

CULTURA DE ANTERAS *in vitro* VISANDO A PRODUÇÃO DE  
LINHAGENS DUPLO-HAPLOIDES DE *Zea mays* L.

**WILLIAN DOS SANTOS GOMES**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
FEVEREIRO – 2018

CULTURA DE ANTERAS *in vitro* VISANDO A PRODUÇÃO DE  
LINHAGENS DUPLO-HAPLOIDES DE *Zea mays* L.

**WILLIAN DOS SANTOS GOMES**

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas”

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Virginia Silva Carvalho

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
FEVEREIRO – 2018

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCH / UENF

071/2018

G633 Gomes, Willian dos Santos.

Cultura de anteras *in vitro* visando a produção de linhagens duplo-haploides de *Zea mays* L. / Willian dos Santos Gomes. – Campos dos Goytacazes, RJ, 2018.

79 f. : il.

Bibliografia: 69 – 79.

Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2018.

Orientadora: Virginia Silva Carvalho.

1. Androgênese. 2. Cultura de Tecidos. 3. Haploidia. 4. Milho. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD – 633.15

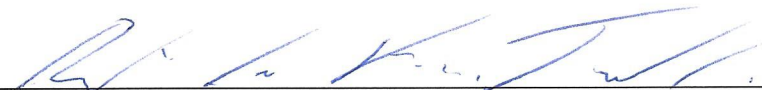
CULTURA DE ANTERAS *in vitro* VISANDO A PRODUÇÃO DE  
LINHAGENS DUPLO-HAPLOIDES DE *Zea mays* L.

**WILLIAN DOS SANTOS GOMES**

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas”

Aprovada em 16 de fevereiro de 2018.


Comissão Examinadora:



Dr. Roberto dos Santos Trindade (D.Sc., Genética e Melhoramento de Plantas)  
Embrapa Milho e Sorgo



Prof.ª Telma Nair Santana Pereira (Ph.D, Melhoramento de Plantas) - UENF



Dr. Victor Paulo Mesquita Aragão (D.Sc., Produção Vegetal) - UENF



Prof.ª Virginia Silva Carvalho (D.Sc., Fitotecnia) - UENF  
(Orientadora)

Aos meus pais Tarcísio Gomes e Ofélia Maria dos Santos Gomes, ao meu irmão David dos Santos Gomes e à minha querida Ester Cristina Ferreira Zagato, pelo imenso amor.

DEDICO

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por Se fazer presente sempre na minha vida nos bons momentos e, também, nos momentos de dificuldades. Pelas muitas bênçãos recebidas e por me manter firme durante essa jornada;

À minha família, minha mãe Ofélia Maria dos Santos Gomes, meu pai Tarcísio Gomes e meu irmão David dos Santos Gomes, pelo amor e apoio incondicional, tornando possível essa conquista;

Ao meu amor, Ester Cristina Ferreira Zagato, pela inspiração, apoio, paciência e companheirismo nos momentos bons e de dificuldades;

À Família Ferreira Zagato, pelo apoio, carinho e acolhimento em vossas vidas;

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela estrutura e oportunidade de realizar o curso de mestrado;

À professora Virginia Silva Carvalho, pelo apoio, paciência, prontidão e oportunidade concedida;

Aos meus conselheiros, Telma Nair Santana Pereira e Messias Pereira Gonzaga, pelos esclarecimentos e ajuda prestada e a todos os professores do PPGMP, pelos ensinamentos durante esses dois anos;

Ao secretário, José Daniel, por sempre ser solícito, atencioso e incentivador;

Ao meu colega de república Danilo Força Baroni, pela troca de experiências e amizade construída;

A todos os meus amigos de laboratório LFIT 112, Andressa, Renato, Renan, Nayara, Roberto, Kezia, Roberta, Clarissa e em especial ao Rafael por toda ajuda prestada e companheirismo nos experimentos;

À FAPERJ, pela oportunidade e concessão da bolsa, tornando possível a finalização do mestrado;

E a todos que, de alguma forma, estiveram comigo durante esse período e que contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema de representação das regiões do pendão de milho consideradas para o estudo..... 14
- Figura 2.** Estádios celulares de micrósporos de *Zea mays* L.. Células meióticas (a); Tétrade (b); Células uninucleadas (c); Células binucleadas (d). Seta: Núcleo. Barra: 20µm ..... 15
- Figura 3.** Diâmetro, perímetro e comprimento respectivamente das anteras localizadas entre as regiões basal, mediana e apical do pendão. As médias seguidas por letras iguais não diferem entre si ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey. .... 18
- Figura 4.** Esquema indicando a simplificação na demarcação de regiões ao longo do pendão com base em parâmetros morfológicos. .... 19
- Figura 5.** Diâmetro, perímetro e comprimento das anteras em função dos períodos de coleta de pendão. (Períodos de coleta: 1= 54 dias, 2= 55 dias, 3= 56 dias, 4= 57 dias e 5= 58 dias). .... 20
- Figura 6.** Variações de umidade relativa na casa de vegetação ao longo dos períodos de coleta..... 21
- Figura 7.** Micrósporos em estágio uninucleado de desenvolvimento observados em microscópio e corados com Carmin acético a 1%. Setas: núcleo celular. Escalas: 20µm. .... 22



<b>Figura 8.</b> Micrósporos em estágio uninucleado de desenvolvimento observados em microscópio e corados com Hoechst a 0,5%. Setas: único núcleo celular. Escalas: 50µm (a), 10µm (b), 30µm (c), 20µm (d). .....	23
<b>Figura 9.</b> Concentração de células uninucleadas por região do pendão. As médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey, (P<0,05). .....	24
<b>Figura 10.</b> Concentração de células no estágio uninucleado de desenvolvimento do micrósporo em função dos períodos de coleta.....	25
<b>Figura 11.</b> Porcentagem de anteras que responderam à indução embriogênica em função dos genótipos estudados. As médias seguidas por letras diferentes diferem entre si (P<0,05) pelo teste de Tukey. ....	46
<b>Figura 12.</b> Porcentagem de anteras que responderam à indução de possíveis calos embriogênicos em função dos meios de cultura testados. As médias seguidas por letras diferentes diferem entre si (P<0,05) pelo teste de Tukey.....	47
<b>Figura 13.</b> Início da indução de possíveis calos embriogênicos dos micrósporos presentes nas anteras de milho, indicado por setas. ....	48
<b>Figura 14.</b> Porcentagem de sobrevivência das anteras de três genótipos de milho em diferentes meios de regeneração. As médias seguidas por letras iguais não diferem entre si (P<0,05) pelo teste de Tukey. ....	51
<b>Figura 15.</b> Extravasamento de micrósporos de <i>Zea mays</i> L. para o meio de cultura de indução embriogênica, indicado por setas. ....	52

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Distribuição e classificação das espécies e subespécies do gênero <i>Zea</i> . .....	6
<b>Tabela 2.</b> Períodos de coleta do pendão determinados de acordo com os dias próximos ao estágio fenológico de pendoamento para as condições ambientais submetidas. Campos dos Goytacazes - RJ, 2018. ....	13
<b>Tabela 3.</b> Resumo da análise de variância com quadrados médios para os efeitos do Genótipo (G), Tempo (T) e Região do pendão (R) e suas interações em relação à média de comprimento das anteras de <i>Zea mays</i> L. Campos dos Goytacazes - RJ, 2018.....	17
<b>Tabela 4.</b> Resumo da análise de variância com quadrados médios para os efeitos do Genótipo (G), Tempo (T), Região do pendão (R) e suas interações na concentração de células no estágio uninucleado de desenvolvimento do micrósporo em <i>Zea mays</i> L. Campos dos Goytacazes - RJ, 2018. ....	24
<b>Tabela 5.</b> Representação dos dias de coleta em graus dias e graus dias acumulados desde a semeadura, destacados em negrito os dias que apresentaram as maiores médias de células no estágio uninucleado de desenvolvimento do micrósporo em <i>Zea mays</i> L. Campos dos Goytacazes - RJ, 2018.....	26
<b>Tabela 6.</b> Relação de trabalhos sobre cultura de anteras em milho listados em ordem cronológica.....	34

<b>Tabela 7.</b> Protocolos com os meios de cultura utilizados para a cultura de anteras em <i>Zea mays</i> L. Campos dos Goytacazes - RJ, 2018. ....	39
<b>Tabela 8.</b> Composição dos meios de cultura para a cultura de anteras em <i>Zea mays</i> L. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018. ....	43
<b>Tabela 9.</b> Resumo da análise de variância com quadrados médios (QM) para os efeitos do Genótipo (G), Meio de cultura (M) e suas interações em relação à média de anteras que responderam à indução de embriões a partir de micrósporos, em <i>Zea mays</i> L. Campos dos Goytacazes - RJ, 2018.....	46
<b>Tabela 10.</b> Porcentagem de anteras responsivas à indução embriogênica nos genótipos CIMMYT-11, PIRANÃO-11 e UENF 506-11 em função dos meios de cultura estudados. Campos dos Goytacazes - RJ, 2018. ....	49
<b>Tabela 11.</b> Resumo da análise de variância com quadrados médios (QM) para os efeitos do Genótipo (G), Meio de cultura (M) e suas interações em relação à média de anteras que sobreviveram no meio de regeneração de plantas na cultura de anteras em milho. ....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>2,4 D</b>	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
<b>AIA</b>	Ácido Indol-3-acético
<b>BA</b>	6-benziladenina
<b>CCTA</b>	Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias
<b>CONAB</b>	Companhia Nacional de Abastecimento
<b>CV (%)</b>	Coeficiente de Variação
<b>DH</b>	Duplo-haploide
<b>FAO</b>	Food And Agriculture Organization
<b>GD</b>	Graus-dias
<b>LFIT</b>	Laboratório de Fitotecnia
<b>NaClO</b>	Hipoclorito de Sódio
<b>NPK</b>	Nitrogênio, Fósforo e Potássio
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>RJ</b>	Rio de Janeiro
<b>SAS</b>	Sistema de análises de sementes
<b>TB</b>	Temperatura base
<b>TIBA</b>	Ácido 2,3,5-triidobenzoico
<b>UENF</b>	Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	v
LISTA DE TABELAS .....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	ix
RESUMO .....	xii
ABSTRACT .....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS .....	3
2.1 Gerais .....	3
2.2 Específicos.....	3
3. CAPÍTULOS.....	5
3.1 DEFINIÇÃO DO ESTÁDIO UNINUCLEADO DO MICRÓSPORO EM <i>Zea mays</i> COM BASE EM PARÂMETROS CRONOLÓGICOS E MORFOLÓGICOS .....	5
3.1.1 INTRODUÇÃO.....	5
3.1.2 REVISÃO DE LITERATURA .....	6
3.1.2.1 Características botânicas e morfológicas do milho .....	6
3.1.2.2 Histórico da haploidia em plantas.....	8
3.1.2.3 Mecanismo da androgênese .....	9
3.1.2.4 Aspectos morfológicos do estágio uninucleado em <i>Zea mays</i> L. ....	11
3.1.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1.3.1 Material Genético .....	12
3.1.3.2 Determinação do estágio de desenvolvimento do micrósporo .....	13

3.1.3.3 Análise citogenética .....	15
3.1.3.4 Análise estatística .....	16
3.1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	16
3.1.4.1 Aspectos morfológicos para correlação de estágio celular .....	16
3.1.4.2 Diferenças na concentração de células no estágio uninucleado .....	22
3.1.5 CONCLUSÕES.....	27
3.2 CULTURA DE ANTERAS EM MILHO COMUM ( <i>Zea mays</i> L.) .....	28
3.2.1 INTRODUÇÃO.....	28
3.2.2 REVISÃO DE LITERATURA .....	29
3.2.2.1 Importância Econômica.....	29
3.2.2.2 Melhoramento de milho.....	30
3.2.2.3 Cultura de Tecidos Vegetais: Cultura de Anteras.....	32
3.2.2.3 Produção de duplo-haploides .....	35
3.2.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.2.3.1 Material vegetal .....	38
3.2.3.2 Pré-tratamento e desinfestação.....	38
3.2.3.3 Cultura de anteras .....	39
3.2.3.3.1 Protocolos para a cultura de anteras.....	39
3.2.3.4 Avaliações.....	45
3.2.3.5 Análise estatística .....	45
3.2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	45
3.2.4.1 Indução embriogênica em <i>Zea mays</i> L. ....	45
3.2.4.2 Regeneração em <i>Zea mays</i> L.....	49
3.2.5 CONCLUSÕES.....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

## RESUMO

GOMES, Willian dos Santos; M.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Fevereiro de 2018; Cultura de anteras *in vitro* visando a produção de linhagens duplo-haploides de *Zea mays* L.; Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Virginia Silva Carvalho; Conselheiros: Prof<sup>a</sup>. Telma Nair Santana Pereira e Prof. Messias Gonzaga Pereira.

Nos programas de melhoramento de milho, a tecnologia de duplo-haploides é importante para a produção de linhagens. A cultura de anteras é uma técnica utilizada em diversas culturas para se produzir plantas duplo-haploides. No entanto, o milho apresenta características recalcitrantes para a androgênese e o sucesso desta técnica é dependente de diversos fatores como genótipo, condições da planta doadora de pólen, estágio de desenvolvimento do micrósporo e condições de cultivo *in vitro*. Além disso, a pesquisa sob domínio público para genótipos de milho tropicais ainda é rara. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi estudar a correlação do estágio uninucleado do micrósporo, que é o mais adequado para a cultura de anteras em milho, com características morfológicas e cronológicas da planta doadora de micrósporos, e, após esta caracterização, definir, para o cultivo *in vitro* de anteras, protocolos mais responsivos para a indução de embriões e para a regeneração de plantas para os genótipos estudados. Os materiais genéticos que fizeram parte deste estudo foram as populações CIMMYT-11 e PIRANÃO-11, além do híbrido UENF 506-11. No primeiro experimento foi verificado que as características morfológicas da antera

não são bons parâmetros de correlação para estágio celular, tendo em vista a possibilidade de variações ambientais existentes ao longo do período de cultivo, resultando em diferenças significativas que podem atrapalhar na definição adequada do estágio celular. O período de cultivo expresso em graus-dias foi o melhor parâmetro de correlação com o estágio celular desejado para os genótipos estudados. No segundo experimento foi observado que os genótipos, assim como os meios de cultura exerceram grande influência na resposta de indução embriogênica. Os meios de cultura Yu-pei e Yu-pei modificados foram os mais responsivos na indução de micrósporos possivelmente induzidos para os genótipos estudados. Na etapa de regeneração dos micrósporos induzidos à embriogênese, não foi observada nenhuma resposta dos genótipos em nenhum dos meios de cultura estudados. De forma geral, os resultados deste trabalho contribuem para o entendimento e desenvolvimento de protocolos adequados para a produção de duplo-haploides com os genótipos de interesse do programa de Genética e Melhoramento de Plantas da UENF.



## ABSTRACT

GOMES, Willian dos Santos; M. Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; February 2018; Anther culture for double-haploid lines production in *Zea mays* L.; Adviser: Virginia Silva Carvalho; Committee members: Telma Nair Santana Pereira and Messias Gonzaga Pereira.

In maize breeding programs, double-haploid technology is important to produce inbred lines. The anther culture is a technique used in several cultures to produce double-haploid plants. However, maize presents recalcitrant characteristics for androgenesis and the success of this technique and is dependent on several factors such as genotype, conditions of the pollen donor plant and stage of development of microspore and in vitro culture conditions. In addition, a research under the public domain for Brazilian corn genotypes is still rare. Therefore, the objective of this work is to study the correlation of the uninucleate stage of the microspore, which is more suitable for an anther culture in corn, with morphological and chronological characteristics of the microspore donor plant. After this definition, the objective of the work is defined, for the in vitro culture of anthers, more responsive protocols for the induction of embryos and for the regeneration of plants for the studied genotypes. The genetic materials that are part of the study as populations CIMMYT-11 and PIRANÃO-11, besides the hybrid UENF 506-11. In the first experiment it was verified that the anther morphologies are not good correction parameters for the cell stage, considering a possibility of variation of life span, period of cultivation time, resulting in different meanings that

may disturb the proper definition of the cell stage. The cultivation period expressed in degrees-days was the best correlation parameter with the desired cell stage for the studied genotypes. In the second experiment it was observed that the genotypes, as well as the culture media exerted great influence on the response of the embryogenic induction. The culture media Yu-pei and modified Yu-pei were the most responsive in the induction of embryogenic calli for the genotypes studied. In the regeneration stage of the microspores induced embryogenesis, no response and genotypes were observed in any culture media studied. In general, the results of this work contribute to the understanding and development of adequate protocols for the production of double-haploids with the genotypes of interest of the Program of Genetics and Plant Breeding of the UENF.

## 1. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é uma cultura de grande importância no cenário mundial. O cereal é amplamente utilizado como matéria prima para diversos fins, que vão desde a alimentação animal e humana, até a indústria de alta tecnologia, passando pela engenharia, na produção de polímeros e produção de energia e também no uso medicinal e farmacológico, fazendo parte da composição de diversos cosméticos e medicamentos. A variabilidade, por conseguinte, permite que o milho apresente os maiores incrementos de produção das últimas décadas (Paiva et al., 2010).

Para abastecer o mercado diversificado que o milho possui, programas de melhoramento são de suma importância para garantir a qualidade e as altas produtividades (Fischer e Edmeades, 2010).

O milho possui predominantemente uma natureza alógama e, portanto, sua fecundação é cruzada. Quando ocasionalmente ocorre a autofecundação, muitas vezes a progênie é caracterizada por traços indesejáveis, como a redução do tamanho da planta e baixos rendimentos. No entanto, quando a fecundação cruzada é realizada, o milho demonstra características desejáveis, fenômeno este comumente referido como "Vigor Híbrido". Este fenômeno é atribuído à ação complementar de genes favoráveis e é, frequentemente, explorado pelos melhoristas para desenvolver híbridos comerciais (Paterniani et al., 2008).

No melhoramento de milho, a obtenção de híbridos envolve várias etapas que demandam tempo e recurso. Um dos fatores limitantes é a obtenção de

linhagens que serão cruzadas para obtenção do material híbrido (Silveira e Moro, 2010). Nos métodos convencionais, a obtenção de linhagens endogâmicas, isto é, com todos os *locos* gênicos em homozigose, é obtida após seis a oito gerações de autofecundações sucessivas, tornando o processo demorado e oneroso (Rosa et al., 2016).

Na busca pela otimização desses recursos, a tecnologia de duplo-haploides é um método que permite a obtenção de linhagens 100% homozigotas em um curto espaço de tempo. Um "Duplo-Haploide" (DH) é um genótipo formado quando as células (n) de um indivíduo haploide são submetidas à duplicação cromossômica, de forma espontânea ou induzida artificialmente (Pierre et al., 2011).

Existem diversos meios para se obter indivíduos duplo-haploides, como a cultura de ovários; o método *bulbosum*; o uso de linhagens indutoras; os micrósporos isolados e a cultura de anteras. Essa última apresenta-se como a principal técnica em diversas culturas, devido à praticidade e eficiência após o estabelecimento de protocolos para as mesmas (Pierre et al., 2011).

Em milho, a cultura de anteras foi estudada por diversos pesquisadores (Ku et al., 1978; Ting et al., 1981; Nitsch et al., 1982; Genovesi e Collins, 1982; Petolino e Jones, 1986; Barnabás et al., 1987; Obert e Barnabás, 2004; Jager et al., 2010; Choudhary et al., 2013; Hosseini et al., 2015).

No entanto, apesar da grande contribuição desses autores em diversos aspectos que regem o sucesso da cultura de anteras, a responsividade da técnica ainda não é satisfatória para a utilização rotineira em todos os programas de melhoramento. Isto se deve a diversos fatores que podem influenciar em sua eficácia, como por exemplo, o genótipo e as condições de crescimento da planta doadora, o estágio de desenvolvimento das anteras no momento da inoculação em meio de cultura, o pré tratamento das anteras e o meio de cultura utilizado para cada espécie (Genovesi e Collins, 1982).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Gerais

Estabelecer protocolos eficientes para a cultura de anteras em milho para os genótipos CIMMYT-11, PIRANÃO-11 e UENF 506-1, visando otimizar a dinâmica de produção de linhagens do programa de melhoramento de milho da Universidade Estadual do Norte Fluminense.

Contribuir para a elucidação dos mecanismos que controlam a responsividade da cultura de anteras para produção de duplo-haploides em *Zea mays* L., utilizando como modelo de estudos os genótipos UENF-506-11; PIRANÃO-11 e CIMMYT-11, como forma de acelerar a obtenção de novas linhagens endogâmicas para o programa de melhoramento de milho da UENF.

### 2.2 Específicos

a) Investigar uma possível correção entre o estágio uninucleado de desenvolvimento do micrósporo com parâmetros cronológicos e morfológicos, a fim de determinar o momento ideal para a coleta das anteras e posterior inoculação *in vitro*.

b) Definir um protocolo responsivo para as fases de indução e regeneração na cultura de antera, utilizando como material de trabalho os genótipos UENF 506-11, CYMMIT 11 e PIRANÃO 11.

### 3. CAPÍTULOS

#### 3.1 DEFINIÇÃO DO ESTÁDIO UNINUCLEADO DO MICRÓSPORO EM *Zea mays* COM BASE EM PARÂMETROS CRONOLÓGICOS E MORFOLÓGICOS

##### 3.1.1 INTRODUÇÃO

A obtenção do estágio adequado de desenvolvimento do micrósporo para a inoculação das anteras *in vitro* tem sido um dos grandes gargalos para o sucesso da cultura de anteras. O estágio citológico considerado ideal para a cultura de anteras em milho é o uninucleado. Neste estágio há a possibilidade de reprogramação dos micrósporos, que seguiriam a rota gametofítica normal, para o desenvolvimento e crescimento esporofítico, tornando possível a diferenciação de micrósporos em plantas haploides/duplo-haploides, por meio de técnicas de cultura de tecidos (Pierre et al., 2011).

No entanto, na prática, a definição desse estágio é dificultada devido à falta de marcadores morfológicos precisos que possam ser correlacionados com o período citológico, o qual pode se modificar em questão de horas. Desse modo, a ausência de precisão nessa etapa resulta no comprometimento da eficácia das etapas seguintes (Moraes et al., 2008).

Apesar da inerente importância do estabelecimento correto do estágio dos micrósoros para o cultivo *in vitro* de anteras, são escassos os estudos correlacionando características citológicas e parâmetros morfológicos e cronológicos, a fim de determinar o período ideal de coleta e inoculação de micrósoros de milho *in vitro* (Moraes et al., 2008).

Tendo em vista esta limitação, sobretudo em genótipos de milho desenvolvidos no Brasil, o objetivo deste estudo foi estabelecer uma correlação direta entre o estágio uninucleado de desenvolvimento dos micrósoros e as características morfológicas e cronológicas de *Zea mays* L. com o intuito de determinar o ponto ideal de colheita das anteras para o cultivo *in vitro*

### 3.1.2 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1.2.1 Características botânicas e morfológicas do milho

Na classificação botânica, o milho é um cereal C4 que pertence à divisão das Fanerógamas, classe das Liliopsidas, ordem Gramineae, família Poaceae, tribo Maydeae, gênero *Zea* e espécie *Zea mays* L. O gênero *Zea* é composto por um grupo de gramíneas, perenes e anuais, nativas do México e da América Central (Doebley, 1990).

**Tabela 1.** Distribuição e classificação das espécies e subespécies do gênero *Zea*.

Seção	Espécie	Subespécie	Hábito	Genoma
<b>Luxuriantes</b>	<i>Zea diploperennis</i>		Perene	2x
	<i>Zea perennis</i>		Perene	4x
	<i>Zea luxuriantes</i>		Anual	2x
<b>Zea</b>	<i>Zea mays</i>	<i>Zea mays mexicana</i>	Anual	2x
		<i>Zea mays parviglumins</i>	Anual	2x
		<i>Zea mays huehuetenangensis</i>	Anual	2x
		<i>Zea mays mays</i>	Anual	2x



O milho é uma espécie alógama e alotetraploide, possuindo um comportamento diploide, com  $2n = 4x = 20$  cromossomos. Possui taxa de autofecundação inferior a 5%, sendo o vento o principal agente de polinização (Marcos Filho, 2005).

É uma espécie monoica, ou seja, possui órgãos masculinos e femininos na mesma planta e em inflorescências diferentes. Os órgãos masculinos estão situados no topo do colmo, agrupados na panícula e os femininos em espigas axilares. Os órgãos masculinos amadurecem antes dos femininos e por isso, é uma espécie protândrica (Sangoi et al., 2013).

O órgão masculino, denominado de pendão ou flecha, é constituído de um eixo central denominado ráquis, do qual surgem várias ramificações laterais. De cada ramificação lateral podem surgir várias outras, denominadas terciárias. Ao longo das ramificações estão localizadas as espiguetas, dispostas aos pares, sendo uma séssil e outra pedunculada; as espiguetas são arranjadas alternadamente (Viana et al., 1999).

O pendoamento inicia-se quando o último ramo do pendão está completamente visível. O início da inflorescência masculina antecede de dois a quatro dias a exposição dos estilos-estigmas. Em condições de campo, a liberação do pólen geralmente ocorre nos finais das manhãs e início das noites. Neste estágio, a planta atinge o máximo crescimento. Um pendão de tamanho médio chega a ter 2,5 milhões de grãos de pólen, o que equivale dizer que a espiga em condições normais dificilmente deixará de ser polinizada pela falta de pólen, uma vez que o número de óvulos está em torno de 750 a 1000 (Fancelli e Dourado Neto, 2000).

A inflorescência feminina é constituída por um eixo, ao longo do qual se dispõem os alvéolos e onde se desenvolvem as espiguetas aos pares, sendo cada espiguetas formada por duas flores, uma fértil e outra estéril. Cada flor tem um ovário com um único óvulo e, a partir do ovário, desenvolve-se o estilo-estigma. O conjunto do estilo-estigma irá constituir o cabelo ou, também, denominada barba de milho (Viana et al., 1999).

Os frutos do milho, além de serem ricos em energia, são conhecidos botanicamente por cariopse e são formados por quatro principais estruturas físicas: pericarpo, endosperma, embrião e pedicelo ou ponta, cada qual com suas características químicas específicas (Wang et al., 2000; José et al., 2005).

O sistema radicular do milho possui uma parte seminal de raízes adventícias que promove a fixação primária e absorção de nutrientes. Além disso, o sistema radicular possui a função de manter a posição vertical da planta, evitando sua queda. Da parte do embrião que corresponde à radícula, originará a raiz primária que se aprofunda no solo em sentido vertical. A seguir, surgem as raízes secundárias, as quais apresentam uma grande capacidade de ramificação e a raiz primária desintegra-se. Posteriormente, surgem as raízes adventícias, que quando atingem o solo ramificam-se intensamente, sendo muito importantes na sustentação física da planta (Freddi et al., 2009).

O caule do milho é um colmo ereto, geralmente não ramificado e apresentando nós e entrenós que se denominam de meritalos, os quais são esponjosos e relativamente ricos em açúcar. As plantas do milho são consideradas de folha estreita, com comprimento muito superior à largura. As folhas estão dispostas alternadamente e inseridas nos nós. As folhas são constituídas de uma bainha invaginante, estreita e de forma lanceolada, possuindo bordos serrilhados com uma nervura central vigorosa (Freddi et al., 2009).

### **3.1.2.2 Histórico da haploidia em plantas**

O primeiro haploide esporofítico natural foi observado em 1921 /por Bergner e colaboradores em uma espécie de erva daninha, *Datura stramonium*. No entanto, somente em 1952 houve a primeira tentativa de utilizar os haploides na reprodução, selecionando a baixa frequência de haploides partenogênicos no milho e, em seguida, aplicando tratamentos de duplicação cromossômica para produzir linhagens 100% endogâmicas (Chase, 1952). Apesar dessa possibilidade, a paternogênese estava limitada a um pequeno número de espécies que respondiam positivamente a essa técnica (Genovesi e Collins, 1982).

Cerca de 40 anos após a identificação do primeiro haploide espontâneo, os pesquisadores do Departamento de Botânica da Universidade de Delhi (Índia), Guha em 1964 e Maheshwari em 1966, renovaram o interesse da comunidade científica sobre haploidia ao obterem os primeiros embriões haploides, dessa vez provenientes de anteras imaturas de *Datura inoxia*. Desse modo, descobriram que

era possível alterar o desenvolvimento gametofítico normal dos micrósporos para diferenciação de um grão de pólen maduro e redirecioná-los para a via de desenvolvimento esporofítica. Como resultado, embriões e plantas haploides foram então produzidos. Esta descoberta abriu o caminho para uma pesquisa mais ampla sobre a cultura de anteras, que foi particularmente bem sucedida em Solanaceae, Brassicaceae e Gramineae (Genovesi e Collins, 1982).

O grande interesse pelos haploides ficou oficialmente evidente com a organização do 'Primeiro Simpósio Internacional de Haploides em Plantas Superiores', que foi realizado em Guelph (Canadá) em 1974 (Kasha, 1974). Desde então, o número de haploides espontâneos detectados cresceu de forma constante, resultando, em 1974, no registro de haploides em mais de cem espécies de angiospermas (Kyunghee, 2016).

Apesar da alta procura por haploides que ocorreu nesse período, os que eram provenientes de produção espontânea não poderiam ser utilizados rotineiramente nos programas de melhoramento, devido à sua baixa frequência de ocorrência, sendo, portanto, necessária a indução dos mesmos por meio de técnicas de cultura de tecidos (Genovesi e Collins, 1982).

No entanto, apesar de culturas economicamente importantes como a cevada (*Hordeum vulgare* L.), o arroz (*Oryza sativa*) o tabaco (*Nicotiana spp*) e o trigo (*Triticum aestivum* L.) responderem de maneira eficiente na produção de haploides pelo cultivo *in vitro*, outras espécies cientificamente interessantes, como a *Arabidopsis thaliana*, muitas plantas lenhosas e o milho (*Zea mays* L.), ainda permanecem recalcitrantes para a cultura de anteras, sendo, portanto necessários mais estudos a fim de compreender os mecanismos da androgênese e englobar essas culturas na lista de espécies responsivas (Germana, 2011).

### **3.1.2.3 Mecanismo da androgênese**

Durante a evolução, as células vegetais mantiveram a capacidade de expressar grande parte do seu genoma quando estimuladas adequadamente, permitindo se organizarem em um novo indivíduo, dando origem a uma nova planta (Seguí-Simarro, 2010).

Esta notável característica, denominada totipotência celular, permite que uma célula adote um crescimento proliferativo (calo) ou desvie para um programa

de desenvolvimento diferente do original. Estes programas incluem a formação de um novo indivíduo por meio da regeneração sucessiva de todos os seus órgãos vegetativos (organogênese) ou diretamente pela entrada em uma nova via embriogênica (embriogênese) (Seguí-Simarro, 2010).

Utilizando condições experimentais adequadas, é possível induzir a organogênese e, ou a embriogênese a partir de células de uma variedade de tecidos e órgãos vegetais, incluindo folhas, cotilédones, raízes, hipocótilos, anteras, ovários, etc. (Razdan, 2003). Do ponto de vista aplicado ao melhoramento vegetal, um dos tipos de células mais interessantes para regenerar indivíduos é a precursora de gametas, devido à possibilidade de regenerar indivíduos haploides ou duplo-haploides (DH), como é o caso dos óvulos (presentes no interior do ovário) e dos micrósporos (presentes no interior das anteras) (Seguí-Simarro, 2010).

A embriogênese proveniente de micrósporos é geralmente induzida pela reprogramação celular dos micrósporos, alterando sua via de desenvolvimento gametofítico para o crescimento e desenvolvimento esporofítico. Sob condições naturais, o micrósporo desenvolve-se em um grão de pólen maduro que compreende dois núcleos reprodutivos e um vegetativo. Assim, a alteração para o desenvolvimento esporofítico deve ser iniciado antes do início da divisão celular, quando os micrósporos não estão comprometidos a seguirem a via de desenvolvimento gametofítico (Genovesi e Collins, 1982).

Essa mudança da ontogenia normal de um micrósporo visando a passagem para a via esporofítica requer profundas modificações na morfogênese celular. Conforme o modelo proposto por Grande e Moraes-Fernandes (1990), existem dois momentos em que o micrósporo poderia ter sua ontogenia alterada: o primeiro seria no início da meiose e o segundo momento, durante o estágio uninucleado do micrósporo (Seguí-Simarro, 2010).

Embora não exista um consenso sobre o início e o ponto final exatos entre os quais a reprogramação pode ser universalmente alcançada, parece que os micrósporos uninucleados são especialmente adequados para serem induzidos. Isto é, provavelmente, devido ao seu estado de transcrição, ainda não totalmente diferenciado (Malik et al., 2007), em oposição ao pólen maduro, onde um programa de expressão específico para genes de maturação de pólen é ativado (Honys e Twell, 2004).

No milho, a cultura de anteras possui um comportamento recalcitrante e os trabalhos que utilizaram anteras, contendo em seus interiores micrósporos em estágio uninucleado de desenvolvimento celular, alcançaram os melhores resultados na resposta embriogênica (Genovesi and Collins, 1982; Barnabás et al., 1999; Spitkó et al., 2006; Jager et al., 2010; Hosseini e Cheshmeali, 2015).

#### **3.1.2.4 Aspectos morfológicos do estágio uninucleado em *Zea mays* L.**

Do ponto de vista morfológico, o estágio uninucleado em milho é alcançado antes da emergência do pendão que ocorre cerca de seis a oito semanas após a semeadura a depender do genótipo e ambiente cultivado. Após esse período, as células gaméticas passam a conter três núcleos (dois generativos e um vegetativo), passando a ser denominados 'grãos de pólen' e, portanto, comprometidos a seguirem o desenvolvimento gametofítico ao invés do crescimento e desenvolvimento esporofítico (Cheng e Neuffer, 1989).

Além do período que precede o pendoamento, o estágio uninucleado de desenvolvimento celular também é observado em diferentes regiões de um mesmo pendão. Isso porque, o desenvolvimento da espiguetta superior precede o do inferior do pendão, gerando micrósporos em diferentes estádios de desenvolvimento. Essa diferença de desenvolvimento pode variar entre os genótipos com o estágio de desenvolvimento, e é mantida até a antese, onde os estádios celulares posteriormente se homogenizam (Cheng e Pareddy, 1994).

Outro problema é que a ocorrência desses estádios é muito variável, por ser dependente da temperatura. Por isso, é preferível expressar o estágio de desenvolvimento da planta em graus-dia, ou soma térmica, do que em número de dias (Streck et al., 2006). O conceito de graus-dia parte do seguinte princípio: o desenvolvimento de uma espécie vegetal está relacionado com o meio-ambiente em cada fase fenológica ou no ciclo da cultura e é controlado a partir da soma térmica diária necessária para cada estágio (Carvalho et al., 2013).

Para que se possa fazer a estimativa climatológica da data de ocorrência de cada um dos principais estádios de desenvolvimento da planta, é necessário que se estabeleçam as exigências térmicas de cada cultivar para atingir os distintos estádios. Os valores de temperatura basal inferior variam de acordo com a espécie e o cultivo. Alguns trabalhos também utilizam valores diferentes para

cada etapa do desenvolvimento da planta. Para a cultura do milho, por exemplo, é utilizado um valor de 10°C como temperatura basal inferior (Assis et al., 2006).

Apesar de existirem métodos que colaborem para uma descrição cada vez mais detalhada sobre o momento em que a célula está mais apta a responder positivamente a cultura de anteras na formação de embriões, (Maraschin et al., 2005; Touraev et al., 2001; Moraes et al., 2008 e Seguí-Simarro 2010), são raros os trabalhos em milho que correlacionem características morfológicas da planta doadora de micrósporos em conjunto com uma cronologia adequada. Essa correlação seria útil para que fosse incorporada na metodologia da técnica, haja vista a importância de coletar os micrósporos no período ideal para garantir alta responsividade *in vitro* (Pierre et al., 2011).

### **3.1.3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1.3.1 Material Genético**

Foram utilizadas duas populações de milho (*Zea mays* L.) pertencentes a grupos heteróticos distintos: população CIMMYT-11, pertencente a um grupo heterótico tipo 'duro' e população PIRANÃO-11, pertencente a um grupo heterótico 'dentado', além de um híbrido interpopulacional oriundo dessas populações (CIMMYT11 X PIRANÃO11) denominado UENF 506-11.

Ambas as populações possuem um gene braquítico que confere a característica de porte mais baixo às plantas. Estas populações são oriundas da Universidade Federal de Viçosa (UFV), onde foram trabalhadas até o quinto ciclo de seleção recorrente recíproca. Do sexto ciclo em diante foi dado prosseguimento ao melhoramento dessas populações na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), onde o mesmo se encontra no 16º ciclo de seleção recorrente recíproca. Essas populações possuem um alto nível de heterozigose, proporcionando maior variabilidade genética das potenciais linhas duplo-haplóides a serem obtidas, caracterizadas e selecionadas para a produção de novos híbridos.

### 3.1.3.2 Determinação do estágio de desenvolvimento do micrósporo

O experimento foi realizado na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, situada em Campos dos Goytacazes – RJ, às coordenadas geográficas 21°45'43''S e 41°17'23''W, altitude média de 11 metros, no período entre os meses de março a maio de 2017. Para a determinação do estágio de desenvolvimento do micrósporo, foi realizado o plantio das sementes das populações (CIMMYT-11 e PIRANÃO-11) e do híbrido (UENF 506-11). Os pendões foram coletados em cinco diferentes períodos de tempo, com intervalos de 24 horas entre uma coleta e outra (Tabela 2). A coleta foi iniciada no período fenológico que antecede a antese (com o pendão ainda dentro do cartucho do milho), a fim de determinar o momento propício que contenha a maior concentração de células no estágio uninucleado de desenvolvimento do micrósporo.

**Tabela 2.** Períodos de coleta do pendão determinados de acordo com os dias próximos ao /estádio fenológico de pendoamento para as condições ambientais submetidas. Campos dos Goytacazes - RJ, 2018.

Dias de coleta	Dias após a germinação
1	54
2	55
3	56
4	57
5	58

O estudo foi conduzido em casa de vegetação coberta com filme agrícola de 150 micrômetros de espessura e tela de sombreamento de 35%. As sementes foram semeadas em vasos de 5L, contendo substrato Basaplant® Hortaliças suplementado com 15g por vaso de NPK, formulação 04-14-08, conforme as indicações técnicas para a cultura do milho.

Cada pendão foi dividido em três áreas distintas (apical, mediana e basal) (Figura 1). As espiguetas foram coletadas nestas três regiões do pendão, uma vez que ao longo destas, existem micrósporos em diferentes estádios de desenvolvimento celular. Esse procedimento teve como objetivo obter marcadores

morfológicos mais precisos, com o intuito de determinar a fase ideal de retirada das espiguetas para a cultura de anteras.



**Figura 1.** Esquema de representação das regiões do pendão de milho consideradas para o estudo.

As anteras foram retiradas das espiguetas logo após sua coleta e foram medidos o perímetro, diâmetro e comprimento das mesmas, utilizando um *scanner* adaptado para análise de sementes SAS<sup>®</sup>. O equipamento é composto por um módulo de captação e um *software* de análise. As anteras foram colocadas sobre uma bandeja acrílica no módulo de captação e sua imagem foi capturada e analisada para posterior coleta dos dados.

O estudo foi conduzido em um delineamento em blocos casualizados, em um esquema fatorial 5x3, com quatro repetições, sendo cinco períodos de coleta dos pendões, após o surgimento dos mesmos dentro do cartucho do milho (54, 55, 56, 57 e 58 dias) e três diferentes genótipos (CIMMYT11, PIRANÃO11 e UENF 506-11). Cada repetição foi constituída por uma planta em um vaso com 5L de substrato. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e os dados quantitativos, submetidos à análise de regressão com o auxílio do programa Genes<sup>®</sup>.

Para a representação da correlação entre os dias de coleta estabelecidos com o estágio celular estudado, foi efetuado o cálculo de graus-dia ( $^{\circ}\text{C dia}$ ), por meio do somatório da diferença entre a temperatura média diária ( $T_m$ ) e a temperatura basal ( $T_b$ ) de  $10^{\circ}\text{C}$ , da emergência até a ocorrência do estágio uninucleado na planta. A temperatura média diária do ar foi obtida pela média aritmética entre as temperaturas máximas e mínimas absolutas, monitoradas por meio de um aparelho datalogger Kimo<sup>®</sup> (Kistock Modelo KH-110 AO).

O cálculo utilizado para a definição de graus dias foi proposto por Arnold (1959):



$$GD = \frac{TM + Tm}{2} - Tb$$

em que: GD = graus-dia, °C; TM = temperatura máxima do dia, °C; Tm = temperatura mínima do dia, °C; Tb = temperatura basal inferior, °C.

### 3.1.3.3 Análise citogenética

Com o objetivo de correlacionar os dados morfológicos com o estágio de desenvolvimento do micrósporo, as anteras coletadas foram submetidas à análise citogenética. Sendo assim, as espiguetas foram coletadas e fixadas em solução de etanol absoluto: ácido acético glacial, na proporção de 3:1, por 24h a 4°C. Em seguida, transferidas para uma solução de álcool 70% e conservadas em geladeira a 4°C até serem utilizadas.

Para o preparo das lâminas, três anteras de cada espiguetas por indivíduo, de cada genótipo estudado, foram maceradas (*squash*) sobre a lâmina em gotas de carmin acético 1%. Em seguida, os resíduos das anteras foram retirados da lâmina e o carmin acético junto aos micrósporos foram cobertos por uma lamínula para observação com auxílio de um microscópio óptico (Bioval®).

A contagem das células se deu classificando-as conforme a Figura 2:



**Figura 2.** Estádios celulares de micrósporos de *Zea mays* L.. Células meióticas (a); Tétrade (b); Células uninucleadas (c); Células binucleadas (d). Seta: Núcleo. Barra: 20µm

O estudo foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado em um esquema fatorial 5x3, sendo cinco períodos de coleta dos (54, 55, 56, 57 e 58

dias) e três diferentes genótipos (CIMMYT11, PIRANÃO11 e UENF 506-11). Cada repetição foi constituída por uma lâmina, onde foram contabilizadas 300 células. Foram realizadas cinco repetições e ao final do processo, as anteras dos tratamentos que apresentaram os maiores índices de micrósporos, no estágio uninucleado, foram correlacionados com os períodos de coletas determinados no início do experimento.

#### **3.1.3.4 Análise estatística**

Foram analisadas as pressuposições de normalidade e de homogeneidade de variâncias dos tratamentos, respectivamente, pelos testes de Lilliefors e Cockram e Bartlet, os quais indicaram a necessidade do uso da transformação raiz de  $Y + 0,5 - \text{SQRT}(Y + 0,5)$  apenas para as variáveis tempo (T) e genótipo (G) na etapa “Diferenças na concentração de células no estágio uninucleado”.

Posteriormente, todos os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os dados relacionados ao período de coleta foram submetidos à análise de regressão. Os resultados foram apresentados com médias não transformadas. Utilizou-se o programa computacional Genes (Cruz, 2013).

### **3.1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1.4.1 Aspectos morfológicos para correlação de estágio celular**

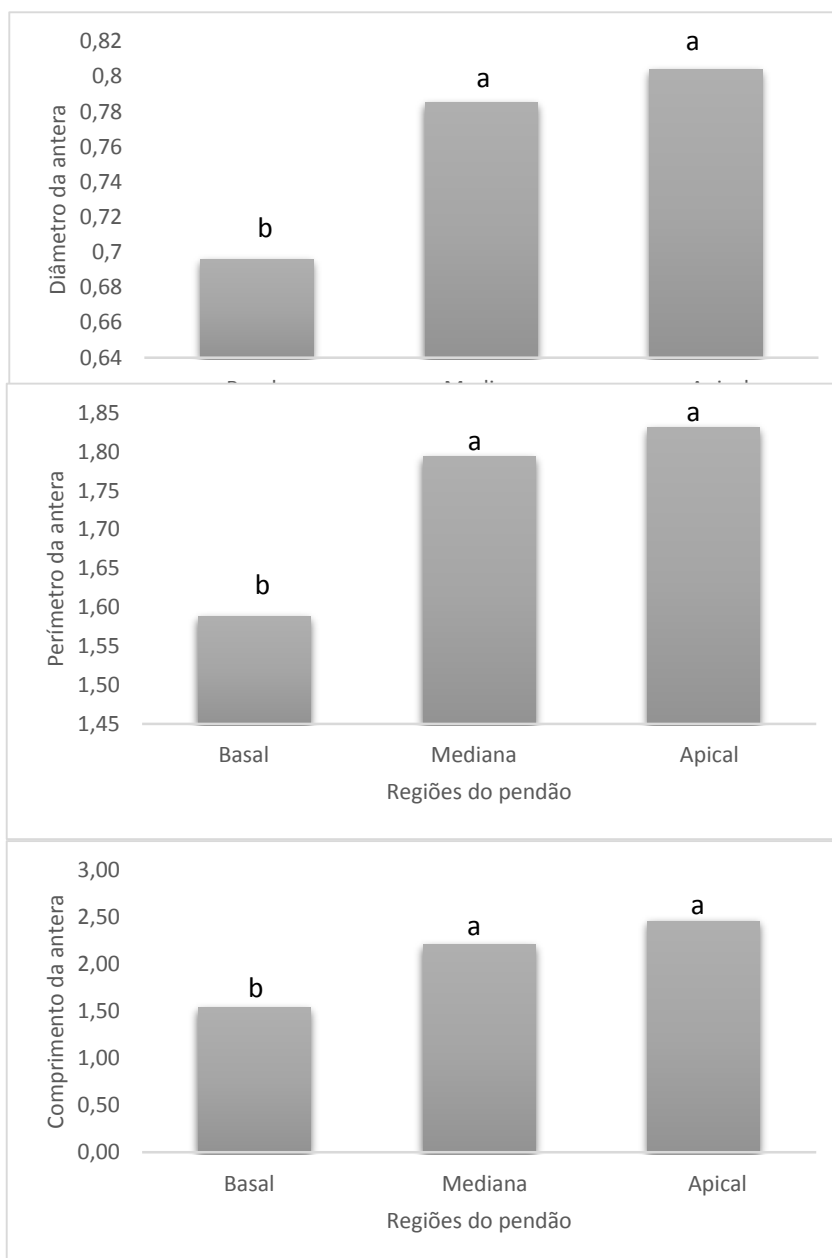
A análise de variância revelou que todos os fatores (genótipo, tempos de coleta do pendão e região do pendão), bem como a interação genótipo x tempo, contribuíram significativamente ( $P < 0,05$ ) para as diferenças observadas no diâmetro, perímetro e comprimento das anteras estudadas (Tabela 3).

**Tabela 3.** Resumo da análise de variância com quadrados médios para os efeitos do Genótipo (G), Tempo (T) e Região do pendão (R) e suas interações em relação à média de comprimento das anteras de *Zea mays* L. Campos dos Goytacazes - RJ, 2018.

<b>Efeitos</b>	<b>GL</b>	<b>QM<sup>a</sup> Diâmetro</b>	<b>QM<sup>a</sup> Perímetro</b>	<b>QM<sup>a</sup> Comprimento</b>
Genótipo (G)	2	0,0717*	0,6198*	4,1851*
Tempo (T)	4	0,1009*	0,7523*	3,6517*
Região (R)	2	0,2000*	1,2601*	18,4776*
<b>Interações</b>				
G x T	8	0,0270*	0,2248*	1,6029*
G x R	4	0,0085 <sup>ns</sup>	0,1399 <sup>ns</sup>	0,6877 <sup>ns</sup>
T x R	8	0,0175 <sup>ns</sup>	0,1058 <sup>ns</sup>	0,4312 <sup>ns</sup>
G x T x R	16	0,0199 <sup>ns</sup>	0,1057 <sup>ns</sup>	0,4092 <sup>ns</sup>
Resíduo	135	0,0162	0,0852	0,4092
CV (%)		16,72	16,38	35,14

<sup>a</sup> **ns** e **\*** indicam não significância e significância em  $P < 0,05$ , respectivamente.

Para os três genótipos analisados (CIMMYT-11, PIRANÃO-11 e UENF-506-11), não houve diferenças significativas no diâmetro, perímetro e comprimento das anteras entre a região mediana e apical do pendão. No entanto, houve diferença significativa entre essas regiões em relação à região basal, que apresentou valores menores para estas variáveis (Figura 3).



**Figura 3.** Diâmetro, perímetro e comprimento, respectivamente, das anteras localizadas entre as regiões basal, mediana e apical do pendão. As médias seguidas por letras iguais não diferem entre si ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

As informações obtidas corroboraram com a descrição feita por Cheng e Pareddy (1994), em que o desenvolvimento das anteras em milho inicia-se na região superior do pendão, seguido pelas demais. Posteriormente, esse desenvolvimento se normaliza ao longo do pendão, quando o mesmo está apto a iniciar a antese.

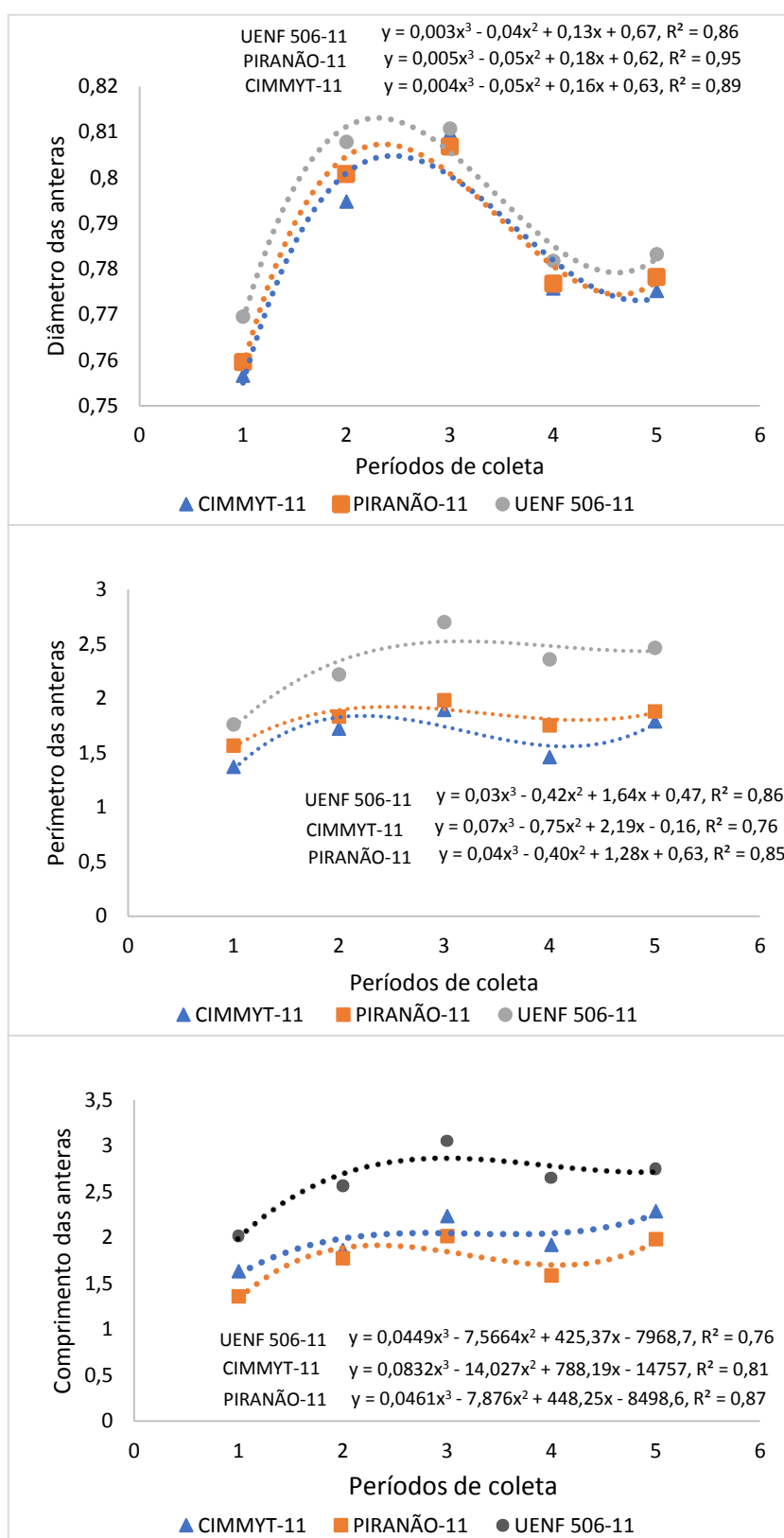
Esses dados indicam uma possível simplificação para apenas duas regiões de coleta para a cultura de anteras: a porção mediana até o ápice e a base (Figura 4).



**Figura 4.** Esquema indicando a simplificação na demarcação de regiões ao longo do pendão com base em parâmetros morfológicos.

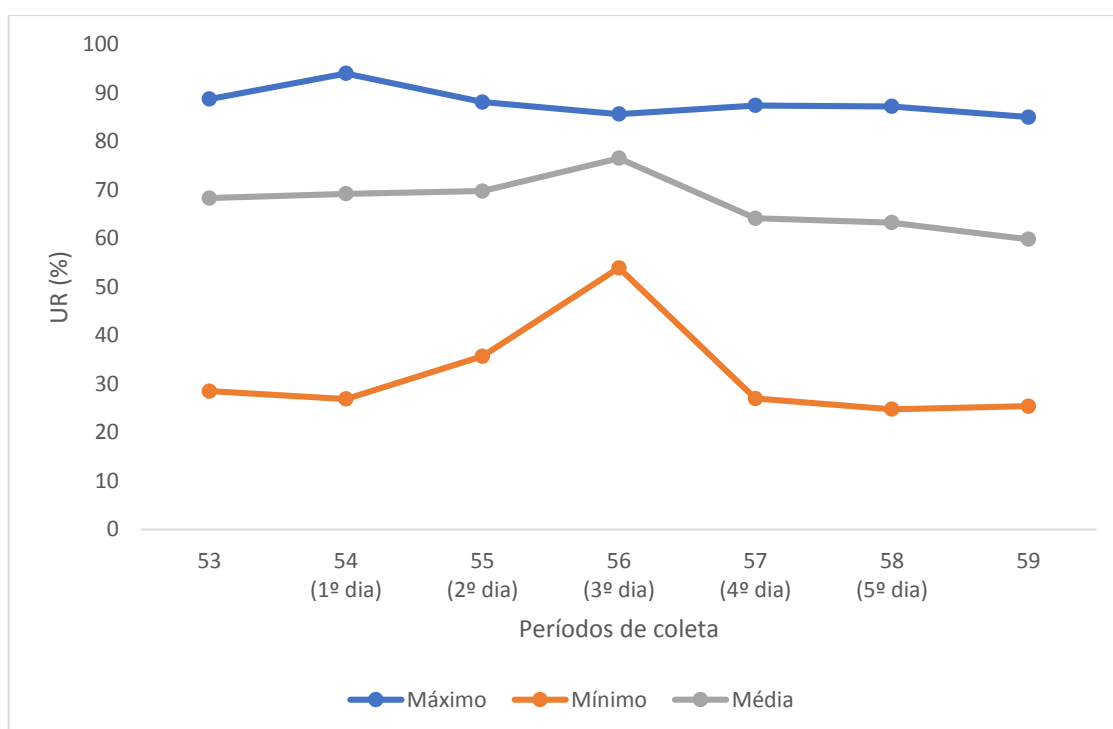
Houve interação entre os períodos de coleta e os genótipos para as três variáveis morfológicas: diâmetro, perímetro e comprimento das anteras (Tabela 3). O híbrido UENF 506-11 apresenta valores superiores aos dos seus progenitores (CIMMYT-11 e PIRANÃO-11) para as três variáveis, independente do período de coleta, evidenciando a existência do efeito da heterose no crescimento e desenvolvimento das anteras do híbrido, em relação aos seus genitores (Figura 5).

Quando analisadas as médias de diâmetro, perímetro e comprimento das anteras, entre os intervalos do terceiro e quarto dia de coleta, é observada uma tendência de crescimento anormal, uma vez que as anteras oriundas do terceiro dia de coleta apresentaram uma média de tamanho superior ao quarto dia de desenvolvimento, não seguindo, portanto, uma lógica de crescimento normal ao longo do tempo (Figura 5).



**Figura 5.** Diâmetro, perímetro e comprimento das anteras em função dos períodos de coleta de pendão. (Períodos de coleta: 1= 54 dias, 2= 55 dias, 3= 56 dias, 4= 57 dias e 5= 58 dias).

Quando analisadas as condições ambientais no período de coleta das anteras, foi observado um aumento na umidade relativa (UR) média e mínima do ar, no segundo e terceiro dia. Este fato pode ter causado um aumento no teor de água das anteras e consequente aumento das mesmas, no segundo e terceiro dia de coletas. A redução da umidade relativa média e mínima no quarto dia de coleta coincide com a diminuição das medidas de diâmetro, perímetro e comprimento das anteras, no dia em questão (Figura 6).

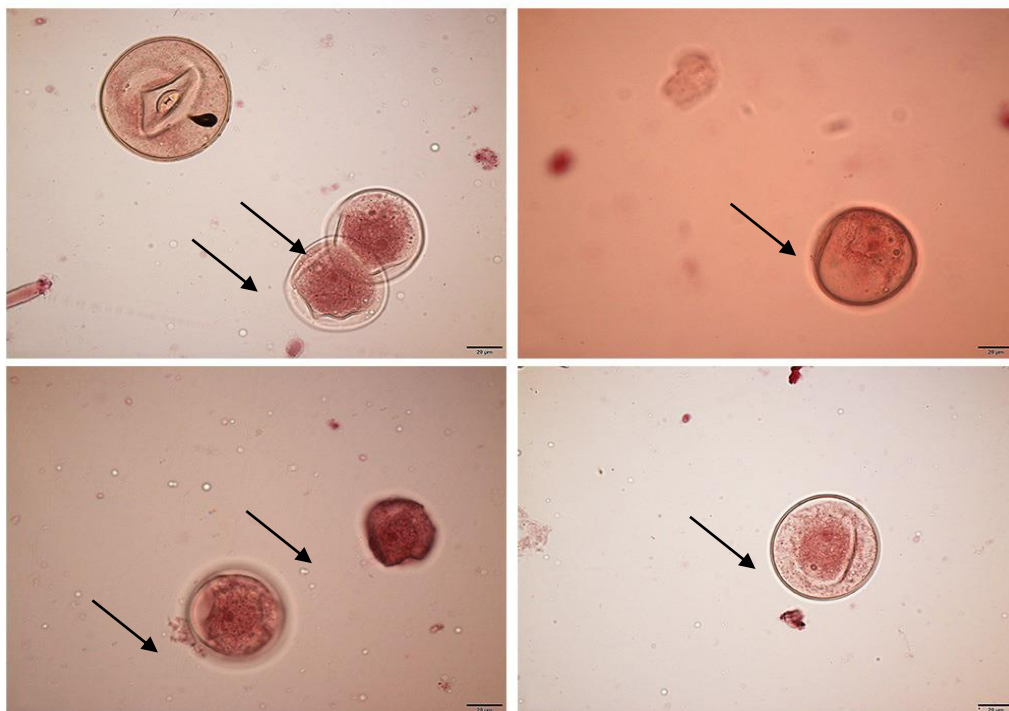


**Figura 6.** Variações de umidade relativa na casa de vegetação ao longo dos períodos de coleta.

Essas observações indicam que o diâmetro, o perímetro e o comprimento das anteras são dependentes da UR, não sendo parâmetros morfológicos confiáveis para a determinação do estágio celular dos micrósporos. Esse fato também foi observado por Moraes et al. (2008), que relataram que a influência ambiental pode interferir no estabelecimento correto de correlações entre parâmetros morfológicos para marcação de estágio celular, portanto, não sendo considerados indicadores confiáveis para o mesmo nos genótipos testados.

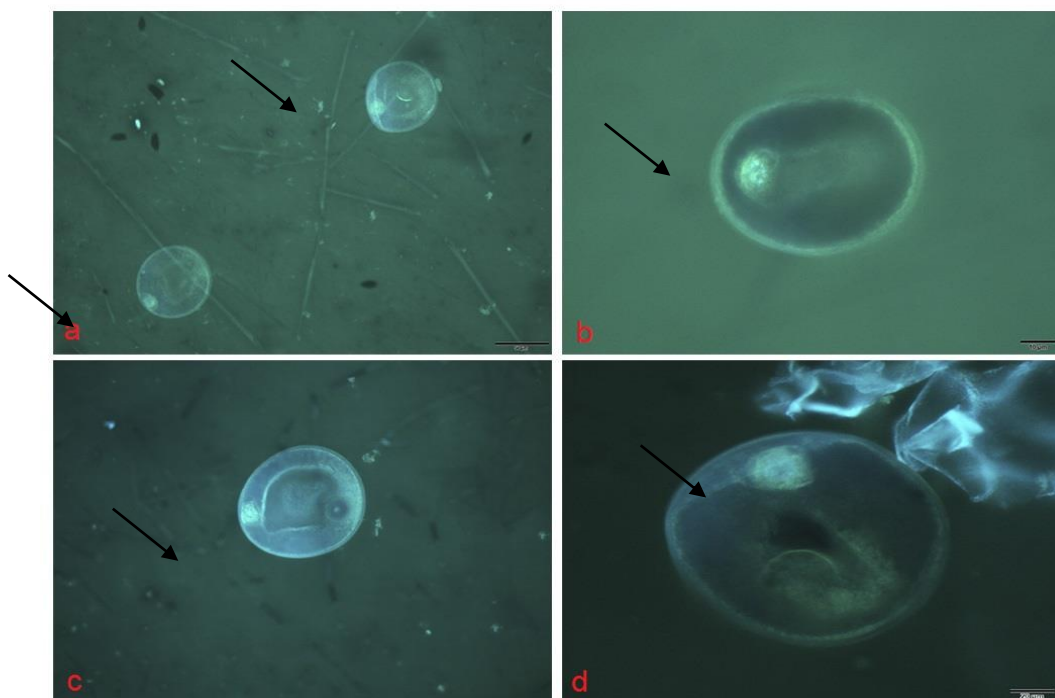
### 3.1.4.2 Diferenças na concentração de células no estágio uninucleado

O estágio uninucleado de desenvolvimento dos micrósporos está representado nas Figuras 7 e 8.



**Figura 7** Micrósporos em estágio uninucleado de desenvolvimento, observados em microscópio e corados com Carmin acético a 1%. Setas: núcleo celular. Escalas: 20μm.





**Figura 8.** Micrósporos em estágio uninucleado de desenvolvimento, observados em microscópio e corados com Hoechst a 0,5%. Setas: único núcleo celular. Escalas: 50µm (a), 10µm (b), 30µm (c), 20µm (d).

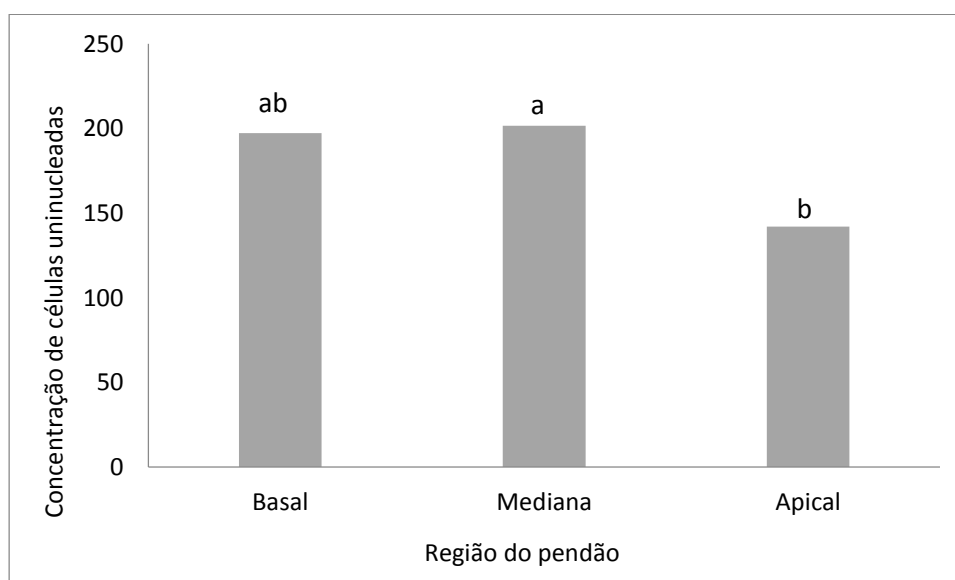
Para a concentração de células em estágio uninucleado no interior das anteras, houve diferença significativa entre os períodos de coleta, e entre as regiões do pendão. Os genótipos estudados não apresentaram diferença significativa na concentração de células em estágio uninucleado e não houve interação entre os fatores (Tabela 4).

**Tabela 4.** Resumo da análise de variância com quadrados médios para os efeitos do Genótipo (G), Tempo (T), Região do pendão (R) e suas interações na concentração de células no estágio uninucleado de desenvolvimento do micrósporo em *Zea mays* L. Campos dos Goytacazes - RJ, 2018.

Efeitos	GL	QM <sup>a</sup>
<b>Genótipo (G)</b>	4	79,2175 <sup>ns</sup>
<b>Tempo (T)</b>	2	28,4131 <sup>*</sup>
<b>Região (R)</b>	2	70,3644 <sup>*</sup>
<b>Interações</b>		
<b>G x T</b>	8	32,8739 <sup>ns</sup>
<b>G x R</b>	8	11,1731 <sup>ns</sup>
<b>T x R</b>	4	5,5838 <sup>ns</sup>
<b>G x T x R</b>	16	29,0016 <sup>ns</sup>
<b>Resíduo</b>	135	21,3253
CV (%) = 36.53		

<sup>a</sup>ns e \* indicam não significância ou significância respectivamente em  $P < 0,05$ .

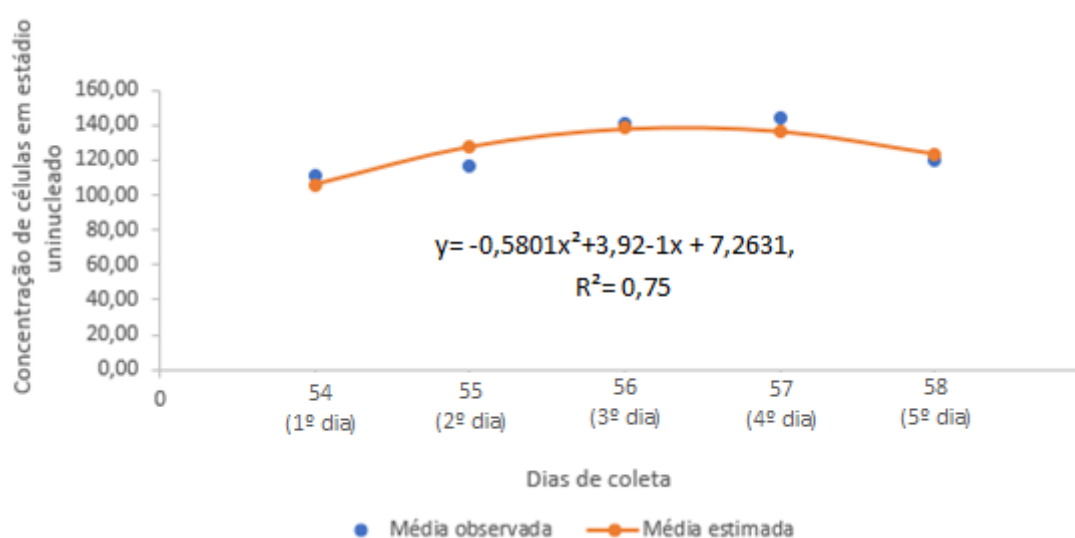
Em relação às regiões existentes ao longo do pendão e sua correlação com a concentração de células no estágio uninucleado de desenvolvimento, a região apical apresentou as menores médias, diferindo-se da região mediana. A região basal não difere das demais (Figura 9).



**Figura 9.** Concentração de células uninucleadas por região do pendão. As médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Esses dados divergem dos resultados obtidos anteriormente para os parâmetros morfológicos das anteras (Figura 3), em que foi possível separar as regiões apical e mediana da região basal. Quando analisado a nível celular, o maior número de células uninucleadas é encontrado nas regiões medianas e basais. Esses dados reforçam a evidência de que o diâmetro, perímetro e comprimento da antera não são marcadores morfológicos eficazes para concentração de células uninucleadas nos genótipos estudados.

Em relação aos períodos de coleta testados, foi observada uma maior concentração de células em estágio uninucleado de desenvolvimento no terceiro e quarto dia de coleta para todos os três genótipos, indicando serem períodos potenciais para coleta de células no estágio em questão (Figura 10).



**Figura 10.** Concentração de células no estágio uninucleado de desenvolvimento do micrósporo, em função dos períodos de coleta.

Apesar do período de tempo fornecer informações mais precisas acerca do momento onde há a maior concentração de células em estágio uninucleado, essas informações podem variar conforme as condições ambientais, às quais a planta foi submetida. Assim sendo, a representação dos dias de coleta em graus/dias é mais precisa na definição do estágio uninucleado. (Tabela 5).

**Tabela 5.** Representação dos dias de coleta em graus dias e graus dias acumulados desde a semeadura, destacados em negrito os dias que apresentaram as maiores médias de células no estágio uninucleado de desenvolvimento do micrósporo em *Zea mays* L. Campos dos Goytacazes - RJ, 2018.

Dia de coleta	Dias após semeadura	Graus dias (°C dia)	Graus dias Acumulados (GDA) desde a semeadura
1º dia	54	20,66	1169,17
2º dia	55	15,35	1184,52
<b>3º dia</b>	<b>56</b>	<b>18,61</b>	<b>1203,14</b>
<b>4º dia</b>	<b>57</b>	<b>20,19</b>	<b>1223,33</b>
5º dia	58	21,28	1244,62

As somas térmicas obtidas neste trabalho são superiores aos valores obtidos por Hanashiro et al. (2013), por exemplo, que obteve em condições de campo a soma térmica relativa ao período de semeadura até o pendoamento (VT), 860 °C e 855 °C dia para os genótipos AG 7088 HS e DKB 370, respectivamente. A provável razão dessa diferença é que o presente trabalho foi realizado em casa de vegetação, onde possivelmente houve um atraso no desenvolvimento devido ao sombreamento, corroborando com a diminuição na disponibilidade de luz no ambiente e interferindo diretamente na fenologia da planta. Algo similar foi observado por Moraes et al. (2008), em que compararam a fenologia do milho em estádios específicos da microsporogênese em diferentes ambientes: câmara de crescimento e campo. Os resultados mostraram que para todos os genótipos analisados, os que foram submetidos à câmara de crescimento apresentaram um retardo no desenvolvimento, se comparados às plantas cultivadas em campo.

Sendo assim, para vias de confiabilidade, os valores médios obtidos neste trabalho devem ser tomados como base em plantios realizados em condições de casa de vegetação

### 3.1.5 CONCLUSÕES

- O tamanho das espiguetas e das anteras de milho são altamente influenciadas pelas condições ambientais;
- O diâmetro, o perímetro e o comprimento das anteras não são marcadores morfológicos confiáveis para estabelecer o estágio uninucleado do micrósporo em milho;
- O período de tempo, expresso em soma térmica, é o marcador mais preciso para o estabelecimento do estágio uninucleado do micrósporo em milho;
- Para a obtenção da maior concentração de células no estágio uninucleado do micrósporo para os genótipos estudados, em condições de casa de vegetação, é recomendável realizar a coleta das anteras na região mediana do pendão, com aproximadamente 1200°C dias, contados a partir da germinação.

## 3.2 CULTURA DE ANTERAS EM MILHO COMUM (*Zea mays* L.)

### 3.2.1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) não é apenas considerado uma cultura de importância mundial como alimento, ração ou como fonte de diversos produtos industriais importantes, mas também é conhecido como uma planta com imensa diversidade genética. Embora tenha sido domesticado pela primeira vez no México, encontra-se difundido em todos os continentes (Prasanna, 2012). No Brasil, o cultivo do milho está presente em todos os Estados, tornando-se componente importante na renda de milhões de pessoas (Araújo e Nass, 2002).

Devido à natureza alógama do milho, em que a heterose é amplamente explorada para obter características agrônomicas desejáveis, a produção de linhagens homocigotas para formação de novos híbridos constitui uma importante etapa para tal. No entanto, a utilização de métodos convencionais de autofecundação para produção de linhagens, pode demandar de seis a oito gerações, tornando o processo demorado e de custo elevado. Em função disto, melhoristas têm procurado métodos que acelerem esse processo. Um deles é o emprego da tecnologia de duplo-haploides (Pierre et al., 2011).

Neste contexto, a produção de plantas duplo-haploides, por meio da cultura de anteras, revela-se como uma ferramenta útil. Ao contrário dos programas convencionais de melhoramento, em que são necessários numerosos ciclos de plantio e colheita de populações segregantes, a regeneração de plantas férteis a

partir de células de gametófitos, permite o desenvolvimento de linhagens em menor tempo (Palú et al., 2003).

A cultura de anteras é um método que vem sendo utilizado em diversas espécies como, *Solanum tuberosum* (batata) (Wenzel e Wehr, 2012), *Oryza sativa* (arroz) (Cha-um et al., 2009), *Hordeum vulgare* (cevada) (Lazaridou et al., 2011) e *Nicotiana tabacum* (tabaco) (Sunderland, 2012). Os chineses foram os primeiros a relatar a cultura de anteras bem sucedida em milho (Genovesi e Collins, 1982). A partir daí, diversos protocolos foram testados por Ku et al. (1978), Miao et al. (1981), Genovesi e Collins (1982), Petolino e Thompson (1987) e Barnabás et al. (1999). No entanto, estes autores não obtiveram resultados estáveis quando testados para outros genótipos, gerando taxas de sucesso inferiores a 20%. A responsividade da cultura de anteras em milho é considerada genótipo-dependente, portanto, sendo necessário encontrar protocolos que sejam eficientes para genótipos elite (Pierre et al., 2011).

Até o momento, pouco se sabe sobre a capacidade androgenética de genótipos brasileiros, tornando necessário testar novos germoplasmas e protocolos. No entanto, poucos trabalhos dessa natureza são encontrados sob domínio público (Pierre et al., 2011). A Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF) possui um renomado programa de melhoramento de milho, em que estes aspectos relacionados à capacidade androgenética podem ser amplamente estudados e futuramente agregar valor à dinâmica de produção de novas linhagens e lançamento de novos híbridos, enfatizando a importância deste trabalho.

### **3.2.2 REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.2.2.1 Importância Econômica**

O milho é empregado para produção de centenas de produtos e subprodutos como pães, farinha, massas e até servir como base para produção de antibióticos. O cereal também é utilizado como insumo industrial na produção

de amido, óleo, açúcar, proteína, celulose e álcool etílico. Entretanto, seu principal uso está vinculado à alimentação animal, em que é utilizado como ração para aves, bovinos, peixes e suínos, resultando em 70% do consumo mundial do grão (Morris, 2002).

Apesar da alimentação humana não ser a principal forma de utilização do milho, em algumas regiões do planeta o milho constitui a principal fonte de alimento, como ocorre em populações da África Subsaariana, México e outras regiões da América. Em algumas partes da Mesoamérica, o milho sozinho contribui com mais de 20% das calorias alimentares da população (Shiferaw et al., 2011; Silva et al., 2012).

Possuindo uma produção mundial de 1,075 bilhões de toneladas na safra de 2016/17, atualmente o milho é o cereal mais cultivado no mundo. Os Estados Unidos, seguidos pela China, Brasil e Argentina, são os maiores produtores, representando 70% da produção mundial (USDA, 2018).

Dentro deste cenário, o Brasil, conta com uma área cultivada de 17,7 milhões de hectares e uma produção de 95 milhões de toneladas conforme a safra 2016/17. Atualmente o milho é cultivado em praticamente todo o território nacional, merecendo destaque as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste. Diante disso, a cultura é considerada estratégica para o desenvolvimento do país, pois além de ser o terceiro maior produtor de milho, ocupa o posto de segundo maior exportador mundial do cereal (USDA, 2018).

Embora o Brasil ocupe lugar de destaque nos índices de produtividade mundial de milho, o Estado do Rio de Janeiro obteve uma produtividade média de apenas 2,4 t ha<sup>-1</sup>, em uma área média de 3.300 hectares plantados, sendo considerada uma produtividade média baixa em comparação com a média nacional de 5,4 t ha<sup>-1</sup> (Conab, 2016).

### **3.2.2.2 Melhoramento de milho**

O milho (*Zea mays* L.) é detentor da caracterização genética mais detalhada dentre as espécies cultivadas. O milho foi uma das primeiras espécies cultivadas a ser trabalhado nos laboratórios de genética para estudos básicos de mitose, meiose, segregação cromossômica, ligação genética e efeitos de *crossing-over* e de elementos de transposição (Pierre et al., 2011).



No início do século XX, o cientista estadunidense George Harrison Shull criou a primeira proposta para a produção de sementes híbridas de milho. Ele revelou que, ao fecundar a planta com o próprio pólen (autofecundação), eram produzidos descendentes menos vigorosos. No entanto, quando repetido o processo por seis ou oito gerações, os descendentes fixavam características agrônomicas importantes. Após esse processo, esses descendentes eram denominados “linhas puras”. Shull observou que duas linhas puras e distintas ao serem cruzadas entre si produziam descendentes com alto vigor, chamado de vigor híbrido ou heterose, dando origem ao milho híbrido (Shull, 1948).

No Brasil, o primeiro programa de melhoramento de milho foi desenvolvido em 1932, no Instituto Agrônomo - IAC, em Campinas. No entanto, em 1938, os pesquisadores da Universidade Federal de Viçosa, Antônio Secundino e Gladstone Drummond produziram o primeiro híbrido comercial, fruto de um cruzamento entre as variedades Cateto e Amarelão. Os trabalhos destes pesquisadores tiveram continuidade com a fundação da companhia Sementes Agroceres S/A. A contribuição desta tecnologia para o desenvolvimento do agronegócio no Brasil é inquestionável (Fancelli e Lima, 1982).

Atualmente no Brasil, existem diversos programas de melhoramento genético de milho, em instituições como Embrapa Milho e Sorgo, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Universidade Federal de Lavras (UFLA), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz-ESALQ/USP, Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal-UNESP, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), além de diversas instituições privadas.

Desde o ano de 1996, a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) vem conduzindo um programa de melhoramento genético de milho, com a finalidade de oferecer aos agricultores, sementes de qualidade adaptadas às regiões Norte e Noroeste Fluminense, como os híbridos intervarietais ‘UENF 506-6’, ‘UENF 506-8’ e o ‘UENF 506-11’, os quais expressam excelente comportamento agrônomico.

Neste contexto, a cultura de tecidos vegetais apresenta grande potencial para seu emprego nos programas de melhoramento de milho (Golle et al., 2009). Ela pode ser utilizada desde a multiplicação de material genético, na troca e

avaliação de germoplasma, até a produção de linhagens para a produção de novos híbridos.

### 3.2.2.3 Cultura de Tecidos Vegetais: Cultura de Anteras

A cultura de tecidos vegetais engloba técnicas de cultivo em meio nutritivo, em condições assépticas, de células, tecidos ou órgãos de planta, sob condições controladas de fotoperíodo, temperatura e de outros fatores. A cultura de tecidos vegetais tem sido utilizada na limpeza clonal para recuperação de plantas livres de vírus e outros agentes causadores de doenças; na conservação e intercâmbio de germoplasma *in vitro*; na micropropagação rápida de plantas; no melhoramento genético, auxiliando na recuperação de híbridos interespecíficos de cruzamentos com incompatibilidade pós-zigótica; na transformação genética de plantas; na produção de haploides, por meio da cultura de óvulos, micrósporos e anteras, dentre outras aplicações (Carvalho et al., 2011).

No que diz respeito à produção de haploides, a cultura de anteras vem se destacando em diversos programas de melhoramento de *Triticum aestivum* L. (Soriano et al., 2007; Grauda et al., 2010), *Oryza sativa* L. (Talebi et al., 2007; He et al., 2006), *Capsicum* sp. (Mityko et al., 1995; Shrestha et al., 2011) e *Zea mays* L. (Genovesi; Collins, 1982; Barnabás et al., 1998; Jager et al., 2010).

A cultura de anteras consiste em excisar as anteras assepticamente dos botões florais e cultivá-las em meios de cultura, ricos em nutrientes necessários para que os micrósporos presentes nas anteras deem origem às plantas haploides. Posteriormente, o número de cromossomos pode ser duplicado com o uso de antimetabólitos. As plantas haploides, após a duplicação dos seus cromossomos, têm grande importância no melhoramento genético na redução do período para a obtenção de linhagens homocigotas (Carvalho et al., 2011).

Em espécies autógamas, onde os sistemas foram ajustados pela seleção natural para a homocigose, a integração entre estratégias de melhoramento e abordagens biotecnológicas tem permitido acelerar a obtenção da homocigose, gerando resultados valiosos em menos tempo. Em plantas alógamas, altamente heterocigotas, a produção de haploides *in vitro* possibilita a obtenção de linhagens puras, que podem ser utilizadas como progenitores no desenvolvimento de cultivares híbridas (Pierre et al., 2011).

A técnica vem sendo relatada em mais de 250 espécies, no entanto, inúmeros fatores afetam a resposta embriogênica da cultura de anteras, tais como o genótipo, o estado fisiológico e as condições de crescimento das plantas doadoras, o estágio de desenvolvimento do pólen, o pré-tratamento de flores ou anteras, o meio de cultura e as condições *in vitro* (Datta 2005).

Em milho, os chineses foram os primeiros a relatarem a cultura de anteras (Anon, 1975). Anteras cultivadas em meio MS (Murashige e Skoog, 1962) em estágio binucleado obtiveram uma resposta embriogênica positiva próxima de 1% com os genótipos utilizados. Em 1978 outras duas equipes chinesas iniciaram estudos com a cultura de anteras em milho: Miao et al. (1981) conseguiram 7% de resposta na produção de embriões utilizando o meio de cultura N6 (Chu 1981). No mesmo ano, Ku et al. (1978) publicaram resultados relatando 13% de resposta embriogênica utilizando o meio de cultura Yu-Pei (YP).

Kuo et al. (1986) identificaram importantes variáveis que determinam o sucesso da cultura de anteras em milho. A genótipo-dependência, isto é, a presença de genes específicos do pólen que controlam a capacidade dos micrósporos em se transformarem em plantas haploides, foi considerada de grande influência na resposta androgenética. A equipe também evidenciou a importância de utilizar níveis adequados de sacarose, fitoreguladores e carvão ativado nos meios de cultura (Forster et al., 2007; Pierre et al., 2011).

A publicação de trabalhos utilizando a cultura de anteras fora da China ocorreu em 1981. Cada um desses trabalhos foi dependente da obtenção de germoplasma responsivo da China. Um foi por Nitsch et al. em 1982, com taxas de resposta entre 3% e 10%. A equipe utilizou meios basais N6 ou YP. Outros artigos de confirmação foram de Brettell et al. (1981) e Genovesi e Collins (1982). Este último gerou duas grandes contribuições para trabalhos seguintes: a identificação de germoplasma americano responsivo e o uso de um pré-tratamento a frio, visando otimizar a resposta androgenética das anteras.

Em 1985, com o intuito de identificar germoplasmas de milho agronomicamente interessantes e responsivos à cultura de anteras, Petolino e Jones (1986) avaliaram 27 genótipos quanto à sua capacidade de produzir embriões a partir de anteras cultivadas *in vitro*. Ao menos 17 genótipos responderam com pelo menos uma antera produzindo embriões.

A partir daí diversos estudos sobre a cultura de anteras em milho foram publicados em todo mundo. Barnabás et al. (1999) e Obert e Barnabás (2004) investigaram a eficiência da colchicina como agente antimitótico para duplicação cromossômica em *Zea mays*, tendo em vista a baixa frequência de duplicação cromossômica espontânea. Jager et al. (2010) e Hosseini e Cheshmeali (2015) examinaram a composição dos meios de cultura utilizados em milho, visando aumentar a eficiência na frequência de embriões derivados dos micrósporos, além de outros trabalhos que buscaram contribuir com a melhoria da eficácia da técnica em milho (Tabela 6).

**Tabela 6.** Relação de trabalhos sobre cultura de anteras em milho, listados em ordem cronológica.

Referência	Meios	Responsividade
Anon (1975)	MS	1,00%
Miao (1980)	6M1	12,00%
Ku et al. (1978)	YP	13,10%
Miao et al. (1981)	N6	7%
Brettell et al. (1981)	N6	0,41%
Ting et al. (1981)	Zheng-14	17%
Genovesi e Collins (1982)	YP	18,30%
Barnabás et al. (1987)	N6	-
Petolino e Thompson (1987)	YP	6,30%
Obert e Barnabás (2004)	YP	15,80%
Jager et al (2010)	YP	27,00%
Hosseini e Cheshmeali	YP,N6	38%
Ismaili e Moammadi (2016)	IMSS,YP,N6	-

Apesar do evidente progresso ao longo dos anos, a cultura de anteras em milho ainda não apresentou resultados sólidos para sua utilização rotineira em programas de melhoramento de milho, apresentando problemas referentes a genótipo dependência, responsividade em meio de indução e de regeneração, tornando necessários mais estudos para otimizar a técnica (Pierre et al., 2011).

### 3.2.2.3 Produção de duplo-haploides

Para a produção de híbridos, em função da demora e do custo para obtenção de linhagens por meio de sucessivas autofecundações, os melhoristas têm procurado métodos que acelerem esse processo. O emprego da tecnologia de duplo-haploides tem se tornado alvo de pesquisas em diversas culturas como arroz, trigo, milho e pimenta. O trabalho pioneiro do emprego de duplo-haploides foi desenvolvido por Chase (1952) com *Zea mays* L. *apud* Pierre et al., 2011.

O duplo-haploide (DH) consiste em um genótipo que é formado quando as células (n) de um haploide são submetidas a um processo de duplicação cromossômica, de forma espontânea ou induzidas artificialmente. A tecnologia de DH encurta consideravelmente o ciclo de reprodução, porque torna possível uma rápida obtenção de linhagens totalmente homozigotas (em duas ou três gerações), em comparação com o processo convencional de desenvolvimento de linhagens endogâmicas que demoram, pelo menos, seis a oito gerações para obter linhagens com aproximadamente 99% de homozigose (Geiger e Gordillo, 2009).

Existem diferentes métodos para obtenção de plantas duplo-haploides, como a gimnogênese; uso de indutores de haploidia; método Bulbosum e a cultura de anteras. Esta última é considerada um método importante para a produção de duplo-haploides, tendo como exemplo a cultivar brasileira de arroz 'BRS Colosso', desenvolvida pela Embrapa por meio da cultura de anteras e, também, a cultivar de trigo 'BR-43', obtida pelo mesmo método (Colombari Filho et al., 2013).

No entanto, diversos fatores podem influenciar no sucesso da cultura de anteras em milho para produção de duplo-haploides, tais como:

*Estádio de desenvolvimento do micrósporo:* De modo geral, o estágio uninucleado vem sendo preferido pelos pesquisadores, devido à possibilidade da reprogramação ontogenética do micrósporo para o crescimento e desenvolvimento embriogênico;

*Meio de cultura:* O meio de cultura apresenta uma função determinante para que seja possível promover o estímulo para formação de embriões e dar início ao seu desenvolvimento até o surgimento de uma planta. Vários meios de cultura têm sido utilizados para a cultura de anteras em milho, no entanto, alguns vêm apresentando resultados superiores aos demais descritos pela literatura. São

eles: Zheng-14, proposto por Ting (1981); 6N1, proposto por Genovesi e Collins (1982); Yu-Pei, proposto por Ku et al. (1978) e, por fim, uma modificação do meio Yu-Pei, proposto por Ku et al. (1981);

*Genótipo:* A capacidade de resposta da cultura de anteras no milho é muito dependente do genótipo. Miao et al. (1981) relataram que, de 159 genótipos testados em 1975, apenas nove foram responsivos. Existe, no entanto, algum grau de dominância associada com genes que permitem a resposta *in vitro*. Em 1977, Miao e sua equipe relataram a identificação de várias linhagens (VIII 10, Shui-Pai, Huang 204, Lai-pin-pai, etc.) que, quando cruzadas, responderam à embriogênese com uma frequência mais elevada da produção de embriões a partir da cultura de anteras. Entre 32 cruzamentos feitos com estas linhagens, 28 responderam positivamente (Kim et al., 2016).

*Condições da planta doadora:* Verificou-se que a fisiologia e o vigor das plantas doadoras têm um efeito limitante na frequência de resposta na cultura de anteras (Nitsch et al., 1982). Sendo assim, plantas doadoras com baixo vigor fornecem anteras que produzem poucos embriões ou calos *in vitro*. O fotoperíodo, intensidade e qualidade da luz, temperatura e nutrição são, portanto, indicativos importantes de fatores ambientais que influenciam no desenvolvimento da planta doadora e, conseqüentemente, na produção das anteras (Kim et al., 2016);

*Pré-tratamento:* O pré-tratamento por choque a frio dos micrósporos em desenvolvimento tem sido usado em plantas para auxiliar na mudança do programa ontogenético do gametófito para o desenvolvimento e crescimento esporofítico (Genovesi e Collins, 1982). Com o milho, Nitsch et al. (1982) relataram que submeter as espiguetas com as anteras por sete dias a 14°C produziu os melhores resultados. Em contraste, Genovesi e Collins (1982) relataram que os melhores níveis de resposta foram alcançados para alguns genótipos quando as espiguetas foram submetidas a choque frio durante 14 dias a 8°C, enquanto que para outros genótipos sete dias a 4°C. Num esforço para esclarecer esses dados, foi realizado um experimento com sete condições de pré-tratamento de choque a frio, relatando que o pré-tratamento durante 10 dias a 7°C, foi o que proporcionou os melhores resultados (Genovesi e Collins, 1982).

*Duplicação Cromossômica:* Devido à baixa frequência de duplo-haploides espontâneos em milho, existe a necessidade de utilizar antimitóticos para realizar a duplicação cromossômica dos indivíduos. O trabalho de Barnabás et al. (1999)

se tornou referência ao estudar a resposta de duplicação cromossômica de *Zea mays* L., na presença de diferentes concentrações de colchicina (0; 0,02% e 0,03%) em três genótipos de milho (DH 309×DH 247, A632×DH309 e B1×F58). Observou-se uma resposta embriogênica significativamente maior em plantas provenientes de micrósporos tratados com colchicina, especialmente em 0,03%. Os testes citológicos mostraram que o tratamento com colchicina, antes da primeira divisão dos micrósporos, mostrou-se mais eficiente resultando em indivíduos duplo-haploides (Kim et al., 2016).

*Regeneração das plantas:* A resposta da antera é definida como a proliferação de um ou mais embriões ou calos de micrósporos contidos em seu lóculo (Genovesi e Collins, 1982). As anteras incubadas a temperaturas na faixa de 25 a 28 °C respondem em quatro a seis semanas. Alguns pesquisadores realizam esta fase de cultura totalmente no escuro (Ting et al., 1981). Outros cultivam por uma a duas semanas no escuro, em seguida, passam para um fotoperíodo de 16:8 horas luz:escuro (Genovesi e Collins, 1982, Petolino e Jones, 1986).

Das estruturas resultantes da cultura de anteras em milho, cerca de 80% são embriões, enquanto que os 20% restantes são calos (Miao et al., 1981, Ting et al., 1981). Uma vez que a resposta se torna óbvia a olho nu (1 a 1,5 mm), os embriões são movidos para um meio com sacarose reduzido e sem carvão ativado. Um dos dois campos de ação pode ser tomado neste ponto: (1) germinar diretamente os embriões em plantas, ou (2) induzir calos totipotentes dos quais podem ser obtidos vários clones. Numerosos meios foram descritos para a germinação direta de embriões, no entanto, o milho vem apresentando dificuldades na resposta de regeneração dessas plantas (Hosseini e Cheshmeali, 2015).

Atualmente, grande parte das pesquisas voltadas para a produção de duplo-haploides em *Zea mays* L. tem sido por meio da indução *in vivo*, com o uso de linhagens indutoras devido à dificuldade de utilizar a cultura de anteras como metodologia rotineira nos programas de melhoramento (Dwivedi et al., 2015).

Visando mudar esse cenário, diversos grupos de pesquisa em todo o mundo, como Coréia do Sul (Kim et al., 2016), Irã (Ismaili e Mohammadi 2014, 2016), Índia (Choudhary et al., 2013), Itália (Germana, 2011), Hungria (Barnabás et al., 2003, 2006; Jager et al., 2010), entre outros, estão engajados em solucionar os pontos críticos determinantes para o sucesso da cultura de anteras para produção

de duplo-haploides em milho. No Brasil, no entanto, são poucos os trabalhos sob domínio público existentes, tornando necessários mais estudos para o desenvolvimento de protocolos adaptados aos genótipos locais.

### **3.2.3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.2.3.1 Material vegetal**

O material vegetal utilizado foi disponibilizado pelo programa de Melhoramento de Milho da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), sendo constituídos pelos genótipos PIRANÃO-11, CIMMYT-11 e o híbrido interpopulacional oriundo dos dois genótipos anteriores, UENF 506-11.

O experimento foi realizado na UENF, em casa de vegetação coberta com filme agrícola de 150 micrômetros de espessura e tela de sombreamento de 35%. As sementes foram semeadas em vasos de 5L, contendo substrato Basaplant<sup>®</sup> Hortaliças suplementado com 15g por vaso de NPK sob a formulação 04-14-08, conforme as indicações técnicas para a cultura do milho.

Aos 56 dias após a semeadura (aproximadamente 1200 GD), os pendões foram retirados de dentro do cartucho das plantas provenientes dos genótipos CIMMYT-11, PIRANÃO-11 e UENF 506-11. Em seguida, as espiguetas oriundas da região mediana do pendão foram selecionadas e submetidas ao pré-tratamento seguido pela desinfestação do material.

#### **3.2.3.2 Pré-tratamento e desinfestação**

A etapa de pré-tratamento das espiguetas foi realizada no Setor de Horticultura do Laboratório de Fitotecnia (LFIT) do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA), da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). As espiguetas contendo as anteras com os micrósoros no estágio uninucleado foram colocadas em placas de Petri, cobertas com papel alumínio e armazenadas durante 10 dias, a 7°C em refrigerador.

Após o período de pré-tratamento, as espiguetas foram submetidas à etapa de desinfestação. O procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar e as



espiguetas (500 por genótipo) foram desinfestadas por imersão em 100 mL de hipoclorito de sódio (NaClO) a 2%, contendo três gotas de Tween 20, por 10 minutos e lavadas em três tempos (5, 10 e 10 minutos), em água desionizada e autoclavada.

### 3.2.3.3 Cultura de anteras

Após desinfestação, as anteras foram removidas das espiguetas com auxílio de pinças sob microscópio estereoscópico (Tecnival®), em câmara de fluxo laminar.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (4x3), com quatro protocolos para a cultura de anteras e três genótipos, sendo uma planta de cada população (PIRANÃO-11 e CYMMIT-11) e uma do híbrido (UENF 506-11). Foram realizadas quatro repetições, sendo cada uma constituída por uma placa de Petri (90mm X 15mm) com 25 mL de meio de cultura e 25 anteras oriundas de uma única planta.

Foram utilizados quatro protocolos para a cultura de anteras, constituídos por dois meios distintos em cada protocolo, sendo um para indução de calos embriogênicos e outro para regeneração das plantas (Tabela 7).

**Tabela 7.** Protocolos com os meios de cultura utilizados para a cultura de anteras em *Zea mays* L. Campos dos Goytacazes - RJ, 2018.

	<b>Protocolo 1 (P1) (Ting, 1981)</b>	<b>Protocolo 2 (P2) (Genovesi, 1982)</b>	<b>Protocolo 3 (P3) (Saisingtong, 1995)</b>	<b>Protocolo 4 (P4) (Barnabás, 1998)</b>
<b>Meio de Indução</b>	Zheng-14	6N1	YU-PEI	YU-PEI Modificado
<b>Meio de Regeneração</b>	Zheng-14	MS	YU-PEI	N6 Modificado

#### 3.2.3.3.1 Protocolos para a cultura de anteras

##### Protocolo 1:

**Meio de indução-** Cultura de anteras de acordo com Ting (1981). As anteras foram inoculadas em meio sólido contendo os sais minerais de Zheng-14 com pH ajustado para 5,8 antes da adição do Phytigel® (Tabela 8). Os meios foram

autoclavados por 20 minutos a 121°C e 1,1 atm de pressão. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, o meio foi distribuído em alíquotas de 25 mL em placas de Petri (90mm X 15mm). Durante essa etapa, além do meio de cultura Zheng-14, as anteras foram submetidas a um tratamento com 30 mg L<sup>-1</sup> de colchicina durante três dias a 27±2°C no escuro, em câmara de crescimento (Barnabás et al., 1999). Posteriormente, as anteras foram transferidas para um meio Zheng-14, livre de colchicina e mantidas em uma temperatura constante de 27±2°C no escuro, por 30 dias.

**Meio de Regeneração-** Cultura de anteras de acordo com Ting (1981). Após 30 dias em meio de indução, as anteras foram transferidas para o meio sólido Zheng-14 com pH ajustado para 5,8 antes da adição do Phytigel® (Tabela 8). Os meios foram autoclavados por 20 minutos a 121°C e 1,1 atm de pressão. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, o meio foi distribuído em alíquotas de 25 mL em placas de Petri (90mm X 15mm). As placas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 27±2°C, com fotoperíodo de 16:8 (luz:escuro) fornecida por lâmpadas fluorescentes OSRAM® luz do dia, irradiância de 50 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, durante 30 dias.

## **Protocolo 2:**

### **Meio de Indução**

Cultura de anteras de acordo com Genovesi e Collins (1982). As anteras foram inoculadas em meio sólido 6N1 com pH ajustado para 5,8 antes da adição do Phytigel® (Tabela 8). Os meios foram autoclavados por 20 minutos a 121°C e 1,1 atm de pressão. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, o meio foi distribuído em alíquotas de 25 mL em placas de Petri (90mm X 15mm). Durante essa etapa, além do meio de cultura 6N1, as anteras foram submetidas a um tratamento com 30 mg L<sup>-1</sup> de colchicina durante três dias a 27±2°C no escuro em câmara de crescimento (Barnabás et al., 1999). Posteriormente, as anteras foram transferidas para um meio 6N1, livre de colchicina e mantidas em uma temperatura constante de 27±2°C no escuro, por 30 dias.

**Meio de Regeneração-** Cultura de anteras de acordo com Genovesi e Collins (1982). As anteras foram inoculadas em meio sólido MS (Murashige and Skoog,

1962), com pH ajustado para 5,8 antes da adição do Phytigel® (Tabela 8). Os meios foram autoclavados por 20 minutos a 121°C e 1,1 atm de pressão. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, o meio foi distribuído em alíquotas de 25 mL em placas de Petri (90mm X 15mm). As placas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 27±2°C, com fotoperíodo de 16:8 (luz:escuro) fornecida por lâmpadas fluorescentes OSRAM® luz do dia, irradiância de 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , durante 30 dias.

### **Protocolo 3:**

**Meio de indução-** Cultura de anteras de acordo com Ku et al. (1978). As anteras foram inoculadas em meio líquido YP com pH ajustado para 5,8 antes da adição do Phytigel® (Tabela 8). Os meios foram autoclavados por 20 minutos a 121°C e 1,1 atm de pressão. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, o meio foi distribuído em alíquotas de 25 mL em placas de Petri (90mm X 15mm). Durante essa etapa, além do meio de cultura YP, as anteras foram submetidas a um tratamento com 30 mg L<sup>-1</sup> de colchicina durante três dias a 27±2°C no escuro, em câmara de crescimento (Barnabás et al., 1999). Posteriormente, as anteras foram transferidas para um meio YP, livre de colchicina e mantidas em uma temperatura constante de 27±2°C no escuro, por 30 dias.

**Meio de Regeneração-** As anteras foram inoculadas em meio sólido YP (Ku et al., 1978) com pH ajustado para 5,8 antes da adição do Phytigel® (Tabela 8). Os meios foram autoclavados por 20 minutos a 121°C e 1,1 atm de pressão. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, o meio foi distribuído em alíquotas de 25 mL em placas de Petri (90mm X 15mm). As placas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 27±2°C, com fotoperíodo de 16:8 (luz:escuro) fornecida por lâmpadas fluorescentes OSRAM® luz do dia, irradiância de 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , durante 30 dias.

### **Protocolo 4:**

**Meio de Indução-** As anteras foram inoculadas em meio líquido YP modificado (Ku et al., 1981) com pH ajustado para 5,8 antes da adição do Phytigel® (Tabela 8). Os meios foram autoclavados por 20 minutos a 121°C e 1,1 atm de pressão. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, o meio foi distribuído em alíquotas de

25 mL em placas de Petri (90mm X 15mm). Durante essa etapa, além do meio de cultura YP modificado, as anteras foram submetidas a um tratamento com 30 mg L<sup>-1</sup> de colchicina durante três dias a 27±2°C no escuro, em câmara de crescimento (Barnabás et al., 1999). Posteriormente, as anteras foram transferidas para um meio YP modificado, livre de colchicina e mantidas em uma temperatura constante de 27±2°C no escuro, por 30 dias.

**Meio de Regeneração-** As anteras foram inoculadas em meio sólido N6 modificado (CHU et al., 1975), com pH ajustado para 5,8 antes da adição do Phytigel® (Tabela 8). Os meios foram autoclavados por 20 minutos a 121°C e 1,1 atm de pressão. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, o meio foi distribuído em alíquotas de 25 mL em placas de Petri (90mm X 15mm). As placas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 27±2°C, com fotoperíodo de 16:8 (luz:escuro) fornecida por lâmpadas fluorescentes OSRAM® luz do dia, irradiância de 50 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, durante 30 dias.

**Tabela 8.** Composição dos meios de cultura para a cultura de anteras em *Zea mays* L. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.

	Protocolo 1 (P1)		Protocolo 2 (P2)	
	Meio de Indução	Meio de Regeneração	Meio de Indução	Meio de Regeneração
Nutrientes mg L <sup>-1</sup>	Zheng-14	Zheng-14	6N1	MS
KNO <sub>3</sub>	3000,00	3.000,00	2.022,00	190,00
NH <sup>4</sup> NO <sub>3</sub>	-	-	-	1.650,00
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	150,00	150,00	-	-
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	384,00	-
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	150,00	150,00	166,00	440,00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	600,00	600,00	-	170,00
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	450,00	450,00	185,00	370,00
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	10,00	10,00	4,40	22,30
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,00	2,00	1,50	16,9
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,00	3,00	1,60	6,20
KI	0,7500	0,75	0,80	0,83
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,0025	0,0025	-	0,025
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,0025	0,0025	-	0,025
NbMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,2500	0,25	-	0,25
NbEDTA	37,30	37,3	37,3	27,80
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	27,80	27,8	27,8	27,80
Glicina	2,00	2,00	-	-
Tiamina HCl	10,00	10,00	0,5	0,5
Mio-inositol	100,00	100,00	-	-
Ácido Nicotínico	1,00	1,00	0,5	0,5
Piridoxina	1,00	1,00	-	-
TIBA	-	-	-	-
2,4-D	2,00	2,00	-	-
BAP	1,00	1,00	-	-
ANA	1,00	1,00	-	-
Cinetina	-	-	-	-
ABA	-	-	-	0,05
Glicina	2,00	2,00	-	-
Hidrolisado de lactalbumina	500,00	500,00	-	-
Prolina	-	-	100,00	-
Sacarose	150.000,00	120.000	120.000,00	3.000,00
Carvão Ativado	500,00	-	500,00	-
Phytigel®	2.000,00	2.000,00	2.000,00	2.000,00
pH	5,8	5,8	5,8	5,8

Tabela 8. Cont.

	Protocolo 3 (P3)		Protocolo 4 (P4)	
	Meio de Indução	Meio de Regeneração	Meio de Indução	Meio de Regeneração
Nutrientes mg L <sup>-1</sup>	YP	YP	YP Modificado	N6 Modificado
<b>KNO<sub>3</sub></b>	2.500,00	2.500,00	2.500,00	2.830,00
<b>NH<sup>4</sup>NO<sub>3</sub></b>	165,00	165,00	165,00	-
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	-	-	-	463,00
<b>CACL<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	176,00	176,00	176,00	166,00
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	510,00	510,00	510,00	400,00
<b>MGSO<sub>2</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	370,00	370,00	370,00	185,00
<b>MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O</b>	4,40	4,40	22,30	4,40
<b>ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	1,50	1,50	8,60	1,50
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	1,60	1,60	6,20	1,60
<b>KI</b>	0,80	0,80	0,83	-
<b>CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O</b>	-	-	0,025	-
<b>CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O</b>	-	-	0,025	-
<b>NbMoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	-	-	0,25	-
<b>NbEDTA</b>	37,3	37,3	37,3	37,3
<b>FeSo<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O</b>	27,8	27,8	27,8	27,8
<b>Tiamina HCl</b>	0,25	0,5	0,5	-
<b>Mio-inositol</b>	-	100,00	100,00	-
<b>Ácido Nicotínico</b>	1,3	1,5	-	1,00
<b>TIBA</b>	0,1	-	0,1	-
<b>ANA</b>	-	-	-	0,5
<b>Cinetina</b>	2,5	-	-	-
<b>Caseína Hidrolisada</b>	500,00	-	500,00	-
<b>Prolina</b>	125,00	-	-	-
<b>Ácido Succínico</b>	-	25,00	-	-
<b>L-Glutamina</b>	125,00	250,00	-	-
<b>L-Asparagina</b>	15,00	-	15,00	-
<b>Sacarose</b>	90.000,0	30.000,00	120.000	40.000,00
<b>Carvão Ativado</b>	500,00	-	500,00	-
<b>Gerlite</b>	2.000,00	2.000,00	2.000,00	2.000,00
<b>pH</b>	5,8	5,8	5,8	5,8

### **3.2.3.4 Avaliações**

Após o cultivo *in vitro* no meio de indução embriogênica, foi avaliado o número de anteras em que foi observada a indução de possíveis calos embriogênicos dos micrósporos. Após o cultivo no meio de regeneração, foi avaliada a quantidade de anteras sobreviventes ao processo.

### **3.2.3.5 Análise estatística**

Foram analisadas as pressuposições de normalidade e de homogeneidade de variâncias dos tratamentos, respectivamente, pelos testes de Lilliefors e Cockram e Bartlet, os quais indicaram a necessidade do uso da transformação raiz de  $Y + 0,5 - \text{SQRT}(Y + 0,5)$  para os dados de regeneração.

Posteriormente, todos os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os resultados foram apresentados com médias não transformadas. Utilizou-se o programa computacional Genes (Cruz, 2013).

## **3.2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.2.4.1 Indução embriogênica em *Zea mays* L.**

A análise de variância revelou que os fatores meio de cultura e genótipo, bem como a interação genótipo x meio de cultura, contribuíram significativamente ( $P < 0,05$ ) para a indução de possíveis calos embriogênicos, na cultura de anteras em milho. (Tabela 9).

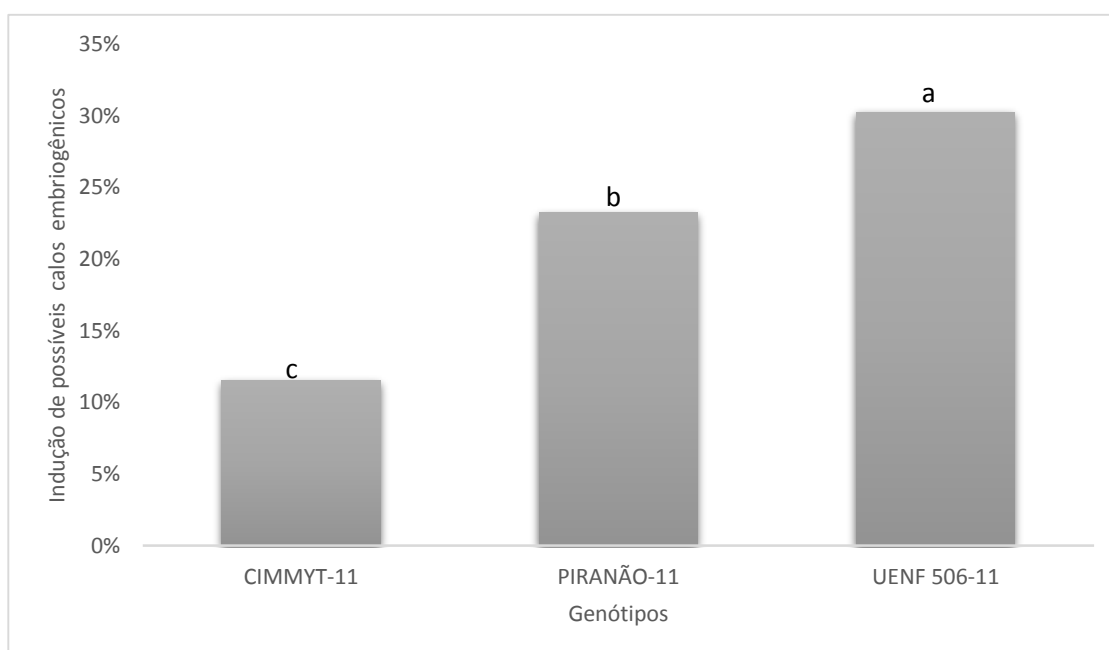
**Tabela 9.** Resumo da análise de variância com quadrados médios (QM) para os efeitos do Genótipo (G), Meio de cultura (M) e suas interações em relação à média de anteras que responderam à indução de embriões a partir de micrósporos, em *Zea mays* L. Campos dos Goytacazes - RJ, 2018.

Fonte de Variação	GL	QM <sup>A</sup>
Genótipo (G)	2	1436,33*
Meio de Cultura (M)	3	890,66*
Interação		
M x G	6	205,66*
Resíduo	36	43,55

CV (%) = 30,46

<sup>a</sup> ns e \* indicam não significância ou significância em  $P < 0,05$ .

Os genótipos mostraram-se significativamente divergentes no que diz respeito à porcentagem de anteras que responderam à indução embriogênica. O híbrido interpopulacional UENF-506-11 apresentou a maior média geral de anteras que responderam à indução (30%), evidenciando sua superioridade neste quesito em relação aos seus parentais CIMMYT-11 (12%) e PIRANÃO-11 (23%). (Figura 11).



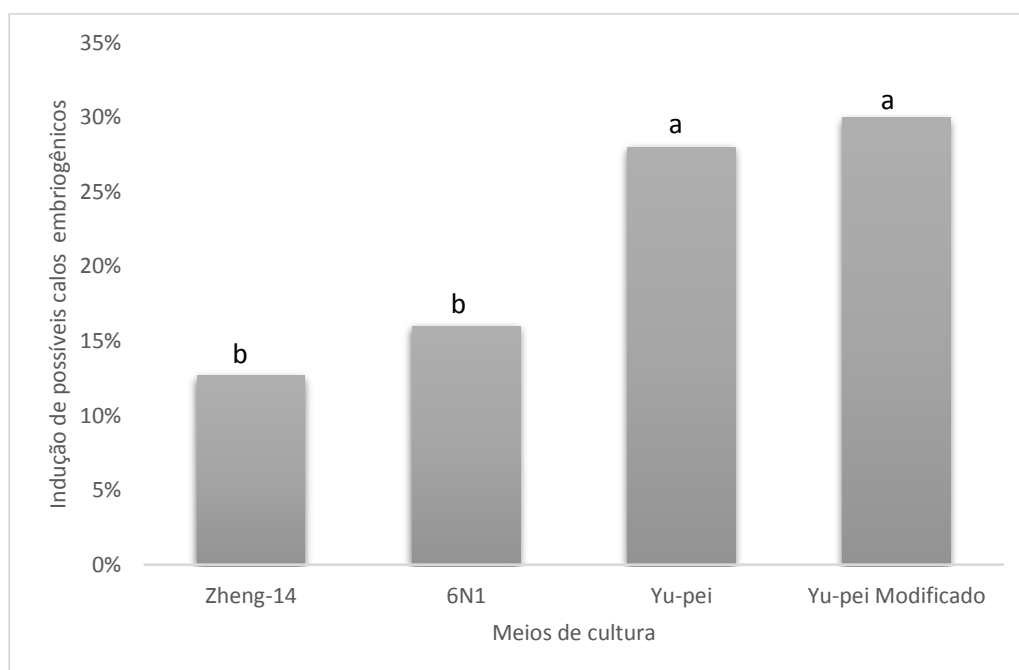
**Figura 11** Porcentagem de anteras que responderam à indução embriogênica em função dos genótipos estudados. As médias seguidas por letras diferentes diferem entre si ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.



Esses resultados de divergência entre genótipos confirmam os relatos na literatura, em que o genótipo exerce grande influência sobre a capacidade de resposta das anteras, sendo, portanto, comumente denominado de “genótipo dependente” (Seguí-Simarro, 2010). Barnabás et al. (1998) também encontraram resultados similares em relação à divergência de resposta entre os genótipos estudados: A632xDH309 (21,05%), A21 (35,10%) e A21xF58 (38,25%), comprovando esta genótipo-dependência.

A superioridade do genótipo UENF 506-11 e de vários outros encontrados na literatura, está associada à sua capacidade androgenética, que por sua vez, está relacionada a alguns alelos. Portanto, são necessários mais estudos que identifiquem estes alelos nos genótipos mais responsivos.

Com relação aos meios de cultura, o Yu-Pei e o Yu-Pei Modificado apresentaram as maiores médias gerais associadas à indução embriogênica (Figura 12).



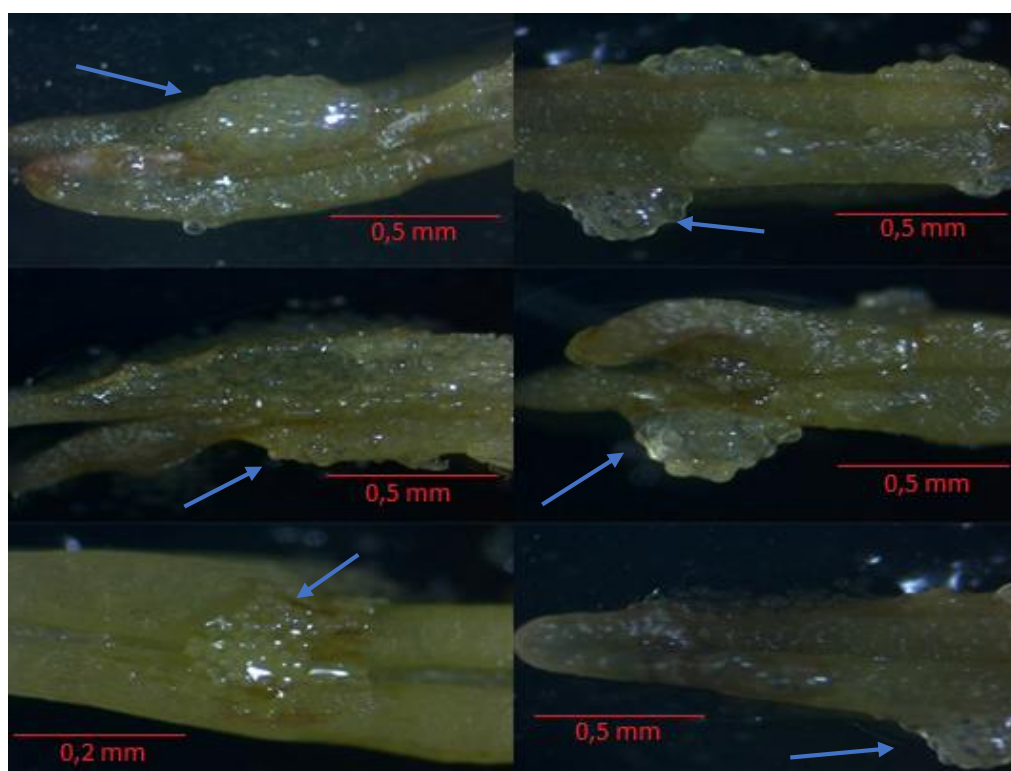
**Figura 12** Porcentagem de anteras que responderam à indução de possíveis calos embriogênicos em função dos meios de cultura testados. As médias seguidas por letras diferentes diferem entre si ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

A superioridade dos meios Yu-pei e Yu-pei modificado pode estar relacionada à presença de alguns componentes que se encontram ausentes nos meios de cultura Zheng-14 e 6N1, como caseína hidrolisada, asparagina e TIBA.

O uso de aditivos orgânicos, como a caseína hidrolisada, tem um efeito benéfico na cultura de anteras. Genovesi e Collins (1982), trabalhando com cultura de anteras em milho, testaram diversos aditivos orgânicos e o mais eficaz foi a caseína hidrolisada.

A asparagina também é um componente benéfico para a cultura de anteras. Olsen (1987) relatou um maior número de anteras responsivas e embriões produzidos a partir dos micrósporos, quando este aminoácido foi adicionado ao meio de cultura.

Outro componente que vem mostrando um efeito benéfico na cultura de anteras de milho é o TIBA. Obert e Barnabás (2004), testando os efeitos de fitorreguladores na resposta embriogênica de micrósporos em milho, relatou que os melhores resultados para a androgênese do milho foram alcançados com o TIBA.



**Figura 13.** Início da indução de possíveis calos embriogênicos dos micrósporos presentes nas anteras de milho, indicado por setas.

Em relação à interação genótipo e meio de cultura é evidenciado que no meio Yu-pei modificado, não houve diferença significativa nas médias de indução embriogênica entre os genótipos PIRANÃO-11 e UENF 506-11. No entanto, observado o comportamento desses mesmos genótipos quando submetidos ao meio Yu-pei, o genótipo UENF 506-11 apresentou médias significativamente superiores ao genótipo PIRANÃO-11 (Tabela 10). Estes resultados indicam que o meio de cultura a ser utilizado na cultura de anteras em milho depende do genótipo.

**Tabela 10.** Porcentagem de anteras responsivas à indução embriogênica nos genótipos CIMMYT-11, PIRANÃO-11 e UENF 506-11 em função dos meios de cultura estudados. Campos dos Goytacazes - RJ, 2018.

Genótipo	Meios de cultura				Média
	Zheng-14	6N1	Yu-pei	Yu-pei Modificado	
CIMMYT-11	8,00 bA	8,00 bB	9,00 abC	21,00 aB	11,50 C
PIRANÃO-11	15,00 bA	19,00 bAB	27,00 abB	32,00 aAB	23,25 B
UENF506-11	15,00 bA	21,00 bA	48,00 aA	37,00 aA	30,25 A
<b>Média</b>	12,66 b	16,00 b	28,00 a	30,00 a	21,66

Médias seguidas por letras iguais minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

A indução embriogênica em milho varia de acordo com as necessidades fisiológicas de cada genótipo. Rakoczy-Trojanowska et al. (1997) sugerem que a necessidade de auxinas para a indução embriogênica é dependente do genótipo. As diferenças na competência embriogênica dos genótipos podem ser causadas pela resposta diferencial das células aos fitorreguladores, bem como, aos níveis endógenos dos mesmos. Sendo assim, a composição dos meios de cultura para o cultivo de anteras em milho vai variar, conforme os requerimentos fisiológicos de cada genótipo (Hosseini e Cheshmeali, 2015).

### 3.2.4.2 Regeneração em *Zea mays* L.

As anteras contendo os micrósporos que iniciaram o processo de indução embriogênica foram transferidas para os respectivos meios de regeneração. Não

foi possível regenerar nenhuma planta nos quatro meios de cultura testados para os três genótipos. Assim sendo, avaliou-se apenas a sobrevivência das anteras ao longo dos 30 dias de cultivo.

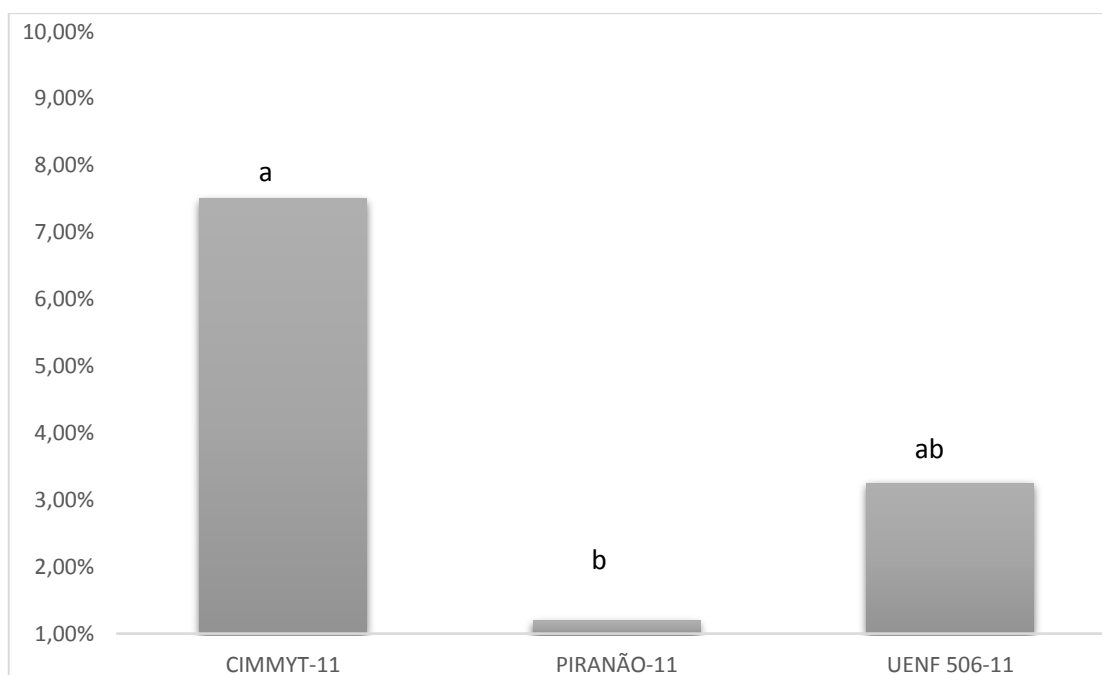
A análise de variância revelou que apenas a fonte de variação genótipo apresentou diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) para a sobrevivência das anteras nos meios de regeneração estudados (Tabela 11).

**Tabela 11.** Resumo da análise de variância com quadrados médios (QM) para os efeitos do Genótipo (G), Meio de cultura (M) e suas interações em relação à média de anteras que sobreviveram no meio de regeneração de plantas na cultura de anteras em milho.

Fonte de Variação	GL	QM <sup>a</sup>
Genótipo (G)	2	0,9402*
Meio de cultura (M)	3	0,3826 <sup>ns</sup>
Interações		
G x M	6	0,4685 <sup>ns</sup>
Resíduo	36	0,2542
CV (%) = 38,82		

<sup>a</sup> **ns** e \* indicam não significância e significância em  $P < 0,05$ , respectivamente.

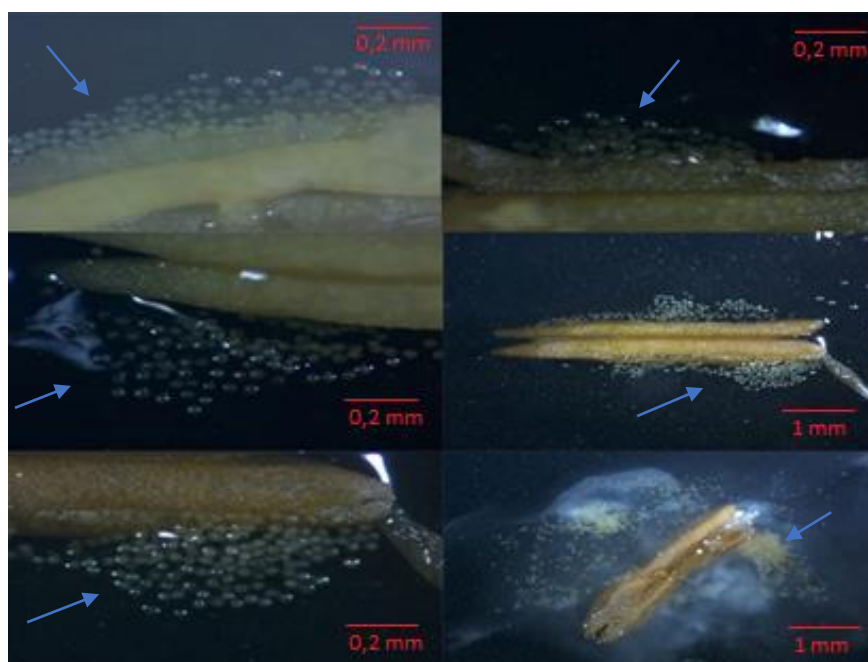
Assim como para a indução de calos embriogênicos, o genótipo também é considerado um fator determinante para o sucesso na etapa de regeneração destes na cultura de anteras em milho (Spitkó et al., 2006). Neste estudo, todos os genótipos apresentaram uma média geral de sobrevivência menor que 10%: CIMMYT-11 (7,5%), PIRANÃO-11 (1,25%) e UENF-506-11 (3,25%) e não foi possível regenerar nenhuma planta (Figura 14).



**Figura 14** Porcentagem de sobrevivência das anteras de três genótipos de milho em diferentes meios de regeneração. As médias seguidas por letras iguais não diferem entre si ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

O comportamento apresentado pelos genótipos no meio de regeneração, não seguiu a mesma lógica de superioridade observada na etapa de indução embriogênica. Spitikó et al. (2006), trabalhando com cultura de anteras em milho, relataram que a capacidade de indução de embriões e de regeneração de plantas são características hereditárias e independentes. Assim sendo, genótipos com grande capacidade de indução de embriões podem não apresentar regeneração satisfatória de plantas, o contrário também pode ocorrer. Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores (Cowen et al., 1992; Murigneaux et al., 1998; Obert et al., 1998).

Outro fator que pode explicar a não regeneração de plantas é o extravasamento dos micrósporos para o meio de cultura na etapa de indução (Figura 15). Deste modo, no momento da transferência das anteras para o meio de regeneração, grande parte dos micrósporos permaneceu no meio de indução, não sendo transferida para o meio de regeneração. Rodrigues et al., (2004) sugerem o uso da cultura de micrósporos isolados para solucionar este problema. Neste método, os micrósporos são separados por centrifugação e cultivados em meio líquido, reduzindo as perdas na etapa de regeneração.



**Figura 15.** Extravasamento de micrósporos de *Zea mays* L. para o meio de cultura de indução embriogênica, indicado por setas.

### 3.2.5 CONCLUSÕES

- Os meios de cultura Yu-pei e Yu-pei modificado foram os mais responsivos para a indução de possíveis calos embriogênicos nos genótipos UENF 506-11, PIRANAO-11 e CIMMYT-11;
- Os genótipos UENF 506-11, PIRANAO-11 e CIMMYT-11 não foram responsivos na regeneração de plantas, nos meios de cultura testados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Araújo, P. M.; Nass, L. L. (2002) Caracterização e avaliação de populações de milho crioulo. *Scientia Agricola*, 59(3):589-593.
- Arnold, C. Y. (1959) The determination and significance of the base temperature in a linear heat unit system. *American Society for Horticulture Science*, 74(4),3.
- Assis, J. P., Neto, D. D., Nass, L. L., Manfron, P. A., Bonnacarrère, R. A. G., & Martin, T. N. (2006) Simulação estocástica de atributos do clima e da produtividade potencial de milho utilizando-se distribuição triangular. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41(3), 539-543.
- Barnabás, B., Fransz, P. F., & Schel, J. H. N. (1987) Ultrastructural studies on pollen embryogenesis in maize (*Zea mays* L.). *Plant cell reports*, 6(3), 212-215.
- Barnabás, B. (2003) Anther culture of maize (*Zea mays* L.). In *Doubled Haploid Production in Crop Plants*. Netherlands, p. 103-108.
- Barnabás, B.; Obert, B.; Kovács, G. (1999) Colchicine, an efficient genome-doubling agent for maize (*Zea mays* L.) microspores cultured in anthero. *Plant Cell Reports*, 18(10): 858-862.
- Barrueto, C. P. (2001) A propagação *in vitro* de plantas. O que é isso? *Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento*, 19:16-21.

- Berilli, A.P.C.G, Pereira, M.G., Trindade, R.S., Costa, F.R. (2013) Response to the selection in the 11<sup>th</sup> cycle of reciprocal recurrent selection among full-sib families of maize. *Acta Scientiarum*, 35:435-441.
- Bolibok, H.; Gruszczynska, A.; Hromada, J.A; Rakoczy-Trojanowska, M. (2007) The identification of QTLs associated with the in vitro response of rye (*Secale cereale* L.). *Cellular and Molecular Biology Letters*, 12(4):523-535.
- Bornman, C.H (1985) Haploidization of sugar beet (*Beta vulgaris*) via gynogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 21(3):36.
- Brettell, R.I.S, Thomas E, Wernicke W (1981) Production of haploid maize plants by anther culture. *Maydica* 26:101-111.
- Carvalho, A.C.P.P.; Torres, A.C; Braga, E.J.B; Lemos, E.E.P; Souza, F.V.D; Peters, J.A; Willadino, L; Câmara, T.R. (2011) Glossário de cultura de tecidos de plantas. *Plant Cell Culture and Micropropagation*, (7)1, 30-60.
- Cha-um, S.; Srianan, B.; Pichakum, A.; Kirdmanee, C. (2009) An efficient procedure for embryogenic callus induction and double haploid plant regeneration through anther culture of thai aromatic rice (*Oryza sativa* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 45(2):171-179.
- Cheng, M. T.; Neuffer, M. G. (1989) Maize microsporogenesis. *Genome*, 32(2), 232-244.
- Cheng, P.; Pareddy, D.R (1994) Morphology and development of the tassel and ear. In: *The maize handbook*. Springer New York. p. 37-47.
- Colombari, F.J.M., Resende, M. D. V., de Moraes, O. P., de Castro, A. P., Guimarães, É. P., Pereira, J. A., ... & Breseghello, F. (2013) Upland rice breeding in Brazil: a simultaneous genotypic evaluation of stability, adaptability and grain yield. *Euphytica*, 192(1), 117-129.
- Cowen, N. M., Johnson, C. D., Armstrong, K., Miller, M., Woosley, A., Pescitelli, S; Petolino, J. F. (1992) Mapping genes conditioning in vitro androgenesis in maize using RFLP analysis. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 84(5), 720-724.



- Cruz, D.C. (2013) GENES - A software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum Agronomy*, 35: 271-276.
- Chase, S. (1952) Monoploids in maize. *Heterosis*, Ames, Iowa, 389-399.
- Choudhary, P., Jhajharia, A., & Singh, D. (2014) In vitro protocol for induction of gametic embryos formation in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Cell & Tissue Research*, 14(1).
- Datta, S. K. (2005) Androgenic haploids: factors controlling development and its application in crop improvement. *Current science*, 1870-1878.
- Doebley, J. (1990) Molecular evidence and the evolution of maize. *Economic Botany*, 44(3):6-27.
- Doebley, J. (2004) The genetics of maize evolution. *Annual Review of Genetics* 38: 37-59.
- Doebley, J. (2008) Population structure and a genetic diversity of new world maize races assessed by DNA microsatellites. *American Journal of Botany*. 95(10):1240-1243.
- Doi, H.; Takahashi, R.; Hikage, T.; Takahata, Y. (2010) Embryogenesis and doubled haploid production from anther culture in gentian (*Gentiana triflora*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 102(1):27-33.
- Dolezel, J., Bartos, J. (2005) Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*, 95: 99–110.
- Dwivedi, S. L., Britt, A. B., Tripathi, L., Sharma, S., Upadhyaya, H. D., & Ortiz, R. (2015) Haploids: constraints and opportunities in plant breeding. *Biotechnology advances*, 33(6), 812-829.
- El-Hennawy, M. A., Abdalla, A. F., Shafey, S. A., & Al-Ashkar, I. M. (2011) Production of doubled haploid wheat lines (*Triticum aestivum* L.) using anther culture technique. *Annals of Agricultural Sciences*, 56(2), 63-72.
- Fancelli, A. L., & Lima, U. A. (1982) *Milho: produção, pré-processamento e transformação agroindustrial*. São Paulo. 2p.

- Fancelli, A. L., & Dourado Neto, D. (2000) *Ecofisiologia e fenologia. Produção de milho*. p 21-54.
- Fischer, R. A.; Edmeades, Gregory O. (2010) Breeding and cereal yield progress. *Crop Science*, 50(1):85-98.
- Forster, B.P.; Heberle-Bors, E.; Kasha, K.J.; Touraev, A. (2007) The resurgence of haploids in higher plants. *Trends Plant Science*, 12: 368–375.
- Freddi, O. S., Centurion, J. F., Almeida, C. X. (2009) Compactação de um latossolo vermelho de textura argilosa afetando o sistema radicular e a produtividade do milho. *Revista Ceres*, 56(5):654-665.
- Fuck, M.P; Bonacelli, M.B. (2009) A pesquisa pública e a indústria sementeira nos segmentos de semente de soja e milho híbrido no Brasil. *Revista Brasileira de Inovação*, 6(1):87-121.
- Fukunaga, K; Hill, J; Vigouroux, Y; Matsuoka, Y; Sanchez, J; Liu, K .(2005) Genetic diversity and population structure of teosinte. *Genetics* 169:2241–2254.
- Genovesi, A. D.; Collins, G. B. (1982) *In vitro* production of haploid plants of corn via anther culture. *Crop science*, 22(6):1137-1144.
- Geiger H.H; Gordillo, G.A. (2009) Doubled haploids in hybrid maize breeding. *Maydica* 54: 458-499.
- Germana, M.A, (2011) Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104(3):283-300.
- Golle, D. P., Reiniger, L. R. S., Curti, A. R., & Bevilacqua, C. B. (2009) Melhoramento florestal: ênfase na aplicação da biotecnologia. *Ciência Rural*, 39 (5), 1606-1613.
- Grauda, D; Lapse, N; Strazdina, V; Kokina, I.; Lapina, L.; Mikelsone, A.; Lubinskis, L.; Rashal, I. (2010) Obtaining of doubled haploid lines by anther culture method for the latvian wheat breeding. *Agronomy Research.*, 8(3):545-552.

- Hanashiro, R. K., Mingotte, F. L. C., & Fornasieri Filho, D. (2013) Desempenho fenológico, morfológico e agrônômico de cultivares de milho em Jaboticabal-SP. *Científica*, 41(2), 226-234.
- He, T.; Yang, Y.; Tu, S.B.; Yu, M.Q.; Li, X.F. (2006) Selection of interspecific hybrids for anther culture of indica rice. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 86: 271–277.
- Honys, D. & D. Twell. (2004) Transcriptome analysis of haploid male gametophyte development in Arabidopsis. *Genome Biology* 5: R85.
- Hosseini, S. Z., Mohammadi, P. P., & Cheshmeali, G. R. (2015) Effect of induction medium on embryogenesis of maize anther culture and increase of normal haploid plantlet regeneration with wathman filter paper. *Iranian Journal of Plant Physiology*, 5(4), 1505-1512.
- Jäger, K., Bartók, T., Ördög, V.; Barnabás, B. (2010) Improvement of maize (*Zea mays* L.) anther culture responses by algae-derived natural substances. *South African Journal of Botany*, 76(3), 511-516.
- José, S. C. B. R., Von Pinho, E. D. R., Von Pinho, R. G., Ramalho, M. A. P.; Silva Filho, J. D. (2005) Características físicas do pericarpo de sementes de milho associadas com tolerância à alta temperatura de secagem. *Revista Brasileira de Sementes*, 27(1), 125-131.
- Kasha, K. J. (1974) Haploids from somatic cells. In *haploids in higher plants-advance and potential. Proceedings of the last symposium on haploids in higher plant*, p 10-14.
- Kim, K., Moon, J., Kim, J., & Lee, B. (2016) Research trends and prospectives in maize anther culture. *Korean Journal of Breeding Science*, 48(2), 93-101.
- KyungHee, K., JaeYoon, K., & ByungMoo, L. (2016) Research trends and prospectives in maize anther culture. *Korean Journal of Breeding Science*, 48(2), 93-101.

- Ku, M. K., Cheng, W. C., Kuo, L. C., Kuan, Y. L., An, H. P., & Huang, C. H. (1978, May) Induction factors and morpho-cytological characteristics of pollen-derived plants in maize (*Zea mays*). In *Plant Tissue Culture May*, p 25-30.
- Lantos, C., Weyen, J., Orsini, J. M., Gnad, H., Schlieter, B., Lein, V.; Pauk, J. (2013) Efficient application of *in vitro* anther culture for different European winter wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding programmes. *Plant Breeding*, 132(2), 149-154.
- Lazaridou, T.; Sistanis, T.; Lithourgidis, A; Aambrus, H. (2011) Response to *in vitro* anther culture of F3 families originating from high and low yielding F3 2 barley plants (*Hordeum vulgare* L.) plants. *Australian Journal of Crop Science*, 5(3):265.
- Malik, M. R., F. Wang, J. M. Dirpaul, N. Zhou, P. L. Polowick, A. M. R. Ferrie & J. E. Krochko. (2007) Transcript profiling and identification of molecular markers for early microspore embryogenesis in *Brassica napus*. *Plant Physiology* .144: 134–154.
- Maraschin, S. D. F., Caspers, M., Potokina, E., Wülfert, F., Graner, A., Spaink, H. P., & Wang, M. (2006) cDNA array analysis of stress-induced gene expression in barley androgenesis. *Physiologia Plantarum*, 127(4), 535-550.
- Marcos Filho, J. (2005) *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas*. Piracicaba. p 56-59.
- Miao, S. H. (1980) Effect of different ammonium salts on the formation of pollen embryoids. *Acta Botanica Sinica*, 22(4), 356-359.
- Miao, S. H., Kuo, C. S., Kwei, Y. L., Sun, A. T., Ku, S. Y., Lu, W. L., ... & Hang, L. (1978, May) *Induction of pollen plants of maize and observations on their progeny*. In *Proceedings of the Symposium on Plant Tissue Culture*, Beijing. p 23-34.
- Mityko, J.; Adrásfalvy, A.; Csillery, G.; Fari, M. (1995) Anther-culture response in different genotypes and F1 hybrids of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Breeding*, 114(1):78-80.

- Mix, G. (1985) Antheren- und Ovarienkultur von Sonnenblumen (*Helianthus annuus* L.). *Land- bauforsch Volkenrode*, 35:153-156.
- Moraes, A. P. D., Bered, F., Carvalho, F. I. F. D., & Kaltchuk-Santos, E. (2008) Morphological markers for microspore developmental stage in maize. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51(5), 911-916.
- Moraes-Fernandes, M. D., Torres, A., Caldas, L. (1990) Obtenção de plantas haploides através da cultura de anteras. *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília: EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisas de Hortaliças*, 311-332.
- Morris, M.L. (2002) *Impacts of international maize breeding research in developing countries*. Mexico, 4p
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Murigneux, A., Bentolila, S., Hardy, T., Baud, S., Guitton, C., Jullien, H. & Beckert, M. (1994) Genotypic variation of quantitative trait loci controlling in vitro androgenesis in maize. *Genome*, 37(6), 970-976.
- Nitsch C, Andersen S, Godard M, Neuffer MG, Sheridan WF (1982) Production of haploid plants of *Zea mays* and *Pennisetum* through androgenesis. In: Earle ED, Demarly Y (eds) *Variability in plants regenerated from tissue culture*. Praeger, New York, p 69-91.
- Obert, B., Orosz, A., Kovács, G., & Barnabás, B. (1998) Study of the androgenic capacity in crosses between highly androgenic exotic DH lines and recalcitrant commercial inbreds in *maize anther culture*. *Novenytermeles*, 47(5), 473-481.
- Obert, B., & Barnabás, B. (2004) Colchicine induced embryogenesis in maize. *Plant cell, tissue and organ culture*, 77(3), 283-285.
- Olsen, F. L. (1987) Induction of microspore embryogenesis in cultured anthers of *Hordeum vulgare*. The effects of ammonium nitrate, glutamine and asparagine as nitrogen sources. *Carlsberg Research Communications*, 52(6), 393.

- Paiva, D.A.S.; Furlaneto; Badiz, F.P. (2010) Estudo energético da produção de biocombustível a partir do milho. *Ciência Rural*, 40(10).
- Palú, E.G; Silva, AB da; Pasqual, M. (2004) Calogênese *in vitro* em anteras de *Coffea arabica* L. *Ciência e Agrotecnologia* 28:736-742
- Paterniani, M. E. A. G.; Guimarães, P. S.; Luders, R. R.; Gallo, P. B.; Souza, A. P. Laborda, P. R.; Oliveira, K. M. (2008) Capacidade combinatória, divergência genética entre linhagens de milho e correlação com heterose. *Bragantia*, 67(3):639-648.
- Petolino, J. F.; Jones, A. M. (1986) Anther culture of elite genotypes of maize. *Crop Science*, 26(5), 1072-1074.
- Petolino, J. F.; Thompson, S. A. (1987) Genetic analysis of anther culture response in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, 74(2), 284-286.
- Pierre, P. M. O., Davide, L. M. C., Couto, E. G. O., Silva, T. N., Ramalho, M. A. P., Dos Santos, J. B. (2011) duplo-haploides: estratégias para obtenção e importância no melhoramento genético do milho. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, 10(1), 1-16.
- Prasanna, B. M. (2012) Diversity in global maize germplasm: characterization and utilization. *Journal of Biosciences*, 37(5), 843-855.
- Pret'ová, A., Obert, B., & Bartošová, Z. (2006) Haploid formation in maize, barley, flax, and potato. *Protoplasma*, 228(1-3), 107-114.
- Razdan, M. K. (2003) Introduction to plant tissue culture. *Science Publishers*, New Hampshire, USA.
- Rosa, L.R; Sena, M.R.; Shiomi, H.F. (2016) Double haploid technology to determine the inheritance of resistance to stalk rot (*Fusarium verticillioides*) in corn inbred lines. *Summa Phytopathologica*, 42(1):59-66.
- Sangoi, L., Zanin, C. G., Schmitt, A.; Vieira, J. (2013) Senescência foliar e resposta de híbridos de milho liberados comercialmente para cultivo em diferentes épocas ao adensamento. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, 12(1), 21-32.

- Seguí-Simarro, J. M. (2010) Androgenesis revisited. *The Botanical Review*, 76(3), 377-404.
- Silva, A.; Laime, R.S., Souto, F.L.; Oliveira, D. (2012) Caracterização de plantas de milho na absorção de nutrientes e metais pesados após submissão à irrigação com efluentes. *Revista Educação Agrícola Superior*, 27:141-145.
- Silveira, F.T; Moro, J.R. (2010) Utilização de linhagens parcialmente endogâmicas S3 para a obtenção de híbridos simples de milho. *Revista Biociências*, 15(2).
- Schaeffer, G.W.; Baenzinger, P.S.; Worley, J. (1979) Haploid plant development from anthers and in vitro culture of wheat. *Crop Science*, 19:697-702.
- Shiferaw, B., Prasanna, B. M., Hellin, J.; Banziger, M. (2011) Crops that feed the world 6. Past successes and future challenges to the role played by maize in global food security. *Food Security*, 3(3), 307.
- Soriano, M.; Cistué, L.; Castillo, A. M. (2008) Enhanced induction of microspore embryogenesis after n-butanol treatment in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *Plant Cell Reports*, 27(5):805-811.
- Spitkó, T., Sagi, L., Pintér, J., Marton, L. C.; Barnabás, B. (2006) Haploid regeneration aptitude of maize (*Zea mays* L.) lines of various origin and of their hybrids. *Maydica*, 51(3), 537.
- Shrestha, S.L; Luitel, B.; Kang, W. H. (2011) Agro-morphological characterization of anther derived plants in sweet pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Boogie). *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 52(2)196-203.
- Shull, G. H. (1948) What is "heterosis". *Genetics*, 33(5), 439-446.
- Streck, N. A., Bosco, L. C., Michelon, S., Walter, L. C., & Marcolin, E. (2006) Duração do ciclo de desenvolvimento de cultivares de arroz em função da emissão de folhas no colmo principal. *Ciência Rural*, 36(4), 1086-1093.
- Sunderland, N. (2012) Anther culture of *Nicotiana tabacum*. *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, 1:283.

- Talebi, R.; Rahemi, M.R.; Arefi, H; Nourozi, M; Bagheri, N. (2007) In vitro plant regeneration through anther culture of some Iranian local rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(12):2056-2060.
- Testillano, P., Georgiev, S., Mogensen, H. L., Coronado, M. J., Dumas, C., Risueño, M. C., & Matthys-Rochon, E. (2004) Spontaneous chromosome doubling results from nuclear fusion during in vitro maize induced microspore embryogenesis. *Chromosoma*, 112(7): 342-349.
- Ting, Y. C.; YU, Margaret; Z, W.Z. (1981) Improved anther culture of maize (*Zea mays*). *Plant Science Letters*, 23(2):139-145.
- Touraev, A., Pfosser, M., & Heberle-Bors, E. (2001) The microspore: a haploid multipurpose cell. *Advances in Botanical Research*, 35, 53-109.
- United States Department of Agriculture. World Agricultural Production. 2018. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>> Acesso em: 04 fev. 2018.
- Viana, F. M. S. et al. Hibridação em milho. (1999) In: *BORÉM, A. (Ed.). Hibridação artificial de plantas*. Viçosa: UFV. p. 401-426
- Vieira, V.D.C.; Moro, V.; Farinacio, D.; Martin, T.N; Menezes, L.F.G. (2015) Caracterização da silagem de milho, produzida em propriedades rurais do sudoeste do Paraná. *Ceres*, 58(4).
- Wang, S. H., Maia, L. H., Silva, L. F. M. D.; Cabral, L. C. (2000) Estudo das propriedades reológicas e sensoriais após reconstituição dos mingaus desidratados de arroz e soja. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 20(1): 68-73.
- Wenzel, G.; Foroughi-Wehr, B. (2012) Anther culture of *Solanum tuberosum*. *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, 1:293-301.
- Yu, X; Li, X; Zhao, X; Jiang, L; Miao, G; Pang, J; Qi, X; Liu, B. (2011) Tissue culture induced genomic alteration in maize (*Zea mays*) inbred lines and F1 hybrids. *Annals of Applied Biology*, 158(3):23