

EFEITO MATERNO E FONTES DE PÓLEN NA OBTENÇÃO DE HAPLÓIDES E DE DUPLO-HAPLÓIDES EM TRIGOS “STAY-GREEN”

MATERNAL EFFECT AND POLLEN SOURCES IN THE OBTAINMENT OF HAPLOIDS AND DOUBLE-HAPLOIDS IN STAY-GREEN WHEAT

José Antônio Gonzalez da Silva; Fernando Irajá Félix de Carvalho; Irineu Hartwig; Ivandro Bertan; Antônio Costa de Oliveira; Douglas André Mallmann Schmidt; Igor Pires Valério; Taciane Finatto; Daniel Andrei Robe Fonseca; Gustavo da Silveira.

RESUMO

A identificação de polinizadores potenciais e uso de efeito materno podem ser estratégias que permitam aumentar a eficiência da técnica de duplo-haplóides em trigo. O presente trabalho teve como objetivo verificar a presença de efeito materno e de fontes de pólen nos caracteres número de grãos cheios formados, número de embriões haplóides resgatados, número de plântulas haplóides desenvolvidas e número de plantas duplo-haplóides obtidas, empregando cruzamento intergenérico trigo x milho em populações de trigo F_1 , provenientes de genitores com e sem a presença do caráter “stay-green”. Foram polinizados 532 espigas de trigo com o milho híbrido AG 6018 e população de milho BR 400 e Pampeano. Os resultados evidenciaram que as fontes de pólen são de extrema importância para obtenção de embriões haplóides e como consequência na produção de duplo-haplóides no cruzamento trigo e milho. O favorecimento na obtenção de grãos cheios, embriões e plantas haplóides e de duplo-haplóides, não têm apoio na hipótese de efeito materno em trigo.

Palavras-Chave: ginogênese, melhoramento vegetal, milho, aditividade, *Triticum aestivum* L.

ABSTRACT

The identification of potential pollinators and maternal effect use can be strategies that favor the increase in the efficiency of double haploid techniques in wheat. The present work had the objective to verify the presence or absence of maternal and pollen sources effect on the characters number of formed full grains, number of rescued haploid embryos, number of developed haploid plantlets and number of obtained double-haploid plants. Intergeneric crosses wheat x corn using stay-green and non stay-green wheat lines were compared at the F_1 generation. A total of 532 wheat

spikes were pollinated with hybrid corn AG 6018 and population corn BR 400 e Pampeano. The results evidenced that the pollen sources are extremely important for obtaining haploid embryos and consequently in the production of double-haploid from wheat x corn crosses. Full grains, haploid embryos, haploid and double haploid plants formation, don't have support in the hypothesis of maternal effect in wheat.

Key-words: gynogenesis, plant breeding, maize and wheat, additive effect, *Triticum aestivum* L.

INTRODUÇÃO

O caráter “stay-green” é um dos fatores que poderá auxiliar o melhorista na obtenção de plantas mais produtivas, estáveis e com maior capacidade de adaptação. A permanência da estrutura verde da planta por um período mais prolongado de tempo até o enchimento de grãos, além de possibilitar maior fotossíntese, poderá auxiliar a planta de forma direta, no desenvolvimento de uma maior tolerância a presença de moléstias, principalmente necrotróficas (SILVA, 1999).

O comportamento da manifestação fenotípica em genótipos “stay-green” revela um prolongamento na duração da área verde dos colmos e das folhas; determinando além disto, o início da senescência que se processa de cima para baixo, onde os colmos e as folhas inferiores são as últimas estruturas a secar, diferentemente do trigo sem a presença do caráter (maturação sincronizada) onde a senescência se dá de baixo para cima e a espiga é a última estrutura a maturar.

(Recebido para Publicação em 16/08/2006, Aprovado em 08/02/2008)

DUVICK (1984), DUVICK (1992), RUSSEL (1986) e CEPPI et al. (1987), apontaram que os genótipos de milho que apresentavam o caráter “stay-green” promoviam aumento no rendimento de grãos. Também, SILVA et al. (2004) estudando o comportamento de linhagens de trigo com a presença do caráter “stay-green”, verificaram maior deposição de reservas nos grãos na fase próxima ao ponto de maturação fisiológica, fase crítica para o aumento do peso médio do grão.

Atualmente, uma das grandes limitações no melhoramento de plantas autógamas, como o trigo, é o tempo necessário a ser alcançado o estágio de homozigose, após a hibridação, o que evidencia, portanto, a necessidade de desenvolver novas técnicas que permitam acelerar o processo e intensificar a eficiência de seleção para o lançamento de variedades mais adaptadas e produtivas (SILVA et al., 2004).

No melhoramento de cereais de estação fria, a haploidia pode permitir acelerar o processo de melhoramento varietal pela eliminação das gerações segregantes heterozigotas com conseqüente ganho de tempo, podendo aumentar a eficiência de seleção e economia de espaço nos campos experimentais (MORAES-FERNANDES, 1990). Desta forma, com a obtenção de linhas homozigotas pela duplo-haploidização a variância aditiva é maximizada, os efeitos não aditivos são neutralizados e as vantagens em caracteres quantitativos podem ser maiores, uma vez que a seleção é realizada primordialmente com base na ação gênica de aditividade, não havendo interferência dos efeitos de dominância e epistasia (SILVA et al., 2002).

A técnica desenvolvida por LAURIE & BENNETT (1987) no cruzamento trigo x milho propiciou o entendimento da participação com menor intensidade do genótipo e maior eficiência na obtenção de haplóides, em relação às dificuldades encontradas na cultura de anteras (LAURIE & REYMONDIE, 1991). Entretanto, vários fatores estão envolvidos no sucesso da obtenção de haplóides por cruzamento trigo x milho como a constituição genética dos genitores, o período de emasculação e polinização, o resgate dos embriões e os meios de cultura antes e depois da polinização, bem como condições adequadas de ambiente como luz, temperatura e outros. Nesta mesma linha de pesquisa, SILVA et al. (2004) polinizando antécios de trigo com milho, verificaram a existência de diferenças na

expressão dos caracteres número de grãos cheios formados e número de embriões haplóides resgatados pelo emprego de diferentes fontes de pólen de espécies distintas ao trigo hexaplóide.

Como os plastídios e mitocôndrias nas plantas codificam para algumas de suas próprias proteínas, é claramente evidente a presença de DNA nestas estruturas do citoplasma, indicando deste modo, que nem todos os caracteres são controlados exclusivamente pelo DNA localizado no núcleo. A maior parte dos genes herdados pelo citoplasma são transmitidos pelo genitor materno. Isto ocorre pela ausência de cloroplastos e mitocôndrias nas células do gameta masculino, ou mesmo que possam estar presentes, geralmente não são transmitidos para a oosfera (gameta materno), permitindo que apenas o núcleo da célula do genitor paterno consiga penetrar, excluindo todo o seu citoplasma; com isto, a ação de genes extranucleares de organelas existentes apenas no zigoto do genitor receptor do grão de pólen pode ser manifestada, determinando desta forma, o efeito de “herança materna” (RAVEN, 2001).

O presente trabalho teve como objetivo verificar a presença de efeito materno e de fontes de pólen nos caracteres número de grãos cheios formados (NGC), número de embriões haplóides resgatados (NEH), número de plântulas haplóides desenvolvidas (NPH) e número de plantas duplo-haplóides obtidas (NPDH), empregando cruzamento intergenérico trigo x milho em populações de trigo F₁, provenientes de genitores com e sem a presença do caráter “stay-green”.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em estufa climatizada nos anos de 2003 e 2004 pertencente à Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel/Universidade Federal de Pelotas (FAEM/UFPel), situada no município de Capão do Leão/RS. Os genótipos utilizados foram TB438 e TB188, que compreendem linhagens selecionadas no programa de melhoramento da Embrapa Clima Temperado (CPACT/RS). Estes genótipos foram obtidos via recombinação em seleção recorrente com várias linhagens promissoras que evidenciavam o caráter “stay-green” e por expressarem senescência sincronizada.

Os genitores TB438 (portador do caráter “stay-green”) e TB188 (maturação sincronizada) foram semeados em

telado no ano de 2002 para a obtenção da população F_1 , considerando também o cruzamento recíproco. As sementes F_1 obtidas foram semeadas em baldes a partir da primeira semana de maio nos dois anos de condução do experimento, sendo utilizados oito épocas distintas com intervalos de dez dias, objetivando facilitar o cruzamento artificial. O solo foi adubado com macro e micronutrientes e pH corrigido para 6,0.

Como fontes de pólen foram utilizadas as cultivares de milho híbrido AG 6018 (híbrido simples de grande potencial produtivo de pólen), BR 400 (população de milho de alta precocidade e produção de pólen) e PAMPEANO (população de milho de ciclo tardio), que foram semeadas em intervalos de sete dias em ambiente com controle de temperatura. Além disto, lâmpadas fluorescentes de 100 W e estufa elétrica foram utilizadas para intensificar a luminosidade no inverno, devido redução de fotoperíodo neste período do ano, e melhor controle da temperatura noturna, de modo a permitir a formação de pólen viável.

A emasculação do trigo foi realizada com a retirada dos antécios centrais, corte das aristas e a remoção das anteras, sendo as espigas ensacadas em envelopes de papel vegetal. Posteriormente, no 3º ou 4º dia após a emasculação, foram realizadas as polinizações com pólen de milho, recém coletado da planta doadora. Após 24 e 48 horas da polinização, era injetada no colmo da planta receptora uma solução de 2,4D a 10%, permanecendo as espigas por 12 a 14 dias em casa de vegetação após a polinização. Após, as espigas foram coletadas e levadas ao Laboratório de Duplo-haplóides e Hidroponia para o resgate de embriões em câmara de fluxo laminar empregando microscópio estereoscópio. Os embriões haplóides foram levados ao meio de cultura modificado “Batata-2” segundo CHUANG et al. (1981). Os embriões haplóides incubados em tubos de ensaio permaneceram três dias no escuro e após, em ambiente com luminosidade (1200 lx) com temperatura controlada para 20° C, ficando por mais 30 a 60 dias em câmara de crescimento nestas condições. Decorrido este período, as plântulas haplóides desenvolvidas foram retiradas do tubo de ensaio e transferidas para potes contendo vermiculita, sendo encobertas por um copo de *Becker* por aproximadamente sete dias, onde eram tratadas com solução nutritiva de *Hoagland* (água e solução na proporção de 2:1). Após 40 a 60 dias, as plântulas foram

colocadas em um *becker* com solução de colchicina (0,25%) e DMSO (dimethyl sulfoxide 2%) por 3 a 4 horas, para duplicação dos cromossomos. A partir deste período, os genótipos foram transplantados em potes com terra e mantidos em casa de vegetação para o desenvolvimento de afilhos férteis e obtenção das sementes duplo-haplóides.

Para uma aplicação válida dos testes de significância nos caracteres avaliados durante as etapas da técnica de duplo-haplóides, os dados foram submetidos ao teste de normalidade para prever a possibilidade de realização da estatística F, que confirmou a necessidade de transformação. Desta forma, os dados foram transformados para $\sqrt{x + 0,5}$, como sugerido CENTENO (2001), quando envolvendo valores de contagens menores do que dez. Logo, os caracteres evidenciaram uma distribuição aproximadamente normal, que permitiu, portanto, a realização de testes estatísticos e verificar a hipótese de diferenças entre as fontes de pólen e existência de efeito materno nos genótipos portadores do caráter “stay-green”. No estudo, as variáveis analisadas foram: número de grãos cheios formados (NGC), número de embriões haplóides obtidos (NEH), número de plantas haplóides formadas (NPH) e número de plantas duplo-haplóides obtidas (NPDH).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados induídos na Tabela 1 evidenciaram que das 532 espigas de trigo polinizadas com milho nos anos de 2003 e 2004 foram obtidos 8611 grãos cheios, 551 embriões haplóides resgatados, 264 plantas haplóides desenvolvidas e 137 genótipos duplo-haplóides formados. Estes resultados evidenciam com base nos dados apresentados por SILVA et al. (2002), a ocorrência de progresso na eficiência de recuperação de haplóides obtidos no Centro de Genômica e Fitomelhoramento da FAEM/UFPel, considerando que num reduzido número de anos passados a obtenção de embriões haplóides era de baixa frequência, sem contar as dificuldades apresentadas durante as técnicas de duplicação de cromossomos e aclimação de plantas.

Na Tabela 2, é possível verificar que o fator ano evidenciou diferenças apenas para o caráter número de plantas duplo-haplóides (NPDH), fato este esperado, visto que, nas etapas que antecederam a obtenção de plantas duplo-haplóides, os procedimentos eram realizados com

determinado controle de ambiente, tanto na casa de vegetação como em laboratório. Além disto, após o processo de duplicação dos genomas, as plantas foram submetidas em condições de telado para produção de filhos férteis a partir do mês de novembro, ambiente adverso às condições normais de desenvolvimento da espécie, o que reduziu consideravelmente o número de plantas sobreviventes. Desta forma, ficou evidente que após o processo de duplicação, o cultivo das plantas em casa de vegetação com controle de ambiente também assume importância, principalmente pela maior estabilidade e previsibilidade de produção de genótipos duplo-haplóides recombinantes.

Para o fator genótipo, diferença significativa foi observada para o caráter número de grãos cheios (NGC) (Tabela 2), indicando possivelmente a existência de efeitos distintos quando as linhagens TB438 e TB188 eram empregadas como genitor paterno e materno. Já, nos demais caracteres avaliados não revelaram diferenças, o que determina que o aumento no NGC não refletiu no incremento do número de embriões haplóides (NEH), número de plantas haplóides (NPH) e NPDH. Aliado a isto, diferenças existentes entre as fontes de pólen (FP) também foram observadas neste caráter, porém, testes realizados nas espigas emasculadas com e sem polinização com milho e de aplicação regular de hormônio 2,4D no colmo do trigo, evidenciaram desenvolvimento normal de grãos cheios na espiga. Desta forma, a hipótese de diferenças existentes na Tabela 2 não é evidente, demonstrando que o NGC não é dependente do polinizador nem do genoma materno, rejeitando biologicamente as diferenças na expressão deste caráter.

Observação relevante na Tabela 2 é a provável existência de efeitos distintos entre as fontes de pólen sobre o NEH, pois representa o caráter mais importante a ser estudado, principalmente devido à reduzida frequência de embriões haplóides recuperados. Isto pode ser evidenciado pelos resultados apresentados na Tabela 1, que do total de 8611 grãos cheios formados foram obtidos apenas 551 embriões imaturos, correspondendo a uma eficiência de 6,4%, sendo que nas etapas subsequentes que vai do desenvolvimento da planta haplóide até duplicação de cromossomos e produção de sementes, a eficiência se dá em torno de 50%, confirmando desta forma, que a fase inicial

de obtenção de embriões é o estágio limitante da técnica de duplo-haploidização.

Contudo, para o NPH ocorreu interação tripla ANO*GEN*FP, o que evidencia a necessidade de desdobramento da análise pela observação de seus efeitos simples através da partição dos graus de liberdade do modelo geral para cada um dos fatores empregados no trabalho. Portanto, pelos resultados inseridos na Tabela 3, independente das diferenças existentes entre as populações de trigo e fontes de pólen, considerando apenas os anos de avaliação, tanto o caráter NPDH como NPH expressaram diferenças, evidenciando que a cada 100 espigas trabalhadas, foi obtida uma média estimada de 58 plantas haplóides em 2003 e 35 em 2004 e conseqüentemente 32 recombinantes duplo-haplóides em 2003 e 15 no ano de 2004.

Tendo por base a análise apenas das fontes de pólen, independente das diferenças entre as populações de trigo nos dois anos de avaliação, o milho BR400 determinou diferenças apenas em relação ao AG6018 quanto ao caráter NGC; no entanto, ficou evidenciado que este caráter não apresenta relação com os fatores testados, como discutido anteriormente, determinando ausência de diferenças entre estas fontes de pólen. Já, em comparação com o genótipo PAMPEANO, o BR400 demonstrou superioridade em todos os caracteres analisados, principalmente quanto ao caráter NEH. Desta forma, considerando este caráter, de cada 100 espigas polinizadas foi obtida uma média estimada de 125 e 70 embriões haplóides, respectivamente. Estudo semelhante foi realizado por SUENAGA & NAKAJIMA (1989) e SILVA et al. (2004), onde indicaram que a frequência de formação de embriões haplóides em trigo foi significativamente diferente entre os distintos genótipos de milho empregados na técnica de cruzamento trigo x milho. Este fato evidencia, portanto, a necessidade do conhecimento pelo melhorista do desempenho dos genótipos doadores do grão de pólen, visto que podem representar estratégia eficiente para o incremento na frequência embriões imaturos recuperados.

A seleção de grãos de pólen para a técnica de duplo-haploidização foi proposta por SILVA et al. (2004), sugerindo a seleção indireta para crescimento vigoroso do tubo polínico através da obtenção das sementes da base da espiga, pois segundo BIGNOTTO et al. (2001) os grãos situados na base da espiga de milho tendem a evidenciar uma melhor

constituição genética no crescimento e desenvolvimento do tubo polínico, devido justamente, serem polinizados por grãos de pólen mais vigorosos, uma vez que o comprimento do estilo-estigma dos grãos situados na base tende a ser maior em comparação aos grãos situados na extremidade da espiga.

Em relação às diferenças estatísticas apresentadas entre os genótipos de milho AG6018 com PAMPEANO quanto ao número de plantas haplóides formadas e duplo-haplóides obtidos (Tabela 3), estes resultados não podem ser confirmados, devido principalmente pela ausência de significância no NEH, visto que é o caráter mais influenciado pela constituição genética do doador do pólen determinado pelo contato direto micrósporo-estigma e núcleo espermático-oosfera na fecundação, para posterior eliminação do genoma paterno e desenvolvimento do embrião haplóide.

Conforme dados incluídos na Tabela 4, considerando o ano de 2003, foram determinadas comparações duas a duas entre as médias dos caracteres avaliados pelo emprego de teste t, de forma a testar a provável hipótese de expressão de efeito materno no processo de duplo-haploidização. Portanto, analisando a população TB188♀ empregando a fonte de pólen do genótipo de milho BR400 em comparação a TB438♀ utilizando este mesmo polinizador (código 1 e 4), não foram observadas diferenças entre os caracteres testados. Além disto, na população TB188♀ versus TB438♀ polinizadas com milho híbrido AG6018 (código 2 e 5) também não foi detectado efeitos distintos e, na população TB188♀ versus TB438♀ utilizando como genitor paterno o milho PAMPEANO, diferenças também não foram observadas na expressão dos caracteres avaliados. Considerando o ano de 2004 (Tabela 5), a mesma estrutura de avaliação foi estabelecida, o que permitiu verificar que tanto a população com TB188♀ ou TB438♀ independente da fonte de pólen utilizada, não evidenciaram diferenças, descartando de sobremaneira a hipótese de efeito materno nos caracteres testados durante as etapas da técnica de duplo-haploidização.

Após, confirmada ausência de efeito materno, foi possível também analisar as diferenças existentes entre as fontes de pólen empregadas dentro de cada população estudada. Desta forma, analisando os resultados da Tabela 4 para o ano de 2003, é visível as diferenças existentes entre o

genótipo BR400 sobre o PAMPEANO (código 1 e 3) quanto ao número de embriões haplóides resgatados na população TB188♀, apresentando valores médios de 1,62 e 0,68 embriões resgatados por espiga polinizada. Conseqüentemente, as diferenças entre as fontes de pólen do genótipo BR400 e PAMPEANO também foram observadas nos caracteres número de plantas haplóides formadas, apresentando valores médios de 1,04 e 0,17 plantas e número de plantas duplo-haplóides obtidas, com médias de 0,66 e 0,12 plantas por espiga trabalhada, respectivamente. Na população TB438♀ diferenças também foram evidenciadas entre a constituição genética do milho BR400 versus o PAMPEANO (código 4 e 6) na indução à formação de embriões haplóides, onde foram observados valores médios de 1,27 e 0,84 embriões recuperados por espiga polinizadas, respectivamente.

Ainda na Tabela 4, diferenças também foram observadas entre as fontes de pólen do genótipo de milho AG6018 em relação ao PAMPEANO (código 2 e 3) quanto ao número de embriões haplóides resgatados na população TB188♀, com valores de 1,10 e 0,68 embriões recuperados, respectivamente. Entretanto, para o número de plantas haplóides formadas e duplo-haplóides obtidos, estas diferenças não foram constatadas, isto se deve provavelmente, pela morte de um grande número de genótipos que ocorreu a partir das fases de regeneração em meio de cultura, transplante e tratamento com produtos químicos, dificultando o entendimento e a interpretação biológica dos resultados. De qualquer forma, a diferença nas médias observadas no número de embriões haplóides obtidos pelo AG6018 e PAMPEANO de 1,10 e 0,68, respectivamente, justificam as diferenças em seus desempenhos. No entanto, diferenças entre as fontes de pólen BR400 e AG6018 não foram detectadas.

Na Tabela 5, considerando o ano de 2004, diferenças também foram constatadas em relação as fontes de pólen para o número de embriões haplóides na população TB188♀, indicada pela superioridade do genótipo BR400 sobre o PAMPEANO (código 1 e 3) com médias de 1,21 e 0,58 embriões haplóides obtidos por espiga de trigo polinizada. Resultado similar também foi observado comparando o AG6018 com PAMPEANO (código 2 e 3) que diferiram entre si com médias de 1,09 e 0,58 embriões recuperados por espiga. Entretanto, os caracteres das

etapas seguintes não evidenciaram diferenças, possivelmente, pela morte de um grande número de plântulas dificultando interpretação dos resultados, como já mencionados anteriormente. Além disto, neste ano de avaliação (Tabela 5) não foram constatadas diferenças entre as distintas fontes de pólen empregadas no estudo levando em consideração a população TB 438♀, exceto no caráter número de plantas duplo-haplóides entre BR400 versus PAMPEANO (código 4 e 6), que diferiram estatisticamente.

CONCLUSÃO

As fontes de pólen são de extrema importância para obtenção de embriões haplóides e como consequência na produção de duplo-haplóides no cruzamento trigo e milho.

O favorecimento na obtenção de grãos cheios, embriões e plantas haplóides e de duplo-haplóides, não têm apoio na hipótese de efeito materno em trigo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES, CNPq e FAPERGS pela concessão de bolsas de Pós-Graduação, Iniciação Científica e suporte nesta pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIGNOTTO, E.A.; RAMALHO, M.A.P.; RIBEIRO, P.H.E. Seleção do pólen por meio da posição da espiga dos grãos na espiga de milho. In: CONGRESSO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 1., 2001, Goiânia. **Resumo...** Goiânia: SBMP, 2001.

CENTENO, A.J. **Curso de estatística aplicada à biologia**. 2.ed. Goiânia: UFG, 2001. 234p.

CEPPI, D.; SALA, M.; GENTINETTA, E. et al. Genotype-dependent leaf senescence in maize. **Plant Physiology**, Rockville, v.85, p.720-725, 1987.

CHUANG, C.-C.; OU YANG, T.-W.; CHIA, H. et al. A set of potato media for Wheat anther culture. In: **Symposium on plant tissue culture**. Peking: Plant tissue culture, 1981. p.51-56.

DUVICK, D.N. Genetic contributions to advances in yield of U.S. maize. **Maydica**, Bergamo, v.37, n.1, p.69-79, 1992.

DUVICK, D.N. Genetic contribution to yield gains of U.S. hybrid maize, 1930 to 1980. In: FEHR, W.R. (Ed.) **Genetic**

contributions to yield gains of five major crop plants. Madison: Crop Science Society of America, 1984, p.1-47.

LAURIE, D.A.; BENNETT, M.D. Wheat x Maize hybridization and the production of haploid wheat plants. In: WHEAT INTERNATIONAL GENETICS SYMPOSIUM, 7., 1988, Cambridge, U.K. **Proceedings...**Cambridge, 1987. p.349-354.

LAURIE, D.A.; REYMONDIE, S. High frequencies of fertilization and haploid seedling production in crosses between commercial hexaploid wheat varieties and maize. **Plant Breeding**, Berlin, v.106, n.3, p.182-189, 1991.

MORAES-FERNANDES, M.I.B. Obtenção de plantas haplóides por meio da cultura de anteras. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Ed.) **Técnicas e aplicações da cultura de tecido de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPq, 1990. p.311-332.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia vegetal**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906p.

RUSSEL, W.A. Contribution of breeding to maize improvement in the United States, 1920s-1980s. **Journal Research**, Iowa State, v.61, p.5-34, 1986.

SILVA, J.A.G.; CARVALHO, F.I.F.; OLIVEIRA, A.C. et al. Populações e fontes de pólen como fatores potenciais na formação de embriões haplóides em cruzamento intergenérico. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.10, n.1, p.31-36, 2004.

SILVA, J.A.G.; CARVALHO, F.I.F.; SILVA, S.A. et al. Temperatura e seus efeitos na polinização para a obtenção de embriões haplóides de trigo em cruzamento intergenérico. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.8, n.2, p.97-102, 2002.

SILVA, S.A. **Estimativa da herança do caráter “stay-green” em genótipos de trigo hexaplóide**. Pelotas, 1999. 56p. Dissertação (Mestrado em Sementes) – Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, Universidade Federal de Pelotas.

SUENAGA, K.; NAKAJIMA, K. Efficient production production of haploid wheat (*Triticum aestivum* L.) through crosses between Japanese wheat and maize (*Zea mays*). **Plant Cell Reports**, Berlin, v.8, p.263-266, 1989.

Tabela 1. Número de espigas polinizadas (NEP) e desempenho obtido nos caracteres: número de grãos cheios formados (NGC), número de embriões haplóides resgatados (NEH), número de plantas haplóides formadas (NPH) e número de plantas duplo-haplóides obtidas (NPDH) em dois anos de avaliação do cruzamento TB438♂ x TB188♀ (Geração F₁) e recíproco empregando três fontes de pólen (FP) de milho (AG6018, BR400 e PAMPEANO). FAEM/UFPel, 2005.

ANO	GEN♀	FP	NEP	NGC	\bar{X}	NEH	\bar{X}	NPH	\bar{X}	NPDH	\bar{X}
2003	TB 438	BR400	61	1118	18,32	78	1,27	36	0,59	21	0,34
2003	TB 438	AG6018	44	760	17,27	46	1,04	25	0,56	12	0,27
2003	TB438	PAMPEANO	39	568	14,56	33	0,84	14	0,35	5	0,12
2003	TB 188	BR400	50	851	17,02	81	1,62	52	1,04	33	0,66
2003	TB 188	AG6018	47	694	14,76	52	1,10	36	0,76	21	0,44
2003	TB 188	PAMPEANO	35	498	14,22	24	0,68	6	0,17	3	0,08
2004	TB 438	BR400	54	917	16,98	49	0,90	26	0,48	14	0,25
2004	TB 438	AG6018	57	981	17,21	51	0,89	19	0,33	7	0,12
2004	TB 438	PAMPEANO	31	471	15,19	22	0,70	7	0,22	1	0,03
2004	TB 188	BR400	42	715	17,02	51	1,21	13	0,30	8	0,19
2004	TB 188	AG6018	43	636	14,79	47	1,09	21	0,48	9	0,20
2004	TB 188	PAMPEANO	29	402	13,86	17	0,58	9	0,31	3	0,10
TOTAL			532	8611		551		264		137	

NEP = número de espigas de trigo polinizadas com milho; \bar{X} = média.

Tabela 2. Resumo da análise de variância do tipo fatorial para testar o efeito do fator genótipo (G) e fontes de pólen (FP) no incremento do número de grãos cheios formados (NGC), número de embriões haplóides resgatados (NEH), número de plantas haplóides formadas (NPH) e número de plantas duplo-haplóides obtidas (NPDH) em dois anos de avaliação. FAEM/UFPel, 2005.

Fonte de Variação	GL	QM			
		NGC	NEH	NPH	NPDH
Ano	1	4,38	5,96	6,36	3,65*
Genótipo	1	217,12*	2,00	0,97	1,01
Fonte Pólen	2	333,72*	11,97*	4,86*	3,05*
Ano x Genótipo	1	0,68	0,08	0,54	0,45
Ano x Fonte Pólen	2	8,15	1,31	1,78	0,56
Genótipo x Fonte Pólen	2	46,70	2,22	0,55	0,15
Ano x Genótipo x Fonte Pólen	2	14,21	0,09	2,19*	0,65
Erro	520	22,85	1,93	0,83	0,43
Total	531	-	-	-	-
Média Geral		16,19	1,03	0,49	0,25
CV %		14,35	39,06	37,72	33,49

G = cruzamento das linhagens de trigo TB438♀ x TB188♂ (Geração F₁) e recíproco, e fontes de pólen (FP) = genótipos de milho AG6018, BR400 e PAMPEANO; QM = quadrado médio.

Tabela 3. Teste t aplicado aos tratamentos referente aos fatores (ANO), genótipo (GEN) e fontes de pólen (FP), independente do efeito de um fator sobre outro, nos caracteres número de grãos cheio formados (NGC), número de embriões haplóides resgatados (NEH), número de plantas haplóides formadas (NPH) e número de plantas duplo-haplóides obtidas (NPDH) FAEMUFPEl, 2005.

ANO	NGC	EP[#]	NEH	EP[#]	NPH	EP[#]	NPDH	EP[#]
2003	16,02	1602	1,09	109	0,58	58	0,32	32
T TESTE	ns		ns		*		*	
2004	15,84	1584	0,90	90	0,35	35	0,15	15
GEN	NGC		NEH		NPH		NPDH	
TB 188 ♀	15,28	1528	1,05	105	0,51	51	0,29	29
T TESTE	*		*		ns		ns	
TB 438 ♀	16,59	1659	0,94	94	0,42	42	0,19	19
FP	NGCH		NEH		NPH		NPDH	
BR400	17,33	1733	1,25	125	0,60	60	0,36	36
T TESTE	*		ns		ns		ns	
AG6018	16,00	1600	1,03	103	0,53	53	0,26	26
BR400	17,33	1733	1,25	125	0,60	60	0,36	36
T TESTE	*		*		*		*	
PAMPEANO	14,46	1446	0,70	70	0,26	26	0,08	8
AG6018	16,00	1600	1,03	103	0,53	53	0,26	26
T TESTE	*		ns		*		*	
PAMPEANO	14,46	1446	0,70	70	0,26	26	0,08	8

EP[#] = considera o valor de 100 espigas de trigo polinizadas com milho; * = significativo a 5% de probabilidade de erro pelo teste t; ns = não significativo.

Tabela 4. Teste t aplicado aos tratamentos genótipo (GEN) e fontes de pólen (FP) sobre os caracteres número de grãos cheio formados (NGC), número de embriões haplóides resgatados (NEH), número de plantas haplóides formadas (NPH) e número de plantas duplo-haplóides obtidas (NPDH) no ano de 2003. FAEMUFPEl, 2005.

2003	GEN♀	FP	NGC	NEH	NPH	NPDH	CÓDIGO
	TB 188	BR400	17,02	1,62	1,04	0,66	1
	TB 188	AG6018	14,76	1,10	0,76	0,44	2
	TB 188	PAMPEANO	14,22	0,68	0,17	0,08	3
	TB 438	BR400	18,32	1,27	0,58	0,34	4
	TB 438	AG6018	17,27	1,04	0,56	0,27	5
	TB438	PAMPEANO	14,56	0,84	0,35	0,12	6
CÓDIGO							
NEH	1	2	3	4	5	6	NGC
1	-	ns	ns	ns	ns	ns	1
2	ns	-	ns	*	ns	ns	2
3	*	*	-	*	ns	ns	3
4	ns	ns	ns	-	ns	ns	4
5	ns	ns	ns	ns	-	ns	5

6	ns	ns	ns	*	ns	-	6
NPDH	1	2	3	4	5	6	NPH
1	-	ns	*	ns	ns	*	1
2	ns	-	ns	ns	ns	ns	2
3	*	ns	-	ns	ns	ns	3
4	ns	ns	ns	-	ns	ns	4
5	ns	ns	ns	ns	-	ns	5
6	*	ns	ns	*	ns	-	6

* = significativo a 5 % de probabilidade de erro pelo teste t; ns = não significativo.

Tabela 5. Teste t aplicado aos tratamentos genótipo (GEN) e fontes de pólen (FP) sobre os caracteres número de grãos cheio formados (NGC), número de embriões haplóides resgatados (NEH), número de plantas haplóides formadas (NPH) e número de plantas duplo-haplóides obtidas (NPDH) no ano de 2004. FAEM/UFPel, 2005.

2004	GEN ♀	FP	NGC	NEH	NPH	NPDH	CÓDIGO
	TB 188	BR400	17,02	1,21	0,30	0,19	1
	TB 188	AG6018	14,79	1,09	0,48	0,20	2
	TB 188	PAMPEANO	13,86	0,58	0,31	0,10	3
	TB 438	BR400	16,98	0,90	0,48	0,25	4
	TB 438	AG6018	17,21	0,89	0,33	0,12	5
	TB438	PAMPEANO	15,19	0,70	0,22	0,03	6

CÓDIGO							
NEH	1	2	3	4	5	6	NGC
1	-	ns	ns	ns	ns	ns	1
2	ns	-	ns	ns	ns	ns	2
3	*	*	-	ns	*	ns	3
4	ns	ns	ns	-	ns	ns	4
5	ns	ns	ns	ns	-	ns	5
6	ns	ns	ns	ns	ns	-	6

NPDH	1	2	3	4	5	6	NPH
1	-	ns	ns	ns	ns	ns	1
2	ns	-		ns	ns	ns	2
3	ns	ns	-	ns	ns	ns	3
4	ns	ns	ns	-	ns	ns	4
5	ns	ns	ns	ns	-	ns	5
6	ns	ns	ns	*	ns	-	6

* = significativo a 5 % de probabilidade de erro pelo teste t; ns = não significativo.