

Emprego de marcadores moleculares na introgressão da resistência ao enfezamento em linhagens-elite

Flaviane M. Costa¹, Flavia F. Teixeira², Claudia T. Guimarães², Silvia N. J. Belicuas², Elizabeth de O. Sabato² e Débora C. dos Santos³

¹ Bolsista PIC FAPEMIG – flavianemcosta@hotmail.com; ² Pesquisadoras da Embrapa Milho e Sorgo, Cx.P. 151, Sete Lagoas, MG. CEP 35701-970olsista PIBIC Júnior; ³ Bolsista PIBIC Júnior

Palavras-chave: *Zea mays*, enfezamento, pré-melhoramento, germoplasma.

Introdução

O melhoramento do milho no Brasil já disponibilizou dezenas de cultivares adaptadas a diversas condições de cultivos. Uma importante fonte de variabilidade genética para suprir os programas de melhoramento é o banco de germoplasma de milho, que mantém cerca de quatro mil acessos, em sua maioria variedades coletadas em território nacional. Porém, as cultivares comerciais e os materiais-elite utilizados nos programas de melhoramento e os acessos do banco de germoplasma se tornaram coleções bem distintas devido à elevada performance agrônômica presente nos materiais-elite. Por essa razão, o potencial de uso direto de acessos provenientes do banco de germoplasma em programas de melhoramento é praticamente nulo. Entretanto, já foram identificadas, na coleção de germoplasma de milho, fontes de resistência a estresses abióticos e bióticos, entre eles os enfezamentos (MIRANDA FILHO et al., 2000).

Novas fontes de variabilidade genética enriquecem a coleção de trabalho do melhorista por meio da ampliação de sua base genética, o que leva à diminuição da vulnerabilidade genética dos materiais-elite (NASS; PATERNIANI, 2000). Para que a ampliação da base genética possa chegar ao milho cultivado é de fundamental importância que as novas fontes tenham desempenho agrônômico satisfatório e, com isso, despertem o interesse do seu uso no melhoramento. Além disso, o desenvolvimento desses materiais deve considerar o enfoque do programa de melhoramento e os grupos heteróticos explorados. Desta forma, o pré-melhoramento poderá desenvolver novas populações com alta aceitação devido à introgressão de alelos que confirmam novas fontes de variabilidade útil ao programa em linhagens-elite de desempenho conhecido e integrados aos grupos heteróticos usados no programa.

O interesse por diversificação e agregação de valor à agricultura é crescente nos dias atuais. Desta forma, o interesse do melhoramento genético se voltará para a diversificação de espécies, sistemas e processos. Neste cenário, o pré-melhoramento combinado à biotecnologia e ao melhoramento genético poderá se tornar importante estratégia de descoberta e disponibilização de funções biológicas inovadoras e viabilizadoras da agricultura sustentável (LOPES, 2006).

Os relatos de prejuízos na cultura do milho devido à incidência de enfezamentos tornaram-se mais frequentes e crescentes a partir dos anos 90, especialmente em localidades onde se optou pelo cultivo do milho safrinha. Os crescentes prejuízos causados pela doença se devem à maior permanência do milho no campo servindo de abrigo para o inseto transmissor do agente causal, a cigarrinha-do-milho (OLIVEIRA et al., 2002). O cultivo do milho safrinha tem atingido grandes áreas. Segundo os indicadores da produção agrícola do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a área colhida com o milho safrinha no Brasil



em 2008 foi cerca de 5 milhões de ha, o que corresponde a aproximadamente um terço da área total cultivada com milho no Brasil. Dados mais recentes mostram que a produção de milho safrinha deve aumentar cerca de 5% na safra 2009/10 em relação à anterior, passando de 17 para 18 milhões de toneladas (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2010).

O fato de que o milho safrinha tem ganhado cada vez mais importância no Brasil é uma constatação geral entre pesquisadores e produtores rurais. A adoção de tecnologias influencia o aumento da cultura. Portanto, agora o grande desafio é tornar a segunda safra, além de uma boa opção técnica, mais rentável para o produtor (EMBRAPA MILHO E SORGO, 2009).

O emprego de técnicas de seleção que visam reduzir o tempo de obtenção de cultivares em programas de melhoramento promove economia de tempo e de recursos. Além disso, a agilidade no desenvolvimento de novas cultivares é especialmente importante quando o objetivo é a obtenção de novas variedades tolerantes a patógenos que são sujeitas a terem suas fontes de resistência quebradas em alguns anos. O uso de marcadores moleculares na recuperação do genótipo do pai recorrente em programas de retrocruzamento é uma das técnicas moleculares de maior potencial de uso rotineiro na seleção assistida (OPENSHAW et al., 1994; YOUSEF; JUVIK, 2002).

O objetivo deste trabalho foi identificar marcadores microssatélites para a seleção de famílias segregantes com maiores percentuais do genotípico do pai recorrente em programa de pré-melhoramento que visa à introgressão de resistência ao enfezamento em linhagens-elite.

Material e Métodos

As famílias consideradas no presente trabalho foram obtidas pela autofecundação de plantas de duas populações. Ambas as populações foram obtidas pelo retrocruzamento entre linhagens-elite provenientes do programa de melhoramento de milho da Embrapa Milho e Sorgo e a F₁ entre essas linhagens e o acesso do banco de germoplasma denominado NAP Corn Stunt. Esse acesso foi obtido por Miranda Filho et al. (2000) e é um composto de base ampla formado por diversos acessos classificados como resistentes ao enfezamento. As linhagens-elite são L228-3 e L3, dos grupos heteróticos dentado e duro, respectivamente. Desta forma, foram obtidos dois grupos de plantas, ambos com, em média, 75% de alelos das linhagens-elite.

Foi extraído o DNA de 46 plantas de cada uma das populações descritas acima, assim como dos parentais. As extrações de DNA foram realizadas no laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Milho e Sorgo pelo método de Isolamento de DNA genômico (SAGHAI-MAROOF et al., 1984) com algumas modificações, conforme o protocolo usualmente utilizado no referido laboratório.

Para identificação de primers polimórficos utilizou-se reações para microssatélite, onde se testaram os seguintes primers: Bnlg1006, Bnlg125, Bnlg1863, Bnlg2241, Phi084, Umc1016, Umc1033, Umc1084, Umc1653, Umc1035, Bnlg155, Bnlg166, Bnlg1325, Bnlg153, Bnlg1811, Bnlg249, Bnlg381, Bnlg594, Mmc0241, Mmc0321, Phi054, Phi041, Phi061, Phi089, Phi109642, Phi113, Umc1015, Umc1071, Umc1221, Umc1222, Umc1537, Umc1781, Umc1786, Umc1875, Umc1887, Umc1970, Bnlg161, Bnlg182, Bnlg105, Bnlg1208, Bnlg1371, Umc1066 e Umc2018.

Utilizaram-se reações para microssatélite: Gel de acrilamida corado com prata (PADILHA, 2002) na genotipagem das famílias, com emprego dos 23 primers microssatélites



selecionados. Foram feitas análises dos resultados e preparo de planilhas contendo os dados obtidos com as análises moleculares.

Resultados e Discussão

Os 43 primers testados cobriram todos os cromossomos do genoma do milho, sendo que nos cromossomos 5 e 6 estavam o maior número de primers com 7 primers avaliados em cada. O que teve o menor número de primers testados foi o cromossomo 4 com 1 primer avaliado.

A presença de polimorfismo foi detectada em 23 primers (Tabela 1), sendo que em 20 primers foi possível detectar a segregação entre os parentais NAP e L228 e em 17 primers foi possível observar a segregação entre os parentais NAP e L3. No cromossomo 6 foi encontrado maior número de primers polimórficos no total de 6 locos segregantes. Em contrapartida, no cromossomo 4 não foram encontrados primers segregantes para as populações testadas.

Tabela1. Primers em que foi detectado polimorfismo entre os genitores NAP Corn Stunt e as linhagens recorrentes L228-3 e L3.

Primers que apresentaram polimorfismo para os genitores			
NAP Corn Stunt e L228-3	Bin	NAP Corn Stunt e L3	Bin
Bnlg1863	8,03	Bnlg2241	3,06
Bnlg2241	3,06	Umc1016	7,02
Umc1033	9,02	Umc1033	9,02
Umc1084	10,07	Umc1084	10,07
Umc1653	6,07	Umc1653	6,07
Bnlg166	2,04	Bnlg166	2,04
Bnlg1811	1,04	Bnlg249	6,06
Bnlg381	2,04	Mmc0241	6,05
Phi089	6,08	Umc1071	1,01
Umc1071	1,01	Umc1221	5,04
Umc1221	5,04	Umc1537	5,07
Umc1537	5,07	Umc1786	8,01
Umc1786	8,01	Umc1875	2,06
Umc1875	2,06	Bnlg105	5,02
Bnlg161	6,00	Bnlg1371	6,01
Bnlg182	1,03	Umc1066	7,01
Bnlg105	5,02	Umc2018	10,01
Bnlg1371	6,01		
Umc1066	7,01		
Umc2018	10,01		

Com a genotipagem das plantas de cada população foi possível constatar que a maioria dos primers testados apresentou a segregação esperada para uma geração de retrocruzamento, ou seja 3:1, exceto para os primers Umc1071, Umc1066, Umc1537, Umc1084, Bnlg182,



Bnlg105, e Bnlg1371 que apresentaram padrão inesperado. Entretanto, em alguns casos, como na amplificação dos primers Umc 1786 e Umc 2018, ambos para a população derivada do cruzamento entre os genitores NAP Corn Stunt e L3, o desvio padrão considerado foi ligeiramente superior ao esperado. Como no processo de consideração das famílias segregantes foi efetivada uma seleção leve, esses dados genotípicos não foram descartados. Desta forma, foram empregados para as demais etapas da análise, a segregação de 13 marcadores microssatélites para a população derivada do cruzamento NAP Corn Stunt x L228-3 e 11 para o cruzamento NAP Corn Stunt x L3.

A classificação das famílias quanto ao percentual de alelos das linhagens está representada na Tabela 2. Nessa tabela, estão sublinhados os materiais que apresentaram percentual de alelos idênticos ao do pai recorrente, acima da média esperada para a geração de retrocruzamento 1. É oportuno mencionar que nessa tabela também estão apresentados os resultados de avaliações preliminares da reação das famílias ao patógeno. Essa avaliação da reação foi feita com base na observação de plantas que foram classificadas como resistentes ou suscetíveis. Entretanto, serão realizadas avaliações posteriores com base no desempenho das famílias em cruzamentos. Com base nestes resultados observou-se que 47,83% dos indivíduos provenientes da autofecundação de plantas do RC NAP corn stunt x L228-3 apresentaram percentual do pai recorrente (L228-3) acima de 75%, ou seja acima da média esperada para a geração uma geração de RC. Isso indica que nestas famílias é esperado melhor desempenho agrônômico, dentre elas as famílias derivadas das plantas identificadas com os seguintes números: 65, 89, 91, 111, 113, 163, 168, 201, 206, 208, 235, 237, 273, 275, 302, 323, 339. Estas famílias haviam sido classificadas previamente como resistentes ao enfezamento. Entre os indivíduos provenientes da autofecundação de plantas da RC NAP corn stunt x L3, observou-se que 21,74% das famílias apresentaram percentual do pai recorrente (L3) acima de 75%, onde classificou-se, dentre essas, as famílias derivadas das plantas 416, 422, 432, 478, 499, 543, 549, 625, 667 e 669, que haviam sido classificadas previamente como resistentes ao enfezamento.

O percentual médio das plantas provenientes da introgressão em L228-3 foi de 72,24%. Desta forma, estes resultados estão próximos do padrão esperado de 75%. No entanto, o percentual médio do pai recorrente no RC com L3 foi de 63,26%. Isso indica que estes materiais tenderam a se parecer com o genitor doador, ou seja, o camposto NAP Corn Stunt. Possivelmente, isso se deve à suave seleção praticada com base na reação ao patógeno.



TABELA 2. Classificação das plantas (Pl) derivadas dos retrocruzamentos entre NAP Corn Stunt e os pais recorrentes L228-3 e L3 quanto ao percentual de alelos dos pais recorrentes (% alelos) e classificação das plantas quanto à reação ao patógeno (Re).

Pai recorrente L228-3			Pai recorrente L3		
Planta	% alelos	Re1	Planta	% alelos	Re1
<u>163</u>	92,31	R	49	71,43	S
<u>208</u>	92,31	R	112	71,43	R
<u>339</u>	90,00	R	220	71,43	R
<u>91</u>	85,71	R	253	71,43	R
<u>73</u>	85,71	S	257	69,23	R
<u>242</u>	85,71	S	199	69,23	S
<u>329</u>	85,71	S	222	69,23	S
<u>302</u>	85,71	R	128	69,23	R
<u>89</u>	84,62	R	264	66,67	R
<u>324</u>	84,62	S	320	66,67	R
<u>65</u>	84,62	R	252	64,29	R
<u>273</u>	84,62	R	209	61,54	R
<u>275</u>	84,62	R	151	61,54	S
<u>201</u>	83,33	R	22	61,54	R
<u>235</u>	83,33	R	81	61,54	R
<u>268</u>	78,57	S	156	61,54	R
<u>111</u>	76,92	R	269	57,14	R
<u>113</u>	76,92	R	176	57,14	R
<u>168</u>	76,92	R	338	57,14	S
<u>206</u>	76,92	R	292	57,14	R
<u>237</u>	76,92	R	92	50,00	R
<u>323</u>	75,00	R	203	45,45	R
59	71,43	R	109	28,57	R
Média 72,24			Média 63,26		

1 Reação R e S indica plantas resistente e suscetível, respectivamente.

Conclusão

A genotipagem com marcadores moleculares foi realizada com sucesso e permitiu a obtenção de 13 marcadores segregantes para a população obtida pelo cruzamento de NAP Corn Stunt com L228-3 e 11 marcadores segregantes para a população obtida pelo cruzamento de NAP Corn Stunt com L3.

Espera-se melhor desempenho agrônomico das famílias derivadas das plantas 65, 89, 91, 111, 113, 163, 168, 201, 206, 208, 235, 237, 273, 275, 302, 323, 339 do retrocruzamento entre NAP corn stunt e L228-3 e das famílias plantas 416, 422, 432, 478, 499, 543, 549, 625, 667, 669 do retrocruzamento entre NAP corn stunt e L3.



Referências

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira:** grãos, safra 2009/2010, sexto levantamento, março 2010. Brasília, DF, 2010. 45 p. Disponível: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/4graos_07.01.10.pdf>. Acesso em: 06 maio 2010.

EMBRAPA MILHO E SORGO. **Seminário aborda rentabilidade com milho safrinha.** 2009. Disponível: <<http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2009/novembro/3a-semana/seminario-aborda-rentabilidade-com-milho-safrinha/?searchterm=milho%20safrinha%202010>>. Acesso em: 06 maio 2010.

LOPES, M. A. O Sistema Brasileiro de Pesquisa em Recursos Genéticos. In: CURSO INTERNACIONAL DE PRÉ-MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2006, Brasília, DF. [Anais...]. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. p. 30-36. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 185).

MIRANDA FILHO, J. B.; NASS, L. L.; SANTOS, M. X.; REGITANO NETO, A. **Avaliação de acessos de milho para resistência a doenças foliares.** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 147 p.

NASS, L. L.; PATERNIANI, E. Pre-breeding: a link between genetic resources and maize breeding. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 3, p. 581-587, 2000.

OLIVEIRA, E.; CARVALHO, R. V.; DUARTE, A. P.; ANDRADE, R. V.; RESENDE, R. O. OLIVEIRA, C. M.; RECCO, P. C. Molicutes e vírus em milho na safrinha e na safra de verão. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 1, n. 2, p. 38-46, 2002.

OPENSHAW, S. J.; JARBOE, S. G.; BEAVIS, W. D. Marker-assisted selection in backcross breeding. In: SYMPOSIUM ANALYSIS OF MOLECULAR MARKER DATA, 1994, Corvallis. **Proceedings....** Corvallis: American Society for Horticultural Science, 1994. p. 41-43.

PADILHA, L. **Marcadores moleculares semi-automatizados na caracterização e determinação da diversidade genética entre linhagens de milho tropical.** 2002. 85 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

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

YOUSEF, G. G.; JUVIK, J. A. Enhancement of seedling emergence in sweet corn by marker-assisted backcrossing of beneficial QTL. **Crop Science**, Madison, v. 42, n. 1, p. 96-104, Jan./Feb. 2002.

Apoio: FAPEMIG

