

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Duplo-haploides em milho tropical: efeito das gerações F_1 e F_2 na expressão do
R1-navajo, obtenção de linhagens e variabilidade genética

Évellyn Giselly de Oliveira Couto

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2017

Évellyn Giselly de Oliveira Couto
Bacharel em Ciências Biológicas

Duplo-haploides em milho tropical: efeito das gerações F_1 e F_2 na expressão do *R1-navajo*, obtenção de linhagens e variabilidade genética

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:

Prof. Dr. **ROBERTO FRITSCHÉ NETO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2017

RESUMO

Duplo-haploides em milho tropical: efeito das gerações F₁ e F₂ na expressão do *R1-navajo*, obtenção de linhagens e variabilidade genética

Dentre as diversas questões envolvendo a tecnologia duplo haploides (DH) em milho, uma que tem sido pouco discutida é a geração em que se deve induzir haploides, no caso, F₁ ou F₂. Destas, a F₁ tem sido a mais utilizada. No entanto, o seu uso constante pode levar a perdas de ganhos genéticos, devido ao menor número de recombinações. Com isso, alguns autores aconselham o uso da F₂ na indução, o que possibilitaria maiores ganhos em variabilidade genética. Desse modo, os objetivos foram verificar o efeito das gerações F₁ e F₂ na expressão do *R1-navajo* em germoplasma tropical, na eficiência relativa de cada uma das etapas da metodologia e na variabilidade genética das linhagens DH obtidas. Para isso, cinco fontes de germoplasma, em gerações F₁ e F₂, foram cruzadas com o indutor de haploidia tropicalizado LI-ESALQ. As sementes deste cruzamento foram agrupadas por meio do marcador *R1-navajo* em três classes: haploides putativos, diploides e inibidas. Após esta etapa, as sementes dos haploides putativos foram submetidas à duplicação cromossômica e as plantas duplicadas foram transplantadas a campo para a obtenção de linhagens DH. As unidades de sementes, plântulas e plantas em cada etapa da metodologia foram quantificadas para o estudo da eficiência relativa na obtenção de DH. Também foram coletadas amostras foliares das linhagens DH para genotipagem por meio de marcadores SNP (Single nucleotide polymorphism). As taxas de indução de haploides (HIR), sementes diploides (DSR) e inibidas (ISR) foram analisadas por meio de um modelo linear generalizado misto considerando distribuição logit multinomial. As eficiências relativas das fontes de germoplasma e gerações em cada etapa da metodologia DH foram estimadas por meio de porcentagem. Os marcadores SNP foram utilizados em estudos de diversidade genética, estrutura populacional e desequilíbrio de ligação. Os valores médios observados para as taxas de HIR, ISR e DSR foram, respectivamente, 1,23%, 23,4% e 75,2% para a geração F₁ e 1,78%, 19,6% e 82,3% para a geração F₂. O maior valor de HIR na F₂ ocorreu devido à segregação dos genes que inibem o marcador *R1-navajo* durante a indução de haploides. Entretanto, apesar da geração F₂ apresentar maior HIR, ela não deve substituir a F₁, uma vez que se perde tempo com um ciclo adicional. A eficiência relativa na obtenção de linhagens DH apresentou o mesmo valor (0,4%) para as gerações F₁ e F₂, indicando que a escolha da geração não interfere na quantidade de DH produzidos. As estimativas dos parâmetros populacionais para as linhagens DH obtidas de geração F₁ apresentaram valores para variância genética (V_G) de 700,55, tamanho efetivo populacional (N_e) de 43,1, diversidade genética de Nei (GD) de 0,28 e conteúdo de informação polimórfica (PIC) de 0,23. Para a geração F₂ as estimativas foram de $V_G=648,88$, $N_e=39,61$, GD=0,26 e PIC=0,22. Os valores de desequilíbrio de ligação foram de 0,069 na geração F₁ e de 0,067 na geração F₂. Ou seja, as linhagens DH oriundas destas duas gerações apresentaram magnitudes semelhantes de diversidade genética e de desequilíbrio de ligação. O uso da geração F₂ teoricamente permitiria obter maior variabilidade genética, devido à recombinação adicional. Entretanto, neste trabalho esta tendência não foi observada. Com isto, em milho tropical, recomenda-se o uso da geração F₁ para a obtenção de DH, por apresentar o melhor balanço entre tempo e variabilidade genética.

Palavras-chave: Linhagens indutoras; Genes de inibição; SNP; Estrutura populacional

ABSTRACT

Doubled haploids in tropical maize: effect of F₁ and F₂ generation on the expressiveness of R1-navajo, lines obtaining and genetic variability

Among the several questions involving doubled haploid technology (DH), one that has been little discussed is the generation in which one should induce haploids, in the F₁ or F₂. Overall, the F₁ generation has been the most used. However, their constant use can lead to losses of genetic gains with the selection cycles due to the lower number of recombination. Thereby, some authors advise the use of F₂ in inductions, which would allow greater gains in genetic variability. Thus, the objectives were to check the effect of the F₁ and F₂ generations on the expression of the R1-navajo in tropical germplasm, on the relative efficiency of each step of the methodology and the genetic variability of the DH lines obtained. For this purpose, five germplasm sources, in F₁ and F₂ generations, were crossed with the tropicalized haploid inducer LI-ESALQ. The seeds from this cross were grouped using the R1-navajo marker into three classes: putative haploids, diploid and inhibited. Then, putative haploid seeds were submitted to chromosome duplication, and the duplicate seedlings were transplanted to the field in order to obtain DH lines. Hence, seed, seedling, and plant at each stage of the methodology were quantified to study the relative efficiency in developing DH lines. Moreover, leaf samples from the D₀ lines were collected for genotyping using SNP (Single nucleotide polymorphism) markers. Finally, the haploid inducer rate (HIR), diploid seed rate (DSR) and inhibited seed rate (ISR) were analyzed using a generalized linear mixed model considering multinomial logit distribution. The relative efficiency of germplasm sources and generation in each stage of the DH methodology was estimated by percentage. SNP markers were used in studies of genetic diversity, population structure, and linkage disequilibrium. The observed mean values of HIR, ISR and DSR were, respectively, 1.23%, 23.4% and 75.2% for the F₁ generation and 1.78%, 19.6% and 82.3% for the F₂ generation. The higher value of HIR in F₂ occurred due to the segregation of genes, which inhibit the R1-navajo marker during haploid induction. However, in spite of the higher value of HIR for F₂ generation, it should not replace F₁ since time is lost with an additional cycle. The relative efficiency observed in the obtention of DH lines was the same value (0.4%) for generations F₁ and F₂, indicating that the choice between those generations does not interfere with the quantity of produced DH. Estimates of the population parameters for the DH lines obtained from F₁ generation presented values for genetic variance (VG) of 700.55, effective population size (Ne) of 43.1, Nei's genetic diversity (DG) of 0.28 and polymorphic information content (PIC) of 0.23. For F₂ generation the estimates were VG = 648.88, Ne = 39.61, GD = 0.26 and PIC = 0.22. Linkage disequilibrium values were 0.069 in the F₁ generation and 0.067 in the F₂ generation. Thus, DH lines from these two generations showed similar values of genetic diversity and linkage disequilibrium. Nonetheless, the use of the F₂ generation theoretically would allow obtaining greater genetic variability, due to the additional cycle of crossing-overs. However, this trend was not observed in this study. Thus, in tropical maize, the use of the F₁ generation to obtain DH lines is recommended, because it performs the best balance between time and genetic variability.

Keywords: Haploid inducer lines; Inhibition genes; SNP; Population structure

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a obtenção de linhagens duplo-haploides (DH) em milho tem se tornado uma prática comum em instituições públicas e privadas em todo o mundo. Isto é devido a esta permitir a obtenção rápida de linhagens completamente homozigotas, propiciando material teste para uma seleção mais confiável do que via linhagens obtidas por meio de autofecundações sucessivas. Além disso, a implementação desta tecnologia em um programa de melhoramento aumenta o ganho genético, simplifica a logística utilizada no desenvolvimento e manutenção das linhagens, possibilita um fácil registro de variedades de plantas e potencializa o desenvolvimento de novos híbridos (MELCHINGER et al., 2005; MELCHINGER et al., 2016a).

Resumidamente, a metodologia DH é classificada pelas seguintes etapas: 1) cruzamento entre uma linhagem indutora de haploidia e genótipo doador; 2) seleção de sementes de putativos haploides por meio do marcador *R1-*nj** (NANDA; CHASE, 1966); 3) duplicação cromossômica, 4) autofecundação das linhagens D_0 para obtenção das linhagens D_1 (MELCHINGER et al., 2005) e 5) início dos *testcrosses* e multiplicação das linhagens D_1 para serem inseridas no programa de melhoramento.

As primeiras linhagens indutoras de haploidia que surgiram, Stock 6 (COE, 1959) e W23 (KERMICLE, 1969, 1971), são de origem temperada. A partir delas foram desenvolvidas outras linhagens com maiores taxas de indução e adaptação, tanto em ambiente temperado como tropical. Hoje, as linhagens temperadas com maiores taxas de indução de haploides (HIR), são derivadas da linhagem ginogenética Stock 6: WS14 (LASHERMES e BECKERT, 1988), RWS (RÖBER; GORDILLO; GEIGER, 2005), HZI1 (ZHANG et al., 2008), PHI (ROTARENCO et al., 2010). Já em países de clima tropical o que se observa é uma implantação mais lenta da tecnologia (PRIGGE et al., 2012c), apesar das etapas da metodologia não serem afetadas por condições climáticas (PRIGGE et al., 2011). Este atraso ocorre principalmente devido a não adaptação dos indutores de haploidia ao clima tropical e à escolha do ambiente em que a metodologia é implementada, visto que as linhagens D_0 exigem um ambiente úmido com temperaturas amenas para que os grãos de pólen e estilo-estigma se desenvolvam bem para a realização da autofecundação. Neste contexto, o Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo (CIMMYT) tem desenvolvido indutores tropicais de haploidia com altas HIR, tais como Tail 8 e Tail 9, em parceria com a Universidade de Hohenheim. Em nossa universidade nós temos um indutor de haploidia ginogenético tropicalizado, LI-ESALQ, proveniente do cruzamento entre (W23xStock6) x híbrido tropical, o qual ainda não foi estudado quanto às taxas de indução de haploides e eficiência na obtenção de linhagens DH.

A escolha das fontes doadoras que serão utilizadas na indução de haploides depende dos objetivos do programa, podendo ser extraídas linhagens DH de populações ou híbridos. Em outra abordagem, que não seja a de obtenção de híbridos imediata, o uso da tecnologia DH pode permitir o resgate de linhagens elite ou selvagens, a partir da indução de haploides nestas fontes (BÖHM et al., 2017). Em um esquema padrão de obtenção de DH, a geração F_1 tem sido preferencialmente utilizada como população base (MELCHINGER et al., 2005; SMITH et al., 2008), enquanto que induções envolvendo a geração F_2 tem sido pouco abordadas no meio científico. Além disso, utilizar gerações mais tardias que a F_2 não faz sentido na tecnologia DH, já que o objetivo é acelerar o processo de obtenção de linhagens. Atualmente, todos os estudos publicados que envolvem esta questão são relacionados a regiões de clima temperado ou de simulação (BERNARDO, 2009; SLEPER; BERNARDO, 2016), de modo que as regiões de clima tropical foram pouco abordadas até o momento.

Dentre as vantagens de se utilizar a geração F_1 na indução de haploides, está o ganho de tempo na obtenção das linhagens DH e a possibilidade de se manter combinações favoráveis existentes nas linhagens parentais, uma vez que a recombinação dos genes ligados ocorrerá somente na meiose que irá originar o gameta responsável pela formação da semente haploide (PIERRE et al., 2011). Por exemplo, em estudos de simulação foi observada herança de cerca de 50% de grandes blocos gênicos intactos de 7 em cada 10 cromossomos parentais (SMITH et al., 2008). No entanto, o uso constante da geração F_1 ao longo dos ciclos de seleção tem gerado discussões no meio científico. Uma das questões abordadas é em relação à taxa de recombinação nessas linhagens ser menor que em linhagens convencionais, o que poderia acarretar em um decréscimo na resposta dos ganhos de seleção (RIGGS; SNAPE, 1977; JANNINK; ABADIE, 1999). Por outro lado, ao utilizar a geração F_2 na indução de haploides, haveria um ciclo a mais na etapa de melhoramento, o que, teoricamente, aumentaria a variabilidade genética das linhagens obtidas, mas também o tempo e os custos. Além disso, por meio de induções de haploides em geração F_2 é esperado cerca de 50% a mais de crossover que nas induções que ocorrem em geração F_1 . Assim, por meio do uso da geração F_2 ocorre maior rompimento nas associações desfavoráveis, enquanto que no uso da geração F_1 ocorre maior preservação de associações favoráveis (SLEPER; BERNARDO, 2016). Além disso, na etapa de indução de haploides em geração F_2 , as plantas menos vigorosas e menos sadias podem ser descartadas no campo, ao contrário das plantas em geração F_1 as quais apresentam fenótipo semelhante (BERNARDO, 2009). Diante das particularidades de cada geração, os autores Sleper e Bernardo (2016) afirmam que a escolha de qual delas utilizar na indução de haploides depende dos objetivos de cada programa de melhoramento, e do tempo e recursos que o melhorista pode investir na

metodologia. No entanto, é importante discutir a respeito do custo e benefício do uso de cada geração na indução de haploides em clima tropical.

Após a obtenção das sementes provenientes do cruzamento entre a fonte de germoplasma com o indutor, os putativos haploides são selecionados pela cor, devido a presença de antocianina nas sementes, ocasionada pelo marcador *R1-ηj* (NANDA; CHASE, 1966). Este marcador é largamente utilizado, porém neste processo ocorre a presença de muitos falsos positivos. Com isto, várias metodologias já foram desenvolvidas para complementar o *R1-ηj*, tais como o teor de óleo (MELCHINGER et al., 2014), a presença e ausência de lígula (PRIGGE et al., 2012a), a presença e ausência de *glossy* e a resistência a herbicidas (MELCHINGER et al., 2016a), e o uso de citometria de fluxo (BATTISTELLI et al., 2013; COUTO et al., 2013). Estas metodologias possibilitam que os indivíduos haploides sejam selecionados com maior confiabilidade, visto que o marcador *R1-ηj* possui expressividade variável que depende do germoplasma utilizado como doador (PRIGGE et al., 2011), ou ainda, pode ser inibido pela presença de genes específicos presentes em germoplasma tropical (CHAIKAM et al., 2015). O germoplasma do milho tropical não possui em sua constituição os genes que atuam na rota da expressão da antocianina. Por outro lado, possui genes mutantes conhecidos como *C1-I*, *C2-Idf* e *in-1D*, que atuam no sentido de impedir a expressão de antocianina nas sementes (COE et al., 1988; STINARD; SACHS, 2002). Na presença destes genes, a inibição pode ser total ou parcial, dependendo de como os alelos estarão presentes, se de modo homocigoto ou heterocigoto (CHAIKAM et al., 2015). Assim, supondo-se por exemplo, que um germoplasma com bom desempenho agrônomico possua os genes inibidores da antocianina, seu uso na obtenção de novas linhagens DH seria dificultado. Neste contexto, é importante ressaltar que o comportamento destes genes inibidores na obtenção de haploides tropicais a partir de gerações F_1 e F_2 ainda não foi estudado em milho tropical.

Outro fator importante na obtenção de linhagens DH é a análise das etapas utilizadas na metodologia em relação às suas eficiências. Neste contexto, Melchinger et al. (2016b) detalharam estas etapas e apresentaram resultados relacionados com os custos de produção das linhagens e de produtos antimitóticos utilizados na duplicação cromossômica. Entretanto até o momento não há na literatura um estudo detalhado das etapas e suas eficiências relativas, considerando induções em gerações F_1 e F_2 ou mesmo, milho tropical. Estes resultados poderiam auxiliar na identificação das etapas críticas da metodologia, direcionar a seleção e o melhoramento de indutores para estas etapas, além de oferecer um planejamento da logística necessária para cada fase da metodologia, em função do número de DH pretendido.

6. CONCLUSÕES

As linhagens DH oriundas de diferentes gerações apresentaram variabilidade genética e desequilíbrio de ligação semelhante. Com isto, em milho tropical, recomenda-se o uso da geração F_1 para a obtenção de DH, por apresentar o melhor balanço entre tempo e variabilidade genética.

A indução de haploides em geração F_2 possibilita a segregação dos genes que inibem o marcador *R1- η j*, aumentando a taxa de indução de haploides (HIR) e diminuindo a taxa de inibição de sementes (ISR), o que acarreta na seleção de mais sementes de haploides putativos. No entanto, somente nos casos específicos em que houver a presença de inibição em um genótipo promissor, a geração F_2 deve ser utilizada.

O uso das gerações F_1 e F_2 na indução de haploides não interfere na eficiência do processo. Por outro lado, a fonte de germoplasma sim.

O indutor tropicalizado LI-ESALQ apresentou taxa média de indução de haploides de 1,5%.

REFERÊNCIAS

- BARRET, P.; BRINKMANN, M.; BECKERT, M. A major locus expressed in the male gametophyte with incomplete penetrance is responsible for in situ gynogenesis in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 117, n. 4, p. 581–594, 2008.
- BATTISTELLI, G. M. et al. Production and identification of doubled haploids in tropical maize. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 4230–4242, 2013.
- BELICUAS, P. R. et al. Androgenetic haploids and SSR markers as tools for the development of tropical maize hybrids. **Euphytica**, v. 156, n. 1–2, p. 95–102, 21 fev. 2007.
- BERNARDO, R. Should maize doubled haploids be induced among F(1) or F (2) plants? **Theoretical and applied genetics.**, v. 119, n. 2, p. 255–62, jul. 2009.
- BÖHM, J. et al. Tapping the genetic diversity of landraces in allogamous crops with doubled haploid lines: a case study from European flint maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 130, n. 5, p. 861–873, 2017.
- BORDES, J. et al. Doubled haploid versus S1 family recurrent selection for testcross performance in a maize population. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 112, n. 6, p. 1063–1072, 2006.
- CHAIKAM, V. et al. Analysis of effectiveness of R1-nj anthocyanin marker for in vivo haploid identification in maize and molecular markers for predicting the inhibition of R1-nj expression. **TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik**, v. 128, n. 1, p. 159–171, 2015.
- CHAIKAM, V. et al. Development and Validation of Red Root Marker-Based Haploid Inducers in Maize. **Crop Science**, v. 56, n. 4, p. 1678, 2016.
- COUTO, E. G. DE O. et al. Identificação de milho haploide por citometria de fluxo, marcadores morfológicos e moleculares. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 37, n. 1, p. 25–31, 2013.
- DE ANDRADE, L. R. B. et al. Genetic vulnerability and the relationship of commercial germplasms of maize in Brazil with the nested association mapping parents. **PLoS ONE**, v. 11, n. 10, p. 1–14, 2016.
- DE OLIVEIRA COUTO, E. G. et al. Verification and characterization of chromosome duplication in haploid maize. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 14, n. 2, p. 6999–7007, 2015.
- EDER, J.; CHALYK, S. In vivo haploid induction in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, n. 4, p. 703–708, 2002.
- FRITSCH- NETO, GARBUGLIO, B. Duplo-Haploides. In: BOREM, A., FRITSCH- NETO, R. (Ed.). . **Biotechnologia aplicada ao melhoramento de plantas**. 1º ed. [s.l.] Suprema, 2013. p. 267–302.
- GEIGER, H. H.; GORDILLO, G. A. Doubled haploids in hybrid maize breeding. **Maydica**, v. 54, n. 4, p. 485–499, 2009.
- GENETICS, A. Anthocyanin Genetics. In: IN: FREELING M, W. V. (EDS) (Ed.). . **The maize handbook**. New York: Springer- Verlag, 1994. p. 279–281.
- HECKENBERGER M, K. M. B. D.; MELCHINGER A.E. Identification of Essentially Derived Varieties Obtained from Biparental Crosses of Homozygous Lines II. Morphological Distances and Heterosis in Comparison with Simple Sequence Repeat and Amplified Fragment Length

Polymorphism Data in Maize. **Crop Sci** 45:1132-1140 (2005), v. 1140, p. 1120–1131, 2005.

KEBEDE, A. Z. et al. Effect of source germplasm and season on the in vivo haploid induction rate in tropical maize. **Euphytica**, v. 180, n. 2, p. 219–226, 2011.

LI, L. et al. Morphological and molecular evidences for DNA introgression in haploid induction via a high oil inducer CAUHOI in maize. **Planta**, v. 230, n. 2, p. 367–376, 2009.

MARRONI, F. et al. Nucleotide diversity and linkage disequilibrium in *Populus nigra* cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD4) gene. **Tree Genetics and Genomes**, v. 7, n. 5, p. 1011–1023, 2011.

MCCLOSKEY, B.; TANKSLEY, S. D. The impact of recombination on short-term selection gain in plant breeding experiments. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 126, n. 9, p. 2299–2312, 2013.

MELCHINGER, A. et al. **Hybrid maize breeding with doubled haploid lines: quantitative genetic and selection theory for optimum allocation of resources**. Proc.41st Annual Illinois Corn Breeder's School, Urbana Champaign. **Anais...Illinois: 2005** Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Hybrid+maize+breeding+with+doubled+haploid+lines+:+quantitative+genetic+and+selection+theory+for+optimum+allocation+of+resources#0>>

MELCHINGER, A. et al. In Vivo haploid induction in maize: comparison of different testing regimes for measuring haploid induction rates. **Crop Science**, v. 56, n. June, p. 1–2, 2016a.

MELCHINGER, A. E. et al. Rapid and accurate identification of in vivo-induced haploid seeds based on oil content in maize. **Scientific reports, Nature**, v. 3, n. 2129, p. 1–5, 2013.

MELCHINGER, A. E. et al. In vivo haploid induction in maize: Identification of haploid seeds by their oil content. **Crop Science**, v. 54, n. 4, p. 1497–1504, 2014.

MELCHINGER, A. E. et al. Colchicine alternatives for chromosome doubling in maize haploids for doubled- haploid production. **Crop Science**, v. 56, n. 2, p. 559–569, 2016b.

PIERRE, P. M. O. et al. Doubled haploids: importance in the genetic breeding of maize. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 10, n. 1, p. 1–16, 2011.

PRASANNA BM, CHAIKAM VIJAY, M. G. **Doubled Haploid Technology in Maize Breeding: Theory and Practice**. [s.l.: s.n.].

PRIGGE, V. et al. Doubled haploids in tropical maize: I. effects of inducers and source germplasm on in vivo haploid induction rates. **Crop Science**, v. 51, n. 4, p. 1498–1506, 2011.

PRIGGE, V. et al. Development of in vivo haploid inducers for tropical maize breeding programs. **Euphytica**, v. 185, n. 3, p. 481–490, 2012a.

PRIGGE, V. et al. New insights into the genetics of in vivo induction of maternal haploids, the backbone of doubled haploid technology in maize. **Genetics**, v. 190, n. 2, p. 781–793, 2012b.

PRIGGE, V. et al. Doubled haploids in tropical maize: II. Quantitative genetic parameters for testcross performance. **Euphytica**, v. 185, n. 3, p. 453–463, 25 Jan. 2012c.

QIU, F. et al. Morphological, cellular and molecular evidences of chromosome random elimination in vivo upon haploid induction in maize. **Current Plant Biology**, v. 1, p. 83–90, 2014.

RIGGS, T. J.; SNAPE, J. W. Effects of linkage and interaction in a comparison of theoretical

populations derived by diploidized haploid and single seed descent methods. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 49, n. 3, p. 111–115, 1977.

RÖBER, F. K.; GORDILLO, G. A.; GEIGER, H. H. In vivo haploid induction in maize - Performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding. **Maydica**, v. 50, n. 3–4, p. 275–283, 2005.

ROTARENCO, V. et al. New inducers of maternal haploids in maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v. 84, n. 3, p. 1–7, 2010.

SHULL, G. H. The composition of a field of maize. **American Breeders Association Report**, Washington, v. 4, p. 296–301, 1908.

_____. A pure line method of corn breeding. **American Breeders Association Report**, Washington, v. 5, p. 51–59, 1909.

_____. Hybridization methods in corn breeding. **American Breeders Association Report**, Washington, v. 6, p. 63–72, 1910.

SLEPER, J. A.; BERNARDO, R. Recombination and genetic variance among maize doubled haploids induced from F1 and F2 plants. **Theoretical and Applied Genetics**, 2016.

SMITH, J. S. C. et al. Use of doubled haploids in maize breeding: Implications for intellectual property protection and genetic diversity in hybrid crops. **Molecular Breeding**, v. 22, n. 1, p. 51–59, 2008.

SOUZA JÚNIOR, C.L. Melhoramento de espécies alógamas. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, T.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001.p. 694-671.

STINARD, P. S.; SACHS, M. M. The identification and characterization of two dominant r1 haplotype-specific inhibitors of aleurone color in *Zea mays*. **Journal of Heredity**, v. 93, n. 6, p. 421–428, 2002.

STRIGENS, A. et al. Unlocking the Genetic Diversity of Maize Landraces with Doubled Haploids Opens New Avenues for Breeding. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. 7–9, 2013.

WU, P. et al. Early spontaneous diploidization of maternal maize haploids generated by in vivo haploid induction. **Euphytica**, p. 127–138, 2014.

XU, X. et al. Gametophytic and zygotic selection leads to segregation distortion through in vivo induction of a maternal haploid in maize. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 4, p. 1083–1096, 2013.

YANG, J. et al. Common SNPs explain a large proportion of the heritability for human height. **Nature Genetics**, v. 569, p. 565–569, 2010.

ZHANG, Z. et al. Chromosome elimination and in vivo haploid production induced by Stock 6-derived inducer line in maize (*Zea mays* L.). **Plant Cell Reports**, v. 27, n. 12, p. 1851–1860, 2008.

ZHAO, X. et al. Fertilization and uniparental chromosome elimination during crosses with maize haploid inducers. **Plant physiology**, v. 163, n. 2, p. 721–731, 2013.

