

# AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS DE APLICAÇÃO DE COLCHICINA PARA DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA EM MILHO

Tácila Cristina Azevedo<sup>1</sup>

Roberto dos Santos Trindade<sup>2</sup>

Flávia Ferreira Mendes Guimaraes<sup>3</sup>

## RESUMO

Diferentes métodos de duplicação cromossômica são utilizados para obtenção de duplo-haploides em milho, contudo comparações de eficiência entre protocolos ainda são incipientes na literatura. O objetivo deste trabalho foi comparar a eficiência de três protocolos de duplicação cromossômica. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, com três repetições, em esquema fatorial composto de três tratamentos de duplicação cromossômica (injeção, tratamento via raízes e tratamento em plântula recém-germinada) e dois tipos de genótipo em tratamento (duplo-haploides e falsos-positivos). Foram utilizadas 270 sementes haploides obtidas do cruzamento do genótipo-fonte 91500212 com o híbrido indutor de haploidia Tail P1 x Tail P2 sendo 90 sementes para cada tratamento. Para o tratamento de injeção, foi realizado uma aplicação de colchicina no caule das plântulas aos 15 dias após germinação. No tratamento via raízes, aos 15 dias após germinação, raízes das plântulas foram imersas em solução de colchicina por seis horas, seguindo-se de remoção de resíduos de colchicina e transplântio para bandejas com substrato. No tratamento de plântula recém-germinada, plântulas com 3 dias de germinação foram imersas em solução de colchicina por 12 horas, seguindo-se a remoção da solução e transplântio para bandejas com substrato. Após a recuperação das plântulas, cerca de 20 dias após tratamento, as mesmas foram transplantadas para vasos de 20 litros com solo adubado, em casa de vegetação, iniciando-se a coleta dos dados. Os resultados indicam que o protocolo de injeção apresentou melhor sobrevivência, melhor praticidade de aplicação, menor custo e menor impacto ambiental.

Palavras chave: *Zea mays* L. Produção de linhagens. Duplo-haploides.

## ABSTRACT

Different methods of chromosome duplication are used to obtain double-haploid in maize, however, comparison of efficiency of different protocols are still incipient in the literature. The aim of this work was comparing the efficiency of three chromosome duplication protocols. The experimental design was randomized blocks, with three replications, in factorial scheme with 3 chromosome duplication protocols (injection, roots and seedlings) and two type of genotypes in evaluation (double-haploids and false-positives). We used 270 haploid seeds obtained from the genotype-source 91500212 crossing with the haploid-inducing hybrid Tail P1 x Tail P2, with 90 seeds for each treatment. For the injection treatment, a colchicine application was carried out on the stem of the seedlings when they reached the stage of 15 days of germination. In the root protocol, the roots of the seedlings in the stage of 15 days of germination were immersed in solution of colchicine for six hours, followed by the removal of mattress residues and transplantation to trays with substrate. In the treatment of newly germinated seedlings, seedlings in 3 days of germination were immersed in solution of colchicine for 12 hours, followed by solution removal and transplanting to trays with substrate. After the recovery of the plants, they were transplanted to the greenhouse where the data was collected. It was possible to identify that the injection protocol stood out showing better survival, better application practice, lower costs and lower environmental impact.

Key words: *Zea mays* L., Lines production. Double-haploids.

---

<sup>1</sup> Discente do curso de Biotecnologia da Faculdade Ciências da Vida, Sete Lagoas, MG.

<sup>2</sup> Co-Orientador, Doutor em Genética e melhoramento de plantas. Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.

<sup>3</sup> Orientadora, Doutora em genética e melhoramento de plantas. Professora da Faculdade Ciências da Vida, Sete Lagoas, MG.

## 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de linhagens é um processo importante na produção de híbridos de milho, demandando seis a oito gerações de autofecundação para obtenção de linhas com 99% de homozigose, um processo simples, porém demorado (BISON *et al.*, 2003). De acordo com Chase (1952), uma alternativa para redução do tempo de obtenção de linhagens consiste na tecnologia de duplo-haploides (DH), que, produz linhagens totalmente homozigotas em apenas duas gerações.

Naturalmente, a ocorrência de haploides em milho é extremamente baixa, cerca de um em mil. Entretanto, técnicas alternativas de obtenção de haploides vêm sendo estudadas, sendo a técnica *in vivo* a mais utilizada em escala comercial. Na técnica *in vivo* é feito o cruzamento entre um genótipo indutor de haploidia e um genótipo-fonte, obtendo, dessa maneira, sementes de milho haploides com a metade do número de cromossomos da espécie ( $n = 10$ ). Em seguida é feita a seleção destas sementes com base em marcadores fenotípicos, e elas passam por um processo de duplicação cromossômica (GEIGER; GORDILLO, 2009).

O desenvolvimento de um protocolo eficiente na duplicação cromossômica é essencial para obtenção de linhagens DH, sendo que, os protocolos que utilizam a colchicina têm sido os mais empregados. A colchicina age como antimitótico que impede a formação das fibras do fuso durante a divisão celular, e, conseqüentemente, não há segregação das cromátides irmãs, ocorrendo dessa forma a duplicação cromossômica (CASTILLO *et al.*, 2009).

Vários protocolos foram desenvolvidos para a utilização da colchicina visando à duplicação cromossômica em milho, se destacando os protocolos de GAYEN *et al.* (1994), que utiliza plântulas recém-germinadas, o tratamento de injeção de colchicina (ZABIROVA *et al.* 1996) e o tratamento de DEIMLING; RÖBER e GEIGER (1997), que aplica solução de colchicina as raízes das plântulas. Esses protocolos são utilizados atualmente em vários programas de obtenção de haploides em todo o mundo. Entretanto a divulgação de protocolos e dados de eficiência de duplicação cromossômica ainda são escassos na literatura. Por isso, esse trabalho se justifica, pela necessidade de adotar um protocolo mais eficiente para obtenção de linhagens DH no programa de melhoramento de milho da Embrapa Milho e Sorgo.

Diante do exposto, o presente trabalho apresenta a seguinte problemática: qual protocolo de aplicação de colchicina possui uma maior eficiência para duplicação cromossômica em milho? Desta forma, levantou-se a hipótese de que existem diferenças significativas no processo de duplicação cromossômica em milho em função do protocolo

aplicado para esta finalidade.

Para testar essa hipótese esse trabalho teve por objetivo comparar a eficiência de três protocolos de duplicação cromossômica em milho, baseados nos dados de sobrevivência das plântulas após o tratamento, de número de haploides positivos com pendão e espigas viáveis para autofecundação, do rendimento final de sementes em cada processo e de outros parâmetros agronômicos.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 MILHO**

O milho (*Zea mays*) pertence à família *Poaceae* e possui 10 pares de cromossomos, é uma espécie cultivada em climas tropicais, subtropicais e temperados, pois possui uma alta capacidade de se adaptar em diferentes condições de ambientes. É a espécie de cereal mais cultivada no Brasil, tendo seu cultivo em todas as microrregiões do país. Na safra de 2017/2018 o Brasil produziu 80,7 milhões de toneladas (Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB, 2019). Em termos mundiais, o Brasil é posicionado como o terceiro maior produtor de milho, atrás somente dos Estados Unidos e China (USDA, 2017).

Há uma infinidade de produtos oriundos do milho como creme de milho, amido de milho, farinha de milho, canjica, pipoca de milho, óleo de milho e maltose para cervejarias entre outros. Ele ainda é utilizado como ração animal, em formulações de produtos de limpeza, plástico, matéria prima para sorvetes e goma de mascar e usado na indústria farmacêutica. (ABIMILHO, 2006)

### **2.2 LINHAGENS DUPLO-HAPLOIDES**

A obtenção de linhagens é um processo rotineiro nos programas de melhoramento de milho e pode ser feita através de métodos tradicionais ou através do uso de tecnologia de duplo-haploide, e este pode ser obtido através de tecnologias *in vivo* ou *in vitro*. Na obtenção tradicional de linhagens, consecutivas autofecundações são realizadas, a fim de atingir a completa homozigose da planta, o que leva em torno de 6 a 8 gerações. Enquanto na obtenção via duplo-haploide, a completa homozigose é atingida com duas gerações, diminuindo assim o tempo para obtenção de uma linhagem. Na obtenção *in vitro* se utiliza técnicas de cultura de

tecidos e na obtenção *in vivo* utiliza indutores de haploidia seguido de duplicação cromossômica (CHASE, 1952).

Indivíduos haploides são aqueles que possuem apenas uma cópia de cada cromossomo, e a obtenção de haploides de milho é feito em sua maioria *in vivo*. Para tal, o genótipo fonte é cruzado com uma planta indutora de haploidia. Geralmente os indutores gimnogenéticos são mais utilizados, de maneira que os genes herdados são apenas do genitor feminino. Tal indutor possui as maiores taxas de indução de haploidia (TRINDADE *et al.*, 2016).

Após o processo de indução de haploidia é necessário selecionar as sementes haploides, visto que o processo de indução tem taxas de 8% a 12% de sucesso por espiga induzida. Portanto, são selecionadas as sementes que serão haploides através de seleção visual pelo marcador R1-navajo, em que as sementes haploides apresentam coloração roxa no endosperma e o embrião com coloração branca, sem nenhuma pigmentação. As sementes que tiveram cruzamento com o indutor e, portanto, são diploides apresentam pigmentação roxa tanto no endosperma quanto no embrião. Uma terceira classe de sementes são as que sofrem inibição, em que a rota de síntese de antocianina é interrompida. Estas sementes não irão apresentar nenhuma coloração, sendo então descartadas (FRITSCHÉ-NETO; GARBUGLIO; BORÉM, 2012).

Selecionadas as sementes haploides, elas devem passar por um processo de duplicação cromossômica *in vivo* através do uso de substâncias como a colchicina. Tal substância age impedindo a polimerização das proteínas do fuso mitótico parando o processo de divisão celular na metáfase, assim a célula duplica o número de cromossomos a fim de dar origem a outra célula, porém como o processo foi paralisado na metáfase, a célula volta a fase de interfase com o dobro de cromossomos. Após este processo, se tem linhagens de milho duplo-haploides (FRITSCHÉ-NETO; GARBUGLIO; BORÉM, 2012).

### **2.3 PROTOCOLOS DE USO DE COLCHICINA**

A duplicação cromossômica é uma etapa essencial na produção de linhagens duplo-haploides em milho, uma vez que linhagens haploides são naturalmente estéreis. Desta forma, a duplicação cromossômica visa permitir a obtenção de linhagens férteis e totalmente homozigotas. O agente mais utilizado para duplicação cromossômica é a colchicina, um agente mutagênico, cancerígeno e de alta toxicidade, com DL50=6mg/kg peso vivo (SIGMA – ALDRICH, 2015), demandando protocolos seguros e de alta eficiência para seu uso.

Existem três protocolos para duplicação cromossômica em milho que utilizam

colchicina. Gayen *et al.* (1994) propuseram o tratamento de plântulas recém-germinadas, em que se corta o coleóptilo de plântulas haploides em estágio de 2 a 3 dias após germinação, colocando-se as mesmas em solução de colchicina a 0,06%. Deimling, Rober e Geiger (1997) inseriram as raízes das plântulas de haploides de milho em solução de colchicina a 0,007% no escuro. Zabirowa *et al.* (1996) propuseram o método de injeção, no qual as plântulas em fase de 10 a 15 dias eram injetadas com solução de colchicina a 0,1% diretamente no coleto, via injeção com agulha hipodérmica de 8 x 0,30mm, visando expor o meristema basal a solução de colchicina, pois os tecidos florais são gerados através desta estrutura.

A eficiência dos protocolos citados anteriormente foi comparada por Chalyk (2000) no qual avaliou a porcentagem de linhagens duplo-haploide que tiveram pólen viável em cada protocolo. O método proposto por Deimling, Rober e Geiger (1997) obteve 28,8% e 31% de duplo-haploides com pólen fértil respectivamente, o método de Zabirowa *et al.* (1996) obteve 27,5% de duplo-haploides com pólen fértil e o método de Gayen *et al.* (1994) não obteve duplo-haploide com pólen fértil.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 LOCAL, MATERIAL GENÉTICO E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL**

Todos os trabalhos efetuados no experimento foram realizados na Embrapa Milho e Sorgo, localizada município de Sete Lagoas, na região central de Minas Gerais.

No experimento, foram utilizadas 270 sementes de milho haploides obtidas por meio do cruzamento do genótipo-fonte 91500212 com o híbrido indutor de haploidia Tail P1 x Tail P2. O genótipo 91500212 trata-se de população S1 derivada de cruzamento biparental entre linhagens elite do grupo Flint pertencentes ao programa de melhoramento de milho da Embrapa Milho e Sorgo. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos inteiramente casualizados, com três repetições, em esquema fatorial, composto pelos 3 tratamentos avaliados e pelo tipo de genótipo em questão (duplo-haploide ou falso – positivo). Para tanto, as 270 sementes foram divididas em três grupos de 90 sementes, com 3 repetições de 30 sementes, em que cada grupo passou por um tratamento de duplicação cromossômica. A descrição dos tratamentos adotados vem a seguir.

#### **3.2 TRATAMENTOS DE DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA**

### **3.2.1 TRATAMENTO DE INJEÇÃO**

O protocolo de injeção foi realizado seguindo a metodologia de Vanous *et. al* (2017). Para aplicação desse protocolo, as plântulas foram previamente semeadas em bandejas de 50 células, com substrato comercial, onde foram mantidas até o estágio V3 (3 folhas expandidas). O protocolo consistiu na aplicação de 100 µl solução de colchicina a 0,125% + 0,5% de DMSO (1,25g de colchicina e 5ml de DMSO), com seringa descartável de 1ml contendo agulha hipodérmica de 8 x 0,30mm. Em seguida, as plantas foram mantidas fora da incidência de luz solar direta e sem irrigação por 8 horas, no Laboratório de Duplo-haploides da Embrapa Milho e Sorgo, para total absorção da solução pelas plântulas. Após este período, as plantas foram levadas para casa de vegetação, sendo transplantadas em definitivo para vasos de 20 litros no vigésimo dia após o tratamento com colchicina.

### **3.2.2 TRATAMENTO VIA IMERSÃO DE RAIZES**

Este protocolo foi realizado seguindo a metodologia de Couto *et. al* (2015). Neste protocolo, os materiais usados foram semeados em bandejas de 50 células com vermiculita como substrato, e conduzidos até o estágio V3 (três folhas expandidas). Neste estágio, as mudas eram retiradas do substrato, tinham suas raízes lavadas em água corrente e eram inseridas em béqueres, contendo solução 1:1:1 de colchicina, Dimetil sulfoxido e Tween 20 (1g:1ml:1ml por litro de água destilada, respectivamente). As plantas foram mantidas por seis horas em solução, sendo lavadas em seguida por 40 minutos em tanque próprio para tal, seguindo-se o transplante para bandejas com substrato comercial. Após transplante, as plantas foram levadas para casa de vegetação por 20 dias, sendo depois transplantadas para vasos de 20 litros com solo adubado, e mantidas em casa de vegetação por todo o ciclo.

### **3.2.3 TRATAMENTO DE PLÂNTULA RECÉM-GERMINADA**

O tratamento de plântula recém-germinada foi realizado seguindo a metodologia de Prigge e Melchinger (2012). Neste protocolo, as sementes foram divididas em três grupos de 30 e semeadas em papel germiteste umedecido com água destilada. Em seguida, o papel germiteste foi fechado em rolos que foram levados para germinador, onde foram mantidos por 36 horas, visando obter plantas com emergência de 2 cm de coleóptilo. Após este período, os rolos foram retirados do germinador e as plântulas receberam um corte a 2mm milímetros do

ápice do coleóptilo, com bisturi. Em seguida, as mesmas foram inseridas em béqueres identificados com solução de colchicina 0,06% + DMSO 0,5% (600 mg de colchicina e 5ml de DMSO por litro) até um volume que permitisse cobrir todas as plântulas.

As plântulas foram mantidas em solução, no escuro por 12 horas, em temperatura de 20°C. Após este período, a solução de colchicina foi removida e as plântulas passaram por lavagem de 30 minutos em água corrente. Posteriormente, as plântulas foram transplantadas para bandejas com substrato comercial e levadas para casa de vegetação para aclimação por 20 dias. O transplante definitivo para vasos com solo adubado se deu no estádio V3.

### **3.3 TRANSPLANTIO**

Após a realização dos protocolos e da recuperação das plântulas, por volta de 20 dias após tratamento, as mesmas foram transplantadas definitivamente para vasos em casa de vegetação, com climatização controlada, distribuídas conforme o delineamento de blocos casualizados, onde cada tratamento foi separado em três blocos com 30 plântulas em cada bloco. As plantas foram mantidas em vasos de 20 litros com solo adubado por todo o seu ciclo.

### **3.4 COLETA DE DADOS E AVALIAÇÃO**

Para a avaliação dos protocolos, foram tomados os seguintes dados: i) número de plantas sobreviventes após o procedimento; ii) florescimento masculino (FF), em dias; iii) florescimento feminino (FF), em dias; iv) intervalo entre florescimento feminino e masculino (ASI), em dias; v) dias de emissão de pólen (DEM); vi) comprimento da haste principal do pendão (CHP), em cm; vii) número de ramificações do pendão (NRP); viii) altura da planta (AP), em cm; ix) altura da primeira espiga (AE), em cm; x) comprimento da espiga (CE), em cm; xi) diâmetro da espiga (DE), em cm; xii) número de sementes na espiga (NS); xiii) número de fileira de grãos na espiga (NF); xiv) peso de espiga (PE), em mg; xv) peso de grãos (PG), em mg; xvi) percentual de haploides e falso-positivos;

### **3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Os dados obtidos foram tabulados no Excel e em seguida foram submetidos à análise de variância (Anova) ou teste T de acordo com cada variável.

As variáveis submetidas à análise de variância foram: FM, FF, DFM, CHP, NRP, ASI, AP, AE, CE, DE, NS, NF, PE e PG. Além da Anova, para cada variável foram efetuados três contrastes entre médias, sendo: 1) tratamento de injeção vs. tratamento de raiz; 2) tratamento de injeção vs. tratamento de plântula recém-germinada; e, 3) tratamento de raiz vs. tratamento de plântula recém-germinada.

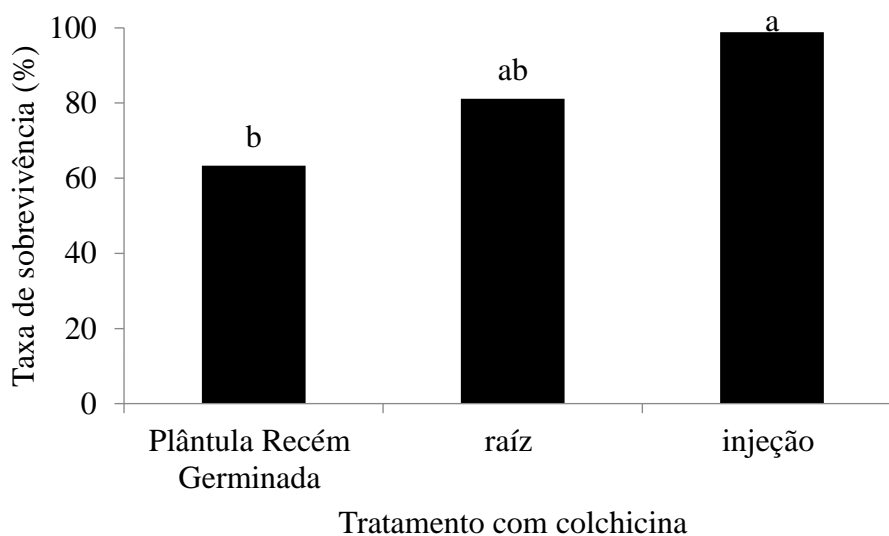
O teste T foi usado para as variáveis: sobrevivência de plântulas, percentual de haploides e falso-positivos e eficiência da duplicação cromossômica para abertura do pendão.

Todas as análises foram efetuadas com o auxílio do software estatístico SAS (SAS Institute, 2000).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 EFEITO DOS PROTOCOLOS SOBRE A SOBREVIVÊNCIA DE PLÂNTULAS

Em valores absolutos, foi possível observar uma grande diferença de sobrevivência de plântulas entre os tratamentos avaliados. Para o tratamento de injeção com colchicina, 89 das 90 plântulas sobreviveram. Já para o tratamento de raiz sobreviveram 73 plantas com taxa de sobrevivência de 81,10%, enquanto que para o tratamento de plântula recém-germinada sobreviveram 57 plantas, com taxa de sobrevivência de 63,33%. Entretanto, o teste T não indicou diferenças significativas entre o tratamento de injeção de colchicina e o de imersão de raízes, e entre o tratamento de imersão de raízes e plântulas recém-germinadas (FIGURA 1).



**Figura 1.** Taxa de sobrevivência das plantas após tratamento com colchicina por diferentes protocolos. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste T a 5% de probabilidade.

Fonte: o próprio autor



Os melhores resultados foram observados para o tratamento de injeção com uma taxa de sobrevivência de 98,99% e pode ser explicado pelo fato de se tratar de um método menos agressivo para a plântula já que ele requer menos transplantios e é realizado com a plântula em estágio mais avançado de desenvolvimento. Os demais métodos demandam mais transplantios, são feitos em estádios iniciais e exigem muito tempo em contato com solução de colchicina, o que também gera estresse para a plântula.

#### 4.2 EFEITOS DOS PROTOCOLOS NO NÚMERO DE DUPLO-HAPLOIDES E FALSO-POSITIVOS

Após analisar a sobrevivência é necessário avaliar das plantas sobreviventes, quantas são realmente duplo-haploides. A avaliação é feita ao longo do ciclo da planta, em função de características como altura, ciclo e coloração de caule, com confirmação na pós-colheita em que, é possível observar nas sementes das espigas das plantas falso-positivas a presença do marcador R1-navajo, vindo do indutor de haploidia. Essa presença é confirmada pela coloração das sementes, em que, milho falso positivo apresenta pigmentação roxa ou sementes brancas enquanto as plantas duplo-haploides não apresentam nenhuma mancha e apenas sementes amarelas (FIGURA 2). Outra característica marcante é a quantidade de sementes em espigas duplo-haploides, que é sempre reduzida, devida a baixa produção de pólen mesmo após o tratamento com colchicina.



**Figura 2** – Espigas de plantas haploides putativas (A), com poucas sementes sem pigmentação e de falsos-positivos (B), com presença de pigmentação purpura e sementes brancas, após colheita.  
Fonte: o próprio autor

Em média, o número de Duplo-haploides obtidos após o tratamento com colchicina foi de 15 plantas, ou seja, uma taxa de sucesso de 20,54%, considerando apenas as plantas sobreviventes após cada tratamento. Não foi observada uma grande variação no número de duplo-haploides entre os tratamentos avaliados, com uma taxa de sucesso entre 14,44 a 18,89%. O teste T não apresentou diferença significativa entre tratamentos para número de haploides obtidos, embora haja um maior número de duplo-haploides no tratamento de injeção e um menor número de falsos positivos no tratamento com plântulas recém-germinadas. Em termos percentuais, do total de plântulas sobreviventes, foram identificados mais duplo-haploides no tratamento com plântulas recém-germinadas do que nos demais tratamentos (TABELA 1).

Tabela 1. Plantas duplo-haploides e falso positivas, após serem submetidas a três protocolos de duplicação cromossômica pelo uso de colchicina.

Tratamento	Duplo-haploide	Falso positivo
Plântula Recém-germinada	13 (22,81%) *a	21 a
Raiz	15 (20,54%) a	31 a
Injeção	17 (19,10%) a	42 a
Média	15 (20,54%)	31.33

\* número entre parênteses representa a taxa de sucesso na obtenção do duplo-haploide. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste T a 5% de probabilidade.

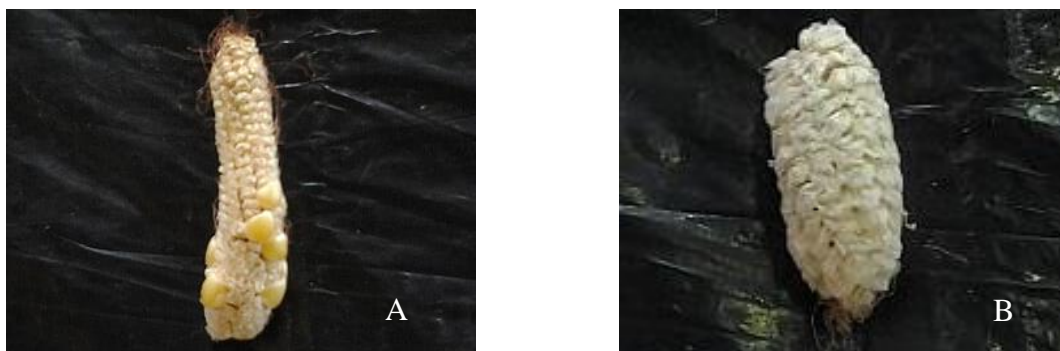
Fonte: o próprio autor

### **4.3 EFEITO DOS PROTOCOLOS SOBRE A ABERTURA DO PENDÃO E PRODUTIBILIDADE DE SEMENTES**

A abertura do pendão e a producibilidade de sementes são importantes indicadores da eficiência do processo de duplicação cromossômica, porque demonstram o efeito deste procedimento na restauração da fertilidade da planta, já que haploides de milho são naturalmente estéreis devido a impossibilidade de pareamento de cromossomos quando da divisão celular (Prigge e Melchinger, 2012). Desta forma, plantas com pólen viável para o cruzamento resultam em espigas com sementes, enquanto plantas com pólen não viável ou estéreis resultam em espigas sem sementes (FIGURA 3).

A viabilidade do pendão foi determinada pelo grau de abertura e emissão de pólen de suas anteras, variando entre pendões com abertura total e boa emissão de pólen, pendões com abertura intermediária e pouca emissão de pólen e pendões com macho-esterilidade, com anteras totalmente fechadas. Verificou-se um maior número de pendões com abertura total no

tratamento de injeção, o que também pode estar relacionado a sobrevivência de plântulas, o que ocasiona, conseqüentemente, uma menor perda de possíveis duplo-haploides de milho.



**Figura 3** – Espigas com sementes (A), indicando eficiência na reversão da macho-esterilidade e espigas sem sementes (B) indicando ineficiência do tratamento de duplicação cromossômica.

Fonte: o próprio autor

Os tratamentos de raiz e em plântula recém-germinada apresentaram valores próximos de abertura total de pendão e de macho esterilidade, com baixos valores destes últimos parâmetros, demonstrando eficiência dos dois tratamentos para reverter a macho esterilidade no pendão nas plantas sobreviventes (TABELA 2). Houve um maior número de pendões com abertura parcial no tratamento de raiz, comparado a plântula recém-germinada, o que pode ser devido tanto a diferenças no número de plantas sobreviventes em ambos os tratamentos como também a maior eficiência do tratamento de raízes na reversão da macho-esterilidade de haploides de milho.

**Tabela 2** – Abertura de pendões em cada tratamento de duplicação cromossômica

Tratamento	Abertura total	Abertura parcial	Com macho-esterilidade
Plântula Recém-germinada	27	23	1
Raiz	39	25	3
Injeção	43	29	14

Fonte: o próprio autor

Com relação a produção de espigas com sementes, os dados da tabela 3 demonstram que, entre os duplo-haploides obtidos no tratamento de plântula recém-germinada, 5 espigas apresentaram sementes enquanto 8 espigas não apresentaram formação de sementes. No tratamento de raiz, 7 espigas apresentaram sementes e 8 espigas não apresentaram sementes. No tratamento de injeção, 11 espigas apresentaram sementes e 4 espigas permaneceram sem sementes. Com isso é possível observar que o tratamento de injeção foi o que resultou em maior quantidade de plantas com pólen viável para o cruzamento, o que se reflete diretamente no número de espigas com semente.

Tabela 3. Resultado do teste T para comparação de médias de espigas com sementes e espigas sem sementes entre os três tratamentos

Tratamento	Com semente	Sem semente
Plântula Recém-germinada	5 a	8 a
Raiz	7 a	8 a
Injeção	11 a	6 a

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste T a 5% de probabilidade.

Fonte: o próprio autor

#### 4.4 EFEITO DOS PROTOCOLOS DE DUPLICAÇÃO CROMOSSOMICA SOBRE AS CARACTERÍSTICAS MORFOAGRONÔMICAS

Os dados dos contrastes ortogonais para as 14 características agronômicas avaliadas indicam diferenças significativas entre tratamentos para florescimento masculino, florescimento feminino, dias de emissão de pólen, altura de planta e altura de inserção da espiga (Tabela 4).

Tabela 4. Médias e contrastes entre os tratamentos de aplicação de colchicina para as 14 características agronômicas avaliadas em plantas duplo haploides de milho.

Var	Médias dos tratamentos			Teste F para Contrastes		
	Injeção	Raiz	Plântula recém-germinada	A	B	C
FM	64	72	78	15,99**	62,34**	17,65**
DFM	11	13	14	12,70**	20,56**	1,64
CHP	26	24	27	0,88	0,31	1,91
NRP	6	4	4	2,17	0,78	0,2
FF	67	72	79	8,89**	96,06**	48,77**
ASI	3	1	2	3,59	0,04	2,26
AP	96	87	88	3,89*	0,17	1,85
AE	54	35	41	36,78*	8,43**	6,53**
CE	69	66	59	0,16	1,42	0,66
DE	29	28	24	0,19	1,99	3,16
NS	83	64	46	1,49	3,45	0,54
NF	9	9	8	1,43	3,3	0,52
PE	30	21	15	0,63	3,53	1,3
PG	27	20	15	0,76	3,3	1,01

A: Injeção vs. Raiz; B: Injeção vs. Plântula recém-germinada; C: Raiz vs. Planta recém-germinada. \*,\*\* Significância de 5 e 1% para os valores de F, respectivamente; FM – florescimento masculino em dias; DFM – dias de emissão de pólen; CHP – comprimento da haste principal do pendão em cm; NRP – número de ramificações do pendão; FF – florescimento feminino em dias; ASI – intervalo entre florescimento masculino e feminino; AP – altura de planta em cm; AE – altura de inserção da espiga em cm; CE – comprimento da espiga em cm; DE – diâmetro da espiga em cm; NS – número de sementes; PE – peso de espiga em mg; PG – peso de grãos em mg.

Fonte: o próprio autor

O FM e FF menores para o tratamento de injeção (64 e 67 dias, respectivamente), enquanto que o tratamento de raiz apresentou média de 72 dias para os dois florescimentos e o de plântula recém-germinada apresentou média de 78 e 79 dias, respectivamente. As plantas apresentaram média de 11 dias para emissão de pólen para o tratamento de injeção, de 13 dias para o tratamento de raiz e 14 dias para o tratamento de plântula recém-germinada, com diferenças significativas apenas para comparação entre injeção x raiz e injeção x plântula.

A altura de planta apresentou diferença significativa apenas na comparação dos protocolos de injeção e raiz onde, a média de altura do tratamento de injeção foi de 96 cm e a média do tratamento de raiz foi de 87cm. A média de altura de inserção de espiga foi de 54 para o tratamento de injeção, 35 para o tratamento de raiz e 41 para o tratamento de plântula. Apesar de não demonstrar diferenças significativa, foi possível observar que no tratamento de injeção houve uma maior produção de sementes.

#### **4.5 COMPARAÇÃO DE PROTOCOLOS COM RELAÇÃO A EFICIÊNCIA E GERAÇÃO DE RESÍDUOS**

Cada tratamento tem sua particularidade para ser executado e isso vai interferir na facilidade da realização do tratamento e no resíduo gerado. O tratamento de raiz é o mais simples de ser aplicado já que demanda apenas remover a plântula do substrato e colocar na solução de colchicina, sendo a absorção da colchicina feita através da raiz. Porém, esse tratamento irá necessitar de uma grande quantidade de reagente, e gera muitos resíduos ao final de sua aplicação, já que o que a plântula não foi capaz de absorver, será descartado. Além disso ele demanda diversos transplantios o que além de ser trabalhoso, gera gasto de substratos.

O tratamento de plântula recém-germinada, é relativamente simples em sua aplicação, é necessário apenas retirar do papel germiteste, cortar o coleóptilo de plântula por plântula e inserir na solução de colchicina, sendo que a própria plântula fará a absorção da solução. Porém, como no tratamento de raiz, ele também irá demandar de uma grande quantidade de reagentes e o que a plântula não for capaz de absorver também será descartado.

No tratamento de injeção, embora a aplicação dependa da habilidade de quem irá realizar o tratamento, já que, será dada uma injeção da solução de colchicina plântula por plântula, há um menor gasto de reagentes e geração de resíduos, já que todo o produto é absorvido pela plântula.

## 5. CONCLUSÕES

O protocolo de injeção apresentou maior eficiência, resultando em melhor sobrevivência, maior produção de duplo-haploides com pólen e espiga viáveis e maior produção de sementes. Este protocolo ainda apresenta as vantagens de ser mais econômico, em termo de gasto de substrato, de reagentes e de número de operações de transplante e de não gerar resíduo adicional após aplicação, o que resulta em menor impacto ambiental.

## 6. REFERÊNCIAS

Associação Brasileira das Indústrias do Milho – ABIMILHO. [www.abimilho.com.br](http://www.abimilho.com.br). Acesso em 09/10/2018.

BISON, O. RAMALHO, M. A. P. RAPOSO, F.V. Potencial de híbridos simples de milho para extração de linhagens. **Ciênc. agrotec.**, Lavras. V.27, n.2, p.348-355, mar./abr., 2003.

BORÉM, A.; CAIXETA, T. E. **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG: UFV, 2006. 374 p.

CHALYK, S. T Obtaining fertile pollen in maize maternal haploids. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 74, n. 1, p. 17-18, Mar. 2000.

CHASE, S. S. Production of momozygous diploids of maize from monoploids. **Agronomy Journal**, Madison, v. 44, p. 263-267, 1952.

Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB [www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br). Acesso em 26/05/2019

Couto *et al.*, 2015 - In vivo haploid induction and efficiency of two chromosome duplication protocols in tropical maize. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 39, n. 5, p. 435-442.

DEIMLING, S.; ROBER, F.; GEIGER, H. H. Methodik und genetik der in-vivo- Haploide induktion bei mais. **Vorträge für Pflanzenzüchtung**, Quedlinburg, v. 38, p. 203-224, 1997.

FRITSCHÉ-NETO, Roberto; Garbuglio, DD; Borém, Aluizio. Double Haploids. In: Aluizio Borém; Roberto Fritsche-Neto. (Org.). **Biotechnology and Plant Breeding: Applications and Approaches for Developing Improved Cultivars**. **San Diego: Elsevier**, 2014, v. 1, p. 201-224.

GEIGER, H. H.; GORDILLO, G. A. Doubled haploids in hybrid maize breeding. *Maydica*. 54(4):485-499, 2009.

GAYEN, P., MADAN, J. K., KUMAR, R., SARKAR, K. R. Chromosome doubling in haploids through colchicine. **Maize Genetics Cooperation NewsLetter**, Columbia, v. 68, n. 1, p. 65, 1994.

PRIGGE V. & MELCHINGER A.E. Production of Haploids and Doubled Haploids in Maize.

Víctor M. Loyola-Vargas and Neftalí Ochoa-Alejo (eds.), **Plant Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology**, v. 877, DOI 10.1007/978-1-61779-818-4\_13, © Springer Science+Business Media, LLC 2012.

SAS Institute (2000). SAS OnlineDOC. Version 8. SAS Institute Inc., Cary.

Sigma – Aldrich. FICHA DE INFORMAÇÕES DE SEGURANÇA DE PRODUTOS QUÍMICOS, 2015.

[www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=BR&language=pt&productNumber=C9754&brand=SIGMA](http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=BR&language=pt&productNumber=C9754&brand=SIGMA). Acesso em: 28/05/2019

TRINDADE, R. S.; GUIMARAES, L. J. M.; SOUZA, I. R. P.; GUIMARAES, P. E. O.; NETTO, D. A. M.; SILVA, A. C. A.; MARIZ, B. L. Indução de Haploidia em Milho: Efeito do avanço de gerações e grupo heterótico da população-fonte. In: XXXI Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 2016, Bento Gonçalves-RS. Anais do XXXI Congresso Nacional de Milho e Sorgo. Sete Lagoas - MG, 2016.

U.S. Department of Agriculture – USDA. [www.usda.gov](http://www.usda.gov). Acesso em 09/10/2018.

VANOUS, K., VANOUS, A., FREI, U. K., & LUBBERSTEDT, T. Generation of maize (*Zea mays*) doubled haploids via traditional methods. **Current Protocols in Plant Biology**, 2, 147–157. doi: 10.1002/cppb.20050, 2017.

ZABIROVA, E. R. *et al.* Technology of the mass accelerated production of homozygous lines: in Russian. **Kukuruza i Sorgo**, Moskova, v. 4, n. 1, p. 17-19, 1996.