



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA
DOUTORADO EM FITOTECNIA

EMMANUEL CABRAL MEDEIROS

**CULTIVO DE EMBRIÕES DE MILHO VISANDO GANHO DE EFICIÊNCIA
NA INTROGRESSÃO DE GENES**

MOSSORÓ

2021

EMMANUEL CABRAL MEDEIROS

**CULTIVO DE EMBRIÕES DE MILHO VISANDO GANHO DE EFICIÊNCIA
NA INTROGRESSÃO DE GENES**

Tese apresentada ao Doutorado em Fitotecnia do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Doutor em Fitotecnia.

Linha de Pesquisa: Melhoramento Genético e Tecnologia em Sementes e Pós-Colheita

Orientador: Prof. Dr. Glauber Henrique de Sousa Nunes

MOSSORÓ

2021

© Todos os direitos estão reservados à Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

C488c

Cabral Medeiros, Emmanuel.
CULTIVO DE EMBRIÕES DE MILHO VISANDO GANHO DE
EFICIÊNCIA NA INTROGRESSÃO DE GENES / Emmanuel
Cabral Medeiros. - 2021.
82 f. : il.

Orientador: GLAUBER HENRIQUE DE SOUSA NUNES.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural
do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Fitotecnia, 2021.

1. Cultivo de embriões. 2. Zea mays. 3.
Biotecnologia. 4. Introgressão gênica. 5. Cultura
de tecidos. I. HENRIQUE DE SOUSA NUNES, GLAUBER,
orient. II. Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

EMMANUEL CABRAL MEDEIROS

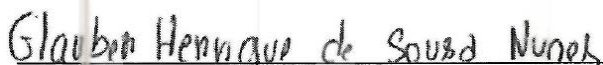
**CULTIVO DE EMBRIÕES DE MILHO VISANDO GANHO DE EFICIÊNCIA
NA INTROGRESSÃO DE GENES**


Tese apresentada ao Doutorado em Fitotecnia
do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia
da Universidade Federal Rural do Semi-Árido
como requisito para obtenção do título de
Doutor em Fitotecnia.

Linha de Pesquisa: Melhoramento Genético e
Tecnologia em Sementes e Pós-Colheita

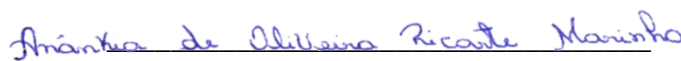
Defendida em: 29/07/2021.

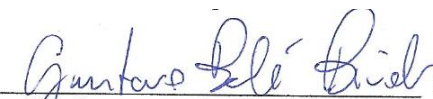
BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Glauber Henrique de Sousa Nunes


Dr. Stefeson Bezerra de Melo


Dra Flávia Fernandes Carneiro


Dra. Anânkia de Oliveira Ricarte Marinho


Dr. Gustavo Barnabé Biudes

AGRADECIMENTOS

Syngenta por conceder espaço e recursos.

Todos que fazem a Syngenta Aracati e parceiros.

Dr. Gustavo Biudes, por todo o ensinamento e oportunidades de conhecimento oferecidas e, mais que isso, estimuladas e apoiadas.

UFERSA, pela oportunidade de conectar Iniciativa Privada com a academia via Doutorado.

Professor Glauber, em especial, mas a todos os que contribuíram para minha formação na UFERSA e que representam uma profissão tão nobre e digna de todo o apreço.

Minha família, que é minha família. Não precisa dizer mais nada!

Dedico à minha filha, Maria Isabelle.

Que a esperança e o sonho possam florescer e
tornem-se realidade.

Emmanuel Cabral Medeiros

RESUMO

MEDEIROS, Emmanuel Cabral. **Cultivo de embriões de milho visando ganho de eficiência na introgressão de genes**. 2021. 82f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró-RN, 2021.

Dada sua importância, o melhoramento do milho tropical baseou-se na seleção convencional e seleções clonais para os tipos de milho de elite que foram multiplicados para distribuição aos produtores, especialmente nos países em desenvolvimento. No entanto, o sucesso desta estratégia é limitado em virtude de baixas variações genéticas nos conjuntos de genes como resultado da domesticação, custos elevados e tempo longo das gerações para produzir apenas uma seleção melhorada. O melhoramento de plantas tem sido um fator importante no aumento da produção agrícola, além de conquistas da pesquisa e desenvolvimento terem agregado muito, mas uma grande frustração que permanece é o tempo para gerar uma nova cultivar para os produtores. A cultura embrionária pode encurtar o ciclo de reprodução pela antecipação do ponto de colheita. Ao remover os embriões do ambiente natural e a cultivar artificialmente, eles germinam e crescem rapidamente, sendo o ciclo de reprodução encurtado. Paralelamente a isso, o emprego de modernas técnicas moleculares permite identificar plantas de interesse genético em populações muito grandes, possibilitando avançar gerações pela planta individual que possua o maior número de caracteres desejáveis, promovendo maior ganho genético, tanto pelo encurtamento do ciclo quanto pela redução em número de retrocruzamentos. Diante disto, o presente trabalho buscou avaliar a aplicação da técnica de cultivo de embriões de milho junto ao uso de marcadores moleculares no processo de introgressão gênica, com os seguintes objetivos: a) comparar o tempo entre gerações nos processos convencional, por sementes, e biotecnológico, por cultivo de embriões *in vitro*; b) avaliar a existência de genótipo dependência e o estágio ideal de desenvolvimento do embrião no processo de cultivo *in vitro*; c) otimizar o meio de cultivo para seleção *in vitro* de indivíduos contendo genes de interesse, assegurando qualidade genotípica e fisiológica das plântulas selecionadas. Para tanto, foram realizados retrocruzamentos obtendo-se embriões RC 1 que foram cultivados *in vitro* e foi feita a genotipagem das plântulas RC1 com marcadores microsatélites para verificar a eficiência do método. Foram testados diferentes agentes seletivos e suas doses no cultivo de embriões para avaliar a eficiência seletiva e a qualidade das plântulas, assim como foram avaliados diferentes genótipos e idades dos embriões resgatados e suas influências no processo de cultivo *in vitro*. Como resultados, foi possível observar que a metodologia de cultivo de embriões de milho reduziu o tempo entre gerações em comparação ao modelo convencional, por sementes. Os marcadores moleculares possibilitaram a comprovação da presença dos genes de interesse nas plântulas selecionadas, assim como a identificação de plântulas com mais similaridade às linhagens recorrentes. A idade dos embriões influenciou na germinação dos embriões *in vitro*, assim como na qualidade das plântulas obtidas, ao passo que os genótipos influenciaram no sucesso da aclimatização. Os agentes seletivos foram eficientes na seleção *in vitro* de embriões, independentemente da concentração utilizada, e tiveram influência significativa na biometria das plântulas formadas e sua sobrevivência durante a aclimatização.

Palavras-chave: Melhoramento genético de plantas. *Zea mays*. Biotecnologia. Resgate de embriões. Cultura de tecidos.

ABSTRACT

MEDEIROS, Emmanuel Cabral. **Cultivation of corn embryos to gain efficiency in gene introgression**. 2021. 82p. Thesis (Doctorate in Phytotechny) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró-RN, 2021.

Given its importance, tropical maize breeding was based on conventional selection and clonal selections for elite maize types that were multiplied for distribution to producers, especially in developing countries. However, the success of this strategy is limited because of low genetic variations in gene sets as a result of domestication, high costs and long generations time to produce only an improved selection. Plant breeding has been an important factor in increasing agricultural production and research, besides development achievements have added a lot, but a major frustration that remains is the time to generate a new cultivar for farmers. Embryonic culture can shorten the reproductive cycle by anticipating the harvest point. By removing embryos from the natural environment and artificially cultivating, they germinate and grow quickly and the reproductive cycle is shortened. Parallel to this, the use of modern molecular techniques allows the identification of plants of genetic interest in very large populations, allowing advancing generations by the individual plant that has the greatest number of desirable characters, promoting greater genetic gain, both by shortening the cycle and by reducing in number of backcrosses. Given this, the present work sought to evaluate the application of the technique of cultivation of corn embryos together with the use of molecular markers in the process of gene introgression, with the following objectives: a) to compare the time between generations in conventional processes, by seeds, and biotechnology, by in vitro embryo culture; b) to assess the existence of a dependency genotype and the ideal stage of embryo development in the in vitro culture process; c) optimize the culture medium for in vitro selection of individuals containing genes of interest, ensuring genotypic and physiological quality of the selected plants. For that, backcrosses were performed, obtaining RC 1 embryos that were cultured in vitro and genotyping of RC1 seedlings with microsatellite markers was carried out to verify the efficiency of the method. Different selective agents and their doses were tested in embryo culture to evaluate the selective efficiency and quality of the seedlings. As well as different genotypes and ages of rescued embryos and their influence on the in vitro culture process were evaluated. As a result, it was possible to observe that the corn embryo cultivation methodology reduced the time between generations compared to the conventional seed model. Molecular markers enabled the proof of the presence of genes of interest in selected seedlings, as well as the identification of seedlings with more similarity to the recurrent lineages. The age of the embryos influenced the germination of embryos in vitro, as well as the quality of the seedlings obtained, while the genotypes influenced the success of acclimatization. The selective agents were efficient in the in vitro selection of embryos, regardless of the concentration used and had a significant influence on the biometry of the formed seedlings and their survival during acclimatization.

Keywords: Plant breeding. *Zea mays*. Biotechnology. Embryo rescue. Culture of Tissue.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ilustração resumida do ciclo do milho, reduzindo o ciclo normal de 115 dias por produção de sementes para 75-85 dias utilizando a tecnologia de cultivo de embriões imaturos coletados entre 15 e 25 dias após a polinização. Aracati, Syngenta, 2021.....	45
Figura 2	Parâmetros biométricos médios: Comprimento e Massa Fresca dos embriões em função do tempo (dias após polinização). Tratamentos seguidos por letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). Aracati, Syngenta, 2021.....	48
Figura 3	Germinação <i>in vitro</i> dos embriões em função do tempo (dias após polinização). Tratamentos seguidos por letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). Aracati, Syngenta, 2021.....	49
Figura 4	Médias do parâmetro Sobrevivência na Aclimatização das plântulas provenientes dos embriões em função do tempo (dias após polinização) e dos diferentes genótipos avaliados. Tratamentos seguidos por letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). Aracati, Syngenta, 2021.....	51
Figura 5	<i>Boxplot</i> com a porcentagem de recuperação do genoma recorrente, conforme tratamento, entre os 163 indivíduos RC1 genotipados por marcadores, com uma média de 86,8%. Os limites do <i>boxplot</i> indicam os percentis 25 e 75; a linha que divide as caixas representa a mediana; as barras de erro acima e abaixo das caixas indicam os percentis 10 e 90. Aracati, Syngenta, 2021.....	53
Figura 6	Médias das germinações dos embriões em função dos tratamentos. Tratamentos seguidos por letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). Aracati, Syngenta, 2021.....	70
Figura 7	Médias dos comprimentos (tamanhos) das plântulas em função dos tratamentos submetidos aos embriões <i>in vitro</i> . Tratamentos seguidos por letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). Aracati, Syngenta, 2021.....	72
Figura 8	Plântulas obtidas de embriões cultivados <i>in vitro</i> em função dos tratamentos submetidos. Aracati, Syngenta, 2021.....	73
Figura 9	Médias das taxas de Aclimatização das plântulas em função dos tratamentos submetidos aos embriões <i>in vitro</i> . Tratamentos seguidos por letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). Aracati, Syngenta, 2021..	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características biotecnológicas de alguns eventos comerciais de milho transgênico (Adaptado de Cabrera-Ponce et al., 2019).....	17
Tabela 2	Resumo da análise de variância para os parâmetros avaliados: Comprimento e Massa fresca de embriões, Germinação <i>in vitro</i> e Aclimatização. Aracati, Syngenta, 2021.....	47
Tabela 3	Número de embriões utilizados, frequências genotípicas e taxas médias de recuperação do parental e aclimatização por tratamento. Aracati, Syngenta, 2021.....	50
Tabela 4	Coefficientes da correlação de Pearson entre os parâmetros avaliados. Aracati, Syngenta, 2021.....	52
Tabela 5	Tratamentos em função das composições dos meios utilizados no cultivo de embriões de milho: composições dos agentes seletivos Glufosinato (GLU), Glifosato (GLI) e Manose (MAN). Aracati, Syngenta, 2021.....	66
Tabela 6	Resumo da análise de variância para os parâmetros avaliados: Germinação de embriões <i>in vitro</i> , Comprimento das plântulas formadas e Sobrevivência na Aclimatização. Aracati, Syngenta, 2021.....	69
Tabela 7	Número de embriões cultivados, frequências de germinação e genotípicas por tratamento. Aracati, Syngenta, 2021.....	70

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO MILHO.....	14
2.2	BIOTECNOLOGIAS APLICADAS NO MELHORAMENTO DO MILHO.....	15
2.3	GENES MARCADORES SELECIONÁVEIS.....	17
2.4	USO E IMPORTÂNCIA DE MARCADORES MOLECULARES NA INTROGRESSÃO GÊNICA.....	20
2.5	CULTIVO DE EMBRIÕES.....	23
2.6	ACLIMATIZAÇÃO DE PLÂNTULAS.....	26
	REFERÊNCIAS.....	29
	CAPÍTULO I - INFLUÊNCIA GENOTÍPICA E DA IDADE DE EMBRIÕES IMATUROS DE MILHO CULTIVADOS <i>IN VITRO</i> VISANDO A ACELERAR CICLOS DE RETROCRUZAMENTOS	38
	ABSTRACT	39
1	INTRODUÇÃO	40
2	MATERIAIS E MÉTODOS	41
2.1	LOCAL DE CULTIVO E CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO.....	41
2.2	MATERIAL VEGETAL E OBTENÇÃO DAS POPULAÇÕES.....	41
2.3	CULTIVO <i>IN VITRO</i>	42
2.4	ACLIMATIZAÇÃO E CONDUÇÃO DAS PLÂNTULAS.....	43
2.5	ANÁLISES DE GENOTIPAGEM E SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES.....	43
2.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	44
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
3.1	CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES IMATUROS DE MILHO.....	45
3.2	IDADE DOS EMBRIÕES E INFLUÊNCIA GENOTÍPICA.....	47
3.2.1	<i>Comprimento e massa fresca dos embriões</i>	47
3.2.2	<i>Germinação in vitro</i>	49
3.2.3	<i>Aclimatização</i>	51
3.3	GENOTIPAGEM E SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES.....	53
4	CONCLUSÕES	56
	REFERÊNCIAS	57

CAPÍTULO II - Influência de agentes seletivos no cultivo <i>in vitro</i> de embriões imaturos de milho visando a acelerar ciclos de retrocruzamentos.....		61
ABSTRACT.....		62
1	INTRODUÇÃO.....	63
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	64
2.1	LOCAL DE CULTIVO E CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO.....	64
2.2	MATERIAL VEGETAL E OBTENÇÃO DAS POPULAÇÕES.....	64
2.3	CULTIVO <i>IN VITRO</i>	65
2.4	ACLIMATIZAÇÃO E CONDUÇÃO DAS PLÂNTULAS.....	66
2.5	ANÁLISES DE GENOTIPAGEM E SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES..	67
2.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	67
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
3.1	INFLUÊNCIA DOS AGENTES SELETIVOS.....	69
3.1.1	<i>Germinação in vitro</i>	69
3.1.2	<i>Comprimento das plântulas</i>	72
3.1.3	<i>Sobrevivência na aclimatização</i>	74
4	CONCLUSÕES.....	77
REFERÊNCIAS.....		78

1 INTRODUÇÃO GERAL

O milho (*Zea mays* L.) é uma cultura C4 dotada de habilidade notável para manter altas taxas de atividade fotossintética, com importante potencial de produção de grãos e biomassa. Trata-se de uma espécie com polinização cruzada, característica que contribuiu para sua ampla variabilidade morfológica e genética, além de adaptabilidade geográfica. Esta espécie é classificada em variedades tropicais e temperadas que crescem em diferentes latitudes e sob diferentes condições climáticas. O milho tropical é endógeno de regiões tropicais, incluindo América Latina e África subsaariana (ANAMI et al., 2010).

O melhoramento do milho tropical baseou-se na seleção convencional e seleções clonais para os tipos de milho elite que foram multiplicados para distribuição aos produtores, especialmente nos países em desenvolvimento. No entanto, o sucesso desta estratégia é limitado por causa de baixas variações genéticas nos conjuntos de genes como resultado da domesticação, custos elevados e tempo de geração longo para produzir uma única seleção melhorada (XU et al., 2009). O melhoramento de plantas tem sido um fator importante no aumento da produção agrícola (BORLAUG, 2002). Conquistas da pesquisa e desenvolvimento têm agregado muito, mas uma grande frustração que permanece é o tempo para gerar uma nova cultivar para os produtores. Exigências futuras buscam cultivares novos e melhorados de alto rendimento.

Uma abordagem biotecnológica combinando cultura de tecidos e transformação genética com genes de interesse pode gerar germoplasma geneticamente transformado (ANAMI et al., 2010). O uso de um gene marcador em um processo de transformação visa a dar uma vantagem seletiva às células transformadas, permitindo que cresçam mais rapidamente e melhor, além de matar as células não transformadas (BRASILEIRO; DUSI, 1999). Os agentes seletivos, quando presentes em meios de cultivo, têm ação de selecionar plântulas contendo genes de interesse. Embora os genótipos de milho tropical tenham sido regenerados por meio de uma cultura de embriões imaturos (PRIOLI; SILVA, 1989; BOHOROVA et al., 1995; CARVALHO et al., 1997; ODUOR et al., 2006), nenhum sistema de regeneração de rotina para fases de retrocruzamentos, normalmente utilizados em programas de introgressão, já foi estabelecido. Embriões de algumas espécies são mais fáceis de cultivar em cultura do que outros, e as diferenças às vezes ocorrem estreitamente entre cultivares relacionados (RANGAN, 1984). O cultivo e seleção de embriões de milho passa pelo processo de excisão de embriões imaturos e o sucesso pode variar, sendo o momento do resgate do embrião o fator *in vitro* mais importante.

A cultura embrionária pode encurtar o ciclo de reprodução pela superação simples da dormência em sementes ou antecipação do ponto de colheita. A dormência pode ser causada por inibidores endógenos, requisitos de luz, baixas temperaturas, requisitos de armazenamento a seco e imaturidade embrionária (YEUNG et al., 1981). A extração do embrião antecipadamente, não necessariamente por dormência, ocorre com fins de antecipar sua germinação. Ao remover os embriões das influências desses fatores, os embriões germinam e crescem rapidamente, sendo o ciclo de reprodução encurtado. O cultivo de embriões pode, em alguns casos, reduzir o tempo de geração por 40 dias (SHARMA; GILL, 1983).

Trabalhos com cultivo de embriões e sua aplicação prática e em larga escala, ligados a programas de melhoramento, não são comumente evidenciados na literatura, especialmente brasileira. O desenvolvimento da técnica de cultivo de embrião *in vitro* é de importância fundamental no melhoramento genético de plantas, a fim de regenerar embriões de sementes e permitir a superação de barreiras genéticas à germinação e à introgressão gênica por meio de cruzamentos entre indivíduos, o que contribui para acelerar a obtenção de cultivares de melhor desempenho global. O melhoramento genético de plantas tem como grande desafio reduzir o tempo gasto no desenvolvimento de novos materiais geneticamente superiores e com isto oferecer aos agricultores melhores alternativas para aumentar seus rendimentos e assegurar o atendimento à demanda por alimentação, crescente em todo o mundo. Neste contexto, o ganho genético possibilitado pela redução no tempo entre gerações contribui para atingir resultados ainda mais expressivos na cultura do milho.

Com este trabalho, buscou-se mais informações sobre a aplicação da técnica de cultivo de embriões de milho no processo de introgressão gênica, com os seguintes objetivos: a) comparar o tempo entre gerações nos processos convencional, por sementes, e biotecnológico, por cultivo de embriões *in vitro*; b) avaliar a existência de genótipo dependência e estágio ideal de desenvolvimento do embrião no processo de cultivo *in vitro*; c) otimizar o meio de cultivo para seleção *in vitro* de indivíduos contendo genes de interesse, assegurando qualidade genotípica e fisiológica das plântulas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO MILHO

Economicamente, o milho é uma cultura importante, com uma receita anual de bilhões de dólares. No Brasil, o milho é hoje a segunda cultura agrícola com maior Valor Bruto de Produção, com R\$ 102,3 bilhões em 2020, 26% a mais do que em 2019 (MAPA, 2021), estando presente em 18 milhões de hectares, segundo Levantamento Sistemático da Produção Agrícola de 2021 (IBGE, 2021). Este crescimento expressivo da cultura possivelmente deve-se em grande parte ao milho híbrido e ao advento da biotecnologia.

Além da sua importância agrônômica, o milho é um organismo modelo para pesquisa básica e aplicada (STRABLE; SCANLON, 2009). Seu genoma é diploide, com mais de 32.000 genes. O genoma do ancestral tropical mexicano, Palomero Toluqueño, também foi sequenciado, identificando-se que alto número de regiões de sequências idênticas em todos os cromossomos está presente em ambos os genótipos. O estudo de *loci* específicos entre o Palomero landrace e os parentes selvagens de teosinto mostrou o impacto do ambiente local na domesticação (VIELLE-CALZADA et al., 2009).

Atualmente existe a necessidade de aumentar a produção agrícola para atender à demanda crescente por alimentos, fibra e energia, sendo, portanto, imprescindível o cultivo do milho em áreas frequentemente submetidas a estresses abióticos bem como melhorias quanto ao aumento da produtividade, ambas podendo ser exploradas por meio do melhoramento genético de plantas. Dentre as culturas de grãos, o milho possui papel de destaque em virtude da sua área de ocupação e valor econômico gerado. É uma planta anual cultivada em quase todos os continentes com grande importância no mundo devido à sua elevada produtividade, valor nutritivo e distintas formas de utilização na alimentação humana, animal, *in natura* e como biocombustível (FORSTHOFER et al., 2006).

De forma geral, no Brasil a semeadura do milho ocorre em duas épocas: a primeira safra ou época normal (outubro a janeiro) e a segunda safra ou safrinha (fevereiro a maio). Apenas 29% do milho são cultivados na safra, sendo o restante (71%) cultivado na segunda safra (CONAB, 2017). Esta diferença se deve, principalmente, pelo fato da cultura do milho ser explorada após a cultura da soja. Atualmente na região centro-oeste, a soja tem sido a principal cultura da safra, ao passo que o milho tem sido mais cultivado na segunda safra. Esta exploração fez com que tanto a área quanto a produção total da segunda safra ultrapassassem, em 2012, a primeira safra. A produtividade, que era baixa no início dessa prática, hoje é equiparada à da safra normal. Nos últimos três anos, uma nova fronteira agrícola tem promovido uma terceira

safra (no período de maio a junho), e os números apresentados pela Companhia Nacional de Abastecimento, em seu último levantamento da safra do cereal divulgado em setembro de 2020, registram aumento de 3,2% na área cultivada na etapa inicial, 6,8% no segundo e principal período e 4,1% no terceiro. No cultivo de verão, que vinha perdendo espaço, a recuperação ocorreu, conforme o órgão oficial, devido à procura maior pelo cereal, relacionada ao aumento das exportações, ao maior uso no etanol e ao aumento de confinamento bovino, dentre outras razões, ampliando-se área e produção em especial na região nordestina-nortista do MATOPIBA (Maranhão, Tocantins, Piauí e Bahia) e SEALBA (Sergipe, Alagoas e nordeste da Bahia), além de parte de Pernambuco, bem como as localizadas acima da linha do Equador, como as de Roraima (CARVALHO et al., 2019).

Parte da produção de milho é reservada ao mercado interno brasileiro, sendo destinada à avicultura e à suinocultura, setores que vêm expandindo suas fronteiras nos últimos anos. Apesar desses setores serem abastecidos pelo mercado brasileiro, algumas regiões, como Norte e Nordeste, ainda dependem do milho produzido em outras regiões.

Isso mostra que é imprescindível a busca por melhorias no nível tecnológico da cultura do milho no sentido de aumentar a produtividade da cultura, já que esse déficit de grãos em determinadas regiões do Brasil acarreta grandes perdas de divisas, devido ao aumento da demanda interna e ao elevado custo de importação. Dessa forma, o desenvolvimento de novos materiais por meio do melhoramento genético de plantas, trazendo cultivares mais adaptados as diferentes regiões, pode se apresentar como alternativa para minimizar os custos de aquisição e aumento de produtividade nas diferentes regiões brasileiras.

2.2 BIOTECNOLOGIAS APLICADAS NO MELHORAMENTO DO MILHO

O Brasil produziu volumes recordes de milho nas últimas safras, ultrapassando as 100 milhões de toneladas. Os resultados expressivos são decorrentes do uso de tecnologia no cultivo, além do aumento da área plantada. Segundo Carvalho et al. (2019), o mercado de sementes disponibilizou 131 cultivares de milho transgênicas, o que representou 67% do total da safra 2019/20. O crescimento expressivo da cultura deve-se em grande parte ao milho híbrido e ao advento da biotecnologia, possibilitados pelo desenvolvimento de metodologias e geração de conhecimento científico, que resultaram na criação de híbridos e variedades de milho com maior potencial de produção. A adoção do milho transgênico foi rápida desde o começo da difusão da biotecnologia, no final da década de 2000. Em apenas dez temporadas de liberação comercial, o crescimento ultrapassou o patamar de 90% da área total de milho plantada no país, sendo maior na segunda safra (CARVALHO et al., 2019).

As tecnologias predominantes são PowercoreTMUltra, VT PRO3 e VT PRO2, que representaram, respectivamente, 19,08%, 19,84% e 12,21% do total de cultivares. Como no ciclo anterior, também havia eventos que variaram de um até quatro por cultivar, dependendo da tecnologia. Grande parte dos eventos estão agrupados em tecnologias como Optimum® Intrasect® (combinação de duas proteínas Cry1F e a Cry1Ab na mesma planta) e Leptra™ (combinação das tecnologias Agrisure® Viptera, YieldGard® e Herculex® I na mesma planta). Os híbridos de milho com as tecnologias Herculex® I, Optimum® Intrasect® ou Leptra™, além do controle das principais lagartas que atacam a cultura, possuem também tolerância aos herbicidas registrados para aplicação em pós-emergência da planta que apresentam como ingrediente ativo o glufosinato de amônio, bem como uma proteína específica para o controle da larva-alfinete. Com relação à finalidade de uso, para a safra 2019/20, 103 cultivares são de uso exclusivamente para grãos, 90 são para uso de silagem e seis são milhos especiais, sendo quatro para milho-verde e dois para milho canjica de cor branca (CARVALHO et al., 2019).

Os genes para diferentes endotoxinas Bt são derivados de diversas cepas da bactéria *Bacillus thuringiensis*, sendo o Bt11 da subsp. *kurstaki* e obtendo como produto a delta-endotoxina Cry1Ab, proteína que confere resistência a insetos lepidópteros, danificando seletivamente o revestimento do intestino médio. O evento transgênico GA21 foi produzido pela inserção estável de um gene que expressa uma proteína modificada de 5-enolpiruvilshikamato-3-fosfato sintase (mEPSPS) do milho quase idêntica (99,3%) em sua sequência de aminoácidos à enzima EPSPS do milho de tipo selvagem, que é inibido pelo glifosato (LEBRUN et al., 1997). O evento MIR162 tem como fonte de gene o *Bacillus thuringiensis* cepa AB88, obtendo como produto a proteína inseticida variante vip3Aa, que tem como função conferir resistência a danos alimentares causados por insetos lepidópteros, danificando seletivamente seu intestino médio (ISAAA, 2021). O crescimento recente dos últimos anos nos países que foram os primeiros a adotar a tecnologia deve-se em grande parte ao emprego dos “genes combinados” ou *stacking* (é um processo de combinação de 2 ou mais *traits* ou genes dentro de uma planta ou variedade, podendo ser combinações de diferentes genes Bt ou combinações de genes Bt + gene de tolerância a herbicida, por exemplo). Neste sentido, o Bt11 compõe um *molecular stacking* com o gene marcador PAT (*fosfinotricina acetiltransferase*), assegurando tolerância ao herbicida Glufosinato, ao passo que o MIR162 é um *molecular stacking* com o gene marcador manA (*fosfomanose isomerase* - PMI), assegurando tolerância ao uso da manose em condições de cultivo *in vitro* (Tabela 1).

Tabela 1. Características biotecnológicas de alguns eventos comerciais de milho transgênico. (Adaptado de Cabrera-Ponce et al., 2019).

Evento Identificador	Característica	Método inserção do gene	Marcador seletivo	Proteína (s) expressa (s)	Ano de aprovação
Bt11	Resistência a lepidóptera; Tolerância a Glufosinato	Transformação de protoplastos mediada por PEG	PAT	Cry1Ab, PAT	1996
GA21	Tolerância a Glifosato	Bombardeamento de partículas	EPSPS	EPSPS	1998
MIR162	Resistência a lepidóptera	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	PMI	Vip3Aa	2008
MIR162, Bt11, GA21	Tolerância a Glifosato, Glufosinato e resistência a insetos	Introgessão gênica	PMI, PAT, EPSPS	Cry1Ab, PAT, Vip3Aa, EPSPS	2010

2.3 GENES MARCADORES SELECIONÁVEIS

Em geral, o gene seletivo é introduzido no genoma da planta junto com os genes de interesse. Atualmente, os genes marcadores selecionáveis (GMS) mais utilizados para a produção de milho transgênico são aqueles que conferem tolerância a herbicidas, tais como os genes *bar*, isolado de *Streptomyces hygroscopicus*, e o *pat*, isolado de *Streptomyces viridochromogenes*, ambos codificando a enzima *fosfinotricina acetiltransferase* (PAT). Esta enzima é usada como marcador de seleção e também como fonte de resistência aos herbicidas do grupo fosfinotricina (PPT) (DE BLOCK et al., 1987). O PPT, que também é conhecido como glufosinato de amônio, é semelhante ao substrato glutamato da enzima glutamina sintetase (GS) e atua como um inibidor competitivo de GS. O glufosinato de amônio é o princípio ativo presente em alguns herbicidas e possui estrutura química semelhante ao glutamato, inibindo a enzima glutamina sintase, envolvida na detoxicação de amônia. O decréscimo de atividade da glutamina sintase gera aumento na concentração de amônia intracelular, com consequente desestruturação da membrana celular e paralisação da fotossíntese, o que provoca a morte da planta. A enzima PAT inativa o herbicida via acetilação (DE BLOCK et al., 1987).

Em alguns casos, o gene marcador é o gene de interesse que expressará uma característica agrônômica, como resistência a herbicidas (ARAGÃO E BRASILEIRO, 2002). Como exemplo, temos o herbicida Finale® (Bayer CropScience SG), que contém em sua formulação comercial 20% da fosfinotricina. Com base nisto, herbicidas comerciais têm sido utilizados para selecionar materiais vegetais contendo genes marcadores, como no experimento de Pereira et al. (2016), que testaram diferentes doses deste princípio ativo para seleção de calos, observando que baixas concentrações (5 e 10 mg.L⁻¹ de PPT) eram suficientes para provocar a seleção *in vitro*, com redução de crescimento das células de 70% em comparação ao controle, após 74 dias no meio seletivo. Os referidos autores

afirmam também que a concentração mais baixa do herbicida permitiu algumas fugas, reduzindo a eficiência de seleção. Por outro lado, concentrações muito elevadas podem ocasionar fitotoxicidade nos tecidos, como descrito por Mancini et al. (2014) em *Paspalum notatum*, onde, utilizando concentrações mais altas de PPT (20 e 40 mg.L⁻¹), a taxa de crescimento foi bastante reduzida ao final do período experimental.

O gene seletivo e os genes de interesse podem ser separados ou fisicamente ligados no mesmo vetor de DNA. A frequência de cotransformação (ou seja, células com ambos os genes integrados no genoma) é cerca de 100% quando os genes estão ligados. Na maioria dos casos, a expressão de genes marcadores de seleção está sob o controle de um componente constitutivo promotor, como o vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) 35S, nopalina e octopina sintase, promotores do gene da actina ou ubiquitina. Ubiquitina é uma das proteínas mais conservadas em plantas, estando envolvida em vários processos celulares, incluindo degradação de proteínas e reparo de DNA. É muito abundante no citoplasma da maioria das células vegetais (CHRISTENSEN et al., 1992). Este promotor é utilizado para direcionar a expressão constitutiva de genes heterólogos em monocotiledôneas. O gene Bt11 (Tabela 1) pode também formar um molecular stack com o gene cry1Ab, isolado da bactéria de solo gram-positiva *Bacillus thuringiensis*, que codifica para a proteína inseticida Cry1Ab, ativa contra insetos da ordem Lepidoptera.

O gene aroA (ou EPSPS) foi isolado de *Salmonella typhimurium* tratada com um agente mutagênico e selecionado para resistência ao herbicida glifosato (Tabela 1). O gene aroA mutado codifica uma forma modificada da enzima 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS; EC 2.5.1.19), que mostra afinidade reduzida para glifosato. Alto nível da expressão constitutiva do gene aroA em plantas transgênicas dá resistência ao glifosato. O herbicida glifosato inibe, por competição, a enzima EPSPS, que está envolvida na via enzimática da biossíntese de aminoácidos aromáticos em bactérias e plantas. A inibição de EPSPS resulta no acúmulo de shiquimato, inibição da síntese de amino aromático ácidos e metabólitos secundários causando morte celular (ARAGÃO E BRASILEIRO, 2002). Entre os métodos alternativos para produzir plantas transgênicas sem o uso de antibióticos ou genes marcadores de herbicidas estão os chamados sistemas de seleção positiva, definidos como aqueles que permitem o crescimento de tecidos transformados (JOERSBO et al., 1998; MIKI; MCHUGH, 2004). Nesse sistema, substâncias que normalmente não são metabolizadas pelas plantas são utilizadas como agentes seletivos, como, por exemplo, o carboidrato manose. O gene vip3A foi isolado também de *Bacillus thuringiensis* e codificado para a proteína vegetativa Vip3A com alta toxicidade para insetos da ordem lepidoptera, incluindo *Agrotis ipsilon*,

Spodoptera frugiperda, *Spodoptera exigua*, *Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea* (ESTRUCH et al., 1996). O molecular stack com o vip3A é o gene marcador seletivo manA de *E. coli*, que codifica a enzima fosfomanose isomerase (PMI, EC 5.3.1.8) (Tabela 1), que converte manose-6-fosfato em frutose-6-fosfato, de modo que as células vegetais transformadas podem assimilar manose por meio da glicólise, ao passo que as células não transformadas não podem metabolizar este carboidrato (REED et al., 2001). A planta comum é incapaz de utilizar a manose 6-P. O acúmulo deste produto gera a inibição da fosfoglicose isomerase e da via metabólica da glicólise, causando inibição do crescimento. Plantas transgênicas que produzem PMI conseguem utilizar a manose como fonte de carbono. A sacarose, uma fonte de carbono frequentemente usada em meios de cultura de tecidos de milho, pode ser substituída por outros açúcares, como frutose ou glicose, mas não por manose. As plantas que expressam o transgene pmi podem ser capazes de metabolizar o agente de seleção "amigável", manose, como uma fonte de carbono. O crescimento de tecidos transgênicos é estimulado em meios contendo manose, ao passo que o tecido não transformado para de crescer ou morre devido à inanição (HANSEN E WRIGHT, 1999).

O gene manA foi aplicado com sucesso como marcador selecionável na transformação de plantas para várias dicotiledôneas e monocotiledôneas, incluindo trigo e milho (WRIGHT et al., 2001), sorgo (GUREL et al., 2009), dendê (BAHARIAH et al., 2013), cana-de-açúcar (ZHANG et al., 2014) e arroz (GUI et al., 2014), dentre outros. O gene manA expresso em células de milho confere a habilidade para utilizar manose como fonte de açúcar provendo uma alternativa de marcador selecionável para transformação de milho e outras culturas (WANG et al., 2000). Em protocolos tradicionais de transformação, células vegetais são colocadas em meio de cultura contendo sais, hormônios e uma fonte de carbono, usualmente sacarose. Em sistemas de seleção fosfomanose isomerase (PMI) / manose, tecidos de plantas são cultivados em um meio similar suplementado com manose, como única fonte de carbono ou com meio contendo ambos, sacarose e manose (REED et al., 2001).

O sistema de seleção positiva usando o gene da fosfomanose isomerase (manA), e seu correspondente agente selecionável manose tem sido amplamente utilizado para a identificação e seleção de células/tecidos transgênicos em várias espécies de monocotiledôneas (GIRI E PRAVEENA, 2015), especialmente o milho, como divulgado por Wright et al. (2001), que descobriram, em trabalho de transformação usando PMI como marcador seletivo, que em meio de seleção contendo manose para o genótipo CG00526 foram obtidas altas frequências de transformação e poucos escapes. A enzima PMI foi encontrada naturalmente na soja e em várias outras leguminosas (LEE; MATHESON, 1984).

O uso de manose como agente seletivo exige estudos preliminares para determinar a melhor concentração deste agente seletivo e a necessidade de fonte suplementar de carbono. O aumento no número de escapes quando a concentração de manose foi reduzida ou combinada com sacarose no meio de seleção também foi relatada para milho (NEGROTTO et al. 2000). Além da escolha dos genes marcadores selecionáveis adequados, o estabelecimento da concentração correta dos agentes seletivos no meio de cultura é uma etapa muito importante no processo de transformação e seleção de plantas. Baixas concentrações de agentes seletivos podem permitir que escapes se regenerem, ao passo que concentrações muito altas impõem um processo rigoroso capaz de matar as plântulas transformadas que expressam níveis moderados de resistência (IJAZ et al., 2012).

2.4 USO E IMPORTÂNCIA DE MARCADORES MOLECULARES NA INTROGRESSÃO GÊNICA

O método do retrocruzamento tem por objetivo recuperar o genótipo do genitor recorrente. O processo envolve a utilização de dois materiais genéticos, sendo um deles adaptado e produtivo, e outro contendo o (s) caráter (es) de interesse que se deseja introduzir. Quanto maior for o número de características a serem introgrididas, maiores serão a complexidade e o tempo requeridos para a condução de um programa baseado em retrocruzamentos (BORÉM, 2017). A aplicação deste método para o melhoramento genético de plantas foi sugerido por Harlan; Pope (1922), os quais observaram que o retrocruzamento foi usado por muitos anos no melhoramento animal com o objetivo de fixar caracteres comercialmente desejáveis, podendo ser aplicado ao melhoramento genético de cereais como a cevada. Eles observaram que esse método havia sido negligenciado em programas visando à produção de progênies específicas. As características com alta herdabilidade, controladas por um ou poucos genes, são mais facilmente transferidas por esse método. Porém, quando o número de genes é muito elevado, necessita-se de uma população com grande número de indivíduos, dificultando aplicação do método de retrocruzamento (BORÉM, 2017).

Quando se deseja transferir duas ou mais características, pode-se lançar mão da estratégia sequencial, paralela ou simultânea. Na primeira, transfere-se uma característica de cada vez; na segunda, conduzem-se dois subprogramas paralelos, nos quais as características são transferidas independentemente, originando, ao final, linhagens quase isogênicas que são cruzadas, permitindo selecionar-se progênies com ambas as características de interesse. Na simultânea, por sua vez, as características são transferidas de uma só vez, requerendo o uso de grandes populações segregantes (ALLARD, 1971). A introgressão gênica por

retrocruzamentos, entre uma planta doadora com o parental recorrente, possui uma frequência esperada de $(1/2)^n$, onde o n é número de genes (FEHR, 1991), ou seja, uma frequência de plantas esperadas, contendo três genes, por exemplo, a cada retrocruzamento é de $(1/2)^3 = 12,5\%$.

A utilização de retrocruzamentos (RC) sucessivos é o método clássico utilizado para conversão de linhagens. Na geração RC1 e nas subseqüentes gerações de retrocruzamentos, os indivíduos selecionados, possuindo o alelo sendo transferido, são retrocruzados com o genitor recorrente (GR). A proporção esperada do genótipo do genitor doador (GD) é reduzida pela metade em cada geração de retrocruzamento, sendo esta porcentagem do GR em cada geração de retrocruzamento calculada como: $\%GR = 100 [1 - (0,5)^{n+1}]$, sendo n o número de retrocruzamentos (FEHR, 1991). De acordo com a fórmula, devem ser atingíveis valores em porcentagens de 75, 87,5, 93,7, 96,8 e 98,4 nas descendências dos retrocruzamentos 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente. Após seis gerações de retrocruzamentos, a proporção média esperada de recuperação do genótipo do GR é maior que 99%, no entanto, até recentemente, discussões a respeito da recuperação do genótipo recorrente durante o processo de retrocruzamento enfatizavam os valores esperados para %GR de acordo com esta fórmula, ignorando largamente a variação genética para %GR que existe ao redor da média esperada. Considerando que o genitor doador é, na maioria das vezes, geneticamente divergente dos genitores recorrentes, podem ser necessários mais ciclos de retrocruzamento para a recuperação acima de 99% do genoma recorrente.

Com o desenvolvimento de marcadores genéticos capazes de fornecer boa cobertura do genoma, o interesse em aproveitar esta variação para aumentar a eficiência do método tem aumentado (DUARTE, 2003). A identificação da origem parental de cada região cromossômica, pela análise de dados moleculares, foi inicialmente proposta por Young; Tanksley (1989), que sugeriram o conceito de genotipagem gráfica. Assim, é possível calcular a proporção de recuperação do genótipo recorrente, em cada indivíduo, na progênie de retrocruzamento, identificando-se aqueles que possuem menor proporção de alelos do genitor doador, em regiões do genoma diferentes daquela próxima ao gene-alvo (FRISCH; MELCHINGER, 2001). O surgimento dos marcadores moleculares abriu muitas possibilidades para sua utilização em programas de conversão baseados no método dos retrocruzamentos. Para Hospital; Charcosset (1997), os marcadores moleculares podem ser usados em programas de retrocruzamentos, principalmente de duas maneiras: seleção “foreground” e seleção “background”, servindo o segundo método, proposto por Tanksley et al. (1989), para acelerar a recuperação do genótipo do genitor recorrente. Duarte (2003), ao trabalhar com conversão de linhagens de milho

normal para QPM (Quality Protein Maize), indica que a utilização de marcadores moleculares para identificação precoce das plantas heterozigotas (O2o2) pode aumentar sua eficiência por vários motivos: a avaliação das progênies pode ser dispensada, o tamanho da população pode ser reduzido a poucas plantas por geração e, devido ao fenótipo alvo ser identificado em plantas jovens, características do grão e da planta podem ser selecionadas simultaneamente. Adicionalmente, marcadores moleculares podem ainda ser utilizados para identificação das plantas com maior proporção de recuperação do genótipo do genitor recorrente, tornando o processo de conversão mais rápido e eficiente.

Ragot et al. (1995) demonstraram experimentalmente a eficiência deste tipo de procedimento para introgressão do transgene Bt em diferentes linhagens de milho. Em programas de introgressão, para apenas um alelo, resultados demonstraram que a seleção por marcadores pode conduzir a um ganho de tempo de no mínimo duas gerações com alta recuperação do genitor recorrente (HOSPITAL et al., 1992; OPENSHAW et al., 1994) e ainda que a conversão assistida pode ser finalizada após quatro gerações de retrocruzamentos, mesmo com um pequeno tamanho da população e um limitado número de marcadores avaliados (FRISCH et al., 1999).

Uma vantagem observável da seleção assistida por marcadores em comparação apenas à seleção fenotípica é que, exemplificadamente, para a realização de piramidação de genes, onde se busca concentrar em um único genótipo diferentes características de interesse (como diferentes resistências a diferentes fatores ao mesmo tempo), pode-se reduzir o tempo necessário à obtenção desse genótipo. Em processos como nos retrocruzamentos, a seleção assistida pode ser aplicada para reduzir a transferência de alelos indesejáveis do genitor doador, durante os ciclos subsequentes, monitorando e mantendo apenas os de interesse, juntamente com os do genitor recorrente, reduzindo o número de ciclos de retrocruzamentos. Tendo em vista a complexidade dos cruzamentos em campo quando da utilização desta metodologia, a redução do número de plantas trabalhadas torna-se uma vantagem significativa (MESQUITA et al., 2005).

A disponibilidade de um grande banco de dados, contendo mais de 1500 sequências de pares de *primers* já desenvolvidas para amplificação de microssatélites nessa espécie (Maize Genetics and Genomics Data Base – <http://www.agron.missouri.edu/ssr.html>), torna fáceis a exploração do seu genoma e a obtenção de dados sobre sua variabilidade genotípica (DUARTE, 2003). Como estratégias adicionais e complementares aos métodos clássicos de melhoramento genético, pode-se contar atualmente com os marcadores moleculares, que exploram uma quantidade quase ilimitada de polimorfismos. Por não serem afetados pelas condições ambientais, nem

pelos estádios de desenvolvimento das plantas, eles permitem a identificação precoce e precisa de indivíduos com melhor combinação de alelos favoráveis. Dentre as aplicações dos marcadores moleculares, tem sido relatada com sucesso sua utilização em programas de retrocruzamentos assistidos, tanto na identificação de indivíduos apresentando maior proporção do genótipo recorrente quanto na seleção daqueles que possuem um ou mais alelos de interesse a serem transferidos a partir do genitor doador (MESQUITA et al., 2005).

2.5 CULTIVO DE EMBRIÕES

O ganho genético representa superioridade genética dos descendentes em comparação à média da geração dos pais e depende basicamente da acurácia de predição, intensidade de seleção, variabilidade genética e intervalo de gerações. Esses fatores formam a equação chave para prever o ganho genético, na qual o fator intervalo de gerações é inversamente proporcional ao ganho genético: quanto menos tempo gasta-se entre gerações, maior o ganho genético (RAMALHO et al., 2012). Neste trabalho, exploramos o ponto referente ao encurtamento de ciclo, que visa a promover ganho genético por meio da redução no tempo entre gerações. E esta produção bem sucedida de plântulas a partir de embriões cultivados depende muito do estágio de maturação e da composição do meio, além, é claro, do genótipo (KUMARI et al., 2018). Estes fatores foram explorados analisando os resultados encontrados nesta pesquisa.

O cultivo de embrião tem sido utilizado mais intensamente como um processo pelo qual melhoristas de plantas resgatam embriões fracos, imaturos ou interespecíficos para prevenir degeneração ou acelerar o ciclo (BRIDGEN, 1994), no entanto o cultivo aliado à seleção *in vitro* das plântulas contendo genes introgridos em retrocruzamentos, além de acelerar o processo de introgressão, pode otimizar recursos, visto que apenas as plântulas contendo os genes de interesse são continuadas, reduzindo custos com insumos, utilização de áreas de plantio, mão de obra, dentre outros custos.

Os estágios do cultivo *in vitro* são: Coleta - coleta do embrião zigótico em campo; Cultivo *in vitro* - colocar os embriões em meio de cultivo semissólido esterilizado para estabelecimento, crescimento e enraizamento; Adaptação - transferência das plântulas para o substrato com alta umidade e controle de temperatura ambiental e o Berçário - transplantar as mudas de bandejas para o campo. O resgate ou cultivo de embriões é uma tecnologia de cultura de tecidos *in vitro* que pode acelerar os ciclos das culturas a partir da antecipação do desenvolvimento do embrião (LI et al., 2015).

Além do benefício potencial de redução no ciclo das culturas com uso do cultivo ou resgate de embriões zigóticos, o processo *in vitro* pode permitir ao mesmo tempo a seleção de plântulas com os genes de interesse, quando estes possuem características ou estão ligados a genes que expressem resistência ou tolerância a algum componente químico que possa ser adicionado ao meio de cultivo, como herbicidas, antibióticos ou mesmo carboidratos específicos (DE BLOCK et al., 1987; WANG et al., 2000).

A cultura embrionária envolve o isolamento e o cultivo de um embrião zigótico maduro ou imaturo sob condições estéreis em um meio com nutriente asséptico para obter uma planta viável. A técnica depende do isolamento do embrião sem lesão, formulando um meio nutritivo adequado e induzindo o contínuo crescimento embriogênico e formação de plântulas (BRIDGEN, 1994). Trabalhos com embriões se distinguem em cultura de embriões ou resgate de embriões, onde o primeiro abrange, dentre outras, a quebra de dormência e o encurtamento do ciclo reprodutivo, ao passo que o segundo termo se aplica quando os embriões correm risco de não formar plântulas, se não forem resgatados, o que frequentemente ocorre quando os embriões resultam de cruzamentos distantes (SHARMA et al., 1996).

A dormência pode ser causada por inibidores endógenos, requisitos de luz, baixas temperaturas, requisitos de armazenamento a seco e imaturidade embrionária (YEUNG et al., 1981). Estes fatores de dormência das sementes podem estar localizados no revestimento de sementes, no endosperma ou em ambos. Removendo os embriões das influências desses fatores, os embriões germinam e crescem rapidamente e o ciclo de reprodução é encurtado, podendo, em alguns casos, reduzir o tempo de geração em 40 dias (SHARMA; GILL, 1983). A cultura do girassol, na qual a maturação de sementes em média leva de 50 a 60% da duração do ciclo de vida que é de 120 a 150 dias (SERIEYS, 1992), por meio da cultura *in vitro* de embriões imaturos com 10 dias de idade, Plotnikov (1983) conseguiu reduzir a duração do ciclo de vida pela metade. Da mesma forma, Alissa et al. (1986) e Aspiroz et al. (1988) puderam cultivar quatro gerações de girassol em um ano, cultivando embriões de 7 dias e de 10 a 18 dias, respectivamente.

O cultivo *in vitro* isolado ou em conjunto tem assegurado ganhos em tempo nos ciclos das culturas. Sistemas de descendência de semente única (do Inglês single seed descent - SSD) modificados em combinação com cultura *in vitro* foram propostos por vários autores para encurtar significativamente os ciclos de reprodução: em trevoceiro para 6 gerações/ano (SURMA et al., 2013), em lentilhas e grão de bico para 8 gerações/ano com (CROSER et al., 2014), em ervilha para 6-8 gerações/ano (RIBALTA et al., 2014), em feijão fava para 6-7 gerações/ano (MOBINI et al., 2014).

A maioria dos artigos afirma que embriões pequenos ($\leq 1,5$ mm) devem ser rejeitados (ALMOUSLEM et al., 1998) e que o resgate de embriões deve ser tentado 10 - 12 dias (INAGAKI E TAHIR, 1990) ou 18 - 21 dias (SAVASKAN, et al., 1997) após a polinização, em casos de plantas de trigo com pólen de milho. Cherkaoui et al. (2000) alcançaram a maior porcentagem de desenvolvimento de embriões quando o resgate de embriões foi realizado aos 14 DAP. Quando o resgate de embriões foi tentado mais cedo, os embriões eram menores e menos diferenciados, produzindo menos plântulas verdes (XYNIAS et al., 2014), mas quando os embriões foram resgatados mais tardiamente à polinização, foram maiores e mais bem diferenciados, tornando-se plântulas verdes mais vigorosas. Semelhantemente, os embriões em desenvolvimento foram extraídos por Gordon-Kamm et al. (1990) de grãos desinfetados superficialmente com 10 a 20 dias pós-polinização e cultivados em meio contendo sais MS, 2% de sacarose e $5,5 \text{ g.L}^{-1}$ de agarose. Os embriões grandes (> 3 mm) foram germinados diretamente no meio descrito acima. Embriões menores precisaram ser cultivados por aproximadamente uma semana neste meio acrescido de 10-5M de ácido abscísico antes de serem transferidos para meio livre de hormônio para germinação.

Em um desses estudos, Amaral et al. (2001) avaliaram a influência do estágio de crescimento dos embriões resgatados sobre o número de plântulas obtidas por meio de cruzamentos entre uvas sem sementes. Quatro classes de estágios embrionários (globular, coração, torpedo e indefinido) foram identificadas. O estágio globular apresentou a menor capacidade de produção de plântulas, ao passo que o estágio de torpedo foi o mais eficiente para recuperação de plântulas, sustentando a visão de que o uso de embriões em estágio avançado de desenvolvimento pode favorecer a produção de plântulas maduras.

A idade dos embriões foi também fator crítico na determinação da capacidade de indução de calo em embriões imaturos de milho para Lu et al. (1983), os quais identificaram que a porcentagem de calo embriogênico primário formado em embriões imaturos com 20 DAP foi significativamente menor que aqueles formados com 16 DAP, provavelmente em virtude da redução na atividade meristemática das células com o envelhecimento, sugerindo que o estado fisiológico e de desenvolvimento dos embriões é importante na resposta de iniciação de calos. Comprovaram ainda que embriões menores que um milímetro de comprimento não responderam ao cultivo, corroborando com os resultados de Bohorova et al. (1995), os quais, estudando cultivo de embriões imaturos de milho, afirmaram que embriões menores que 0,5 mm não responderam ao cultivo *in vitro*.

O desenvolvimento bem sucedido de um embrião depende de muitos fatores. Tal como acontece com a maioria de outros processos, o genótipo da planta influencia fortemente o sucesso, como

apresentado por Razi et al. (2013) estudando os efeitos da variação genotípica da uva na eficiência de resgate de embriões e o desenvolvimento embrionário. Genótipos de milho têm larga variação na sua competência para regenerar plântulas, razão pela qual muitas das linhagens se mostram inacessíveis para o melhoramento utilizando técnicas de transformação genética. Muitos dos genótipos falham para produzir calos embriogênicos de tecidos competentes por respostas recalcitrantes *in vitro*. As diferenças são associadas à susceptibilidade à programação genética e reprogramação das células competentes por fatores internos ou externos. Contudo, calos embriogênicos regeneráveis de milho têm sido induzidos de vários tecidos meristemáticos, e embriões imaturos têm se apresentado como mais eficiente na sua competência de regeneração porque contêm largo número de células ativamente em divisão (ANAMI et al., 2010).

Resposta de tecidos de milho em cultivo é genótipo dependente, sendo necessário acessar uma vasta gama de genótipos para identificar aqueles com alta resposta regenerativa, os quais podem ser usados durante transformação genética, mas isto não é particularidade desta cultura, Spiegel-Roy et al. (1985), trabalhando com cultivo *in vitro* e formação de plântulas a partir de cultivares de uva, identificaram que, em condições idênticas, as taxas de germinação de embriões e formação de mudas obtidas a partir da cultura de óvulos eram muito maiores quando utilizavam Flame Seedless do que quando eram usados Perlette ou Sultanina como progenitores femininos. O sucesso do cultivo de embriões variou de genótipo para genótipo também no trabalho de Vidhanaarachchi et al. (2016), que estudaram o efeito de diferentes genótipos de coco na resposta do cultivo *in vitro* de embriões. Variação significativa na germinação *in vitro* foi observada entre os cultivares selecionados: San Ramon Tall (77,48%), Sri Lanka Red Dwarf (67,28%), Sri Lanka Green Dwarf (71,85%) e King Coconut (52,5%).

2.6 ACLIMATIZAÇÃO DE PLÂNTULAS

A técnica de cultivo ou resgate de embriões por si só não fecha o processo de obtenção de plântulas na fase *in vitro*. Da mesma forma que altas taxas de germinação são importantes, a capacidade de sobrevivência das plântulas na aclimatização é igualmente crítica (LEWIS et al., 2019).

A aclimatização ou endurecimento é uma etapa vital na cultura de tecidos vegetais, afetando o sucesso geral do processo e a adaptação ao ambiente *ex vitro* para melhor sobrevivência. Não só influencia a sobrevivência das plântulas cultivadas, como também afeta o desempenho no campo, que determina o rendimento e a qualidade do produto. Já foi observado que o processo de aclimatação depende de uma série de fatores cruciais, incluindo o

genótipo, que não só influencia a resposta do explante a diferentes meios de cultura, como também a organogênese e a capacidade das plântulas regeneradas de resistir às condições *ex vitro* de cultivo. No entanto, estudos realizados para desvendar o papel do genótipo no processo de aclimatação de forma mais direta são escassos e inespecíficos (HAZARIKA et al., 2006).

Ombori et al. (2008), trabalhando com aclimatização e crescimento de plântulas de milho regeneradas *in vitro*, observaram diferenças entre os diferentes genótipos, variando de 98% a 60% entre os cinco genótipos avaliados em sua sobrevivência na estufa, dos quais 90% sobreviveram após transferência para campo. Bhojwani; Mukhopadhyay (1986) relataram que o sucesso da regeneração e, eventualmente, o estabelecimento final em espécies leguminosas vem de uma seleção correta do genótipo. As variações genotípicas podem se dever ao nível endógeno de hormônios (CARMAN, 1990). O nível de concentração interna de ABA e IAA na embriogênese foi estabelecido em muitas plantas de cultivo, incluindo trigo (CARMAN; CAMPBELL, 1990) e milho (CARNES; WRIGHT, 1988). Apesar disto, a literatura sobre propagação *in vitro* mostra que a parte da aclimatização em geral tem recebido menos atenção em comparação com a proliferação *in vitro*, constituindo um dos principais fatores dificultadores para a micropropagação comercial de diferentes plantas. Embora esforços consideráveis tenham sido direcionados para otimizar a condição para os estágios de micropropagação *in vitro*, pouca atenção tem sido dada para entender o processo de aclimatização de plântulas micropropagadas. Consequentemente, o estágio de transplântio continua a ser um grande gargalo na micropropagação de muitas plantas (HAZARIKA et al., 2006).

É muito importante e crítico o bom estabelecimento das plântulas durante aclimatização, pois, além dos custos envolvidos, corre-se o risco de perder plântulas com altas taxas de recuperação do genitor recorrente, que são as de maior interesse, o que tem forte impacto no ganho de tempo na conversão de linhagens. No entanto, em alguns programas de melhoramento perdas na aclimatização são aceitáveis porque o processo permite, como relatado por Bermejo et al. (2016), que, trabalhando com lentilha, observaram que as plântulas obtidas de sementes imaturas sobreviveram à transferência para condições *ex vitro* com sucesso de cerca de 30%. Porém, isso não foi limitante porque elas eram morfológicamente normais e férteis e tinham ao menos 10 frutos com 1-3 sementes por vagem. Como apenas uma semente é suficiente para manter uma população de linhagens recombinantes, esse protocolo foi considerado eficiente para ser usado em combinação com uma técnica de descendente de semente única para acelerar a obtenção de linhagens recombinantes. Com este protocolo proposto *in vitro* e *in vivo*, quatro

gerações por ano podem ser obtidas para os genótipos testados, segundo Bermejo et al. (2016).

Outro importante ponto está relacionado à ausência de variantes somaclonais ou anomalias que podem ocorrer quando vegetais são submetidos ao cultivo *in vitro*. No entanto, estas variantes são mais frequentes quando passam por fase de desdiferenciação e rediferenciação, como a formação de calos ou mesmo embriogênese somática direta. Em milho, estas variações são bem identificadas e descritas por vários autores, como Anami et al. (2010), que relataram anormalidades morfológicas em brotações de milho, as chamadas variações somaclonais. Eles observaram fenótipos anormais em plântulas regenerantes durante a fase reprodutiva, incluindo a emergência tanto do pendão quanto da espiga no próprio talo do pendão, resultando em sementes do pendão. Outras variações somaclonais que ocorreram em baixa frequência incluem espigas múltiplas, folhas emergindo do mesmo nó e número reduzido de inflorescência masculina. Esses defeitos foram mais pronunciados nos regenerantes dos híbridos do que nas linhagens, sugerindo que os fatores genéticos podem ser responsáveis pelas principais diferenças entre os híbridos e as linhagens, uma possível resposta dependente do genótipo (FLUMINHAN; AGUIAR-PERECIN, 1998).

REFERÊNCIAS

- ALISSA, A.; JONARD, R.; SERIEYS, H.; VINCOURT, P. La culture d'embryons isolés in vitro dans un programme d'amélioration du tournesol. **CR Acad Sci**, Paris, t 303, série III, 5, p. 161–164, 1986.
- ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgard Blücher, 1971.
- ALMOUSLEM, A. B.; JAUHAR, P. P.; PETERSON, T. S.; BOMMINENI, V. R.; RAO, M. B.. Haploid durum wheat production via hybridization with maize. **Crop Science**, 38, p. 1080–1087, 1998.
- AMARAL, A. L.; OLIVEIRA, P. R.; CZERAINSKI, A. B.; CAMARGO, U. A. Embryo growth stages on plant obtention from crosses between seedless grape parents. **Rev. Bras. Frutic.**, 23: 647–651, 2001.
- ANAMI, S. E.; MGUTU, A. J.; TARACHA, C. Somatic embryogenesis and plant regeneration of tropical maize genotypes. **Plant Cell Tiss. Organ. Cult.**, 102, 285–295, 2010.
- ARAGÃO, F. J. L.; BRASILEIRO, A. C. M. Positive, negative and marker-free strategies for transgenic plant selection. **Braz. J. Plant Physiol.**, v. 14, n. 1, p. 1-10, 2002.
- ARAGÃO, F. J. L.; BARROS, L. M. G.; BRASILEIRO, A. C. M.; RIBEIRO, S. G.; SMITH, F. D.; SANFORD, J. C.; FARIA, J. C.; RECH, E. L. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. **Theor. Appl. Genet.**, 93:142-150, 1996.
- ASPIROZ, H. S.; VINCOURT, P.; SERIEYS, H.; GALLAIS, A. La culture in vitro des embryons immatures dans l'accélération du cycle de selection des lignées de tournesol et ses effets morphovégétatifs. **Helia**, 10: 35–38, 1988.
- BAHARIAH, B.; PARVEEZ, G. K. A.; MASANI, M. Y. A.; MASURA, S. S.; KHALID, N.; OTHMAN, R. Y. Biolistic transformation of oil palm using the phosphomannose isomerase (pmi) gene as a positive selectable marker. **Biocatal. Agric. Biotechnol.**, v. 2, n. 4, p. 295-304, 2013.
- BERMEJO, C.; GATTI, I.; COINTRY, E. In vitro embryo culture to shorten the breeding cycle in lentil (*Lens culinaris* Medik). **Plant Cell Tissue Org**, 127, p. 585–590, 2016.

BHOJWANI, S. S.; MUKHOPADHYAY, A. Some aspects of plant regeneration in tissue culture of legumes. In: GUPTA, P. K.; BAHL, J. R. (org.). **Genetics and Crop Improvement**. Meerut: Rastogy and Co., 1986. p. 377-385.

BOHOROVA, N.; VAN GINKEL, M.; RAJARAM S.; HOISINGTON, D. A. Tissue culture response of CIMMYT elite bread wheat varieties and evaluation of regenerated plants. **Cereal Research Communications**, 23, p. 243-249, 1995.

BORÉM, A. **Melhoramento de Plantas**. 7. ed. Viçosa: UFV, 2017.

BORLAUG, N. Feeding a world of 10 billion people: the miracle ahead. In vitro Cellular and Developmental Biology – **Plant**, 38: 221–228, 2002.

BRASILEIRO, A. C. M.; DUSI, D. M. A. Transformação genética de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO J. A. (org.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, Brasília, Brazil. 1999. p. 679-735.

BRIDGEN, M. P. A review of plant embryo culture. **HortScience**, 29, p. 1243–1246, 1994.

CABRERA-PONCE, J. L.; VALENCIA-LOZANO, E.; TREJO-SAAVEDRA, D. L. Chapter 3—Genetic Modifications of Corn. In Serna-Saldivar. **Corn**, 3rd ed., S.O., Ed.; AACC International Press: Oxford, UK, 2019. p. 43–85.

CARMAN, J.G. Embryogenic cells in plant tissue culture: occurrence and behaviour. In Vitro Cellular and Developmental Biology – **Plant** 26, p. 746-753, 1990.

CARMAN, J. G.; CAMPBELL, W. F. Factors affecting somatic embryogenesis in wheat. In: BAJAJ, Y. P. S. (org.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry** (vol 13), Springer, Berlin, 1990. p. 68-97.

CARNES, M. G.; WRIGHT, M. S. Endogenous hormone levels of immature corn caryopses of A188 Missouri –17 and Dekalb XL-12. **Plant Science** 57, 185-203, 1988.

CARVALHO, C.; KIST, B. B.; BELING, R. R. **Anuário brasileiro do milho 2020**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2019.

CARVALHO, C. H. S.; BOHOROVA, N.; BORDALLO, P. N.; ABREU, L. L.; VALICENTE, F. H.; BRESSAN, W.; PAIVA, E. Type II callus production and plant regeneration in tropical maize genotypes. **Plant Cell Rep.**, 17: p.73–76, 1997.

CHERKAOUI, S.; LAMSAOURI, O.; CHLYAH, A.; CHLYAH, H.. Durum wheat × maize crosses for haploid wheat production: Influence of parental genotypes and various experimental factors. **Plant Breeding** 119: p. 31–36, 2000.

CHRISTENSEN, A. H.; SHARROCK, R. A.; QUAIL, P. H. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 18, p. 675- 689, 1992.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. v. 4 - Safra 2016/17, n. 12 - Décimo segundo levantamento, setembro 2017. Disponível em: <http://www.conab.gov.br.perspec.agropec>. Acesso em: 20 jun. 2021.

CROSER, J.; RIBALTA, F.; PAZOS NAVARRO, M.; MUNDAY, C.; NELSON, K.; EDWARDS, K.; CASTELLO M.C.; BENNETT, R.; ERSKINE, W. Accelerated single seed descent (aSSD)—**a novel breeding technique to speed attainment of homozygosity**. In: ISAT 2015 2nd international symposium on agricultural technology, Thailand, p. 1–4. 2014.

DE BLOCK, M.; BOTTERMAN, J.; VANDEWIELE, M.; DOCKX, J.; THOEN, C.; GOSSELÉ, V.; MOVVA, N. R.; THOMPSON, C.; VAN MONTAGU, M.; LEEMANS, J. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. **Embo Journal**, Oxford, v. 9, p. 2513-2518, 1987.

DUARTE, J. M. **Conversão de linhagens elites em milho de alta qualidade protéica (QPM)**. 2003. 129f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) –Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

ESTRUCH, J. J.; WARREN, G. W.; MULLINS, M. A.; NYE, G. J.; CRAIG, J. A.; KOZIEL, M. G. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 11, p. 5389-5394, 1996.

FEHR, W. R. **Principles of cultivar development**. Vol.1 Theory and Technique. New York: Macmillan, 1991.

FLUMINHAN, A.; DE AGUIAR-PERECIN, M. L. R. Embryogenic response and mitotic instability in callus cultures derived from maize inbred lines differing in heterochromatic knob content of chromosomes. **Ann. Bot.**, 82: p. 569–576, 1998.

FORSTHOFER, E. L.; SILVA, P. R. F.; STRIEDER, M. L.; MINETTO, T.; RAMBO, L.; ARGENTA, G.; SANGOI L.; SUHRE, E.; SILVA, A. A. Desempenho agrônomo e econômico do milho em diferentes níveis de manejo e épocas de semeadura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 3, p. 399-407, 2006.

FRISCH, M.; BOHN, M.; MELCHINGER, A. E. Comparison of selection strategies for marker-assisted backcrossing of a gene. **Crop Science**, Madison, v. 39, n. 5, p. 1295-1301, set./out. 1999.

FRISCH, M.; MELCHINGER, A. E. The length of the intact donor chromosome segment around a target gene in marker-assisted backcrossing. **Genetics**, Baltimore, v. 157, n. 3, p. 1343-1356, mar. 2001.

GIRI, C. C.; PRAVEENA, M. In vitro regeneration, somatic hybridization and genetic transformation studies: an appraisal on biotechnological interventions in grasses. **Plant Cell Tissue Organ. Cult.**, v. 120, n. 3, p. 843-860, 2015.

GORDON-KAMM, W. J., BASZCZYNSKI, C. L., BRUCE, W. B., TOMES, D. T. Transgenic cereals – *Zea mays* (maize). In: VASIL, I. K. (org.). **Molecular Improvement of Cereal Crops**. Springer Netherlands, 1999. p. 189–253.

GUI, H.; LI, X.; LIU, Y.; HAN, K.; LI, X. The relationship between PMI (manA) gene expression and optimal selection pressure in Indica rice transformation. **Plant Cell Rep.** 33, p. 1081-1090, 2014

GUREL, S.; GUREL, E.; KAUR, R.; WONG, J.; MENG, L.; TAN, H.Q.; LEMAUX, P.G. Efficient, reproducible *Agrobacterium*-mediated transformation of sorghum using heat treatment of immature embryos. **Plant Cell Rep.**, v. 2, n. 3, p. 429-444, 2009.

HANSEN, G.; WRIGHT, M. Recent advances in the transformation of plants. **Trends Plant Sci.**, 4, p. 226–231, 1999.

HARLAN, H. V.; POPE, M. N. The use and value of backcross in small grain breeding. **Journal of Heredity**, Cary, v. 13, p. 319-322, 1922.

HAZARIKA, N. B., DA SILVA, T. A. J.; AKSHAY, T. Effective acclimatization of in vitro cultured plants: methods, physiology and genetics. In: TEIXEIRA DA SILVA, J (org.).

Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology. Volume II. Global Science Books, UK, 2006. p 427–438.

HOSPITAL, F.; CHARCOSSET, A. Marker-assisted introgression of quantitative trait loci. **Genetics**, Baltimore, v. 147, n. 3, p. 1469-1485, nov. 1997.

HOSPITAL, F.; CHEVALET, C.; MULSANT, P. Using markers in gene introgression breeding programs. **Genetics**, Baltimore, v. 132, n. 4, p. 1199- 1210, dez. 1992.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. 2021. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/brasil>. Acesso em: 27 fev. 2021.

INAGAKI, M.; TAHIR, M. Comparison of haploid production frequencies in wheat varieties crossed with *Hordeum bulbosum* L. and maize. **Japanese Journal of Breeding**, 40: 209–216. 1990.

ISAAA. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications. **GM Approval Database**. 2014. Disponível em: <https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/event/default.asp?EventID=154EEEvent=Bt11%20x%20MIR162%20x%20GA21>. Acesso em: 25 fev. 2021

JOERSBO, M.; DONALDSON, I.; KREIBERG, J.; PETERSEN, S. G.; BRUNSTEDT, J.; OKKELS, F. T. Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet. **Mol. Breed.**, 4, p. 111-117, 1998.

LEBRUN, M.; SAILLAND, A.; FREYSSINET, G.; DEGRYSE, E. Mutated 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, gene coding for said protein and transformed plants containing said gene. **WO9704103-A 1**, France. 1997.

LEE, B. T.; MATHESON, N. K. Phosphomannoisomerase and phosphoglucoisomerase in seeds of *Cassia coluteoides* and some other legumes that synthesize galactomannan. **Phytochemistry**, 23, p. 983-987, 1984.

LEWIS, M.; CHAPPELL, M.; ZHANG, D.; MAYNARD, R. Development of an Embryo Rescue Protocol for Butterfly Weed. **HortTechnology**, v. 30, n. 1, p. 1-7, 2019.

- LI, J.; WANG, X.; WANG, X.; WANG, Y. Embryo rescue technique and its applications for seedless breeding in grape. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, 120, p. 861-880, 2015.
- LU, C.; VASIL, V.; VASIL, I. K. Improved efficiency of somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of maize (*Zea mays* L.). **The or. Appl. Genet.**, 66, p. 285-289, 1983.
- MANCINI, M.; WOITOVICH, N.; PERMINGEAT, H. R.; PODIO, M.; SIENA, L. A.; ORTIZ, J. P. A.; PESSINO, S. C.; FELITTI, S. A. Development of a modified transformation platform for apomixes candidate genes research in *Paspalum notatum* (bahiagrass). **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.**, 50, p. 412-424, 2014.
- MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Valor Bruto da Produção Agropecuária (VBP)**. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/politica-agricola/valor-bruto-da-producao-agropecuaria-vbp>. Acesso em: 27 fev. 2021.
- MIKI, B.; MCHUGH, S. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. **J. Biotech.**, 107, p. 193-232, 2004.
- MOBINI, S. H.; LULSDORF, M.; WARKENTIN, T. D.; VANDENBERG, A. Plant growth regulators improve in vitro flowering and rapid generation advancement in lentil and faba bean. **In Vitro Cell Dev. Biol. Plant**, v. 51, n. 1, p. 71–79, 2014.
- NEGROTTO, D.; JOLLEY, M.; BEER, S.; WENCK, A. R.; HANSEN, G. The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation. **Plant Cell Rep.**, 19, p. 798–803, 2000.
- ODUOR, R. O.; NJAGI, E. N. M.; NDUNG’U, S.; MACHUKA, J. S. In vitro regeneration of dryland Kenyan maize genotypes through somatic embryogenesis. **Int. J. Bot.**, 2, p. 146–151, 2006.
- OMBORI, O.; GITONGA, N. M.; MACHUKA, J. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of tropical maize (*Zea Mays* L.) inbred lines. **Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 224-232, 2008.

OPENSHAW, S. J.; JARBOE, S. G.; BEAVIS, W. D. Marker assisted selection in backcross breeding. In: LOWER, R. (org.). **Joint Plant Breeding Symposium on Analysis of Molecular Marker Data**. Corvallis: Oregon State University, 1994. p. 41–43.

PEREIRA, A. V. C.; VIEIRA, L. G. E.; RIBAS, A. F. Optimal concentration of selective agents for inhibiting in vitro growth of *Urochloa brizantha* embryogenic calli. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 15, n. 23, p. 1159–1167, 2016.

PLOTNIKOV, V. A. Use of method of culturing young embryos for accelerated development of sunflower cytoplasmic male sterility analogues. **Tsitologiya i Genetika**, v. 17, n. 6, p. 40–43, 1983.

PRIOLI, L. M.; SILVA, W. J. Somatic embryogenesis and plant regeneration capacity in tropical maize inbreds. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 12, p. 553-566, 1989.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2020. URL: <https://www.R-project.org/>

RAGOT, M.; BIASIOLLI, M.; DELBUT, M. F.; DELL'ORCO, A.; MALGARINI, L.; THEVENIN, P.; VERNOY, J.; VIVANT, J.; ZIMMERMANN, R.; GAY, G. Marker-assisted backcrossing: a practical example. In: **techniques et utilisations des marqueurs moleculaires**, 1994, Montpellier. Proceeding Paris: INRA, 1995. p. 45-56.

RANGAN, T. S. Culture of ovules. In: VASIL, I. K. (org.). **Cell culture and somatic cell genetics of plants**. vol. 1. Laboratory procedures and their applications. New York: Academic press, 1984. p. 227–231.

RAZI, M.; MARANDI, R. J.; BANEH, H. D.; HOSSEINI, B.; DARVISHZADEH, R. Effect of paternal genotypes sprays with BA and IAA concentration on embryo rescue of F1 progenies from 'Askari' (*Vitis vinifera* L.) cultivar. **J. Agric. Sci. Technol.**, 15: 1023–1032, 2013.

REED, J.; PRIVALLE, L.; POWELL, M. L.; MEGHJI, M.; DAWSON, J.; DUNDER, E.; SUTTIE, J.; WENCK, A.; LAUNIS, K.; KRAMER, C.; CHANG, Y-F.; HANSEN, G.; WRIGHT, M. Phosphomannose isomerase: an efficient selectable marker for plant transformation. **In Vitro Cell Dev. Biol. Plant** 37, 127–132, 2001.

RIBALTA, F. M.; CROSER, J. S.; ERSKINE, W.; FINNEGAN, P. M.; LULSDORF, M. M.; OCHATT, S. Antigibberellin-induced reduction of internode length favors *in vitro* flowering and seed-set in different pea genotypes. **Biol. Plant**, 58: 39–46, 2014.

SAVASKAN, C.; ELLERBOCK, C.; FISH, L. J.; SNAPE, J. W. Doubled haploid production in Turkish durum wheats using crosses with maize. **Plant Breeding**, 116: 299–301, 1997.

SERIEYS, H. *In vitro* culture of zygotic embryos: its use in Soya and Sunflower improvement. In: DATTÉE Y., DUMAS C., GALLAIS A. (org.). **Reproductive Biology and Plant Breeding**. Springer-, Berlin, Heidelberg, 1992. p. 235–246.

SHARMA, D. R.; KAUR, R.; KUMAR, K. Embryo rescue in plants – a review. **Euphytica**, v. 89, p. 325-337, 1996.

SHARMA, H. C.; GILL, B. S. New hybrids between Agropyron and wheat. II. Production, morphology and cytogenetic analysis of F1 hybrids and back cross derivatives. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 66, p. 111-121, 1983.

SPIEGEL-ROY, P.; SAHAR, N.; BARON, J.; LAVI, U. *In vitro* culture and plant formation from grape cultivars with abortive ovules and seeds. **J. Am. Soc. Hortic. Sci.**, 110: 109–112, 1985.

STRABLE, J.; SCANLON, M. J. Maize (*Zea mays*): a model organism for basic and applied research in plant biology. **Cold Spring Harb. Protoc.**, 132: 152-163, 2009.

SURMA, M.; ADAMSKI, T.; ŚWIĘCICKI, W.; BARZYK, P.; KACZMAREK, Z.; KUCZYŃSKA, A.; KRYSTKOWIAK, K.; MIKOŁAJCZAK, K.; OGRODOWICZ, P. Preliminary results of *in vitro* culture of pea and lupin embryos for the reduction of generation cycles in single seed descent technique. **Acta Soc. Bot. Pol.**, v. 82, n. 3, p. 231–236, 2013.

TANKSLEY, S. D.; YOUNG, N. D.; PATTERSON, A. H.; BONIERBALE, M. W. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. **Bio/Technology**, New York, v. 7, n. 3, p. 257-263, mar. 1989.

USDA - UNIDET STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. World Agricultural Supply and Demand Estimates. [S. 1.]: WASDE, 2017. 40 p.

VIDHANAARACHCHI, V. R. M.; SURANJITH, W. C.; GUNATHILAKE, T. R. Effect of genotype, embryo maturity and culture medium on *in vitro* embryo germination of Sri Lankan

coconut (*Cocos nucifera* L.) varieties. **Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka**, v. 44, n. 3, p. 273–278, 2016.

VIELLE-CALZADA, J. P.; MARTINEZ, DE LA VEJA, O.; HERNANDEZ-GUZMAN, G.; IBARRA-LACLETTE, E.; ALVAREZ-MEJIA C.; VEGA-ARREGUIN, J.C.; JIMENEZ-MORAITA, B.; FERNANDEZ-CORTES, A.; CORONA-ARMENTA, G.; HERRERA-ESTRELLA, L.; HERRERA-ESTRELLA, A. The Palomero genome suggests metal effects on domestication. **Science**, 326: 1078, 2009.

WANG, A. S.; EVANS, R. A.; ALTENDORF, P. R.; HANTEN, J. A.; DOYLE, M. C.; ROSICHAN, J. L. A mannose selection system for production of fertile transgenic maize plants from protoplasts. **Plant Cell Rep.**, 19, p. 654–660, 2000.

WRIGHT, M.; DAWSON, J.; DUNDER, E.; SUTTIE, J.; REED, J.; KRAMER, C.; CHANG, Y.; NOVITZKY, R.; WANG, H.; ARTIM-MOOREL, L. Efficient biolistic transformation of maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) using the phosphomannose isomerase gene, *pmi*, as the selectable marker. **Plant Cell Rep.**, 20, p. 429-436, 2001.

XU, Y.; SKINNER, D. J.; WU, H.; PALACIOS-ROJAS, N.; ARAUS, J. L.; YAN, J.; GAO, S.; WARBURTON, M. L.; CROUCH, J. H. Advances in maize genomics and their value for enhancing genetic gains from breeding. **Int. J. Plant Genomics**, 30 p. 2009.

XYNIAS, I.; KOUFALIS, A.; GOULI-VAVDINOUDI, E.; ROUPAKIA, D. Factors affecting doubled haploid plant production via maize technique in bread wheat. **Acta Biologica Cracoviensia series Botanica**, v. 56, n. 2, p. 67- 73, 2014.

YEUNG, E. C.; AITKEN, J.; BIONDI, S.; THORPE, T. A. Shoot histogenesis in cotyledon explants of radiata pine. **Botanical Gazette**, 142, p. 494-501, 1981.

YOUNG, N. D.; TANKSLEY, S. D. Restriction fragment length polymorphisms maps and the concept of graphical genotypes. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 77, n. 1, p. 95-101, jan. 1989.

ZHANG, M.; ZHUO, X.; WANG, J.; WU, Y.; YAO, W.; CHEN, R. Effective selection and regeneration of transgenic sugarcane plants using positive selection system. **In Vitro Cell Dev. Biol. Plant**, 51, p. 52-61, 2014.

CAPÍTULO I

INFLUÊNCIA GENOTÍPICA E DA IDADE DE EMBRIÕES IMATUROS DE MILHO CULTIVADOS *IN VITRO* VISANDO A ACELERAR CICLOS DE RETROCRUZAMENTOS

RESUMO

Em programas de melhoramento genético de milho, a introgressão de alelos de interesse em linhagens elites por meio de retrocruzamentos é uma das estratégias mais utilizadas, pois permite a manutenção do genótipo de boa qualidade enquanto incorporam-se características de interesse de um genitor doador. O milho tem se mostrado genótipo dependente em processos regenerativos *in vitro*, que, assim como a idade do explante, se mostra como gargalo importante na obtenção de um protocolo eficiente de resgate e cultivo de embriões. O objetivo do presente estudo foi obter o tempo fisiológico ideal para o processo de resgate de embriões, entendendo as possíveis influências do genótipo, considerando as condições locais, em combinação com a técnica de marcadores moleculares. Para tanto, foram realizados retrocruzamentos entre a geração F₁, contendo genes de doadores conhecidos, e os genitores recorrentes de cada um dos três genótipos utilizados. Das espigas RC1 obtidas, foram coletados embriões imaturos em diferentes idades para serem cultivados *in vitro*. Também foram realizadas genotipagens com seleção assistida por marcadores nas plântulas geradas, como forma de verificar a eficiência do método. O experimento com cultivo de embriões imaturos foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com nove tratamentos compostos por três diferentes idades de coleta dos embriões (15, 20 e 25 dias após polinização) em geração RC1 e três diferentes genótipos recorrentes. O efeito de diferentes genótipos e da idade dos embriões resgatados durante o processo de cultivo de embriões e seleção genotípica *in vitro* foram avaliados. Foi possível observar a viabilidade da metodologia de cultivo de embriões de milho e o ganho em tempo que proporciona em relação ao modelo convencional por sementes. O uso de marcadores moleculares possibilitou identificar as melhores plântulas em relação à similaridade com o genitor recorrente e potencializar o ganho em gerações. Embriões coletados com 15 dias após a polinização apresentam menor tamanho e produção de massa fresca, assim como foi constatada correlação com a menor taxa de aclimatização. A coleta e cultivo de embriões com 20 dias após a polinização se mostrou como melhor opção para o processo. O fator genótipo apresentou influência na aclimatização, nas condições deste experimento.

Palavras-chave: Melhoramento genético de plantas. *Zea mays*. Biotecnologia. Resgate de embriões. Cultura de tecidos.

ABSTRACT

In maize breeding programs, the introgression of alleles of interest into elite lines through backcrossing is one of the most used strategies, as it allows the maintenance of a good quality genotype while incorporating characteristics of interest to a donor parent. Maize has been shown to be genotype dependent on in vitro regenerative processes and, as well as explant age, are important bottlenecks in obtaining an efficient embryo rescue and cultivation protocol. The aim of the present study was to obtain the ideal physiological time for the embryo rescue process, understanding the possible influences of the genotype, considering the local conditions, in combination with the technique of molecular markers. For this purpose, backcrosses were performed between the F1 generation, containing genes from known donors, and the recurrent parents of each of the three genotypes used. From the BC1 ears obtained, immature embryos at different ages were collected to be cultivated in vitro. Genotyping with marker assisted selection was also performed on the seedlings generated, as a way to verify the efficiency of the method. The experiment with cultivation of immature embryos was carried out in a completely randomized design, with nine treatments composed of three different embryo collection ages (15, 20 and 25 days after pollination) in BC1 generation and three different recurrent genotypes. The effect of different genotypes and the age of embryos rescued during the embryo culture process and in vitro genotypic selection were evaluated. It was possible to observe the viability of the corn embryo cultivation methodology and the gain in time it provides in relation to the conventional seed model. The use of molecular markers made it possible to identify the best seedlings in relation to similarity with the recurrent parent and enhance the gain in generations. Embryos collected 15 days after pollination have smaller size and fresh mass production, as well as a correlation with a lower acclimatization rate. The collection and cultivation of embryos 20 days after pollination proved to be the best option for the process. The genotype factor influenced the acclimatization under the conditions of this experiment.

Keywords: Plant breeding. *Zea mays*. Biotechnology. Embryo rescue. Culture of Tissue.

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays*) é um cereal da família Poaceae com grande importância mundial. No Brasil, é a segunda cultura agrícola com maior valor bruto de produção em 2020 (MAPA, 2021), estando presente em 18 milhões de hectares, segundo levantamento sistemático da produção agrícola de 2021 (IBGE, 2021). O desempenho expressivo da cultura deve-se em grande parte ao milho híbrido e ao advento da biotecnologia. Atualmente, plantas transgênicas com resistência a herbicidas, insetos e doenças são cultivadas, sendo as resistentes a herbicidas e insetos as duas mais comercializadas desde os últimos 10 anos (JAMES, 2013). Um dos principais objetivos dos programas de melhoramento genético de milho é a introgressão em linhagens elites de um ou mais alelos de interesse de um genitor doador por meio do método de retrocruzamentos. Esta estratégia permite a manutenção do genótipo de uma boa linhagem enquanto incorporam-se características de interesse para as quais esta é deficiente, incluindo resistências (CARNEIRO et al., 2009). O desenvolvimento de marcadores genéticos capazes de fornecer boa cobertura do genoma eleva o interesse em aproveitar esta variação para aumentar a eficiência do método (DUARTE, 2003). Estes avanços da biotecnologia vêm contribuindo para o aumento do potencial de produtividade da maioria das espécies agronômicas (BORÉM E MIRANDA, 2013); corroboram neste sentido tecnologias como a cultura de tecidos vegetais e a utilização de marcadores moleculares. O princípio básico da cultura de tecidos é a da totipotência das células vegetais e sua capacidade de regenerar plântulas oriundas de células isoladas, tecidos ou órgãos vegetais, como os embriões, que são excelentes explantes para propagação clonal *in vitro* (FERREIRA et al., 1998).

Fatores

inerentes aos grupos de maturação dos genótipos, estágio dos embriões, composição dos meios de cultivo, dentre outros, podem definir o sucesso do processo. Em um laboratório comercial, é importante ter protocolos bem definidos para assegurar escalabilidade, garantir boa qualidade e reduzir perdas. Como proposta deste experimento, buscou-se obter o tempo fisiológico ideal para o processo de resgate de embriões, entendendo as possíveis influências do genótipo, considerando as condições locais.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 LOCAL DE CULTIVO E CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO

O experimento foi realizado na Estação de Pesquisa da Syngenta, unidade Aracati, Ceará, no período de maio a setembro de 2020. O município de Aracati-CE está localizado na região semiárida do Nordeste brasileiro, tendo coordenadas geográficas 4° 51' de latitude sul, 37°28' de longitude W. Gr. e 30 m de altitude.

O clima da região, na classificação de Köppen, encontra-se numa transição entre o clima semiárido - Bsw'h' e o clima quente úmido do litoral - Aw' (SILVA NETO et al., 2019). Registra-se precipitação pluviométrica bastante irregular, e com total acumulado de 344 mm durante período do experimento; temperatura do ar média de 26°C com máximas em torno de 39°C e mínimas de 16°C; umidade relativa do ar média de 72% no período da experimentação, com máximas em torno de 98% e mínimas de 21%, conforme dados da estação meteorológica existente na estação de pesquisa.

2.2 MATERIAL VEGETAL E OBTENÇÃO DAS POPULAÇÕES

Sementes de três linhagens puras de milho foram obtidas do programa de melhoramento genético da Syngenta. As sementes foram semeadas em campo com espaçamento de 20 x 80 cm (entre plantas e linhas, respectivamente) para promover o cruzamento com um genitor doador. O doador, semeado nas mesmas condições da linhagem, foi um material homozigoto conhecido, composto por um triplo stack formado por três eventos independentes Bt11, GA21 e MIR162, que lhe asseguram características de interesse para serem introgrididas na linhagem, cada evento contendo seu respectivo gene marcador seletivo (Tabela 1, página 17). As sementes da geração F₁ colhidas no primeiro cruzamento, descendentes do genitor doador (GD) com o genitor recorrente (GR), foram semeadas na sequência para obtenção de plantas para utilização no retrocruzamento com o GR, produzindo espigas de geração RC1, usadas como fonte de explantes para coleta dos embriões imaturos utilizados no experimento.

Os genótipos recorrente e doador foram cultivados em campo, nas condições ambientais acima citadas. Para evitar contaminação de pólen, as primeiras espigas que apareceram nas plantas de milho foram cobertas com sacos de papel antes da emergência dos estigmas e posteriormente foram cruzadas manualmente quando o comprimento do estigma estava ideal (completamente exposto) para a receptividade do pólen e obtenção de embriões imaturos.

2.3 CULTIVO *IN VITRO*

Espigas RC1 tiveram suas palhas retiradas e iniciou-se o procedimento de desinfestação. Inicialmente, foram lavadas com detergente líquido comercial e enxaguados em água corrente. Em ambiente asséptico, as espigas foram imersas em álcool 70% por cinco minutos, com posterior retirada do álcool 70% e imersão por 30 minutos em 500 mL de solução de NaClO a 2,5% com duas gotas de Tween 20. Depois, houve o descarte da solução de NaClO e por fim as espigas foram enxaguadas por três vezes nos tempos de 3, 5 e 10 minutos, com água deionizada e autoclavada para retirar resíduos do agente desinfetante. Logo em seguida, foi realizada a excisão dos embriões em câmara de fluxo laminar. A extração dos embriões imaturos foi feita por meio de uma incisão transversal na porção terminal das sementes, com auxílio de pinças e bisturis, sendo as coroas das sementes (1-2 mm) removidas com uma lâmina de bisturi estéril e os embriões imaturos foram excisados pela inserção de uma espátula entre o endosperma e o pericarpo, liberando o endosperma da semente e expondo o embrião. Após retirada com ajuda de bisturi para forçar a expulsão do embrião através do corte, os embriões foram isolados e colocados em frascos contendo meio de cultura, composto por sais minerais e vitaminas do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de 100 mg.L^{-1} de mio-inositol, solidificado com 3 g.L^{-1} de Phytigel Caisson®, com pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$ e autoclavado por 15 minutos a 121°C e 1,1 atm de pressão. Após inoculação dos embriões, estes foram mantidos no escuro por dois dias e posteriormente foram expostos à luz numa irradiância de $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ por mais 5 dias. Os explantes foram mantidos em sala de cultivo com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sob fotoperíodo de 16 horas provida por lâmpadas de LED tipo luz do dia.

O experimento com cultivo de embriões imaturos foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com nove tratamentos compostos por três diferentes idades de coleta dos embriões (15, 20 e 25 dias após polinização) em geração RC1 e três diferentes genótipos recorrentes. Foram quatro repetições por tratamento, cada uma foi constituída por 50 embriões em cada placa de petri com diâmetro de 150 mm e altura de 25 mm contendo 60 mL de meio de cultura. À composição do meio de cultivo, foram adicionados os agentes seletivos glufosinato (5 mg.L^{-1}), glifosato (140 mg.L^{-1}) e manose (50 g.L^{-1}), para seleção dos genes/marcadores de interesse, aos quais os embriões foram submetidos.

Aos sete dias de cultivo *in vitro*, as plântulas formadas foram avaliadas, sendo verificadas as taxas de germinação/sobrevivência, além de análises biométricas e genotípicas, tendo sido considerados germinados apenas os embriões que mostraram desenvolvimento de radícula e caulículo. Os embriões foram medidos da base à ponta (da sua parte basal até a apical)

com auxílio de régua graduada e pesados com auxílio de balança de precisão. Para obtenção da taxa de germinação (TG), foi utilizada a equação abaixo:

$$TG = \frac{\text{número de embriões germinados}}{\text{número de embriões inoculados } in vitro}$$

2.4 ACLIMATIZAÇÃO E CONDUÇÃO DAS PLÂNTULAS

Todas as plântulas sobreviventes, após sete dias do cultivo *in vitro*, seguiram para aclimatização em bandejas de polipropileno com células de 100 mL contendo substrato Carolina Soil® e foram acondicionadas em estufas com temperatura e umidade médias em torno de 27°C e 85%, respectivamente. Passados 14 dias na estufa, foi avaliada a taxa de sobrevivência das plântulas por meio da fórmula:

$$TS = \frac{\text{número de plantas sobreviventes}}{\text{número de plantas inicialmente aclimatizadas}}$$

As plântulas foram então transferidas individualmente no 15º dia após aclimatização para vasos com capacidade para 11 litros contendo substrato Carolina Soil®, permanecendo em estufas com temperatura e umidade em torno 29°C e 80%, respectivamente. As irrigações foram feitas de modo a manter o substrato sempre úmido, com irrigações diárias em torno de 3 Litros de água por vaso, a depender da temperatura diária.

2.5 ANÁLISES DE GENOTIPAGEM E SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES

Amostras foliares foram coletadas de todas as plântulas individualmente no 15º dia após aclimatização e colocadas em placas de coleta. Ainda em Aracati, foi realizado o processo de liofilização *overnight* para assegurar melhor maceração e qualidade das amostras. As placas com amostras foliares das plântulas foram enviadas ao laboratório de Genotipagem da Syngenta, em Uberlândia MG, para realização das análises.

A extração do DNA foi realizada conforme metodologia da Syngenta. O processo de liofilização *overnight* foi refeito, seguido pelo preparo e processamento das amostras, sendo adicionadas esferas metálicas dentro de cada poço das placas contendo amostras para realização da maceração, adição dos tampões de extração, agitação robusta, centrifugação, transferência, centrifugação, descarte de sobrenadante, adição de etanol, centrifugação, descarte de sobrenadante, secagem do DNA (1hora), suspensão do DNA, agitação (1 hora) e banho maria (20 min). Após essas etapas, as placas seguiram para diluir o DNA na proporção de 1:3, com seguinte adição dos

controles, separação e diluição dos marcadores moleculares SNP, do inglês *single nucleotide polymorphism*. Por fim, as amostras seguiram para alíquotagem em *arrays* nos equipamentos da plataforma nexar, onde distribuí-se o DNA e os reagentes da PCR e selou-se a fita dos *arrays*. Após este procedimento, os *arrays* são centrifugados e levados a um termociclador de reação em cadeia da polimerase para ciclos de desnaturação 96°C, anelamento dos *primers* 55°C e extensão dos *primers* a 72°C. Os *arrays* são secos e centrifugados e a leitura destes acontece em equipamento nexar compilando todas as informações para análise de dados.

Os resultados foram analisados em relação às expectativas genéticas com 300 marcadores para cada amostra. MAIC (*Marker Assisted Inbred Conversion*) é uma análise utilizada em qualquer conversão de uma linhagem envolvendo o retrocruzamento assistido por marcadores para recuperar com uma probabilidade alta o genótipo original do parental recorrente contendo o transgene ou evento específico do parental doador.

2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos foram submetidos aos testes de normalidade de Shapiro-Wilk e de homogeneidade de variâncias paramétricos de Bartlett. Posteriormente, foi aplicada a análise de variância e, sempre que se constatou a significância estatística pelo teste F a 5% de probabilidade, as médias foram comparadas pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). Também foram estimados os coeficientes de Correlação de Pearson. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote ExpDes.pt do *software* R-Studio version 4.0.2 (R CORE TEAM, 2020) para testar o efeito significativo da idade dos embriões cultivados e diferentes genótipos no cultivo *in vitro* de embriões imaturos de milho.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES IMATUROS DE MILHO

O início da germinação dos embriões aconteceu dois dias após inoculação, independentemente do genótipo e da idade dos embriões. A polinização das plantas F₁ aconteceu quando as plantas estavam com 60 dias após o semeio, em média, ocorrendo retirada e cultivo dos embriões 15, 20 e 25 dias após polinização (DAP), o que asseguraria concluir um ciclo (avanço de geração) com 75, 80 e 85 dias, respectivamente. As plantas dos mesmos genótipos, oriundas de sementes, completaram os seus ciclos, do semeio até o semeio da geração seguinte, com cerca de 115 dias (Figura 1). Esta diferença maior no processo convencional, por sementes, se deve ao maior tempo para maturação das sementes até a colheita (110 dias), seguido do seu processamento (secagem debulha e novo semeio) da semente.

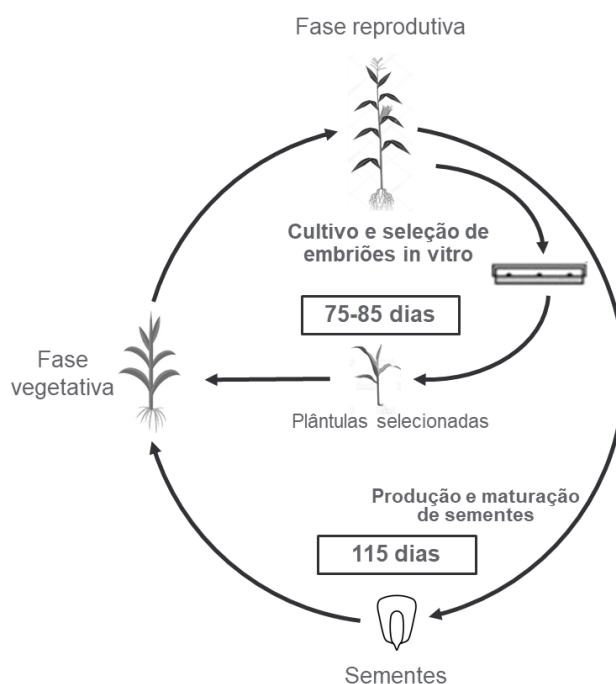


Figura 1. Ilustração resumida do ciclo do milho, reduzindo o ciclo normal de 115 dias por produção de sementes para 75-85 dias utilizando a tecnologia de cultivo de embriões imaturos coletados entre 15 e 25 dias após a polinização. Aracati, Syngenta, 2021.

Um ponto muito importante a ser considerado são as condições climáticas durante o ciclo da cultura. Durante a condução deste experimento (semeio de sementes F₁ até aclimatização de plântulas RC1), as temperaturas médias foram em torno de 26°C, geralmente comuns para o segundo quadrimestre do ano de 2020 nesta localização, que vai de maio a agosto. Quando são observados os dados climáticos deste mesmo ano, é possível constatar que

no primeiro (janeiro a abril) e no terceiro (setembro a dezembro) quadrimestres as temperaturas atingiram médias de 28°C. Em outras palavras, é possível encontrar uma variação tanto no tempo necessário para completar o ciclo por meio do cultivo de embriões imaturos quanto por meio do processo convencional por sementes, a depender da época do ano. Para determinação mais precisa do total de ciclos ao ano, estes estudos precisam ser conduzidos em diferentes épocas considerando o clima do momento. No entanto, com os resultados obtidos pode-se estimar que pelo menos quatro ciclos seriam viáveis por ano, nas condições climáticas locais, usando a tecnologia de cultivo de embriões imaturos de milho.

Em função dos eventos que ocorrem ao longo do ciclo da cultura, é possível estabelecer estádios de desenvolvimento caracterizados por alterações morfológicas provocadas principalmente pelo ambiente. A duração das fases fenológicas de uma cultura, avaliada pelo número de dias, varia entre regiões, anos e datas de semeadura, em razão das variações climáticas, como umidade relativa, temperatura do ar e do solo, chuva, radiação solar e fotoperíodo (COSTA, 1994). No desenvolvimento do milho, a duração do ciclo em dias tem demonstrado inconsistência. Isso se deve ao fato de que a duração de subperíodos e ciclos da planta estão associados às variações das condições ambientais e não ao número de dias. A temperatura tem-se apresentado como o elemento climático mais importante para predizer os eventos fenológicos da cultura, desde que não haja deficiência hídrica. Gadioli et al. (2000) demonstraram isto obtendo como resultados que os graus-dia necessários para atingir o estágio fenológico do florescimento (estádio 5) foram obtidos em menos tempo (59-62 dias após semeio) nas épocas 3 e 2 (mais graus-dia no mesmo período de DAS) e em mais tempo (67-68 dias após semeio) na época 1 (menos graus-dia no mesmo período de DAS) para os dois híbridos superprecoces.

Os resultados obtidos estão de acordo com o trabalho de Plotnikon (1983), que conseguiu reduzir pela metade a duração do ciclo de vida do girassol por meio do cultivo de embriões *in vitro*. Da mesma forma, Alissa et al. (1986) e Aspiroz et al. (1988) puderam cultivar quatro gerações de girassol em um ano, cultivando embriões de 7 dias e de 10 a 18 dias, respectivamente.

A disponibilidade de um sistema de regeneração *in vitro* para o milho tropical é requisito para uma transformação genética eficaz. O resgate de embriões é uma tecnologia de cultura de tecidos *in vitro* que pode acelerar os ciclos das culturas a partir da antecipação do desenvolvimento do embrião (LI et al., 2015).

3.2 IDADE DOS EMBRIÕES E INFLUÊNCIA GENOTÍPICA

Os resultados relacionados à idade dos embriões (tempo entre a polinização e a extração do embrião) e dos genótipos, assim como sua interação estão expostos na Tabela 2. Não foi constatada interação entre os dois fatores em nenhuma das variáveis analisadas. O genótipo mostrou significância apenas na variável sobrevivência na aclimatização. Para a variável idade dos embriões, existe influência significativa deste fator em todos os parâmetros avaliados.

Tabela 2. Resumo da análise de variância para os parâmetros avaliados: Comprimento e Massa fresca de embriões, Germinação *in vitro* e Aclimatização. Aracati, Syngenta, 2021.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Comprimento	Massa Fresca	Germinação	Aclimatização
		Quadrado Médio			
Genótipo (G)	2	0.001 ^{N.S.}	0.01 ^{N.S.}	0.11 ^{N.S.}	0.06*
Idade (I)	2	25.75**	548.52**	13.86*	0.17**
G*I	4	0.001 ^{N.S.}	0.03 ^{N.S.}	1.15 ^{N.S.}	0.0085 ^{N.S.}
Erro	27	4.5	0.68	97.75	0.23
C.V. (%)		8.75	1.59	35.49	10.75

C.V. Coeficiente de variação; N.S. Não significativo; * significativo a 5% e ** significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

3.2.1 Comprimento e massa fresca dos embriões

É importante considerar que tanto a idade quanto o genótipo dos embriões e sua influência nos resultados podem variar conforme o local onde as plantas são cultivadas. Pervin et al. (2019) trabalharam com plantas de milho cultivadas em Bangladesh sob condições de campo normais em novembro de 2016 e, após 18 dias de polinização, as espigas foram dissecadas da planta cultivada no campo e levadas ao laboratório de cultura de tecidos. Mesmo com 18 dias após a polinização, o tamanho do embrião foi de 0,9 - 1,8 mm nas condições ambientais em que estavam.

Os resultados obtidos no ensaio conduzido em Aracati mostraram que o comprimento (tamanho) e a massa fresca dos embriões variaram em função da idade de coleta após polinização, não diferindo entre os três diferentes genótipos (Tabela 2). Embriões mais jovens, coletados com 15 dias após a polinização (DAP), tiveram menor tamanho, em torno de 3 mm, ao passo que aqueles coletados com 20 e 25 DAP atingiram 5,25 e 7,75 mm, respectivamente, sendo todos diferentes estatisticamente entre eles. Esta mesma relação foi observada na massa fresca, tendo os embriões com 15 dias apresentado cerca de 2,93 mg por embrião, ao passo que aqueles coletados com 20 e 25 DAP atingiram 10,56 e 16,42 mg por embrião, respectivamente, sendo todos diferentes estatisticamente entre eles (Figura 2).

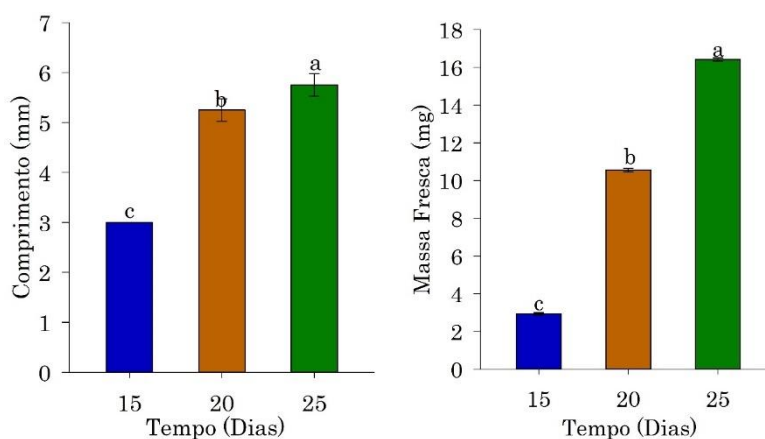


Figura 2. Parâmetros biométricos médios: Comprimento e Massa Fresca dos embriões em função do tempo (dias após polinização). Tratamentos seguidos por letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). Aracati, Syngenta, 2021.

As características de tamanho e de massa fresca dos embriões podem refletir um fator importante na classificação qualitativa destes explantes no processo de cultivo *in vitro* e *ex vitro*, seja pela reserva nutricional e sua capacidade de regeneração de plântulas vigorosas, seja pela totipotência e plasticidade celular necessária para seguir uma rota de desenvolvimento específico (GUPTA et al., 2004). As relações entre as características biométricas e os resultados no desenvolvimento dos embriões imaturos de milho cultivados podem ser exploradas em um processo comercial de produção de linhagens convertidas. Os embriões menores, coletados com idade mais jovem, apresentaram menor tamanho e menor quantidade de massa fresca e talvez necessitem de variações na composição do meio de cultivo que venham a potencializar seu rápido desenvolvimento no ambiente *in vitro* e contribuir com o vigor da planta em processos seguintes. A cultura de embriões muito jovens é muito difícil, principalmente em virtude da complexidade nutricional envolvida. Apesar do progresso considerável no campo da cultura de embriões, o resgate de embriões parece difícil quando o aborto do embrião ocorre em um estágio muito inicial de desenvolvimento (KUMARI et al., 2018). O embrião em crescimento é um sistema dinâmico que mostra mudanças nas demandas durante seu crescimento e desenvolvimento. Quanto menor o embrião, mais complexo é o meio de cultivo necessário. A literatura indica que a sacarose é o açúcar mais comumente utilizado para servir como fonte de carbono e estabilizador osmótico. Na maioria dos casos, a sacarose deu melhor resultado do que outros açúcares. No entanto, em alguns estudos comparativos (SHARMA et al., 1996), outros açúcares também deram bons resultados. Por exemplo, os embriões de *Datura stramonium* cresceram bem com 4% de sacarose, ao passo que os de *D. metaloides* cresceram bem tanto com sacarose quanto com glicose, manose ou glicerol. Em

geral, uma concentração mais alta de sacarose é usada para cultivar embriões imaturos. Conforme Sharma et al. (1996), esta concentração é mais importante no sentido de incrementar a osmolaridade do meio do que para fornecer nutrição. Embriões imaturos são conhecidos por exigir maior força osmótica do meio em comparação com os relativamente maduros.

3.2.2 Germinação *in vitro*

No que diz respeito à germinação dos embriões *in vitro*, considerando-se que houve uma piramidação com três genes simultaneamente e a presença de três agentes seletivos no meio de cultivo, espera-se a frequência de $(1/2)^3 = 12,5\%$. Os embriões coletados com 15 e 20 DAP proporcionaram taxas de germinação próximas do esperado, com médias de 11,3 e 12,5% para 15 e 20 DAP, respectivamente. Embriões coletados 25 DAP apresentaram menor média, com cerca de 8,3% dos embriões germinados no meio de cultivo contendo agentes seletivos, diferindo estatisticamente do tratamento com 20 dias (Figura 3). É possível também constatar que o tratamento com 20 DAP proporcionou maior número de plântulas ao final do processo, independentemente do genótipo (Tabela 3).

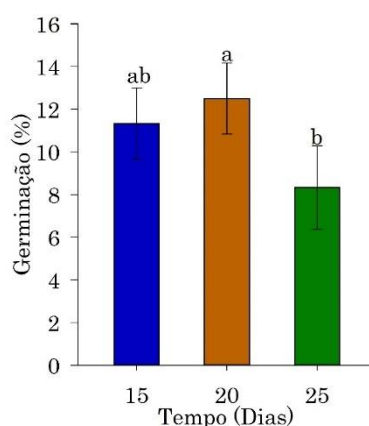


Figura 3. Germinação *in vitro* dos embriões em função do tempo (dias após polinização). Tratamentos seguidos por letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). Aracati, Syngenta, 2021.

Cabe destacar ainda que em todas as plântulas germinadas confirmou-se a presença dos genes marcadores (Tabela 3), comprovando o efeito dos agentes seletivos utilizados no meio de cultivo e a eficiência na seleção *in vitro* independente das idades ou genótipos avaliados.

Tabela 3. Número de embriões utilizados, frequências genotípicas e taxas médias de recuperação do parental e aclimatização por tratamento. Aracati, Syngenta, 2021.

Genótipo	Número de embriões	GM	AS	DAP	FE (%)	FO (%)		TM (%)		Número de plântulas
						<i>in vitro</i>	SNP*	RP	SA	
1	200	3	3	15	12,5	10,5	100	88	71	15
2	200	3	3	15	12,5	12,0	100	84	67	16

3	200	3	3	15	12,5	11,5	100	89	74	17
1	200	3	3	20	12,5	13,0	100	89	96	25
2	200	3	3	20	12,5	13,0	100	85	77	20
3	200	3	3	20	12,5	11,5	100	86	100	23
1	200	3	3	25	12,5	8,0	100	88	94	15
2	200	3	3	25	12,5	7,5	100	87	87	13
3	200	3	3	25	12,5	9,5	100	87	100	19

GM: genes marcadores; AS: agentes seletivos; DAP: dias após polinização; FE: frequência de seleção esperada; FO: frequência obtida de seleção (*in vitro*) e dos genes nas plântulas (SNP); TM: taxa média de recuperação do parental recorrente (RP) e de sobrevivência na aclimatização (SA); N° plântulas = N° embriões x *in vitro* x SA. *amostras das plântulas provenientes do cultivo *in vitro* dos embriões.

As características biométricas de tamanho e massa fresca, relacionadas ao número de dias após a polinização, podem ser indicadores do momento fisiológico adequado para obter embriões com boa qualidade e ajudar no planejamento de um laboratório de cultivo de embriões, de modo a conduzirem seus processos e planejar suas atividades considerando estas informações. Em consonância com os dados encontrados neste experimento, Oduor et al. (2006) observaram, em seu trabalho com cultivo de embriões imaturos de milho, que calos foram iniciados destes embriões, não havendo diferença significativa entre os genótipos de milho testados, mas influência da idade dos embriões na formação de calos, sendo maiores em embriões mais jovens com 17, 18, 19 e 20 DAP e menores aos 21 DAP. A influência da idade do explante no desenvolvimento *in vitro* é relatada na literatura e a causa está ligada ao estágio de desenvolvimento celular (PEN et al., 2018). De fato, a utilização de embriões com idade superior àquela ideal para cada processo tem se mostrado como limiar entre a fase ótima de regeneração e o início de um declínio na rota proposta.

Ainda neste sentido, Bermejo et al. (2016) estudaram o cultivo de embriões *in vitro* para encurtar o ciclo de reprodução em lentilhas (*Lens culinaris* Medik). Eles consideraram sementes imaturas com 15 DAP (2 mm), 18 DAP (3-4 mm), 21 DAP (5 mm) e 24 DAP (6 mm). A análise de variância revelou que os genótipos, idade do embrião (DAP) e sua interação apresentaram efeitos significativos na germinação. A porcentagem de germinação aumentou significativamente até 21 DAP e depois estabilizou para quase todos os genótipos. Este estudo ajuda na compreensão da existência de uma faixa ideal de cultivo dos embriões e as características visuais, como a biometria (tamanho dos embriões), auxiliam na identificação do momento ideal para obtenção dos melhores resultados.

Não houve a influência do genótipo ou da sua interação com a idade do embrião na germinação *in vitro*. Esta é uma informação muito importante, principalmente em processos comerciais de conversão nos quais haja incisivos custos quando se aplicam vários protocolos para diferentes genótipos, reduzindo complexidades, visto que em um processo de

melhoramento genético são utilizadas inúmeras linhagens. Porém, em nosso trabalho foram utilizados apenas três genótipos, de forma que mais estudos, com maior amplitude genotípica, se fazem necessários para melhor visibilidade da influência deste fator.

3.2.3 Aclimatização

Tanto a idade dos embriões quanto a variação genotípica influenciaram o sucesso na aclimatização das plântulas (Tabela 2, página 47). O genótipo 2 apresentou taxa média de sobrevivência de 75%, inferior aos genótipos 1 e 3, com 87 e 91%, respectivamente. Os embriões que foram cultivados 15 dias após polinização apresentaram média inferior de sobrevivência na aclimatização, com 70%, em relação aos embriões cultivados com 20 e 25 DAP, com 91 e 94% respectivamente (Figura 4).

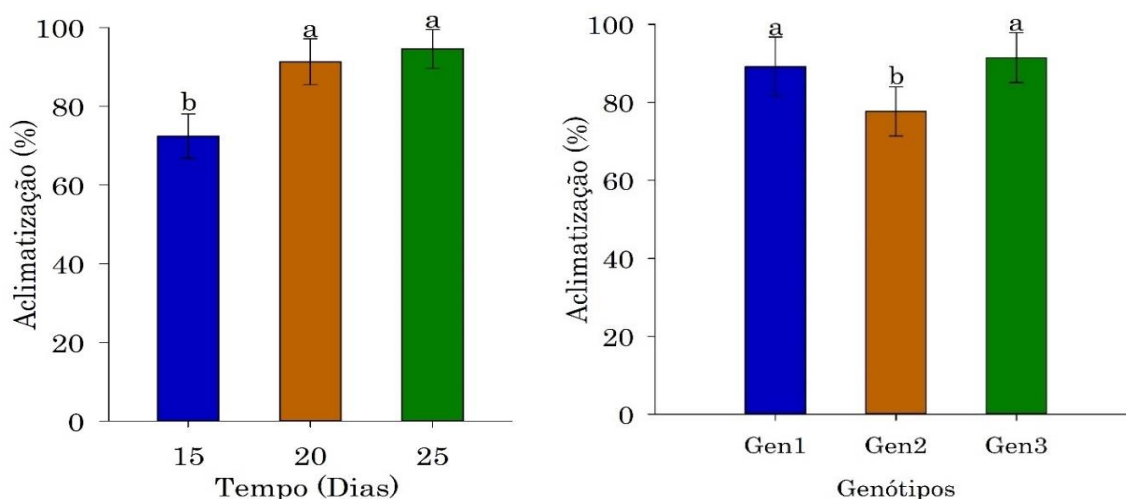


Figura 4. Médias do parâmetro Sobrevivência na Aclimatização das plântulas provenientes dos embriões em função do tempo (dias após polinização) e dos diferentes genótipos avaliados. Tratamentos seguidos por letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). Aracati, Syngenta, 2021.

As plântulas sobreviventes foram transplantadas para vasos e conduzidas em estufas até o florescimento, por volta dos 63 ± 5 dias. Não foram observadas plântulas com variações morfológicas (foram comparadas com os genótipos recorrentes semeados paralelamente) e todas as plântulas sobreviveram após transplântio para vasos. É muito importante e crítico o bom estabelecimento das plântulas durante aclimatização, pois, além de custos envolvidos, corre-se o risco de perder plântulas com altas taxas de recuperação do genitor recorrente, que são as de maior interesse, o que tem forte impacto no ganho de tempo na conversão de linhagens.

Segundo correlação de Pearson entre os parâmetros avaliados, houve interação significativa entre os fatores biométricos Comprimento e Massa Fresca dos embriões com Aclimatização (Tabela 4).

Tabela 4. Coeficientes da correlação de Pearson entre os parâmetros avaliados. Aracati, Syngenta, 2021.

Parâmetros	Germinação	Aclimatização	Massa Fresca
Sobrevivência	-0.33 ^{N.S.}		
Massa Fresca	-0.29 ^{N.S.}	0.65**	
Comprimento	-0.18 ^{N.S.}	0.65**	0.92**

Não significativo, ** significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

O baixo acúmulo de carboidratos na fase *in vitro* pode ser um dos fatores responsáveis pela alta mortalidade durante aclimatização de plântulas provenientes de cultivo *in vitro* (WALTER, 2015). Embriões coletados 15 DAP apresentaram menor tamanho e peso dos embriões, o que pode ter provocado plântulas menos vigorosas, com menor número e qualidade de radículas e, conseqüentemente, com menor reserva e preparo para superar os estresses envolvidos na aclimatização (mudança de temperatura, umidade e autotrofismo). Muitas das plântulas de cultura *in vitro* têm somente duas radículas longas e finas, e se forem danificadas durante o transplante pode ocorrer a morte das plântulas, no entanto, se a plântula obtida for vigorosa, novas raízes surgirão no lugar da danificada, não ocorrendo outros prejuízos por esta lesão de manipulação (FERREIRA et al., 1998).

Os resultados encontrados neste experimento vão ao encontro dos dados apresentados por Ombori et al. (2008), trabalhando com aclimatização e crescimento de plântulas de milho regeneradas *in vitro*, observaram diferenças entre os diferentes genótipos, variando de 98 a 60% entre os cinco genótipos avaliados em sua sobrevivência na estufa. Destas, 90% sobreviveram após transferência para campo. Bhojwani e Mukhopadhyay (1986) relataram que o sucesso da regeneração e, eventualmente, o estabelecimento final vêm de uma seleção correta do genótipo. O fato da especificidade do genótipo para regeneração foi relatado em outras espécies de plantas, incluindo ornamentais e justificadas ao nível endógeno de hormônios de cada genótipo (CARMAN 1990).

Outro importante ponto está relacionado à ausência de variantes somaclonais ou anomalias que podem ocorrer quando vegetais são submetidos ao cultivo *in vitro*. No entanto, estas variantes são mais frequentes quando passam por fase de desdiferenciação e rediferenciação, como a pré-formação de calos ou mesmo embriogênese somática direta. Em milho, estas variações são bem identificadas e descritas por vários autores, como Anami et al. (2010), que relataram anormalidades morfológicas em brotações de milho, as chamadas variações somaclonais. Eles observaram

fenótipos anormais em plântulas regenerantes durante a fase reprodutiva, incluindo a emergência tanto do pendão quanto da espiga no próprio talo do pendão, resultando em sementes do pendão. Outras variações somaclonais que ocorreram em baixa frequência incluem espigas múltiplas, folhas emergindo do mesmo nó e número reduzido de inflorescências masculinas.

3.3 GENOTIPAGEM E SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES

Quando genotipadas com os marcadores moleculares SNPs, as plântulas derivadas dos embriões cultivados neste experimento geraram média de recuperação do genoma recorrente de 86,8% (figura 5), acima da média esperada na geração RC1, que é de 75% ($100 [1 - (0,5)^{n+1}]$, $n = 1$). Não se pretendeu comparar as similaridades entre os tratamentos, visto que outros fatores, como a proximidade genética entre genitores doador e recorrente, poderiam influenciar e estas informações não foram tomadas para este experimento. Segundo critérios de seleção genotípica utilizado comercialmente, foram selecionadas as dez melhores plântulas RC1 para potencial uso no RC2, as quais apresentaram média de recuperação do genótipo recorrente de 92,6%, um avanço aproximado de 17% em comparação ao que seria um retrocruzamento convencional baseado na média esperada na geração RC1.

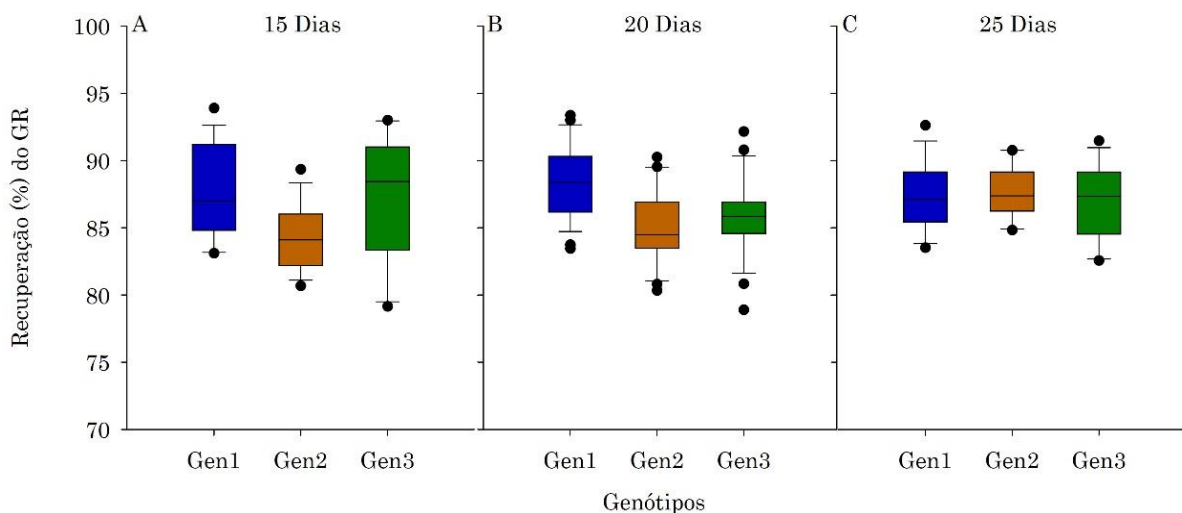


Figura 5. *Boxplot* com a porcentagem de recuperação do genoma recorrente, conforme tratamento, entre os 163 indivíduos RC1 genotipados por marcadores, com uma média de 86,8%. Os limites do *boxplot* indicam os percentis 25 e 75; a linha que divide as caixas representa a mediana; as barras de erro acima e abaixo das caixas indicam os percentis 10 e 90. Aracati, Syngenta, 2021.

Ragot et al. (1995) demonstraram experimentalmente a eficiência deste tipo de procedimento para introgressão do transgene Bt em diferentes linhagens de milho. Em programas de introgressão, para apenas um alelo, resultados mostraram que a seleção assistida por marcadores pode conduzir a um ganho de tempo de no mínimo duas gerações com alta recuperação do genitor recorrente (HOSPITAL et al., 1992; OPENSHAW et al., 1994) e que a conversão assistida pode ser finalizada após quatro gerações de retrocruzamento, mesmo com pequeno tamanho da população e limitado número de marcadores avaliados (FRISCH et al., 1999).

Uma vantagem observadas na seleção assistida por marcadores em comparação à seleção fenotípica é que, para a realização de piramidação de genes, onde se busca concentrar em um único genótipo diferentes características de interesse (como diferentes resistências a diferentes fatores ao mesmo tempo), é possível reduzir o tempo necessário para obtenção desse genótipo superior. Em processos como nos retrocruzamentos, a seleção assistida pode ser aplicada com a finalidade de reduzir a transferência de alelos indesejáveis do genitor doador, durante os ciclos subsequentes, monitorando e mantendo apenas os de interesse, juntamente com os do genitor recorrente, reduzindo o número de ciclos de retrocruzamentos. Tendo em vista a complexidade dos cruzamentos a campo quando da utilização desta metodologia, a redução do número de plantas trabalhadas torna-se uma vantagem significativa (MESQUITA et al., 2005).

Os dados moleculares obtidos no presente trabalho mostraram, no RC1, ganho de quase duas gerações de retrocruzamentos, visto que foram obtidas plântulas com mediana de 87% e, ainda que de modo prático, a média das três melhores plântulas esteve em 91%, o que resultaria em resultados muito próximos ao esperado em três ciclos, em relação ao retrocruzamento convencional. Estes resultados corroboram com os resultados encontrados por Mesquita et al. (2005), os quais obtiveram, em seu trabalho com retrocruzamento assistido por marcadores SSRs em milho, taxa de 82% no RC1, e no RC2 obteve-se recuperação de 96%, valor próximo a quatro gerações de retrocruzamentos, e ainda duas plântulas com 98,20%. Tal valor equivale a uma proporção de recuperação do genoma do parental recorrente a ser obtida no quinto ciclo de retrocruzamento, representando um ganho de três ciclos, em relação ao retrocruzamento convencional. Outras pesquisas estão dispostas na literatura que destaca estes ganhos genéticos, colaborando com o fator tempo: Openshaw et al. (1994), que obtiveram ganho de três gerações em termos de recuperação do genoma recorrente; Visscher et al. (1996) e Frisch et al. (1999), que conseguiram alto grau de recuperação do genoma recorrente com ganho de uma a duas gerações de retrocruzamento, utilizando retrocruzamento assistido por marcadores.

Aspectos da qualidade genética e fisiológica das plântulas formadas foram evidenciados, trazendo a possibilidade de ajudar na tomada de decisões para produção comercial de novos híbridos de milho que passam pela atividade de introgressão gênica por retrocruzamento. Todos os objetivos do melhoramento de plantas devem convergir numa meta principal: o ganho genético. Auxiliar os melhoristas com informações que possibilitem otimização de recursos, redução de tempo, ganho em qualidade e em escala de produção nos seus processos certamente propiciará resultados positivos para empresas e agricultores na missão de garantir a segurança alimentar no mundo.

4 CONCLUSÕES

- O uso do cultivo de embriões imaturos de milho se mostrou eficiente para reduzir o tempo entre gerações de 115 dias por produção de sementes para 75-85 dias, possibilitando quatro ciclos por ano;
- Com relação ao fator idade, os embriões coletados com 15 DAP apresentam menor tamanho e massa fresca e estão correlacionados com a menor taxa de aclimatização;
- Ainda sobre o fator idade, os embriões coletados com 25 DAP ocasionaram redução na taxa de germinação *in vitro*. Aqueles com 15 e 20 DAP proporcionaram taxas de germinação próximas do esperado;
- Com relação ao fator genótipo, apenas a aclimatização sofreu influência nas condições deste experimento. Os parâmetros comprimento, massa fresca e germinação não foram influenciados;
- O resgate de embriões com 20 DAP se mostrou como melhor alternativa, pois proporcionou maior número de plântulas ao final do processo, independentemente do genótipo;
- A utilização de marcadores moleculares possibilitou a identificação de plântulas geradas do primeiro retrocruzamento com taxas de similaridade do genitor recorrente acima de 90%.

REFERÊNCIAS

- ALISSA, A.; JONARD, R.; SERIEYS, H.; VINCOURT, P. La culture d'embryons isolés *in vitro* dans un programme d'amélioration du tournesol. **CR Acad Sci Paris**, t 303, série III, 5: 161–164, 1986.
- ANAMI, S. E.; MGUTU, A. J.; TARACHA, C. Somatic embryogenesis and plant regeneration of tropical maize genotypes. **Plant Cell Tiss Organ Cult** 102, 285–295, 2010.
- ASPIROZ, H. S.; VINCOURT, P.; SERIEYS, H.; GALLAIS, A. La culture *in vitro* des embryons immatures dans l'accélération du cycle de selection des lignées de tournesol et ses effets morphovégétatifs. **Helia**, 10: 35–38, 1988.
- BERMEJO, C.; GATTI, I.; COINTRY, E. *In vitro* embryo culture to shorten the breeding cycle in lentil (*Lens culinaris* Medik). **Plant Cell Tissue Org.**, 127: 585–590, 2016.
- BHOJWANI, S. S.; MUKHOPADHYAY, A. Some aspects of plant regeneration in tissue culture of legumes. In: GUPTA, P. K.; BAHL, J. R. (org.). **Genetics and Crop Improvement**. Rastogy and Co., Meerut, 1986. p. 377-385.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de plantas**. 6. ed. Viçosa: Editora UFV. 2013.
- CARMAN, J.G. Embryogenic cells in plant tissue culture: occurrence and behaviour. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* – **Plant** 26, 746-753. 1990.
- CARNEIRO, A. A.; GUIMARAES, C. T.; VALICENTE, F. H.; WAQUIL, J. M.; VASCONCELOS, M. J. V.; CARNEIRO, N. P.; MENDES, S. M. **Milho Bt: teoria e prática da produção de plantas transgênicas resistentes a insetos-praga**. Circular técnica, 135. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009.
- COSTA, A.F.S. da. **Influência das condições climáticas no crescimento e desenvolvimento de plantas de milho (*Zea mays* L.), avaliadas em diferentes épocas de plantio**. Viçosa, 1994. 109f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
- DUARTE, J. M. **Conversão de linhagens elites em milho de alta qualidade protéica (QPM)**. 2003. 129f. Tese (Doutorado). Lavras: UFLA, 2003.
- FERREIRA, M. E.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A.; Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (org.).

Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. p. 21-44.

FRISCH, M.; BOHN, M.; MELCHINGER, A. E. Comparison of selection strategies for marker-assisted backcrossing of a gene. **Crop Science**, Madison, v. 39, n. 5, p. 1295-1301, set./out. 1999.

GADIOLI, J. L.; DOURADO-NETO, D.; GARCÍA, A. G.; BASANTA, M. D. V. Temperatura do ar, rendimento de grãos de milho e caracterização fenológica associada à soma calórica. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 3, p. 377-383, 2000.

GUPTA, S.; KHANNA, V. K.; SINGH, R.; GARG, G. K. Identification of in vitro responsive immature embryo size for plant regeneration in Sudan grass (*Sorghum sudanenses* Piper). **Indian Journal of Biotechnology**, 3: 124–127, 2004.

HOSPITAL, F.; CHEVALET, C.; MULSANT, P. Using markers in gene introgression breeding programs. **Genetics**, Baltimore, v. 132, n. 4, p. 1199- 1210, dez. 1992.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. 2021. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/brasil>. Acesso em: 27 fev. 2021.

JAMES, R. **Global status of commercialized Biotech/GM crops**. ISAAA Brief N° 46 ISAAA Ithaca, NY, 2013.

KUMARI, P.; THANESHWARI AND RAHUL. Embryo Rescue in Horticultural Crops. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.**, v. 7, n. 6, p. 3350-3358, 2018.

LI, J.; WANG, X.; WANG, X.; WANG, Y. Embryo rescue technique and its applications for seedless breeding in grape. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 120, p. 861-880, 2015.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Valor Bruto da Produção Agropecuária (VBP)**. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/politica-agricola/valor-bruto-da-producao-agropecuaria-vbp>. Acesso em: 27 fev. 2021.

MESQUITA, A. G. G., GUIMARÃES, C. T., PARENTONI, S. N., PAIVA, E. Recuperação do genitor recorrente em milho utilizando retrocruzamento assistido por marcadores microssatélites. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 4, n. 3, p. 275-285, 2005.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for the rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.** 15: 73-497, 1962.

ODUOR, R. O.; NJAGI, E. N. M.; NDUNG'U, S.; MACHUKA, J.S. *In vitro* Regeneration of Dryland Kenyan Maize Genotypes Through Somatic Embryogenesis. **International Journal of Botany**, 2: 146-151, 2006.

OMBORI, O.; GITONGA, N. M.; MACHUKA, J. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of tropical maize (*Zea Mays* L.) inbred lines. **Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 224-232, 2008.

OPENSHAW, S. J.; JARBOE, S. G.; BEAVIS, W. D. Marker assisted selection in backcross breeding. In: LOWER, R. (org.). **Joint Plant Breeding Symposium on Analysis of Molecular Marker Data**. Corvallis, Oregon State University, 1994. p. 41-43.

PEN, S.; NATH, U. K.; SONG, S.; GOSWAMI, G.; LEE, J.-H.; JUNG, H.-J.; KIM, H.-T.; PARK, J.-I.; NOU, I.-S. Developmental Stage and Shape of Embryo Determine the Efficacy of Embryo Rescue in Introgressing Orange/Yellow Color and Anthocyanin Genes of Brassica Species. **Plants**, 7, 99, 2018.

PERVIN, M. M.; AZAD, A. K.; RAHMAN, A.; SHOYON, S. R.; ALI, K. Regeneration of Plant through Embryo Culture from Promising Maize (*Zea mays* L.) Inbred Lines. **Acta Scientific Agriculture**, v. 3, n. 11, p. 55-61, 2019.

PLOTNIKOV, V. A. Use of method of culturing young embryos for accelerated development of sunflower cytoplasmic male sterility analogues. **Tsitologiya i Genetika**, v. 17, n. 6, p. 40-43, 1983.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**. Vienna, Austria, 2020. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 27 fev. 2021.

RAGOT, M.; BIASIOLLI, M.; DELBUT, M. F.; DELL'ORCO, A.; MALGARINI, L.; THEVENIN, P.; VERNON, J.; VIVANT, J.; ZIMMERMANN, R.; GAY, G. Marker-assisted backcrossing: a practical example. In: **techniques et utilisations des marqueurs moleculaires**, 1994, Montpellier. Proceeding Paris: INRA, 1995. p. 45-56.

RANGAN, T. S. Culture of ovules, In: VASIL, I. K. (org.). **Cell culture and somatic cell genetics of plants**. vol. 1. Laboratory procedures and their applications. Academic, New York. 1984. p. 227–231.

RAZI M.; MARANDI, R. J.; BANEH, H. D.; HOSSEINI, B.; DARVISHZADEH, R. Effect of paternal genotypes sprays with BA and IAA concentration on embryo rescue of F₁ progenies from ‘Askari’ (*Vitis vinifera* L.) cultivar. **J. Agric. Sci. Technol.**, 15: p. 1023–1032, 2013.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P.; SOUZA, E. A.; CONÇALVES, F. M. A.; SOUZA, J. C. **Genética na agropecuária**. Lavras, Editora UFLA, 2012.

SHARMA, D. R.; KAUR, R.; KUMAR, K. Embryo rescue in plants – a review. **Euphytica**, v. 89, p. 325-337, 1996.

SILVA NETO, J. O.; VIEIRA, L. F.; SIQUEIRA, L. E. L.; OLIVEIRA, V. P. V. Aplicação do índice de vegetação por diferença normalizada (NDVI) para análise da degradação ambiental nos municípios de Fortim, Aracati e Icapuí – Ceará, Brasil. **Revista GeoUECE (Online)**, v. 08, n. 14, p. 273-283, jan./jun. 2019.

VIDHANAARACHCHI, V. R. M.; SURANJITH, W. C.; GUNATHILAKE, T. R. Effect of genotype, embryo maturity and culture medium on *in vitro* embryo germination of Sri Lankan coconut (*Cocos nucifera* L.) varieties. **Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka**, v. 44, n. 3, p. 273–278, 2016.

VISSCHER, P. M. Proportion of the variation in genetic composition in backcrossing programs explained by genetic marker. **The Journal of Heredity: Brief Communications**, Cary, v. 87, n. 2, p. 136-138, mar./abr. 1996.

WALTER, R. **Resgate de embriões zigóticos de espécies do gênero capsicum visando à sua utilização em programas de melhoramento genético**. 2015. 71f. Tese (Doutorado). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2015.

CAPÍTULO II

INFLUÊNCIA DE AGENTES SELETIVOS NO CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES IMATUROS DE MILHO VISANDO A ACELERAR CICLOS DE RETROCRUZAMENTOS

RESUMO

Em geral, um gene seletivo marcador é introduzido no genoma da planta junto com os genes de interesse e, em alguns casos, o gene marcador já é o gene de interesse que expressará uma característica agrônômica, como resistência a herbicidas. Com base nisso, herbicidas comerciais têm sido utilizados para selecionar materiais vegetais contendo genes marcadores. Além disso, existem métodos alternativos usando substâncias normalmente não são metabolizadas pelas plantas, como o carboidrato manose. O uso de agentes seletivos exige estudos preliminares para determinar sua melhor concentração, pois baixas concentrações podem gerar escapes, ao passo que altas concentrações podem ser tóxicas. O objetivo do presente estudo foi conhecer a eficiência de diferentes agentes seletivos e concentrações no meio de cultivo para avaliação da germinação e qualidade das plântulas produzidas. Para tanto, foram realizados o retrocruzamento e obtenção do RC1 em um genótipo de milho. Das espigas formadas neste retrocruzamento, foram coletados embriões imaturos e cultivados *in vitro* sob ação de agentes seletivos. Nas plântulas formadas, foram realizadas análises moleculares com marcadores assistidos para verificar a eficiência deles, assim como sua similaridade com o parental recorrente. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com oito tratamentos formados pelos agentes seletivos manose, glufosinato e glifosato, em diferentes concentrações, com sete repetições por tratamento e 25 embriões por repetição. Foram avaliadas a taxa de germinação de embriões *in vitro*, comprimento das plântulas formadas e sobrevivência na aclimatização. Em adição, dados moleculares de similaridade com o parental recorrente e da presença dos genes de interesse foram obtidos. A análise de variância mostrou que o tipo e a concentração dos agentes seletivos no meio de cultivo influenciaram a germinação, o comprimento das plântulas *in vitro* e sua sobrevivência na aclimatização. Todas as doses dos agentes seletivos testados neste experimento proporcionaram eficiência esperada na seleção *in vitro*. A dose mais alta de manose, assim como a interação entre os agentes, causou redução mais acentuada no comprimento das plântulas. A interação dos três agentes seletivos também causou menor taxa de sobrevivência na aclimatização. O uso de marcadores moleculares possibilitou identificar as melhores plântulas em relação à similaridade com o genitor recorrente.

Palavras-chave: Glufosinato. Manose. Glifosato. Resgate de embriões. Agentes seletivos.

ABSTRACT

In general, a selective marker gene is introduced into the plant genome along with the genes of interest and, in some cases, the marker gene is already the gene of interest that will express an agronomic trait, such as herbicide resistance. Based on this, commercial herbicides have been used to select plant materials containing marker genes. There are also alternative methods that use substances not normally metabolized by plants, such as the carbohydrate mannose. The use of selective agents requires preliminary studies to determine their best concentration, as low concentrations can generate leakage, while high concentrations can be toxic. The objective of the present study was to know the efficiency of different selective agents and concentrations in the culture medium to evaluate the germination and quality of the produced seedlings. For this purpose, backcrossing and obtaining the RC1 in a corn genotype was performed. From the ears formed in this backcrossing, immature embryos were collected and cultivated *in vitro* under the action of selective agents. In the formed seedlings, molecular analyzes with assisted markers were carried out to verify their efficiency, as well as their similarity with the recurrent parent. A completely randomized design was used with 8 treatments formed by the selective agents mannose, glufosinate and glyphosate, in different concentrations, with seven replicates per treatment and 25 embryos per repetition. *In vitro* embryo germination rate, length of seedlings formed and survival in acclimatization were evaluated. In addition, molecular data of similarity with the recurrent parent and the presence of genes of interest were obtained. The analysis of variance showed that the type and concentration of selective agents in the culture medium influenced germination, *in vitro* seedling length and their survival during acclimatization. All doses of selective agents tested in this experiment provided expected efficiency in *in vitro* selection. The highest dose of mannose, as well as the interaction between the agents, caused a greater reduction in seedling length. The interaction of the three selective agents also caused a lower survival rate in acclimatization. The use of molecular markers made it possible to identify the best seedlings in relation to similarity with the recurrent parent.

Keywords: Glufosinate. Mannose. Glyphosate. Embryo rescue. Selective agents.

1 INTRODUÇÃO

A adoção do milho transgênico foi rápida desde o começo da difusão da biotecnologia, no final da década de 2000. Em apenas dez temporadas de liberação comercial, o crescimento ultrapassou o patamar de 90% da área total de milho plantada no país. Os híbridos de milho com as tecnologias do controle das principais lagartas que atacam a cultura possuem também tolerância a herbicidas, como o ingrediente ativo glufosinato de amônio, glifosato, dentre outros (CARVALHO et al., 2019).

Alguns destes eventos são o Bt11 da bactéria *Bacillus thuringiensis*, obtendo como produto a delta-endotoxina Cry1Ab, proteína que confere resistência a insetos lepidópteros. O evento transgênico GA21 produzido pela inserção estável de um gene que expressa uma proteína modificada mEPSPS do milho, que é inibido pelo glifosato (LEBRUN et al., 1997) e o evento MIR162, obtendo como produto a proteína inseticida variante vip3Aa, que tem a função de conferir resistência a danos alimentares causados por insetos lepidópteros, danificando seletivamente seu intestino médio (ISAAA, 2021). Além dos eventos transgênicos, faz parte do pacote o uso de genes marcadores em um processo de transformação que visa a conferir vantagem seletiva às células transformadas, permitindo que cresçam mais rápido e melhor, além de matar as células não transformadas (BRASILEIRO; DUSI, 1999).

Atualmente os genes marcadores selecionáveis (GMS) mais utilizados para a produção de milho transgênico são aqueles que também conferem tolerância a herbicidas, como o glufosinato de amônio e o glifosato. Por sua vez, a manose provoca inibição da fosfoglicose isomerase e da via metabólica da glicólise, causando inibição do crescimento em plantas comuns, ao passo que plantas transgênicas que produzem fosfomanose isomerase conseguem utilizar a manose como fonte de carbono (REED et al., 2001). O uso de agentes seletivos exige estudos preliminares para determinar a melhor concentração. O aumento no número de escapes quando a concentração é reduzida foi relatada para milho (NEGROTTA et al. 2000) e outras culturas (PEREIRA et al., 2016), reduzindo a eficiência de seleção. Por outro lado, concentrações muito elevadas podem ocasionar fitotoxicidade nos tecidos (MANCINI et al., 2014).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo conhecer o efeito de diferentes agentes seletivos e doses para avaliação de eficiência seletiva e qualidade das plântulas produzidas via resgate de embriões imaturos de milho.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 LOCAL DE CULTIVO E CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO

A pesquisa foi realizada na Estação de Pesquisa da Syngenta, unidade em Aracati, Ceará, no período de Maio a Setembro de 2020. O município de Aracati-CE está localizado na região semiárida do Nordeste brasileiro, tendo as coordenadas geográficas 4° 51' de latitude sul, 37°28' de longitude W. Gr., e 30 m de altitude.

O clima da região, na classificação de Köppen, encontra-se numa transição entre o clima semiárido - Bsw'h' e o clima quente úmido do litoral - Aw' (SILVA NETO et al., 2019). Com precipitação pluviométrica bastante irregular, e com total acumulado de 344 mm durante período do experimento; temperatura do ar média de 26°C com máximas em torno de 39°C e mínimas de 16°C; umidade relativa do ar média de 72% no período da experimentação, com máximas em torno de 98% e mínimas de 21%, conforme dados da estação meteorológica existente na estação de pesquisa.

2.2 MATERIAL VEGETAL E OBTENÇÃO DAS POPULAÇÕES

Sementes de uma linhagem pura de milho foram obtidas do programa de melhoramento genético da Syngenta. As sementes foram semeadas em campo com espaçamento de 20 x 80 cm (entre plantas e linhas, respectivamente) para promover o cruzamento com um genitor doador. O doador, semeado nas mesmas condições da linhagem, foi um material homozigoto conhecido, composto por um triplo stack formado por três eventos independentes Bt11, GA21 e MIR162, que lhe asseguram características de interesse para serem introgrididas na linhagem, cada evento contendo seu respectivo gene marcador seletivo (Tabela 1, página 17).

As sementes da geração F₁ colhidas deste primeiro cruzamento, descendentes do genitor doador (GD) com o genitor recorrente (GR), foram semeadas na sequência para obtenção de plantas para utilização no cruzamento com o GR, produzindo espigas de geração RC1 (retrocruzamento), usadas como fonte de explantes para coleta dos embriões imaturos utilizados no experimento. Os genótipos recorrente e doador foram cultivados em campo, nas condições ambientais acima citadas. Para evitar contaminação de pólen, as primeiras espigas que aparecerem nas plantas de milho foram cobertas com sacos de papel antes da emergência dos estigmas e posteriormente foram cruzadas manualmente quando o comprimento do estigma estava ideal para a fixação do pólen no estigma e obtenção de embriões imaturos.

2.3 CULTIVO *IN VITRO*

Espigas RC1 de milho foram coletadas com 20 dias após a polinização, realizada manualmente e induzida entre a geração F₁ e o seu genitor recorrente. Estas espigas RC1 tiveram suas palhas retiradas e iniciou-se o procedimento de desinfestação, inicialmente com detergente líquido comercial e enxágue em água corrente. Em ambiente asséptico, as espigas foram imersas em álcool 70% por cinco minutos, com posterior retirada do álcool 70% e imersão por 30 minutos em 500 mL de solução de NaClO a 2,5% com duas gotas de Tween 20 e na sequência descarte da solução de NaClO; por fim, as espigas foram enxaguadas com água desionizada e autoclavadas por três vezes nos tempos de 3, 5 e 10 minutos, para retirar restos dos agentes desinfestantes.

Depois, foi realizada a excisão dos embriões em câmara de fluxo laminar. A extração dos embriões imaturos foi feita por meio de uma incisão transversal na porção terminal das sementes, com auxílio de pinças e bisturis, sendo as coroas das sementes (1-2 mm) removidas com uma lâmina de bisturi estéril e os embriões imaturos foram excisados pela inserção de uma espátula entre o endosperma e o pericarpo, liberando o endosperma da semente e expondo o embrião. Houve a retirada com ajuda de bisturi para forçar a expulsão do embrião através do corte; os embriões foram isolados e colocados em frascos contendo meio de cultura. O meio de cultura base foi composto por sais minerais e vitaminas de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, solidificado com 3 g.L⁻¹ de Phytigel Caisson®, com pH ajustado para 5,8± 0,1 e autoclavado por 15 minutos a 121°C e 1,1 atm de pressão. Após inoculação dos embriões, estes foram mantidos no escuro por dois dias e posteriormente foram expostos à luz por mais 5 dias. Os explantes foram mantidos em sala de cultivo com temperatura de 25± 2°C, sob fotoperíodo de 16:8 horas luz:escuro e irradiância de 50 µmol.m⁻².s⁻¹ provida por lâmpadas de LED tipo luz do dia.

O experimento com cultivo de embriões imaturos foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com sete repetições por tratamento, cada uma sendo constituída por 25 embriões em cada frasco de cultivo com diâmetro de 70 mm e altura de 100 mm contendo 30 mL de meio de cultura. Os tratamentos variaram de acordo com a composição no meio de cultivo dos agentes seletivos Glufosinato (0; 2,5; 5 mg.L⁻¹), Glifosato (0; 70; 140 mg.L⁻¹) e Manose (0; 25; 50 g.L⁻¹) para os genes/marcadores de interesse aos quais os embriões foram submetidos, formando oito tratamentos conforme Tabela 5.

Tabela 5. Tratamentos em função das composições dos meios utilizados no cultivo de embriões de milho: composições dos agentes seletivos Glufosinato (GLU), Glifosato (GLI) e Manose (MAN). Aracati, Syngenta, 2021.

Tratamento	GLU (mg.L ⁻¹)	GLI (mg.L ⁻¹)	MAN (g.L ⁻¹)
Test 0	0	0	0
GLU50	2,5	0	0
GLU100	5	0	0
GLI50	0	70	0
GLI100	0	140	0
MAN50	0	0	25
MAN100	0	0	50
Test 100	5	140	50

Após sete dias de cultivo *in vitro*, as plântulas formadas foram avaliadas, sendo verificadas as taxas de germinação (sobrevivência), além de análises biométricas e genotípicas, tendo sido considerados germinados apenas os embriões que mostraram desenvolvimento de radícula e parte aérea. As plântulas foram medidas da base até a ponta da folha mais expandida com auxílio de régua graduada. A taxa de

germinação (TG) foi obtida utilizando-se a expressão abaixo:

$$TG = \frac{\text{número de embriões germinados}}{\text{número de embriões inoculados } in vitro}$$

2.4 ACLIMATIZAÇÃO E CONDUÇÃO DAS PLÂNTULAS

Todas as plântulas sobreviventes do cultivo *in vitro* seguiram para aclimatização em bandejas de semeio com células de 100 mL contendo substrato Carolina Soil® e foram acondicionadas em estufas com temperatura e umidade médias em torno de 27°C e 85%, respectivamente. Passados 14 dias na estufa, foi avaliada a taxa de sobrevivência das plântulas na aclimatização (SA) utilizando-se a expressão abaixo:

$$TG = \frac{\text{número de embriões germinados}}{\text{número de embriões inoculados } in vitro}$$

As plântulas foram então transferidas individualmente para vasos com capacidade de 11 litros contendo substrato Carolina Soil®, nos quais permaneceram em estufas com temperatura e umidade em torno 29°C 80%, respectivamente. As irrigações foram feitas de modo a manter o substrato sempre úmido, com irrigações diárias em torno de 3 litros por vaso, a depender da temperatura diária.

2.5 ANÁLISES DE GENOTIPAGEM E SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES

Amostras foliares dos tratamentos com agentes seletivos no meio de cultivo foram coletadas de todas as plântulas individualmente e colocadas em placas, contendo poços de coleta, mantidas em isopor com gelo e em seguida foi realizada a liofilização *overnight* para assegurar melhor maceração e qualidade das amostras. As placas com amostras foliares das plântulas foram enviadas ao laboratório de Genotipagem da Syngenta, em Uberlândia MG, para realização das análises. A extração do DNA foi realizada conforme metodologia da Syngenta. A liofilização *overnight* foi refeita, sucedida pelo preparo e processamento das amostras, onde são adicionadas esferas metálicas dentro de cada poço das placas contendo amostras para realização da maceração, adição dos tampões de extração, agitação robusta, centrifugação, transferência, centrifugação, descarte de sobrenadante, adição de etanol, centrifugação, descarte de sobrenadante, secagem do DNA (1 hora), suspensão do DNA, agitação (1 hora) e banho maria (20 min).

Após essas etapas, as placas seguiram para diluir o DNA na proporção de 1:3, com seguinte adição dos controles, que, conforme informação do sistema, separa e dilui os marcadores moleculares SNP, do inglês *single nucleotide polymorphism*. Por fim, as amostras seguem para aliquotagem em *arrays* nos equipamentos da plataforma nexar, onde se distribui o DNA e os reagentes da PCR (marcadores) e sela-se a fita dos *arrays*. Após este procedimento, os *arrays* são centrifugados e levados a um termociclador de reação em cadeia da polimerase (PCR) para ciclos de desnaturação 96°C, anelamento dos *primers* 55°C e extensão dos *primers* a 72°C. Os *arrays* são secos e centrifugados, e a sua leitura acontece em equipamento nexar compilando todas as informações para análise de dados. Os resultados foram analisados em relação às expectativas genéticas com 300 marcadores SNPs para cada amostra. MAIC (Marker Assisted Inbred Conversion) é uma análise utilizada em qualquer conversão de uma linhagem que envolva o retrocruzamento assistido por marcadores para recuperar com probabilidade alta o genótipo original do parental recorrente contendo o transgene ou evento específico do parental doador.

2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para testar o efeito significativo dos diferentes agentes seletivos e suas concentrações no cultivo *in vitro* de embriões imaturos de milho, os dados obtidos foram submetidos aos testes de normalidade de Shapiro-Wilk e de homogeneidade de variâncias paramétricos de Bartlett. Posteriormente, foi aplicada a análise de variância, e sempre que se constatou a significância estatística pelo teste F a 5% de probabilidade as médias foram comparadas pelo teste Tukey (p

$\leq 0,05$). Também foram estimados os coeficientes de Correlação de Pearson. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote ExpDes.pt do *software* R-Studio version 4.0.2 (R CORE TEAM, 2020).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 INFLUÊNCIA DOS AGENTES SELETIVOS

Os resultados obtidos nos permitem visualizar claramente a influência exercida pelos diferentes meios de cultivo com suas variações de agentes seletivos e suas concentrações. Estes diferentes tratamentos influenciaram com elevada significância todos os parâmetros avaliados no experimento: germinação, comprimento das plântulas e sobrevivência na aclimatização (Tabela 6).

Tabela 6. Resumo da análise de variância para os parâmetros avaliados: Germinação de embriões *in vitro*, Comprimento das plântulas formadas e Sobrevivência na Aclimatização. Aracati, Syngenta, 2021.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Germinação	Comprimento	Aclimatização
		Quadrado Médio		
Tratamento	7	243,59**	28,16**	0,13**
Erro	48	5,78	0,009	0,002
C.V. (%)		19,63	1,36	5,74

C.V. Coeficiente de variação; ** significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

3.1.1 Germinação *in vitro*

Em todos os tratamentos testados neste trabalho, as seleções de embriões obtidas foram similares às frequências esperadas conforme fórmula de frequência esperada de $(1/2)^n$, proposta por Fehr (1991), independentemente do agente seletivo e sua concentração. A germinação dos embriões sofreu influência dos tratamentos utilizados neste experimento (Tabela 6), apresentando diferenças estatísticas dentro do esperado: o tratamento sem agentes seletivos obteve 98,3% dos embriões germinados, aqueles que continham no meio de cultivo apenas um agente seletivo, com 50 ou 100% da concentração utilizada, apresentaram valores próximos a 50% dos embriões germinados, sem que o grupo diferisse estatisticamente entre si. Por sua vez, o tratamento contendo os três agentes seletivos apresentou média de 11,4% (Figura 6).

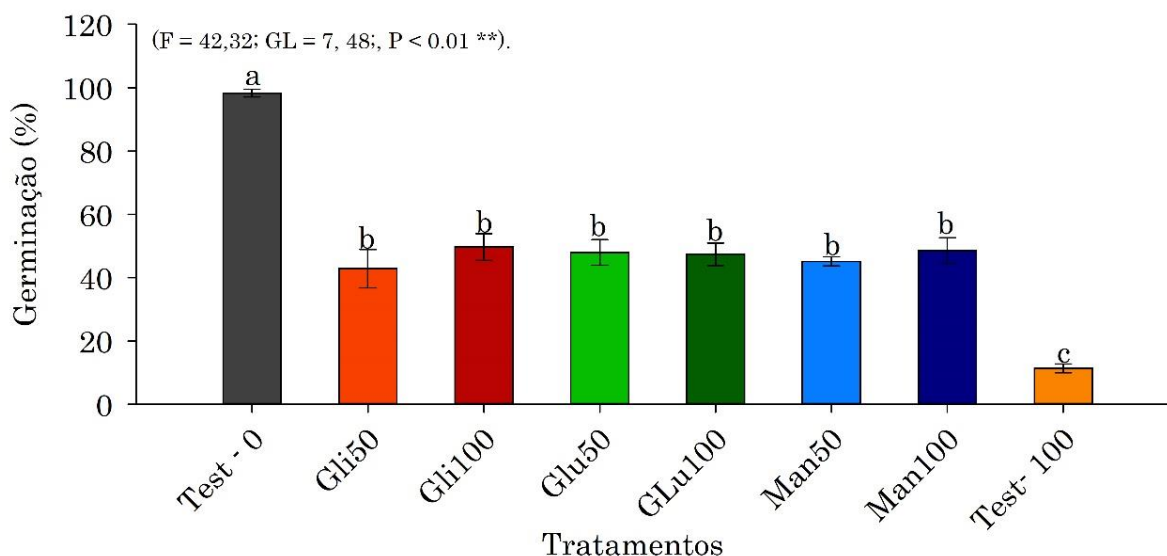


Figura 6. Médias das germinações dos embriões em função dos tratamentos. Tratamentos seguidos por letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). Aracati, Syngenta, 2021.

As análises feitas por meio dos marcadores moleculares comprovaram a eficiência da seleção *in vitro* quando na presença dos agentes seletivos; mesmo com doses menores dos agentes seletivos, todas as plântulas sobreviventes continham os genes selecionados *in vitro* (Tabela 7).

Tabela 7. Número de embriões cultivados, frequências de germinação e genotípicas por tratamento. Aracati, Syngenta, 2021.

tratamento	Número de embriões	GLU (mg.L ⁻¹)	GLI (mg.L ⁻¹)	MAN (g.L ⁻¹)	Germinação <i>in vitro</i>		
					FE (%)	FO (%)	SNP*
Test 0	175	0	0	0	100	98	NA
GLU50	175	2,5	0	0	50	48	100
GLU100	175	5	0	0	50	47	100
GLI50	175	0	70	0	50	43	100
GLI100	175	0	140	0	50	50	100
MAN50	175	0	0	25	50	45	100
MAN100	175	0	0	50	50	49	100
Test 100	175	5	140	50	12,5	11	100

GLU: glufosinato; GLI: glifosato; MAN: manose; FE: frequência esperada; FO: frequência obtida; SNP: marcadores moleculares (do inglês Single Nucleotide Polimorphism). *amostras das plântulas provenientes do cultivo *in vitro* dos embriões. NA: não aplicada análise.

Estas informações têm importância significativa em processos produtivos. Primeiramente é possível observar a quase completa germinação dos embriões cultivados em meios ausentes de agentes seletivos, evidenciando a dependência do uso destes elementos como componentes essenciais no processo de seleção *in vitro* de embriões com os genes

introgredidos. A segunda observação relacionada à taxa de seleção obtida com embriões submetidos aos três agentes seletivos na concentração integral, considerando-se que houve uma piramidação com três genes simultaneamente por retrocruzamentos, evidenciando uma seleção eficiente de indivíduos muito próxima da frequência estimada matematicamente de $(1/2)^3 = 12,5\%$. A terceira observação diz respeito às doses de 50% dos agentes seletivos, as quais mostraram a mesma eficiência de seleção das doses: 100%.

Quando utilizamos a fórmula da frequência esperada, considerando apenas um dos genes, para os tratamentos contendo apenas um agente seletivo, temos a expectativa de que $(1/2)^1 = 50\%$ dos indivíduos germinem e sobrevivam ao tratamento com herbicidas. Os valores encontrados tanto para os tratamentos com 100% da dose testada quanto para 50% da dose apresentaram resultados muito próximos da expectativa. Isto nos indica a possibilidade de redução da dose aplicada para seleção de embriões e consequente redução dos custos de produção e das quantidades de químicos de risco a serem manuseados, assim como de descartes de produtos químicos perigosos em um laboratório de larga escala de cultivo de embriões. Como mencionado acima, mesmo reduzindo as concentrações dos agentes seletivos, não houve escapes e todas as plântulas analisadas com os marcadores moleculares constataram a presença dos genes selecionados (Tabela 7). Isto oferece a segurança para o processo e permite indicar a redução no uso destes químicos.

O herbicida Finale® (Bayer CropScience SG), que contém em sua formulação comercial 20% de PPT (fosfinotricina equivalente ao glufosinato), foi utilizada por Pereira et al. (2016) a 0, 5, 10, 20 e 40 mg.L⁻¹ do princípio ativo em seu experimento. Nos primeiros 30 dias no meio seletivo, houve uma cessação do crescimento ativo e um leve escurecimento da superfície do calo em todas as concentrações testadas. No entanto, a concentração mais baixa do herbicida permitiu algumas fugas. Estas fugas devem ser evitadas incrementando a dose do agente seletivo como proposto por Mancini et al. (2014) em *Paspalum notatum*, tendo a concentração de 1,0 mg.L⁻¹ aumentado a recuperação das plântulas transgênicas e minimizado a quantidade de escapes (aproximadamente 10%). Com concentrações mais altas de PPT, a taxa de crescimento foi reduzida ao final do período experimental. Os dois casos mencionados acima evidenciam a necessidade de ajustes dentro de um protocolo para identificar a dose ideal, que ela esteja em uma faixa suficiente para evitar danos de toxicidade aos materiais vegetais, porém que assegurem a eficiente seleção das plântulas resultantes do cultivo *in vitro* com meios seletivos.

3.1.2 Comprimento das plântulas

Em relação ao desenvolvimento das plântulas regeneradas dos embriões cultivados *in vitro*, foi possível verificar influência dos agentes seletivos e suas diferentes concentrações na biometria das plântulas e na taxa de sobrevivência durante aclimatização (Tabela 6, página 69). Observa-se na figura 7 que o agente seletivo Glifosato no meio de cultivo não apresentou diferença significativa comparando com o controle (Teste 0), ao passo que a presença do Glufosinato no meio de cultivo promoveu redução da altura das plântulas formadas, independentemente da concentração utilizada (Figura 7). A Manose promoveu efeitos significativos em ambas as concentrações, mais acentuados na sua concentração mais elevada (50 g.L⁻¹) (Figura 7). O principal efeito observado se deu com a utilização conjunta dos três agentes seletivos no meio de cultivo, ocasionando maior redução da altura das plântulas, quando comparadas à média obtida das plântulas originadas de embriões cultivados em meio sem a presença de agentes seletivos (Teste 0) (Figura 7). Da mesma forma, estas correlações se repetiram na influência sobre a taxa de sobrevivência na aclimatização das plântulas, tendo as plântulas com menores alturas apresentado as menores taxas de sucesso na aclimatização, possivelmente em virtude dos menores vigor e reserva nutricional para tolerar a mudança do ambiente *in vitro* para o ambiente *ex vitro*.

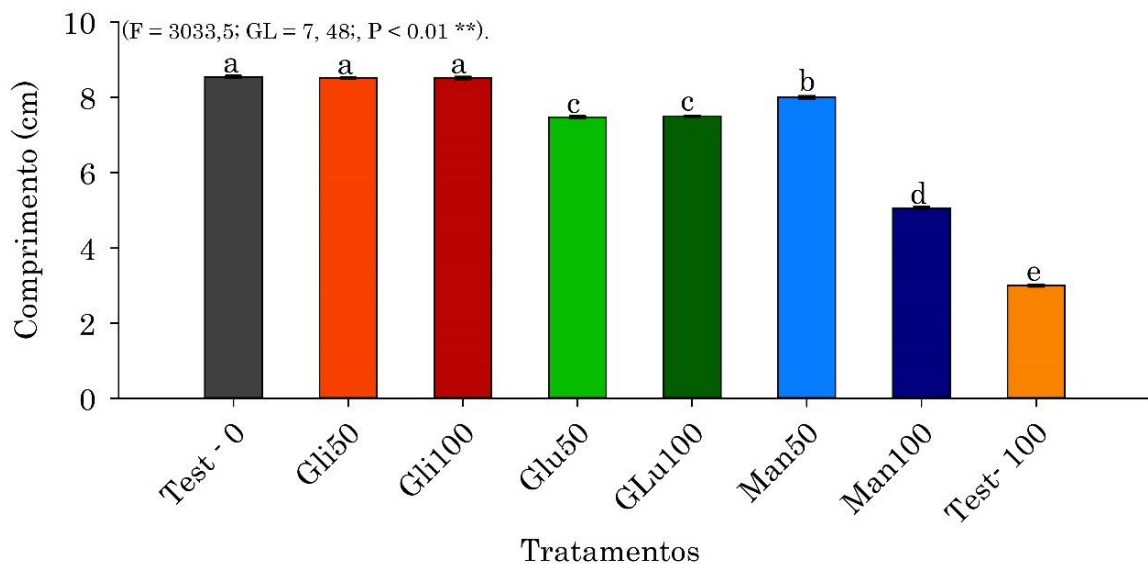


Figura 7. Médias dos comprimentos (tamanhos) das plântulas em função dos tratamentos submetidos aos embriões *in vitro*. Tratamentos seguidos por letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). Aracati, Syngenta, 2021.

O efeito na redução do tamanho das plântulas (Figura 8) proporcionado pelo glufosinato e pela manose em materiais vegetais cultivados *in vitro* é citado por alguns autores, e os resultados obtidos com os embriões de milho neste experimento vão ao encontro destes resultados, como apresentado por Pereira et al. (2016), que, trabalhando com fosfinotricina (glufosinato) em seu experimento para identificar a concentração ideal de agentes seletivos com calos de *Urochloa brizantha*, observaram que nos primeiros 30 dias no meio seletivo houve cessação do crescimento ativo e leve escurecimento da superfície do calo em todas as concentrações testadas. Eles constataram também que calos cultivados em meio contendo apenas manose (30 g.L⁻¹) cresceram muito mal desde o início do procedimento de seleção. Uma redução de peso foi observada depois disso, provavelmente devido à perda de água e encolhimento das células. O efeito inibidor da manose foi aliviado pela adição de sacarose ao meio. O efeito tóxico da manose para as células vegetais aumentou com a diminuição da concentração de sacarose no meio, indicando que há uma interação entre esses carboidratos (JOERSBO et al., 1998).

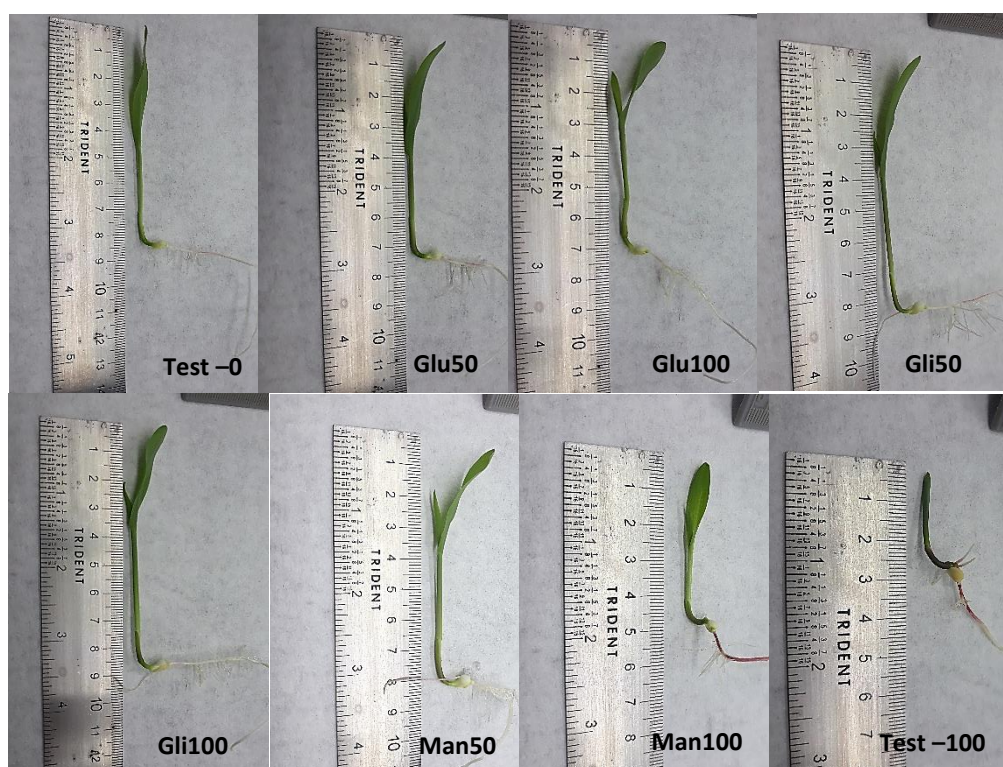


Figura 8. Plântulas obtidas de embriões cultivados *in vitro* em função dos tratamentos submetidos. Aracati, Syngenta, 2021.

Do mesmo modo, Paiva Neto et al. (2003) relataram que explantes de *Bixa orellana* (urucum) que permaneceram por longos períodos em meio MS suplementado com manose como única fonte de carboidrato cresceram pálidos, perdendo a coloração verde inicial. Eles

permaneceram aparentemente vivos porque não ocorreu necrose ou escurecimento dos explantes, o que foi confirmado com a viabilidade do explante após os seguimentos de hipocótilo serem transferidos para meio de cultura suplementados com sacarose, após uma permanência de 90 dias no meio original suplementado apenas com manose. As brotações regeneradas em manose tiveram aparência amarelada e também exibiram baixas taxas de alongamento do broto e expansão foliar quando comparados com aqueles diferenciados em meio com suplementação de sacarose. A sacarose foi hábil para conter os efeitos inibitórios da manose, mesmo em menores concentrações evitando que os explantes crescessem pálidos. No experimento conduzido com embriões de milho, não houve adição de sacarose ao meio de cultivo e este pode ser um ponto a ser explorado em trabalhos posteriores, mas fica evidente o efeito inibitório causado pela manose, mesmo em indivíduos contendo genes promotores da tolerância ao uso da manose.

3.1.3 *Sobrevivência na aclimatização*

Com relação à taxa de aclimatização de plântulas, foi possível constatar a influência significativa dos tratamentos nestes resultados (Tabela 6, página 69). Da mesma forma que altas taxas de germinação são importantes, a capacidade de sobrevivência das plântulas é igualmente crítica (LEWIS et al., 2019). O tipo de agente seletivo e a concentração influenciaram o sucesso na aclimatização das plântulas. O maior impacto negativo foi observado na interação dos três agentes seletivos, com 55% de taxa de sobrevivência. Quando não houve a presença de agentes seletivos no meio de cultivo, a taxa de sobrevivência das mudas na aclimatização foi de 93%. Os resultados de aclimatização acima mencionados fazem conexão com os resultados obtidos em relação ao comprimento das plântulas. Aqueles tratamentos que ocasionaram reduções no comprimento das plântulas, por efeitos dos agentes seletivos ou concentrações dos mesmos no meio de cultivo, também apresentaram reduções nas taxas de sobrevivência de plântulas durante a aclimatização, não por um efeito em separado, mas por consequência do menor vigor, de menor tamanho causado por um efeito dos agentes seletivos.

O Glufosinato apresentou menores taxas médias de sobrevivência com 50% da concentração em comparação aos demais tratamentos com 50% da dose do agente seletivo, indicando ser o agente mais impactante com a menor dose aplicada. Não houve diferença estatística entre as diferentes doses para o Glifosato e a Manose, no entanto nas maiores concentrações houve redução da taxa de sobrevivência das plântulas (Figura 9).

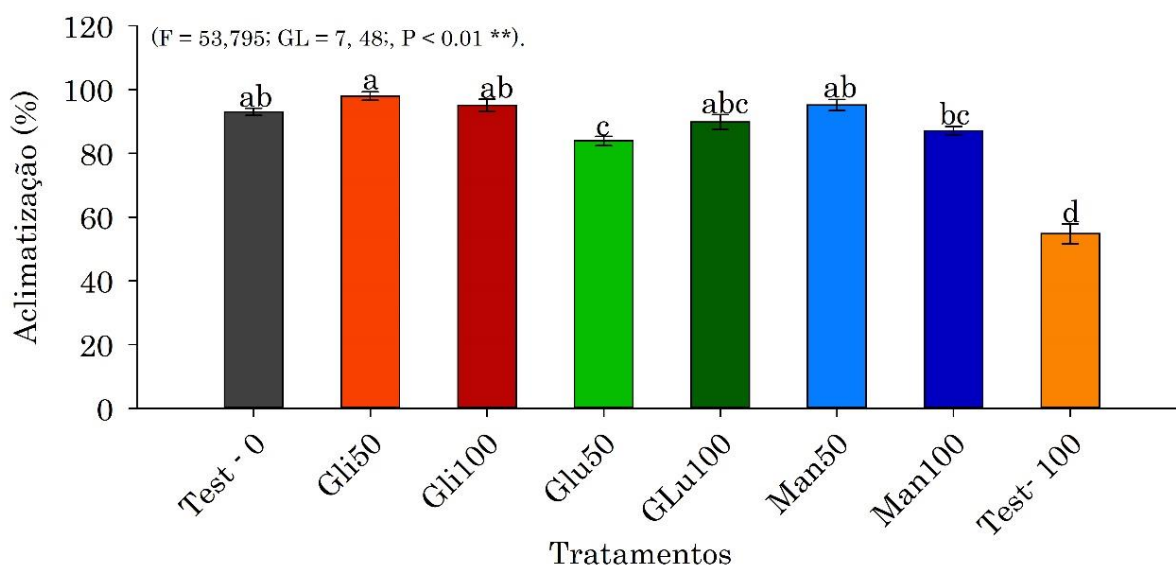


Figura 9. Médias das taxas de Aclimatização das plântulas em função dos tratamentos submetidos aos embriões *in vitro*. Tratamentos seguidos por letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). Aracati, Syngenta, 2021.

O baixo acúmulo de carboidratos na fase *in vitro* pode ser um dos fatores responsáveis por alta mortalidade durante aclimatização de plântulas provenientes de cultivo *in vitro* (WALTER, 2015). Plântulas apresentando menor tamanho foram menos vigorosas, com menor número e qualidade de raízes (dados não apresentados) e, conseqüentemente, com menor reserva e preparo para superar os estresses envolvidos na aclimatização (mudança de temperatura, umidade e autotrofismo). Muitas das plântulas de cultura *in vitro* têm somente duas radículas longas e finas, e se estas forem danificadas durante o transplante as plântulas podem morrer; no entanto, se a plântula obtida for vigorosa, novas radículas surgirão no lugar da danificada, não ocorrendo outros prejuízos por esta lesão de manipulação (FERREIRA et al., 1998).

As plântulas sobreviventes foram transplantadas para vasos e conduzidas em estufas até florescimento, por volta dos 63 ± 5 dias. Não foram observadas plântulas com variações morfológicas (foram comparadas com os genótipos recorrentes semeados paralelamente), e todas as plântulas sobreviveram após transplantio.

Outro importante ponto está relacionado à ausência de variantes somaclonais ou anomalias que podem ocorrer quando vegetais são submetidos ao cultivo *in vitro*. No entanto, estas variantes são mais frequentes quando passam por fase de desdiferenciação e rediferenciação, como a pré-formação de calos ou mesmo embriogênese somática direta. Em

milho, estas variações são bem identificadas e descritas por vários autores, como Anami et al. (2010), que relataram anormalidades morfológicas em brotações de milho, as chamadas variações somaclonais. Os autores observaram fenótipos anormais em plantas regenerantes durante a fase reprodutiva, incluindo a emergência tanto do pendão quando a espiga está no próprio talo do pendão, resultando em sementes do pendão. Outras variações somaclonais ocorridas em baixa frequência incluem espigas múltiplas, folhas emergindo do mesmo nó e número reduzido de inflorescências masculinas. Esses defeitos foram mais pronunciados nos regenerantes dos híbridos do que nas linhagens, sugerindo que os fatores genéticos podem ser responsáveis pelas principais diferenças entre os híbridos e as linhagens, uma possível resposta dependente do genótipo (FLUMINHAN; AGUIAR-PERECIN, 1998). Os resultados desta pesquisa devem auxiliar na tomada de decisão em programas de melhoramento genético de milho, capazes de acelerar o desenvolvimento de novos híbridos por meio de retrocruzamentos. Todos os objetivos do melhoramento de plantas devem convergir numa meta principal: o ganho genético. Auxiliar os melhoristas com informações que possibilitem otimização de recursos, redução de tempo, ganho em qualidade e em escala de produção nos seus processos certamente propiciará resultados positivos para empresas e agricultores na missão de garantir a segurança alimentar no mundo.

4 CONCLUSÕES

- Independentemente da dose avaliada, os agentes seletivos proporcionaram a seleção dos embriões *in vitro* conforme os genes marcadores de seleção que continham;
- O Glufosinato, independentemente da dose avaliada, causou redução no comprimento das plântulas formadas a partir dos embriões cultivados *in vitro* contendo esta substância;
- A manose causou redução no comprimento das plântulas formadas a partir dos embriões cultivados *in vitro* contendo esta substância, havendo maior redução do tamanho na maior dose de manose (50 g.L⁻¹);
- A interação entre os agentes seletivos com suas maiores doses testadas potencializou a redução no comprimento das plântulas, como também a sobrevivência das plântulas na aclimatização.

REFERÊNCIAS

- ALISSA, A.; JONARD, R.; SERIEYS, H.; VINCOURT, P. La culture d'embryons isolés *in vitro* dans un programme d'amélioration du tournesol. **CR Acad Sci Paris**, t 303, série III, 5: 161–164, 1986.
- ANAMI, S.E.; MGUTU, A.J.; TARACHA, C. Somatic embryogenesis and plant regeneration of tropical maize genotypes. **Plant Cell Tiss Organ Cult** 102, 285–295, 2010.
- ASPIROZ, H. S.; VINCOURT, P.; SERIEYS, H.; GALLAIS, A. La culture *in vitro* des embryons immatures dans l'accélération du cycle de selection des lignées de tournesol et ses effets morphovégétatifs. **Helia** 10: 35–38, 1988.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de plantas**. 6. ed. Viçosa: Editora UFV. 2013.
- COSTA, A. F. S. **Influência das condições climáticas no crescimento e desenvolvimento de plantas de milho (*Zea mays* L.), avaliadas em diferentes épocas de plantio**. 1994. 109f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1994.
- DUARTE, J. M. **Conversão de linhagens elites em milho de alta qualidade protéica (QPM)**. 129f. Tese (Doutorado). Lavras: UFLA, 2003.
- FEHR, W. R. **Principles of cultivar development**. Vol.1 Theory and Technique. Macmillan, New York. 1991.
- FERREIRA, M. E.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A.; Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (org.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, 1998. p. 21-44.
- FLUMINHAN, A.; DE AGUIAR-PERECIN, M.L.R. Embryogenic response and mitotic instability in callus cultures derived from maize inbred lines differing in heterochromatic knob content of chromosomes. **Ann. Bot.**, 82: 569–576, 1998.
- FRISCH, M.; BOHN, M.; MELCHINGER, A. E. Comparison of selection strategies for marker-assisted backcrossing of a gene. **Crop Science**, Madison, v. 39, n. 5, p. 1295-1301, set./out. 1999.

GADIOLI, J. L.; DOURADO-NETO, D.; GARCÍA, A. G.; BASANTA, M. D. V. Temperatura do ar, rendimento de grãos de milho e caracterização fenológica associada à soma calórica. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 3, p. 377-383, 2000.

HOSPITAL, F.; CHARCOSSET, A. Marker-assisted introgression of quantitative trait loci. **Genetics**, Baltimore, v. 147, n. 3, p. 1469-1485, nov. 1997.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. 2021. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/brasil>. Acesso em: 27 fev. 2021.

IJAZ, S.; RANA, I. A.; KHAN, I. A.; SALEEM, M. Establishment of an *in vitro* regeneration system for genetic transformation of selected sugarcane genotypes. **Genet. Mol. Res.**, v. 11, n. 1, p. 512-530, 2012.

JAMES, R. **Global status of commercialized Biotech/GM crops**. ISAAA Brief N° 46 ISAAA Ithaca, NY. 2013.

JOERSBO, M.; DONALDSON, I.; KREIBERG, J.; PETERSEN, S. G.; BRUNSTEDT, J.; OKKELS, F. T. Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet. **Mol. Breed.** 4:111-117, 1998.

KUMARI, P.; THANESHWARI; RAHUL. Embryo Rescue in Horticultural Crops. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.**, v. 7, n. 6, p. 3350-3358, 2018.

LEWIS, M.; CHAPPELL, M.; ZHANG, D.; MAYNARD, R. Development of an Embryo Rescue Protocol for Butterfly Weed. **HortTechnology**, v. 30, n. 1, p. 1-7, 2019.

MANCINI M, WOITOVICH N, PERMINGEAT HR, PODIO M, SIENA LA, ORTIZ JPA, PESSINO SC, FELITTI SA. Development of a modified transformation platform for apomixes candidate genes research in *Paspalum notatum* (bahiagrass). **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.**, 50: 412-424, 2014.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Valor Bruto da Produção Agropecuária (VBP)**. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/politica-agricola/valor-bruto-da-producao-agropecuaria-vbp>. Acesso em: 27 fev. 2021.

MESQUITA, A. G. G., GUIMARÃES, C. T., PARENTONI, S. N., PAIVA, E. Recuperação do genitor recorrente em milho utilizando retrocruzamento assistido por marcadores microsatélites. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 4, n. 3, p. 275-285, 2005.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for the rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **-Physiol. Plant.** 15: 73-497, 1962.

OPENSHAW, S. J.; JARBOE, S. G.; BEAVIS, W. D. Marker assisted selection in backcross breeding. In: LOWER, R. (Ed.) **Joint Plant Breeding Symposium on Analysis of Molecular Marker Data**. Corvallis, Oregon State University, 1994. p. 41-43.

PAIVA NETO, V. B.; CARVALHO, C. R.; OTONI, W. C. Mannose – a potential selection system for genetic transformation of annatto (*Bixa orellana* L.). **Biol. Plant.**, v. 47, n. 3, p. 441-444, 2003.

PEREIRA, A. V. C.; VIEIRA, L. G. E.; RIBAS, A. F. Optimal concentration of selective agents for inhibiting *in vitro* growth of *Urochloa brizantha* embryogenic calli. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 15, n. 23, p. 1159-1167, 2016.

PLOTNIKOV, V. A. Use of method of culturing young embryos for accelerated development of sunflower cytoplasmic male sterility analogues. **Tsitologiya i Genetika**, v. 17, n. 6, p. 40-43, 1983.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**. Vienna, Austria, 2020. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 27 fev. 2021.

RAGOT, M.; BIASIOLLI, M.; DELBUT, M. F.; DELL'ORCO, A.; MALGARINI, L.; THEVENIN, P.; VERNON, J.; VIVANT, J.; ZIMMERMANN, R.; GAY, G. Marker-assisted backcrossing: a practical example. In: **techniques et utilisations des marqueurs moleculaires**, 1994, Montpellier. Proceeding Paris: INRA, 1995. p. 45-56.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P.; SOUZA, E. A.; CONÇALVES, F. M. A.; SOUZA, J. C. **Genética na agropecuária**. Lavras, Editora UFLA, 2012.

SERIEYS, H. *In vitro* culture of zygotic embryos: its use in Soya and Sunflower improvement. In: DATTÉE Y., DUMAS C., GALLAIS A. (org.). **Reproductive Biology and Plant Breeding**. Springer-, Berlin, Heidelberg. 1992. p. 235-246.

VISSCHER, P. M. Proportion of the variation in genetic composition in backcrossing programs explained by genetic marker. **The Journal of Heredity: Brief Communications**, Cary, v. 87, n. 2, p. 136-138, mar./abr. 1996.

WALTER, R. **Resgate de embriões zigóticos de espécies do gênero capsicum visando à sua utilização em programas de melhoramento genético**. 2015. 71f. Tese (Doutorado). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2015.