

# RETROCRUZAMENTO ASSISTIDO POR MARCADORES MOLECULARES PARA CONVERSÃO DE LINHAGEM DE MILHO NORMAL EM QPM

Jair Moura Duarte<sup>1</sup>; Claudia Teixeira Guimarães<sup>2</sup>; Uiraci Gomes de Paula Lana<sup>2</sup>;  
Cleso Antônio Patto Pacheco<sup>2</sup>; Paulo Evaristo Guimarães<sup>2</sup>; Edilson Paiva<sup>2</sup>

**Palavras-chave:** *opaco-2*, SSR, RFLP, melhoramento assistido, milho

## INTRODUÇÃO

Um dos principais objetivos dos programas de melhoramento de milho é a introgressão em linhagem elites de um ou mais alelos de interesse de um genitor doador. A utilização de retrocruzamentos sucessivos constitui-se no método clássico utilizado para conversão de linhagens. Nos programas de melhoramento de milho QPM, a estratégia de conversão de populações e linhagens de milho normal tem sido utilizada visando aproveitar as características desejáveis presente neste germoplasma, de forma a se obter versões QPM de variedades e híbridos superiores. Este processo de conversão torna-se complexo porque requer a manipulação simultânea de três sistemas genéticos: a mutação *opaco-2*, os genes modificadores dos efeitos negativos desta mutação e os genes que controlam o conteúdo de lisina. Visando tornar o processo de conversão de milho normal em QPM mais eficiente, Guimarães et al. (2000) propuseram um método modificado de retrocruzamento que diminui o tempo necessário à recuperação do genoma do genitor recorrente e fornece a oportunidade para seleção para características QPM em todas as gerações MRC (retrocruzamento modificado). Além disso, pode ser aplicado em programas de melhoramento que utilizam estratégias convencionais ou marcadores moleculares para identificar os genótipos desejáveis. O presente trabalho foi realizado objetivando avaliar o uso de marcadores moleculares e o método de retrocruzamento modificado em programas de conversão de linhagens elites de milho normal em QPM.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado na área experimental e no Núcleo de Biologia Aplicada da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, MG.

No programa de conversão, a linhagem QPM L87 foi a doadora (D) do alelo *opaco-2*

---

<sup>1</sup> Estudante de Doutorado pela UFLA, Pesquisador da Syngenta Seeds, Caixa Postal 585, Uberlândia, MG 38406-270 jair.duarte@syngenta.com

<sup>2</sup> Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, Sete Lagoas, MG 35701-970 claudia@cnpms.embrapa.br

(O<sub>2</sub>) e de alelos modificadores do endosperma e a linhagem normal L161 foi o genitor recorrente (R). As linhagens são originárias do programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo. A partir das populações F<sub>1</sub> iniciou-se o processo de conversão, conforme descrito por Guimarães et al. (2000).

O plantio das populações a campo foi realizado manualmente em linhas de 5 metros com espaçamento de 0,90 cm entre elas, sendo deixadas 25 plantas em cada linha após o desbaste. As plantas selecionadas em cada fileira da geração MRC foram as utilizadas para análises de marcadores moleculares (identificação de plantas heterozigotas e seleção do genótipo da linhagem recorrente), sendo autofecundadas para confirmação do genótipo da planta pelo fenótipo das progênes. A identificação das plantas RC no campo e nas posteriores análises moleculares foi realizada de forma a identificar a geração de retrocruzamento (RC) e o número da planta (1 a 36), de forma seqüencial.

A seleção utilizando marcadores moleculares foi empregada nas gerações RC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> e RC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> nos dois projetos de conversão estudados. A estratégia de seleção foi a seguinte inicialmente por marcadores RFLP para as identificação das plantas heterozigotas (O<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Em seguida, as plantas heterozigotas foram avaliadas por marcadores SSRs visando à identificação daquelas com maior proporção de recuperação do genótipo do genitor recorrente. As três espigas selecionadas para avanço das gerações MRC e RC subsequentes foram as que receberam pólen das duas melhores plantas da geração RC anterior de acordo com a informação dos marcadores moleculares.

O DNA genômico de cada material foi extraído de folhas jovens segundo o método descrito por Saghai-Marooft et al. (1984), sendo posteriormente quantificado em géis de agarose 0,8%. As análises de RFLP, utilizando o cDNA do gene *opaco-2* marcado com digoxigenina como sonda, foram realizadas segundo por Torres et al. (1997). As reações de SSR foram realizadas de acordo com os procedimentos descritos por Ninamango-Cárdenas et al. (2003), empregando-se *primers* específicos para o genoma do milho cujas seqüências estão publicamente disponíveis no *Maize Genome Database – MaizeDB*.

Os dados dos marcadores SSRs foram codificados como A para o alelo advindo da linhagem recorrente em homozigose e H para o loco em heterozigose. A posição dos marcadores em cM ao longo do genoma do milho foi obtida de acordo com o mapa de consenso para marcadores SSR (*Maize Genome Database*). Os dados moleculares foram utilizados para a genotipagem gráfica dos indivíduos conforme proposto por Young e Tanksley (1989), utilizando o programa Graphical GenoTypes – GGT (Van Berloo, 1999).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Utilização de marcadores RFLP para identificação das plantas heterozigotas nas gerações de retrocruzamento:** Os genótipos normal, QPM e os híbridos  $F_1$  foram diferenciados pela hibridização da sonda do gene *opaco-2*, com os DNAs genômicos digeridos com as enzimas *EcoRI* e *HindIII*. A eficiência do marcador foi confirmada pela autofecundação das plantas  $RC_2F_1$  e  $RC_3F_1$  a partir de um exame visual das sementes em uma caixa de luz.

Em programas de conversões de linhagens normais para QPM utilizando o método proposto por Guimarães et al. (2000), a identificação precoce dos indivíduos que possuem o alelo  $o_2$  por marcadores moleculares apresenta a grande vantagem de reduzir pela metade o número de cruzamentos necessários para obtenção das próximas gerações RC e MRC, além de dispensar as gerações de autofecundação para confirmação do genótipo heterozigoto. Outra vantagem a ser considerada é que a expressão dos modificadores do endosperma nos grãos a serem avaliados é genótipo específica e complexa (Vasal, 2000), o que torna a seleção fenotípica difícil de ser realizada com eficiência e segurança em algumas populações.

**Utilização de marcadores SSRs para acelerar a recuperação dos genótipos recorrentes:** No programa de conversão, foram avaliadas 14 plantas com 24 marcadores SSRs polimórficos entre os pais na geração  $RC_2F_1$  e 22 plantas com 32 marcadores SSRs na geração  $RC_3F_1$ . A proporção de recuperação do genitor recorrente seguiu o padrão de distribuição normal, de acordo com o teste de Shapiro-Wilk.

A proporção média de recuperação do genótipo do genitor recorrente na geração  $RC_2F_1$  foi de 86,5%, variando de 93 a 79,2%. O valor assemelha-se à estimativa média teórica esperada em populações  $RC_2$ , que é de 87,5%. A geração  $RC_3F_1$  foi obtida a partir de sementes de três espigas que receberam pólen da planta que apresentou 93% de recuperação do genótipo da linhagem recorrente L161. Nas representações gráficas genotípicas das plantas, as diferenças entre a melhor e a pior planta corresponderam à segmentos em heterozigose nos cromossomos 5, 6, 7 e 9. Além disso, a diferença entre as melhores plantas da geração  $RC_2F_1$ , em relação às médias de recuperação foi de 6,5%, equivalendo ao ganho obtido com um novo ciclo de retrocruzamento, onde a média teórica esperada de recuperação do genótipo recorrente seria de 93,8%.

Este ganho, entretanto, não se confirmou quando foram avaliadas as médias de recuperação obtidas nas gerações  $RC_3F_1$ , onde a proporção média obtida de recuperação do genótipo da linhagem recorrente foi de 94,1%. Este valor é ligeiramente superior à percentagem média teórica esperada de 93,8% para uma geração  $RC_3$ , não refletindo o

ganho de 6,5% que seria esperado nesta geração de retrocruzamento pela seleção da melhor planta RC<sub>2</sub> dentre as avaliadas.

Tais resultados demonstram que, nas condições estabelecidas no presente trabalho, embora tenha sido possível identificar plantas com diferentes proporções de recuperação do genótipo do genitor recorrente, esta seleção não se refletiu em ganhos para a população de retrocruzamento seguinte, considerando-se as proporções de recuperação do genótipo recorrente. Desta forma, os dados contradizem os disponíveis na literatura, obtidos principalmente por simulação, os quais atestam que a seleção de plantas com as maiores proporções de recuperação do genótipo do genitor recorrente acarretam ganhos efetivos nos programas de retrocruzamento assistidos por marcadores (Hospital et al., 1992; Openshaw et al., 1994; Frisch et al., 1999; Hospital, 2001; Ribaut et al., 2002).

Dentre as justificativas para o resultado, pode-se considerar que o número de plantas genotipadas foi relativamente baixo, variando de 14 para as gerações RC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> até 22 para a geração RC<sub>3</sub>F<sub>1</sub>. O tamanho da população analisada tem sido reportado em estudos de simulação como o fator mais importante a afetar a eficiência da seleção assistida por marcadores moleculares (Frisch et al., 1999). Outro aspecto a ser considerado é que o número de marcadores analisados em cada população (média de 3 marcadores por cromossomo), representa uma amostragem relativamente pequena do genoma. Dados da literatura sugerem que um número adequado de marcadores a serem utilizados neste tipo de seleção seria entre dois (Openshaw et al., 1994) e três (Hospital et al., 1992) para cada 100 cM do genoma.

**Comparações entre programas de retrocruzamento convencional e assistido:** A seleção assistida por SSR nas gerações RC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> e RC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> não proporcionou ganhos na proporção de recuperação do genótipo recorrente para as gerações MRC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>, quando comparados com a seleção fenotípica. As gerações RC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> selecionadas para grãos QPM (O<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) se mostraram geneticamente mais próximas das gerações MRC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> que das gerações RC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> selecionadas para grãos normais (O<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Provavelmente, na transferência e seleção do alelo o<sub>2</sub> e de genes modificadores do endosperma, ocorreu o arraste simultâneo de outros segmentos do genótipo do doador devido à ligação (“linkage drag”). Este arraste genômico pode ser confirmado na avaliação dos genótipos gráficos, onde as plantas com menor proporção do genótipo recorrente apresentaram segmentos em heterozigose no grupo de ligação 7, onde está localizado o gene *opaco-2* (bin 7.01), e onde foram mapeados dois genes modificadores da textura do endosperma (Lopes, 1993). Assim, a seleção assistida por marcadores para conversão de linhagens QPM deve considerar marcadores que flanqueiam o alelo alvo, principalmente nas gerações iniciais do programa de retrocruzamento (Hospital et al., 1992).

## CONCLUSÕES

1. A utilização da enzima *EcoRI* em conjunto com a sonda do cDNA do gene *opaco-2* foi eficiente para identificação e seleção precoce dos genótipos heterozigotos (*O2o2*) nas gerações de retrocruzamento avaliadas.
2. Considerando a estratégia de seleção e o tamanho das populações analisadas, a identificação das plantas com maior proporção de recuperação do genótipo do genitor recorrente por marcadores SSRs não representou uma vantagem significativa, quando comparado com a seleção fenotípica convencional.
3. Foi constatada a ocorrência de arraste devido à ligação (“linkage drag”) com a seleção do alelo *o2* e de modificadores do endosperma nas gerações de retrocruzamentos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

GUIMARÃES, P.E.O.; PACHECO, C.A.P.; LOPES, M.A. Processo de introdução de características genéticas expressas em sementes e controladas por um gene recessivo e seus modificadores. 2000. Patente: Privilégio e Inovação. n. PI 00046, “Processo de introdução de característica”. 14 de setembro de 2000 (Depósito).

HOSPITAL, F. Size of donor chromosome segments around introgressed loci and reduction of linkage drag in marker-assisted backcross program. **Genetics**, v. 158, p. 1363-1379, 2001.

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

LOPES, M.A. Genetic and biochemical characterization of the maize mutants floury-2 and modified opaque-2. 1993. 269p. Thesis (Agronomy and Plant Genetics) - University of Arizona, Tucson.

NINAMANGO-CÁRDENAS, F.E.; GUIMARÃES, C.T.; MARTINS, P.R.; PARENTONI, S.N.; CARNEIRO, N.P.; LOPES, M.A.; MORO, J.R.; PAIVA, E. 2003. Mapping QTLs for aluminum tolerance in maize. **Euphytica**, v. 132. (in press).

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.

RIBAUT, J.M.; JIANG, C.; HOISINGTON, D. Simulations experiments on efficiencies of gene introgression by backcrossing. **Crop Science**, v. 42, p. 557-565, 2002.

SAGHAI-MAROOF, M.A.; SOLIMAN, K.M., JORGENSEN, R.A.; ALLARD, R.W. Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 81, p. 8014-8018, 1984.

TORRES, G.A.; PARENTONI, S.N.; LOPES, M.A.; PAIVA, E. A search for RFLP markers to identify genes for aluminum tolerance in maize. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 20, n. 3, p. 459-465, 1997.

VAN BERLOO, R. GGT: Software for the display of Graphical Genotypes. **Journal of Heredity**, v. 90, p. 328-329, 1999.

VASAL, S.K. High Quality Protein Corn. In: Hallauer, A.R. (ed.) Specialty Corns 2nd edition. CRC Press: Boca Raton, p. 85-129, 2000.

YOUNG, N.D.; TANKSLEY, S.D. Restriction Fragment Length Polymorphisms maps and the concept of graphical genotypes. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 77, p. 95-101, 1989.