

# RETROCRUZAMENTOS AUXILIADOS POR MARCADORES MOLECULARES PARA CONVERSÃO DE LINHAGENS NORMAIS EM MILHO DE ALTA QUALIDADE PROTÉICA (QPM)

DUARTE J.M., PACHECO C.A.P., CARNEIRO N.P., GUIMARÃES C.T., GUIMARÃES P.E., LOPES M.A. e PAIVA E.

Embrapa Milho e Sorgo, CP 151 - Sete Lagoas - MG - 35701-970. E-mail: jmduarte@ufla.br

Palavras-chave: Milho, QPM, Retrocruzamentos, SSRs, RFLP, Opaco-2

## INTRODUÇÃO

Milhos de alta qualidade protéica (QPM's), que apresentam altos teores de lisina e triptofano e um fenótipo vítreo do grão têm sido desenvolvidos e representam uma oportunidade de se obter milhos com bom desempenho agrônomico e de melhor qualidade nutricional. O seu desenvolvimento requer a presença da mutação *opaco-2*, a seleção de modificadores genéticos para superar efeitos pleiotrópicos negativos e seleção para melhor qualidade protéica nos endospermas modificados. Vasal *et al.* (1980) desenvolveram uma combinação de retrocruzamento seguida por seleção recorrente em populações segregantes para converter populações de milho normal em QPM. Este procedimento permitiu o desenvolvimento de muitas populações QPM, mas requer um número elevado de gerações para recuperação do genoma do genitor recorrente, além de permitir a seleção das características QPM apenas nas gerações segregantes de cada ciclo de retrocruzamento. Visando melhorar a eficiência do processo de conversão, Guimarães e Lopes (1996) propuseram um método modificado de retrocruzamento para a conversão de milho normal em QPM, no qual o tempo necessário para a recuperação do genoma recorrente é reduzido e a seleção para características QPM pode ser feita em todas as gerações de retrocruzamento modificado (MRC). Esta metodologia consiste basicamente na obtenção da geração F<sub>1</sub> entre a linhagem QPM e a linhagem elite normal (Fase 1), seguida da obtenção simultânea da geração F<sub>2</sub> e do RC<sub>1</sub> (Fase 2) e, posteriormente, da obtenção do retrocruzamento modificado 1 (MRC<sub>1</sub>) e do RC<sub>2</sub>, por meio do cruzamento de uma planta RC<sub>1</sub> (macho) com plantas da geração F<sub>2</sub> e da linhagem recorrente (Fase 3). As outras fases são semelhantes à fase 3, substituindo-se a geração F<sub>2</sub> pelo MRC<sub>1</sub>, o RC<sub>1</sub> pelo RC<sub>2</sub> e assim sucessivamente. As primeiras 5 linhagens elites do programa de melhoramento da EMBRAPA – Milho e Sorgo que estão sendo convertidas serão submetidas à fase 5, para obtenção dos RC<sub>4</sub> e MRC<sub>3</sub>. Algumas dificuldades encontradas na conversão de materiais elites em QPM, mesmo utilizando a metodologia dos retrocruzamentos modificados, decorrem da complexidade da seleção em cada ciclo uma vez que características agrônomicas e do grão devem ser avaliadas. A seleção de grãos QPM pode ser facilmente realizada em alguns genótipos, contudo pode tornar-se não confiável em outros *backgrounds* genéticos, sobretudo quando os genes modificadores conferem um alto grau de vitreosidade à semente, e também pelo efeito do ambiente. Dessa forma, programas convencionais de melhoramento podem tornar-se mais eficazes se dispuserem de ferramentas que possam tornar o processo seletivo mais eficiente.

Na conversão de linhagens, o uso de marcadores moleculares para a identificação precoce de plantas que apresentam um alelo *opaco-2* antes do cruzamento, pode aumentar a eficiência do processo de conversão por vários motivos: a avaliação das progênes pode ser dispensada; o tamanho da população pode ser reduzido a poucas plantas por geração e, devido ao genótipo alvo ser identificado em plantas jovens, características do grão e da planta podem ser selecionadas simultaneamente. Os marcadores moleculares podem ainda maximizar a eficiência dos programas de retrocruzamento, aumentando a proporção de conversão dos indivíduos e reduzindo o tempo requerido para obter uma recuperação aceitável do genitor recorrente (Openshaw *et al.*, 1994).

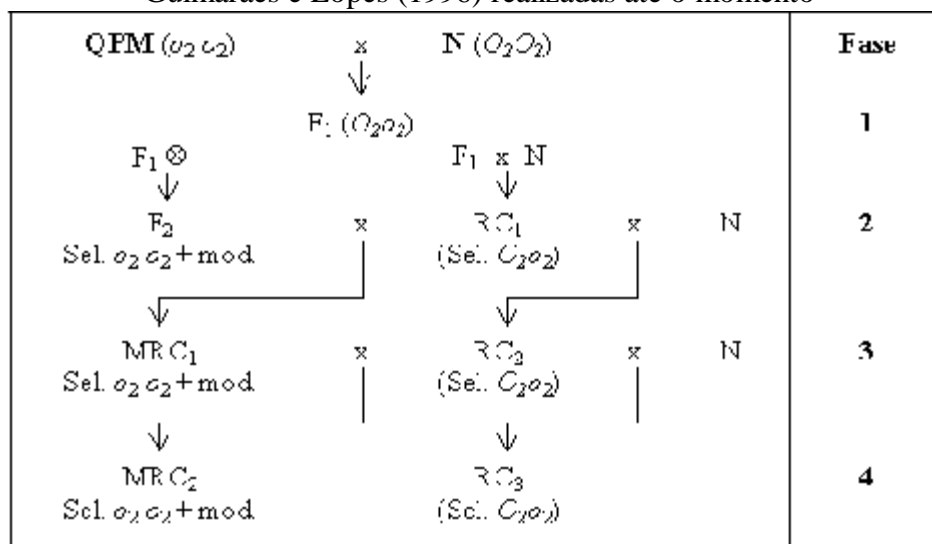
Neste trabalho, foram utilizados marcadores RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) para identificação de genótipos *O<sub>2</sub>O<sub>2</sub>* em plantas jovens e marcadores SSRs (Simple Sequence Repeats) para identificação das plantas com maior proporção de recuperação do genitor recorrente, em um programa de conversão de linhagens elites de milho em QPM.

## MATERIAL E MÉTODOS

As linhagens doadoras (D) do alelo *opaco-2* (*o<sub>2</sub>*) e de alelos modificadores do endosperma foram as linhagens QPM L37CT e L876518, as quais foram cruzadas com as linhagens elites normais L28.41 e L161-1-8A-1, respectivamente, as quais foram utilizadas como genitores recorrentes (R). Todas as linhagens são oriundas do programa de melhoramento da EMBRAPA Milho e Sorgo.

A metodologia de conversão que está sendo utilizada foi proposta por Guimarães e Lopes (1996), cuja descrição das fases realizadas até o momento estão apresentadas no quadro 1.

**Quadro 1-** Fases da metodologia de conversão de milho normal em QPM proposta por Guimarães e Lopes (1996) realizadas até o momento



Na fase 4 (obtenção do RC<sub>3</sub> e MRC<sub>2</sub>) foram coletadas folhas jovens de 36 plantas RC<sub>2</sub> de cada processo de conversão para extração do DNA. Para as análises de RFLP, o DNA genômico foi digerido com a enzima EcoR-I, sendo utilizado o gene *Opaco-2* como sonda. Os procedimentos de digestão, transferência e hibridização foram realizados segundo Torres *et al.* (1997). O objetivo da análise foi a discriminação entre os genótipos *O<sub>2</sub>O<sub>2</sub>* e *O<sub>2</sub>o<sub>2</sub>*, para

utilização das plantas heterozigotas ( $O_2o_2$ ) nos cruzamentos com as plantas  $MRC_1$  e com as linhagens recorrentes, para obtenção das sementes  $MRC_2$  e  $RC_3$ . As plantas selecionadas por meio da análise de RFLP foram autofecundadas para confirmação do genótipo predito.

Os indivíduos heterozigotos ( $O_2o_2$ ) selecionados na geração  $RC_2$  foram genotipados por meio de marcadores SSRs para avaliar a proporção de recuperação do genótipo das linhagens recorrentes. As reações de SSRs foram realizadas conforme descrito por Taramino e Tingey (1996) utilizando *primers* específicos adquiridos da Research Genetics, Inc., cujas seqüências estão publicamente disponíveis no *Maize Genome Database* (<http://www.agron.missouri.edu/ssr.htm>). Inicialmente foram testados mais de 250 *primers*, sendo selecionados aqueles polimórficos entre os genitores e bem distribuídos ao longo de todo o genoma do milho (média de três marcadores por cromossomo). Os dados de posição dos marcadores no genoma e dos alelos para cada indivíduo foram utilizados para a genotipagem gráfica dos indivíduos  $RC_2$ , utilizando-se o programa Graphical GenoTypes – GGT (van Berloo, 1999).

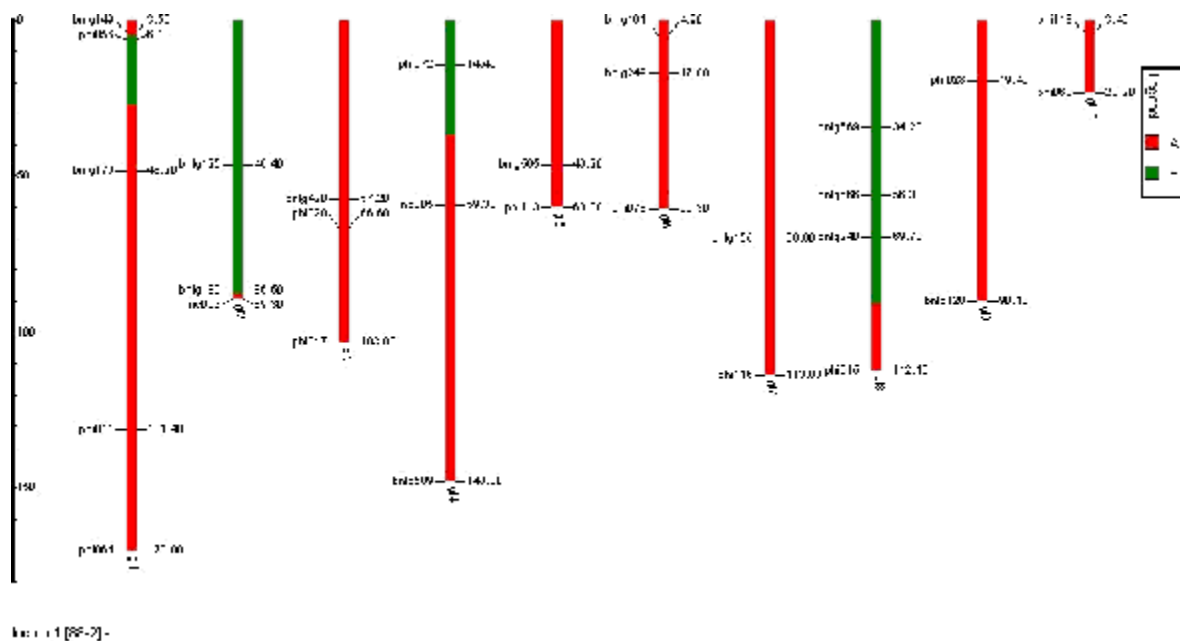
Assim, para dar continuidade ao processo de conversão, foram selecionadas apenas as sementes das gerações  $MRC_2$  e  $RC_3$  provenientes de espigas que tiveram como genitor masculino as plantas de maior proporção de recuperação da linhagem recorrente entre as avaliadas. A seleção para modificação do endosperma nas sementes do  $MRC_2$  foi realizada com o auxílio de uma caixa de luz (diafanoscópio).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os DNAs das linhagens normais, QPM's e  $F_1$ 's foram digeridos com a enzima EcoR-I, para se verificar o padrão de restrição, quando hibridizados com o gene *Opaco-2*. Os genótipos de interesse ( $O_2O_2$ ,  $O_2o_2$  e  $o_2o_2$ ) foram diferenciados por esta combinação sonda + enzima, sendo gerada uma banda de 7.913 pb para o genótipo  $O_2O_2$  e uma banda de 5.710 pb para o genótipo  $o_2o_2$ , sendo que os indivíduos  $F_1$ 's possuíam ambas as bandas, evidenciando um polimorfismo eficiente para diferenciação dos genótipos. Na análise das 36 plantas  $RC_2$  amostradas em cada processo, 22 apresentaram o genótipo  $O_2O_2$  e 14 apresentaram o genótipo  $O_2o_2$ , confirmando as proporções esperadas nas gerações de retrocruzamento de 50%  $O_2O_2$ :50%  $O_2o_2$  ( $\chi^2=1,78_{NS}$ ). Os resultados das autofecundações confirmaram todas as identificações precoces dos indivíduos heterozigotos ( $O_2o_2$ ) realizadas por meio dos RFLPs. Com isso, o número de cruzamentos necessários para esta etapa do processo de conversão foi reduzido em 50%.

A genotipagem com marcadores SSRs das plantas heterozigotas demonstrou que, nas duas populações trabalhadas, houve uma variação com relação à proporção de recuperação do genótipo recorrente, seguindo a proporção de recuperação um padrão de distribuição normal. Para a L28.41 x L37CT, a proporção de recuperação média do genótipo recorrente foi de 86,46% com desvio padrão de 4,79%, valores bem próximos da proporção média esperada na geração  $RC_2$  (87,5%). Dessa forma, para obtenção da geração  $MRC_2$ , selecionou-se sementes QPM entre as espigas que tiveram como genitor masculino a planta que apresentou a maior recuperação do genoma da linhagem L28.41 (92,15%), cuja representação gráfica genotípica está na Figura 1. Para a obtenção de sementes  $RC_3$ , foram selecionadas sementes de uma espiga cujo genitor masculino apresentava 91% do genoma da linhagem recorrente (maior proporção de recuperação entre as plantas que deram origem à geração  $RC_3$ ). Para a L161-1-8A-1 x L876518, a proporção de recuperação média do genoma recorrente foi de 86,95% com desvio padrão de 3,96%. Para obtenção da geração  $MRC_2$ , selecionou-se sementes QPM entre as espigas que tiveram como genitor masculino a planta que apresentou uma recuperação de 88,75% do genoma da L161-1-8A-1 e para a

obtenção da geração RC<sub>3</sub>, foram selecionadas sementes de uma espiga cujo genitor masculino apresentava 93,25% do genoma desta linhagem (maior proporção de recuperação entre todas as plantas avaliadas).



**Figura 1** – Representação gráfica genotípica da planta RC<sub>2</sub> com maior proporção de recuperação do genoma recorrente do cruzamento entre L2841 (R) x L37CT (D) (Legenda: A = homocigoto recorrente; H = heterocigoto).

Dessa forma, as sementes RC<sub>3</sub> e MRC<sub>2</sub> cujos pais apresentaram a maior proporção de recuperação das linhagens recorrentes foram mantidas para dar continuidade no processo de conversão (Fase 5), ressaltando-se ainda que nas sementes MRC<sub>2</sub>, procedeu-se a seleção daquelas que apresentaram um maior grau de modificação nas sementes (análise visual). Estas sementes serão ainda analisadas visando um monitoramento da qualidade nutricional (teores de lisina e triptofano). Considerando os resultados obtidos utilizando diferentes tipos de marcadores moleculares para auxiliar o processo de conversão destas duas linhagens, será possível posteriormente realizar-se uma análise comparativa do processo com e sem o auxílio destes marcadores, haja visto que outras linhagens estão sendo convertidas sem o emprego destas ferramentas. Estes processos de conversão estão sendo avançados, visando-se a obtenção de linhagens QPM com o máximo de recuperação de genoma e o mesmo desempenho agrônomo de suas similares normais.

**LITERATURA CITADA**

- GUIMARÃES, P.E.O.; LOPES, M.A. Conversão de genótipos de milho de endosperma normal para QPM. (1996). Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 21. Londrina, **Resumos**. Londrina: IAPAR, 1996. pp 29.
- 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.
- TARAMINO, G.; TINGEY, S. Simple Sequence Repeats for germplasm analysis and mapping in maize. **Genome**, Ottawa, v. 39, p. 277-287, 1996.
- 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., VILLEGAS, E., BJARNASON, M., GELAW, B. AND GOETZ, P. Genetic modifiers and breeding strategies in developing hard endosperm opaque-2 materials. P. 37-71. In Pollmer, W. G. and Phillips, R. (eds). **Improvement of quality traits of maize for grain and silage use**. Nijhoff, The Hague. 1980