro repetições, constituídas por parcelas de 24 plântulas em oito vasos, sendo inicialmente alocados três plântulas por vaso. Serão utilizados vasos de 12 L, contendo a mistura de terra, areia e adubo orgânico nas proporções de 3:1:1, respectivamente. Na quarta semana após o transplante será feito o desbaste e o *roguing* para eliminação dos possíveis diplóides, deixando no máximo duas plantas/vaso até a fase final do experimento.

O manejo do experimento envolverá o uso de irrigação por gotejamento e fertirrigação, com a finalidade de reduzir estresses e oferecer as melhores condições para o desenvolvimento das plantas DHs.

Todo resíduo das soluções utilizadas como tratamentos de duplicação cromossômica, serão coletados separadamente e acondicionados em galões plásticos para realização do descarte adequado, por empresa especializada.

Este experimento será avaliado quanto aos números de: a) sementes haploides putativas empregadas; b) sementes germinadas; c) plântulas submetidas a tratamento; d) plântulas transplantadas; e) plântulas sobreviventes na 1ª, 2ª, 3ª e 4ª semanas após o transplante; f) plantas D0 sobreviventes até a fase de polinização; g) plantas macho estéreis; h) plantas D0 polinizadas; i) D0 que produziram sementes D1.

A partir destes dados serão estimadas as seguintes taxas de: a) sobrevivência na 1ª, 2ª, 3ª e 4ª semanas (TS1ªS, TS2ªS, TS3ªS e TS4ªS) = número de plantas sobreviventes após o transplante/número de plantas submetidas ao tratamento e transplantadas; b) sobrevivência (TS) = número de plantas sobreviventes até a polinização/(número de plantas submetidas ao tratamento e transplantadas plantas - número de plantas eliminadas no raleio e *roguing*); c) autofecundação (TA) = plantas autofecundadas/plantas sobreviventes até a polinização; d) eficiência de autofecundação (EA) = número de plantas D0 que produziram semente/número de plantas autofecundadas; e) macho estéril (ME) = plantas com pendão estéril/plantas sobreviventes até a autofecundação; f) reprodução (TR) = número de plantas D0 que produziram sementes/número de plantas D0 sobreviventes até a polinização; g) sucesso geral (TSG) = número de plantas D0 que produziram sementes/(número de plantas submetidas ao tratamento e transplantadas plantas - número de plantas eliminadas no raleio e *roguing*).

Em todos os experimentos, as taxas de germinação de sementes, desbaste de plantas nos vasos, plantas falso haploides e sobrevivência de plântulas antes do tratamento de duplicação cromossômica não entrarão no cálculo das taxas de sucesso da duplicação cromossômica, uma vez que essas perdas não são resultantes da utilização do tratamento de duplicação dos haploides. As plantas que apresentaram espigas segregantes também não serão utilizadas na estimação das taxas, sendo consideradas falso haploides.

Para análise da quantidade de sementes oriundas de plantas férteis D0, as espigas D1 obtidas serão categorizadas em espigas com: a) menos de cinco sementes; b) cinco a 25 sementes; c) 26 a 50 sementes; d) 51 a 100 sementes; e) mais de 100 sementes. A proporção de espigas D1 em cada tratamento será obtida pela divisão do número de espigas nessa categoria pelo número total de espigas.

A análise de variância das taxas relacionadas ao sucesso da duplicação cromossômica e obtenção de DH's será realizada empregando o seguinte modelo: $Y_{ij} = m + B_j + T_i + e_{ijk}$, onde: m = média geral do experimento; B_j = efeito aleatório do j -ésimo bloco ($j = 1, 2, \dots, J$); T_i = efeito fixo do i -ésimo tratamento de duplicação cromossômica ($i = 1, 2, \dots, I$); e_{ijk} = erro aleatório.

Uma vez verificado efeito significativo de tratamentos, será realizado o desdobramento da análise de tratamentos dentro de cada solução de duplicação, para proceder a análise de regressão dentro de cada solução de duplicação cromossômica, visando obter as equações e curvas relativas aos tratamentos e tempos de exposição (Tabela 2).

Tabela 2. Esquema da análise de variância e de regressões relativas aos tempos (T) de exposição de raízes imersas (IR) em diferentes soluções (COL=colchicina; PRO = pronamide; APM+PRO = Amiprofós-metil e pronamide).

FV	GL	SQ	QM	F
Bloco	3	SQ _B	QM _B	QM _B /QM _e
Tratamento	23	SQ _{Trat}	QM _{Trat}	QM _{Trat} /QM _e
Soluções	3	SQ _S	QM _S	QM _S /QM _e
Tempos/IR-COL	6	SQ _{T/COL}	QM _{T/COL}	QM _{T/COL} /QM _e
Regressão linear	1	SQ _{Reg.Linear 1}	QM _{Reg.Linear 1}	QM _{Reg.Linear 1} /QM _e
Regressão quadrática	1	SQ _{Reg.Quadr 1}	QM _{Reg.Quadr 1}	QM _{Reg.Quadr 1} /QM _e
Regressão cúbica	1	SQ _{Reg.Cúbica 1}	QM _{Reg.Cúbica 1}	QM _{Reg.Cúbica 1} /QM _e
Desvios de regressão	3	SQ _{Desvio.Reg 1}	QM _{Desvio.Reg 1}	QM _{Desvio.Reg 1} /QM _e
Tempos/IR-PRO	6	SQ _{T/PRO}	QM _{T/PRO}	QM _{T/PRO} /QM _e
Regressão linear	1	SQ _{Reg.Linear 2}	QM _{Reg.Linear 2}	QM _{Reg.Linear 2} /QM _e
Regressão quadrática	1	SQ _{Reg.Quadr 2}	QM _{Reg.Quadr 2}	QM _{Reg.Quadr 2} /QM _e
Regressão cúbica	1	SQ _{Reg.Cúbica 2}	QM _{Reg.Cúbica 2}	QM _{Reg.Cúbica 2} /QM _e
Desvios de regressão	3	SQ _{Desvio.Reg 2}	QM _{Desvio.Reg 2}	QM _{Desvio.Reg 2} /QM _e
Tempos/IR-APM+PRO	8	SQ _{T/APM+PRO}	QM _{T/APM+PRO}	QM _{T/APM+PRO} /QM _e
Regressão linear	1	SQ _{Reg.Linear 3}	QM _{Reg.Linear 3}	QM _{Reg.Linear 3} /QM _e
Regressão quadrática	1	SQ _{Reg.Quadr 3}	QM _{Reg.Quadr 3}	QM _{Reg.Quadr 3} /QM _e
Regressão cúbica	1	SQ _{Reg.Cúbica 3}	QM _{Reg.Cúbica 3}	QM _{Reg.Cúbica 3} /QM _e
Desvios de regressão	5	SQ _{Desvio.Reg 3}	QM _{Desvio.Reg 3}	QM _{Desvio.Reg 3} /QM _e
Erro	69	SQ _e	QM _e	

As médias dos tratamentos de duplicação cromossômica serão agrupadas pelo método de Scott e Knott a 5% de probabilidade.

Com base nos resultados obtidos será determinado o tempo ideal de exposição à cada tipo de solução antimitótica.

3.2.2. Confirmação do tempo ideal de exposição (TIE) à cada tipo solução antimitótica em amostras de oito populações de milho superdoce em casa de vegetação e a campo

Com base nos resultados obtidos no experimento anterior será identificado um tempo de exposição (TE) mais promissores para cada tipo de solução antimitótica. Assim, para confirmação do tempo ideal de exposição para cada solução serão empregados o TE; TE menos uma hora; TE mais uma hora (Tabela 3).

Tabela 3. Tratamentos de duplicação cromossômica (T01 a T10) por imersão de raízes (IR) constituídos pela combinação de diferentes soluções (COL=colchicina; PRO = pronamide; APM+PRO = Amiprofós-metil e pronamide) e três tempos de exposição (TE) e o controle negativo (CN).

Soluções para duplicação	Tempos de exposição (horas)		
	TE -1h	TE	TE +1h
IR-COL	T01	T02	T03
IR-PRO	T04	T05	T06
IR-APM+PRO	T07	T08	T09
IR-CN	T10 (igual ao maior TE empregado)		

Amostras de 600 SHP's obtidas de cada uma das oito populações doadoras de milho superdoce serão embebidas em água de torneira, separadamente, por seis horas para homogeneizar a germinação. Posteriormente, será realizada a semeadura das SHP's para germinação em três bandejas plásticas de 200 células contendo substrato turfa Sphagnum, em casa de vegetação LMG/UEL.

Entre 9 e 10 dias após a semeadura, as plântulas no estágio V2 terão suas raízes lavadas em água para remoção completa do substrato das raízes, para depois serem depositadas em

bandejas plásticas contendo duas folhas de papel germitest umedecido com água filtrada, uma folha no fundo da bandeja e outra sobre as plântulas lavadas de cada população doadora individualizada, visando reduzir o estresse.

De cada uma das oito populações doadoras serão amostradas 32 plântulas haploides/população/tratamento, que serão divididas em dois para formação de dois maços de 128 plântulas, que serão agrupadas e alinhadas no nível da semente e presos por uma fita de papel alumínio e elástico. Serão preparados 20 maços de amostras de plântulas para receberem 10 tratamentos, dois maços para cada tratamento, resultantes da combinação de quatro tipos de soluções e três tempos de exposição (Tabela 3).

No processo de tratamento dos maços serão adotadas as mesmas concentrações de soluções e procedimentos citados no experimento anterior, sendo efetivado o transplântio para o local definitivo de desenvolvimento, logo após a lavagem das raízes por 30 minutos em água corrente, para remoção dos resíduos dos tratamentos.

Nesta fase do projeto, os tratamentos serão realizados em um experimento em casa de vegetação do LMG/UEL e outro em condições de campo na FAZESC, empregando em cada experimento o delineamento em blocos completos casualizados, com 5 repetições.

No experimento a ser instalado em casa de vegetação será empregado parcelas de 40 plântulas em 20 vasos, sendo inicialmente alocados de duas a três plântulas por vaso, visando atingir o estande final desejado de duas plantas por vaso. Serão utilizados vasos de 12 L contendo a mistura de terra, areia e adubo orgânico nas proporções de 3:1:1, respectivamente. Após na quarta semana do transplântio será feito o desbaste e o *roguing* para eliminação dos possíveis diplóides, deixando no máximo duas plantas/vaso até a fase final do experimento.

No experimento de campo as parcelas serão constituídas de 40 plântulas transplantadas de cada tratamento, alocadas em fileiras de 8,00 m de comprimento, no espaçamento de 0,80x0,20m.

Em ambos os experimentos serão adotadas as práticas agronômicas recomendadas para a cultura do milho e irrigação para redução do estresse.

As mesmas avaliações de contagens e estimativas de taxa de sucesso adotadas no experimento anterior serão empregadas nestes experimentos, sendo a análise de variância em blocos completamente casualizados e seu modelo matemático apresentado anteriormente, sendo realizado a seguir o teste de agrupamento de médias de Scott & Knott.

Dependendo dos resultados obtidos neste experimento, poderão ser conduzidos experimentos nas casas de vegetação da TMG-Cambé ou de Rondonópolis, para a validação do(s) melhor(es) agente(s) antimitótico(s) e sua(s) respectiva(s) concentrações e tempo(s) ideal(is) de exposição para duplicação cromossômica de haplóides, obtidos de diferentes populações doadoras de milho comum da TMG (Tabela 4).

Tabela 4. Tratamentos de duplicação cromossômica (T01 a T03) por imersão de raízes (IR) empregando as soluções de pronamida (PRO) e Amiprofós-metil e pronamida (APM+PRO) no tempo de exposição considerado ideal (TEI) e o controle negativo (CN).

Soluções para duplicação	TEI
IR-PRO	T01
IR-APM+PRO	T02
IR-CN	T03

3.2.3. Elaborar e avaliar ferramentas auxiliares para duplicação cromossômica

Nos métodos de duplicação cromossômica são utilizadas substâncias antimitóticas com elevada toxicidade (Colchicina, Amiprofós-metil e Pronamida), que necessitam de cuidados especiais para a sua manipulação, manuseio e descarte. Além disto, em um único dia são tratados milhares de indivíduos haploides com soluções antimitóticas, o que exige o desenvolvimento de processos e ferramentas para agilizar os trabalhos de duplicação cromossômica e manter segurança no trabalho.

No método de duplicação por imersão de raízes utilizado atualmente, as plântulas obtidas das SHP têm as suas raízes lavadas para remoção completa do substrato. A seguir, estas

plântulas com as raízes nuas são alinhadas verticalmente em uma bancada sobre uma fita de papel alumínio e enroladas cuidadosamente, para formação de maços contendo 100 a 120 plântulas, que são presos por um elástico e etiqueta de identificação da população doadora. Os maços formados são acondicionados em recipientes contendo solução antimutagênica. Após o tratamento, os maços de plântulas passaram por uma lavagem das raízes em água corrente de torneira durante 30 minutos, para remover resíduos da solução, sendo em seguida transplantadas no ambiente definitivo de desenvolvimento.

Este método de duplicação cromossômica, apesar de ser eficiente para obtenção de DHs, apresenta as seguintes necessidades de aprimoramento:

- a) O processo de formação dos maços com fitas de papel alumínio é lento e trabalhoso, demandando muito treino e padronização da equipe, além de requerer o preparo de uma série de fitas de papel alumínio, que depois necessitarão de descarte adequado. Neste sentido, é importante desenvolver suportes portáteis permanentes e inertes, que consigam padronizar o alinhamento das plântulas no nível da região da coroa e agilizar o processo de manutenção das plântulas agrupadas e alinhadas, com menor risco de mistura de genótipos.
- b) O manuseio dos maços de plântulas em rolos de papel alumínio é feito pelo contato manual da pessoa que está fazendo o tratamento. O desenvolvimento de suportes permanentes contendo alças permite o manuseio sem o contato direto com as plântulas antes e depois do tratamento. Isto reduz os riscos de quebrar plântulas e o da contaminação por contato manual de quem está realizando o tratamento.
- c) O recipiente contendo a solução antimutagênica é vertido manualmente e galões de descarte. O desenvolvimento de recipientes com sistema de ejeção mecânica da solução é ponto importante para evitar possível contaminação do operador.
- d) A colocação dos maços de plântulas em recipientes com água corrente e sua respectiva lavagem é acompanhada pelo manuseio do operador, que precisa trocar água das bandejas e movimentar os maços no recipiente, o que pode aumentar os riscos no trabalho. O desenvolvimento de recipientes que sejam capazes de ajustar os suportes permanentes de tratamentos das plântulas, recebam diretamente a solução para tratamento de duplicação cromossômica, tenham mecanismo para esgotar a solução para tanques de descarte, contenham um sistema de entrada e saída de água que permitam um fluxo de água corrente, tudo isto sem precisar movimentar estes suportes contendo as plântulas tratadas, representa um importante avanço para acelerar o trabalho, reduzir riscos operacionais e a necessidade de mão-de-obra.

As ferramentas e protótipos desenvolvidos para aprimorar deste método de duplicação cromossômica serão testados no LMG/UEL, TMG de Cambé e de Rondonópolis, durante a obtenção de DHs em diferentes populações de milho. Durante o processo de obtenção dos DHs em casa de vegetação, serão adotados conjuntamente o processo tradicional e a inovação (ferramentas e protótipos) em um mesmo conjunto de populações doadoras, sendo avaliadas as taxas de sucesso de duplicação, economia de tempo, pessoal, recursos e aumento da segurança no trabalho.

À medida que as ferramentas facilitadoras forem desenvolvidas e apresentarem bons resultados, elas serão utilizadas em substituição ao processo tradicional que emprega maços de plantas, enrolados e presos por papel alumínio.

4. Metas a serem alcançadas

As metas estabelecidas para este projeto são:

- a) multiplicação das sementes dos indutores temperados introduzidos;
- b) obtenção da geração F1 do cruzamento do indutor M741J e 10 genótipos adaptados;
- c) obtenção espigas F2 separadas por combinação, com boa produção de sementes e marcação pelo gene *R1-nj* geração F2, por meio da autofecundação da geração F1 à campo;
- d) com base na THI do F1, nível de marcação pelo *R1-nj* em espigas F1 e F2 e desempenho agrônomo de F2, selecionar quatro combinações de genótipos adaptados cruzados com o indutor induzido, para seguir o melhoramento do indutor;

- e) selecionar e Individualizar as espigas F2 bem-marcadas de cada combinação e eliminar sementes sem marcação;
- f) semear amostras de sementes F2 de cada uma das quatro combinações, separadamente, para identificar cerca de 180 plântulas de raiz roxa, homozigóticas para marcadores *mtl* e portadoras de *zmdmp/combinção*, que serão transplantadas em para vasos e autofecundadas para obter a geração F3;
- g) semear amostras das progênes F3 em bandejas para identificar cerca de 10 a 20 progênes/combinção, cujas plântulas não segregarem para o gene *PI1*. As progênes selecionadas serão semeadas a campo para avanço de geração, por meio da autofecundação, visando obter pelo menos 10 espigas F4/progênie para selecionar quanto a produtividade e marcação pelo *R1-nj*;
- h) semear em bandejas amostras de 10 sementes de cada uma das progênes F4 selecionadas, para extração de DNA para SAM, quando serão genotipadas cerca de 200 linhagens/combinção, visando selecionar as espigas das progênes com sementes homozigóticas para os marcadores *mtl*, *zmdmp*.
- i) as linhagens selecionadas por SAM seguirão para o avanço e obtenção da geração F5.
- j) selecionar as linhagens da geração F5 obtidas e realizar o avanço para a geração F6. Concomitantemente, será realizado cruzamentos teste destas linhagens F5 com população de doadora de milho superdoce com primeira bainha foliar verde e experimentos para avaliação do desempenho *per se* das linhagens;
- k) selecionar cerca de 5 a 10 linhagens que tenham THI acima de 8%, plântulas com raiz roxa, para futuros estudos envolvendo combinações híbridas, desempenho agrônômico *per se* e THI com diferentes populações doadoras da TMG;
- l) identificar intervalos de tempos ideais de exposição à diferentes agentes antimetabólicos, empregando o método de imersão de raízes para duplicação cromossômica, em amostras de 16 populações de milho (superdoce e branco), por meio de um experimento em casa de vegetação;
- m) a partir a identificação dos intervalos de tempo ideal de exposição, estabelecer um experimento à campo e outro em casa de vegetação para confirmação do melhor tempo de exposição para melhor balanço entre taxas de sobrevivência, de reprodução e sucesso geral na produção de DHs, que sejam mais eficientes para obtenção de linhagens DHs e competitivos em relação ao uso de colchicina.
- n) elaborar e avaliar ferramentas auxiliares para duplicação cromossômica;
- o) contribuir na formação de estudantes de graduação e pós-graduação para atuarem em pesquisas envolvendo melhoramento de plantas e estudos de genética em milho;
- p) divulgar os resultados obtidos em eventos, tais como congressos, simpósios, meios eletrônicos e revistas científicas.

5. Indicadores de acompanhamento

Como indicadores para o acompanhamento da realização das metas tem-se:

- a) multiplicação das sementes dos três indutores temperados introduzidos;
- b) bulk da F1 do cruzamento do indutor M741J e 10 genótipos adaptados;
- c) obtenção de 40 a 50 espigas F2/combinção com as melhores produções de sementes e marcação pelo gene *R1-nj* geração F2;
- d) seleção quatro combinações de genótipos adaptados cruzados com o indutor induzido, para seguir o melhoramento do indutor;
- e) genotipagem de cerca de 1000 plântulas amostras de sementes F2 de cada uma das quatro combinações e seleção de plântulas de raiz roxa, homozigóticas para marcadores *mtl* e portadoras de *zmdmp* por combinação, que serão transplantadas em para vasos e autofecundadas para obter a geração F3.
- f) identificação de cerca de dez F3 por combinação, cujas plântulas não segregarem para o gene *PI1* para avanço de geração, visando obter pelo menos 10 espigas F4/progênie para selecionar quanto a produtividade e marcação pelo *R1-nj*.
- g) genotipagem de progênes F4 selecionadas, visando selecionar as espigas das progênes com sementes homozigóticas para os marcadores *mtl*, *zmdmp*.

Ano 3:

Atividade	Meses											
	2027										2028	
	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F
Semear em bandejas amostras de 10 sementes de cada uma das progênies F4 selecionadas, para extração de DNA e realização da SAM, visando selecionar as espigas das progênies com sementes homocigóticas para os marcadores <i>mlt</i> , <i>zmdmp</i> ;	X											
Em campo na TMG-Sorriso e na FAZESC, as linhagens selecionadas por SAM seguirão para o avanço e obtenção a geração F5.	X	X	X	X	X							
Avanço para de F5 parava geração F6 e multiplicação de sementes							X	X	X	X	X	X
Cruzamento teste destas linhagens F5 com população de doadora de milho superdoce com primeira bainha foliar verde							X	X	X	X	X	X
Experimentos para avaliação do desempenho <i>per se</i> das linhagens							X	X	X	X	X	X
Selecionar cerca de 5 a 10 linhagens que tenham THI acima de 8%, plântulas com raiz roxa, para futuros estudos envolvendo combinações híbridas, desempenho agrônômico <i>per se</i>												X
Análise de dados e preparo de publicações	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Revisão da literatura	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

8. Resultados esperados (até ½ página): Listar os resultados e os benefícios esperados (considerando os aspectos social, econômico, ambiental e científico) com a execução do projeto.

O presente projeto dará início a um programa de melhoramento de linhagens indutoras de haploidia em milho adaptadas para ambientes tropicais e subtropicais, com diferentes genes marcadores utilizados na identificação de indivíduos haploides na fase de sementes, plântulas e plantas adultas. O desenvolvimento de linhagens indutoras tropicalizadas próprias, sem a necessidade de contratos de licenciamento de elevado custo e que não permitem o melhoramento, permitirá um contínuo aprimoramento das linhagens para diferentes características como taxa de indução à haploidia, produtividade de sementes, eficiência de marcação de haploides, maior coincidência de florescimento com as populações doadoras tropicais, resistência à doenças e a identificação de combinações híbridas de indutores para uso em lotes isolados de indução.

A otimização de métodos de duplicação cromossômica com substâncias alternativas ao uso da colchicina é de fundamental importância para a produção de DHs, pois deverá alcançar taxas de sucesso de duplicação cromossômica semelhantes ao das soluções com colchicina, mas com expressiva redução dos custos de produtos e riscos para a saúde humana e do ambiente.

A elaboração e avaliação de ferramentas auxiliares para duplicação cromossômica deverão melhorar a eficiência do trabalho; promover avanços nas taxas de sobrevivência de

plântulas; fornecer condições mais favoráveis de permanência das plântulas durante o tratamento; facilitar o processo de tratamento e lavagem das plântulas tratadas; reduzir possibilidades de contatos com substâncias tóxicas e aumentar a segura dos trabalhos.

A realização deste projeto deverá contribuir na geração de conhecimentos que facilitarão o acesso à tecnologia de produção de linhagens DHs e propiciando treinamento e capacitação discente e de técnicos da TMG.

9. Previsão orçamentária anual

A previsão orçamentária anual para a realização do projeto é apresentada a seguir:

Destinação	Valores (R\$)
a) Taxa de administração da FAUEL	13.480,00
b) Bolsas para a pesquisa	86.400,00
c) Aquisição e manutenção de equipamentos, infraestrutura, reagentes e consumíveis utilizados no desenvolvimento das atividades, conforme descrito no projeto	30.000,00
d) Todo e qualquer serviços de terceiros necessários à execução das atividades	4.920,00
Total Anual	134.800,00

10. Referências bibliográficas

- ALMEIDA, V.C., TRENTIN, H.U., FREI, U.K., LÜBBERSTEDT, T. Genomic prediction of maternal haploid induction rate in maize. **Plant Genome**, v. 13, n. 1, 2020.
- ARSHAD, S., MENGLI, W., QURBAN, A.; GHULAM, M.; ZHENGQIANG, M.; YUANXIN, Y. Paclitaxel and Caffeine–Taurine, New Colchicine Alternatives for Chromosomes Doubling in Maize Haploid Breeding. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 19, p. 14659, 2023.
- BARRET, P., BRINKMANN, M., BECKERT, M. A major locus expressed in the male gametophyte with incomplete penetrance is responsible for in situ gynogenesis in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 117, n. 4, p. 581-594, 2008.
- BARTELS, Paul G.; HILTON, James L. Comparison of trifluralin, oryzalin, pronamide, propham, and colchicine treatments on microtubules. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 3, n. 4, p. 462-472, 1973.
- CHAIKAM V., MAHUKU G. **Doubled haploid: Technology in maize breeding: theory and practice**. International Maize and Wheat Improvement Center, Mexico, p. 9-13, 2012.
- CHAIKAM, V., NAIR S.K., BABU R., MARTINEZ, L., TEJOMURTULA, J., PRASANNA.M.B. 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. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 128, p. 159–171, 2015.
- CHAIKAM, V.; GOWDA, M.; MARTINEZ, L.; OCHIENG, J.; OMAR, H.A.; PRASANNA, B.M., Improving the Efficiency of Colchicine-Based Chromosomal Doubling of Maize Haploids, **Plants**, v. 9, n. 4, p. 459, 2020.
- CHAIKAM, V., MOLENAAR, W., MELCHINGER, A.E., BODDUPALLI, P.M. Doubled haploid technology for line development in maize: technical advances and prospects. **Theoretical and Applied Genetics** v. 132, p. 3227–3243, 2019.
- CHAIKAM, V.; NAIR, S.K.; MARTINEZ, L.; LOPEZ, L.A.; UTZ, H.F.; MELCHINGER, A.E.; BODDUPALLI, P.M. Marker-Assisted Breeding of Improved Maternal Haploid Inducers in Maize for the Tropical/Subtropical Regions. **Plant Science**, v. 9, 2018.
- CHALYK, S.T. Creating new haploid-inducing lines of maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**. v. 73, p. 53-54, 1999.
- CHASE, S. S. **Monoploids in maize**. Ames: Iowa State College Press, p.389-399, 1952.
- CHAIKAM, V.; MARTINEZ, L.; MELCHINGER, A.E.; SCHIPPRACK, W.; BODDUPALLI, P.M. Development and validation of red root marker-based haploid inducers in maize. **Crop Sci**, v. 56, p. 1678–1688, 2016.

- CHEN, S.J.; SONG, T.M. Identification haploid with high oil xenia effect in maize. **Acta Agronomica Sinica**, v. 29, n. 4, p. 587-590, 2003.
- COE, E. H. A line of maize with high haploid frequency. **American Naturalist**, v.93, p.381-382, 1959.
- COE, E.H. Anthocyanin Genetics. In **The Maize Handbook**; Springer: New York, NY, USA, p. 279–281, 1994.
- DELLA VEDOVA, C.B.; LORBIECKE, R.; KIRSCH, H.; SCHULTE, M.B.; SCHEETS, K.; BORCHERT, L.M.; SCHEFFLER, B.E.; WIENAND, U.; CONE, K.C.; BIRCHLER, J.A. The dominant inhibitory chalcone synthase allele C2-Idf (Inhibitor diffuse) from *Zea mays* (L.) acts via an endogenous RNA silencing mechanism. **Genetics**, v.170, p. 1989–2002, 2005.
- DERMAIL, A., LÜBBERSTEDT, T., SUWARNO, W. B., CHANKAEW, S., LERTRAT, K., RUANJAICHON, V. Combining ability of tropicalx temperate maize inducers for haploid induction rate, R1-nj seed set, and agronomic traits. **Front. in Plant Sci.**, v. 14, p. 1154905, 2023
- DONG, X.; XU, X.; LI, L.; LIU, C.; TIAN, X.; LI, W.; CHEN, S. Marker-assisted selection and evaluation of high oil in vivo haploid inducers in maize. **Mol. Breed.**, v.34, p.1147–1158, 2014.
- EDER, J.; CHALYK, S. In vivo haploid induction in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, p. 703-708, 2002.
- EVANS, M.M. The indeterminate gametophyte1 gene of maize encodes a LOB domain protein required for embryo sac and leaf development. **The Plant Cell**, v. 19, n. 1, p. 46-62, 2007.
- FORD, R.H. Inheritance of Kernel Color in Corn: Explanations & Investigations. **Am. Biol. Teach.**, v. 62, p. 181–188, 2000.
- GAYEN, P. Madan, J. K., Kumar, R., Sarkar, K. R. Chromosome doubling in haploids through colchicine. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v. 68, p.65, 1994.
- GILLES, L.M.; KHALED, A., LAFFAIRE, J., CHAIGNON, S., GENDROT, G., LAPLAIGE, J., BERGÈS, H., BEYDON, G., BAYLE, V., BARRET, P. Loss of pollen-specific phospholipase NOT LIKE DAD triggers gynogenesis in maize. **EMBO J.**, v. 36, p. 707-717, 2017.
- HÄNTZSCHEL, K.R., WEBER, G. Blockage of mitosis in maize root tips using colchicine-alternatives. **Protoplasma**, v. 241, p. 99-104, 2010.
- JACQUIER, N. M. A., GILLES, L. M., PYOTT, D. E., MARTINANT, J.-P., ROGOWSKY, P. M., AND WIDIEZ, T. Puzzling out plant reproduction by haploid induction for innovations in plant breeding. **Nat. Plants**, v. 6, p. 610–619, 2020.
- JIANG, C., SUN, J., LI, R., YAN, S., CHEN, W., GUO, L., QIN, G., WANG, P., LUO, C., HUANG, W., ZHANG, Q., FERNIE, A. R., JACKSON, D., LI, X., YAN, . A reactive oxygen species burst causes haploid induction in maize. **Molecular Plant**, v. 15, n. 6, p. 943-955, 2022.
- KATO, A., GEIGER, H. H. Chromosome doubling of haploid maize seedlings using nitrous oxide gas at the flower primordial stage. **Plant breeding**, v. 121, n. 5, p. 370-377, 2002.
- KELLIHER, T., STARR, D., RICHBURG, L., CHINTAMANANI, S., DELZER, B., NUCCIO, M. L., GREEN, J., CHEN, Z., MCCUISTON, J., WANG, W., LIEBLER, T., BULLOCK, P., MARTIN, B. MATRILINEAL, a sperm-specific phospholipase, triggers maize haploid induction. **Nature**, v. 542, n. 7639, p. 105-109, 2017.
- KERMICLE, J. Androgenesis and the indeterminate gametophyte mutation: source of the cytoplasm. **Maize Genetics Cooperation News Letter**, 1973.
- KERMICLE, J. L. Indeterminate gametophyte (ig): biology and use. In: **The maize handbook**. New York, NY: Springer New York, 1994. p. 388-393.
- KERMICLE, J. L. Pleiotropic effects on seed development of the indeterminate gametophyte gene in maize. **American Journal of Botany**, v. 58, n. 1, p. 1-7, 1971.
- KERMICLE, J. L. Androgenesis conditioned by a mutation in maize. **Science**, v. 166, n. 3911, p. 1422-1424, 1969.
- KHAMMONA, K., DERMAIL, A., SURIHARN, K., LÜBBERSTEDT, T., WANCHANA, S., THUNNOM, B., PONCHEEWIN, W., TOOJINDA, T., RUANJAICHON, V., ARIKIT, S. Accelerating haploid induction rate and haploid validation through marker-assisted selection for qhir1 and qhir8 in maize. **Front. Plant Sci.**, v.15, 1337463, 2024.
- LASHERMES, P.; BECKERT, M. Genetic control of maternal haploidy in maize (*Zea mays* L.) and selection of haploid inducing lines. **Theoretical and applied genetics**, v. 76, p. 405-410, 1988.
- LI, L.; XU, X.; JIN, W.; Chen, S. Morphological and molecular evidences for DNA introgression in haploid induction via a high oil inducer CAUHOI in maize. **Planta**, v. 230, n. 2, p. 367–376, 2009.

- LI, Y., LIN, Z., YUE, Y., ZHAO, H., FEI, X., E., L., LIU, C., CHEN, S., LAI, J., SONG, W. Loss-of-function alleles of ZmPLD3 cause haploid induction in maize. **Nature plants**, v. 7, n. 12, p. 1579-1588, 2021.
- Liu, C., Li, J., Chen, M., Li, W., Zhong, Y., Dong, X., et al. Development of high-oil maize haploid inducer with a novel phenotyping strategy. **Crop J.**, v. 10, p. 524–531, 2022.
- Liu, C.; Li, W.; Zhong, Y.; Dong, X.; Hu, H.; Tian, X.; Wang, L.; Chen, B.; Chen, C.; Melchinger, A.E.; et al. Fine mapping of qhir8 affecting in vivo haploid induction in maize. **Theor. Appl. Genet.**, v. 128, p. 2507–2515, 2015.
- LIU, C., LI, X., MENG, D., ZHONG, Y., CHEN, C., DONG, X., XU, X., CHEN, B., LI, W., LI, L., TIAN, X., ZHAO, H., SONG, W., LUO, H., ZHANG, Q., LAI, J., JIN, W., YAN, J., CHEN, S. A 4-bp insertion at ZmPLA1 encoding a putative phospholipase A generates haploid induction in maize. **Molecular Plant**, v. 10, n. 3, p. 520-522, 2017.
- MAHUKU, G. **Putative DH seedlings: from the lab to the field, Doubled haploid technology in maize breeding: theory and practice**. CIMMYT, Mexico, DF, p. 30-38, 2012.
- MAQBOOL, M. A.; BESHIR, A.; KHOKHAR, E. S. Doubled haploids in maize: Development, deployment, and challenges. **Crop Science**, v. 60, n. 6, p. 2815-2840, 2020.
- MELCHINGER, A. E.; MOLENAAR, W.; MIRDITA, V.; SCHIPPRACK, W. Colchicine alternatives for chromosome doubling in maize haploids for doubled haploid production. **Crop Science**, v. 56, p.1-11, 2016.
- MOLENAAR, W.S., DE OLIVEIRA COUTO, E.G., PIEPHO, H.-P., MELCHINGER, A.E. Early diagnosis of ploidy status in doubled haploid production of maize by stomata length and flow cytometry measurements. **Plant Breed.**, v.138, p.266–276, 2019.
- NAIR, S. K., MOLENAAR, W., MELCHINGER, A. E., BODDUPALLI, P. M., MARTINEZ, L., LOPEZ, L. A. Dissection of a major QTL qhir1 conferring maternal haploid induction ability in maize. **Theor. Appl. Genet.**, v.130, p.1113–1122, 2017.
- NANDA, D. K., CHASE, S. S. (). An embryo marker for detecting monoploids of maize (*Zea mays* L.). **Crop Sci.**, v.6, p.213-215, 1966.
- PAZ-ARES, J.; GHOSAL, D.; SAEDLER, H. Molecular analysis of the C1-I allele from *Zea mays*: A dominant mutant of the regulatory C1 locus. **EMBO J.**, v. 9, p. 315–321, 1990.
- PETRONI, K., PILU, R., AND TONELLI, C. Anthocyanins in corn: a wealth of genes for human health. **Planta**, v.240, p.901-911, 2014.
- PRASANNA, B. M.; CHAIKAM, V.; MAHUKU, G. **Doubled haploid technology in maize breeding: theory and practice**. CIMMYT, 2012.
- PRIGGE, V.; MELCHINGER, A. E. Production of haploids and doubled haploids in maize. **Plant cell culture protocols**, p. 161-172, 2012.
- PRIGGE, V., SÁNCHEZ, C., DHILLON, B. S., SCHIPPRACK, W., ARAUS, J. L., BÄNZIGER, M., MELCHINGER, A. E. Doubled haploids in tropical maize: I. Effects of inducers and source germplasm on in vivo haploid induction rates. **Crop science**, v. 51, n. 4, p. 1498-1506, 2011.
- PRIGGE, V., SCHIPPRACK, W., MAHUKU, G., ATLIN, G. N., AND MELCHINGER, A. E. Development of in vivo haploid inducers for tropical maize breeding programs. **Euphytica**, v. 185, p. 481-490, 2012a.
- PRIGGE, V., XU, X., LI, L., BABU, R., CHEN, S., ATLIN, G. N., et al. (). New insights into the genetics of in vivo induction of maternal haploids, the backbone of doubled haploid technology in maize. **Genetics**, v.190, p.781-793, 2012b.
- PRIGGE, V.; XU, X.; LI, L.; BABU, R.; CHEN, S.; ATLIN, G.N.; MELCHINGER, A.E. New insights into the genetics of in vivo induction of maternal haploids, the backbone of doubled haploid technology in maize. **Genetics**, v. 190, p.781-793, 2012.
- REN, X.; CI, J.; CUI, X.; YANG, W. Doubling effect of anti-microtubule herbicides on the maize haploid, **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v.30, n.10, 2018.
- RÖBER, F. K.; GORDILLO, G. A.; GEIGER, H. H. In vivo haploid introduction in maize performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding. **Maydica**, v.50, p.275-283, 2005.
- ROTARENCO, V., DICU, G.; STATE, D., FUIA, S. New inducers of maternal haploids in maize, **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v.84, 2010.
- SEKIYA, A., PESTANA, J. K., SILVA, M. G. B. D., KRAUSE, M. D., SILVA, C. R. M., FERREIRA, J. M. Haploid induction in tropical supersweet corn and ploidy determination at the seedling stage. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 55, 2020.

- SINTANAPARADEE, P., DERMAIL, A., LÜBBERSTEDT, T., LERTRAT, K., CHANKAEW, S., RUANJAICHON, V., et al. Seasonal variation of tropical savanna altered agronomic adaptation of Stock-6-derived inducer lines. **Plants**, v.11, p. 2902, 2022
- SORIANO, M., CISTUÉ, L., VALLÉS, M. P., CASTILLO, A. M. Effects of colchicine on anther and microspore culture of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 91, p. 225-234, 2007.
- THAWARORIT, A., DERMAIL, A., LERTRAT, K., CHANKAEW, S., AND SURIHARN, K. Stratified haploid identification system through the R1-nj kernel and reduced seedling vigor in tropical maize germplasm. **Biodiversitas**, v.24, p.4262–4268, 2023.
- TIAN, X.; QIN, Y.; CHEN, B.; LIU, C.; WANG, L.; LI, X.; DONG, X.; LIU, L.; CHEN, S. Heterofertilization together with failed egg–sperm cell fusion supports single fertilization involved in *in vivo* haploid induction in maize, **Journal of Experimental Botany**. v. 69, n. 20, p. 4689-4701, 2018.
- TRENTIN, H. U., FREI, U. K., LÜBBERSTEDT, T. Breeding maize maternal haploid inducers. **Plants**, v. 9, p. 614, 2020.
- VANOUS, K., VANOUS, A., FREI, U. K., AND LÜBBERSTEDT, T. Generation of Maize (*Zea mays*) Doubled Haploids via Traditional Methods. **Curr. Protoc. Plant Biol.**, v. 2, p. 147–157, 2017.
- WALKER, E. L., ROBBINS, T. P., BUREAU, T. E., KERMICLE, J., AND DELLAPORTA, S. L. Transposon-mediated chromosomal rearrangements and gene duplications in the formation of the maize R-r complex. **EMBO J.**, v.14, p.2350–2363, 1995.
- 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 and applied Genetics**, v. 81, p. 205-211, 1991.
- WU, P.; REN, J.; LI, L.; CHEN, S. Early spontaneous diploidization of maternal maize haploids generated by *in vivo* haploid induction. **Euphytica**, v. 200, p. 127–138, 2014.
- XU, X.; LI, L.; DONG, X.; JIN, W.; MELCHINGER, A.E.; CHEN, S. Gametophytic and zygotic selection leads to segregation distortion through *in vivo* induction of a maternal haploid in maize. **J. Exp. Bot.**, v.64, p.1083–1096, 2013.
- ZHANG, Z.; QIU, F.; LIU, Y.; MA, K.; LI, Z.; XU, S. Chromosome elimination and *in vivo* haploid production induced by Stock 6-derived inducer line in maize (*Zea mays* L.). **Plant Cell Reports**, v. 27, n. 12, p. 1851–1860, 2008.
- ZHONG, Y., LIU, C., QI, X., JIAO, Y., WANG, D., WANG, Y., LIU, Z., CHEN, C., CHEN, B., TIAN, X., LI, J., CHEN, M., DONG, X., XU, X., LI, L., LI, W., LIU, W., JIN, W., LAI, J., CHEN, S. Mutation of ZmDMP enhances haploid induction in maize. **Nature plants**, v. 5, n. 6, p. 575-580, 2019.
- ZHOU, X., CHENG, Z., MENG, H. Effects of pendimethalin on garlic chromosome doubling *in vitro*. **Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica**, v. 29, n. 12, p. 2571-2575, 2009.

11. Cronograma Financeiro (Projeto TMG-FAUEL)

1ºAno - Valor Total R\$ 134.800,00		
Parcela	Data de Vencimento	Valor
01/05	30/março/25	12,5% - R\$ 16.850,00
02/05	30/abril/25	50,0% - R\$ 67.400,00
03/05	30/junho/25	12,5% - R\$ 16.850,00
04/05	30/setembro/25	12,5% - R\$ 16.850,00
05/05	20/dezembro/25	12,5% - R\$ 16.850,00
2ºAno - Valor Total R\$ 134.800,00 + INPC Acumulado de março/2025 a fevereiro/2026		
Parcela	Data de Vencimento	Valor
01/05	30/março/26	Equivalente a 12,5% do valor total
02/05	30/abril/26	Equivalente a 50,0% do valor total
03/05	30/junho/26	Equivalente a 12,5% do valor total
04/05	30/setembro/26	Equivalente a 12,5% do valor total
05/05	20/dezembro/26	Equivalente a 12,5% do valor total
3ºAno - Valor 2º Ano + INPC Acumulado de março/2026 a fevereiro/2027		
Parcela	Data de Vencimento	Valor
01/05	30/março/27	Equivalente a 12,5% do valor total
02/05	30/abril/27	Equivalente a 50,0% do valor total
03/05	30/junho/27	Equivalente a 12,5% do valor total
04/05	30/setembro/27	Equivalente a 12,5% do valor total
05/05	20/dezembro/27	Equivalente a 12,5% do valor total