

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES  
MOLECULARES PARA A  
CARACTERIZAÇÃO DO GENE *gametófito  
indeterminado (ig1)* EM GENÓTIPOS DE  
MILHO**

**GLACY JAQUELINE DA SILVA**

**2009**

**GLACY JAQUELINE DA SILVA**

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MOLECULARES PARA A  
CARACTERIZAÇÃO DO GENE *gametófito indeterminado (ig1)* EM  
GENÓTIPOS DE MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal  
de Lavras como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em Agronomia,  
área de concentração em Biotecnologia Vegetal,  
para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Dr. Edilson Paiva

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2009

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Silva, Glacy Jaqueline.

Desenvolvimento de marcadores moleculares para a  
caracterização do gene *gametófito indeterminado (ig1)* em  
genótipos de milho / Glacy Jaqueline Silva. – Lavras : UFLA, 2009.  
48 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.  
Orientador: Edilson Paiva.  
Bibliografia.

1. Gametófito indeterminado. 2. Milho híbrido. 3. Marcadores  
moleculares. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.153

**GLACY JAQUELINE DA SILVA**

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MOLECULARES PARA A  
CARACTERIZAÇÃO DO GENE *gametófito indeterminado (ig1)* EM  
GENÓTIPOS DE MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 29 de maio de 2009

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva

UFLA

Dra. Claudia Teixeira Guimarães

EMBRAPA MILHO E SORGO

Dr. Edilson Paiva  
EMBRAPA MILHO E SORGO  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL

Dedico este trabalho a meus pais, que em todo momento me incentivaram, me apoiaram, que foram duros comigo quando precisei, mas carinhosos mesmo quando não mereci e que não me negaram recursos mesmo na dificuldade.

Cada página é dedicada a vocês dois: José e Nilva e aos meus irmãos Tiago e Francieli , com muito amor.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, pelo presente da vida a cada amanhecer.

À Universidade Federal de Lavras e ao programa de Biotecnologia vegetal, pela oportunidade.

À EMBRAPA Milho e Sorgo, pelo apoio técnico e possibilidade de realizar o experimento.

Aos meus pais, José Julio Rodrigues da Silva e Nilva Galeski da Silva por terem financiado meus estudos até este momento, sem nunca cobrar nada em troca.

Ao meu orientador, Dr. Edilson Paiva, pela oportunidade e ensinamentos transmitidos durante o experimento.

Ao meu coorientador, Ubiraci Gomes de Paula Lana, que me auxiliou sempre com seus conhecimentos, e foi imprescindível para a realização deste trabalho, e por quem tenho grande admiração.

Aos colegas e amigos de laboratório, em especial Miguel, Carlos, Belkiss, Marília, Flávia, Janaina, Jéssica, Mayra, Fernanda e Célio, pela amizade e apoio técnico.

Ao Marcelo Rabel, pelo conhecimento transmitido e ajuda durante toda a realização do experimento.

Aos Pesquisadores Sidney N. Parentoni e Claudia T. Guimarães, pelas explicações, discussões e sugestões.

Aos colegas do galpão de melhoramento de milho, sempre prestativos.

Ao Dr. Paulo César Magalhães, pelo fornecimento dos campos experimentais.

Ao Dr. Ivan Schuster e Dra. Elisa S.N. Vieira, pelo apoio, confiança e amizade.

A minha amiga Rosane, que esteve presente em todos os momentos.

Aos amigos de mestrado, em especial Humberto, Kátia, Danielle e Nadia pela amizade e grupos de estudo.

As minhas grandes amigas Kelly e Brenda, presentes em todos os momentos, principalmente na distância.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meus mais sinceros agradecimentos.

## **EPIGRAFE**

"Não há garantia de que o universo se resigna às nossas predisposições. Mas não vejo como podemos tratar o universo sem estudá-lo. A melhor maneira de evitar abusos é que a população em geral seja cientificamente educada, para compreender as implicações de tais investigações. Em troca da liberdade de investigação, os cientistas estão obrigados a explicar seus trabalhos. Se a ciência é considerada um sacerdócio fechado, muito difícil e elitista para a compreensão da pessoa média, os perigos de abuso são maiores. Mas se a ciência é um tópico de interesse e preocupação geral - se tanto suas coisas boas como suas conseqüências sociais forem discutidas regular e competentemente nas escolas, na imprensa, e nas mesas familiares - teremos aumentado enormemente nossas possibilidades de entender como é realmente o mundo, e como melhorar a ele e a nós mesmos." (Carl Sagan)

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO.....	i
ABSTRACT .....	iii
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	4
2.1 Histórico e importância do milho .....	4
2.2 Milho híbrido .....	5
2.3 Obtenção de híbridos comerciais de milho .....	6
2.4 Plantas haploides.....	8
2.4.1 Gene $R^{nj}$ .....	11
2.4.2 Sistema gametófito indeterminado ( <i>ig1</i> ).....	11
2.5 Marcadores moleculares .....	14
2.5.1 Sequenciamento de ácidos nucleicos e bioinformática.....	17
3 MATERIAL E MÉTODO .....	19
3.1 Material genético .....	19
3.2 Extração e amplificação do DNA genômico .....	20
3.3 Identificação dos marcadores moleculares específicos para o gene <i>Ig1</i> .....	23
3.4 Florescimento .....	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1 Marcadores Moleculares específicos para o gene <i>gametófito indeterminado1</i> .....	27
4.2 Plantas no campo .....	32
4.3 Contagem de sementes e análise visual .....	35
5 CONCLUSÕES .....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

## RESUMO

SILVA, Glacy Jaqueline da. **Desenvolvimento de marcadores moleculares para a identificação do gene *gametófito indeterminado1 (ig1)* em milho**. 2009. 48p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG<sup>1</sup>.

Uma técnica disponível para a obtenção de milho híbrido é a utilização de haplóides duplicados (duplo haplóides), pois esta diminui o tempo para a obtenção de linhagens endogâmicas. Os haplóides em milho são obtidos a partir de linhagens indutoras, androgenéticas, ou gimnogenéticas. Porém, estas linhagens são adaptadas a climas temperados, e em climas tropicais, sofrem com o foto-período, diferença de temperatura e ataque de pragas. A linhagem de milho Wisconsin-23 (W23), indutora de haploidia androgenética (haplóides provindos do macho), possui um gene mutante, denominado de *gametófito indeterminado1 (ig1)* que, entre seus efeitos, causa degeneração no saco embrionário do grão de milho, formação de 16 ou mais núcleos polares, ao invés de 8, levando o aparecimento de sementes defeituosas e poliembriônicas, e resultando em cerca de 3% de haploides. Uma alternativa para o uso de duplo-haploides, a partir da linhagem W23, seria a incorporação do gene *ig1*, e o marcador morfológico *r-navajo*, em uma linhagem tropical. Os objetivos deste trabalho foram: desenvolver um marcador molecular específico e co-dominante para o gene *gametófito indeterminado1*; validar o gene *ig1* em 3 famílias em F<sub>3</sub> tropicalizadas, provindas do cruzamento do híbrido simples BRS1010 com a linhagem temperada W23, verificar a presença do gen *ig1* em uma fonte da linhagem temperada W23, e em plantas provindas de sementes poliembriônicas, da mesma linhagem W23, e avaliar características morfológicas descritas como sendo derivadas das anormalidades causadas pelo mutante, como poliembriônia, sementes defeituosas, abortadas e plantas macho-estéreis. Entre as famílias em F<sub>3</sub> tropicalizadas, a segregação mendeliana realizada através do teste de Qui-quadrado, foi a esperada, 1:2:1 a 5% de probabilidade. A família 90109 teve, segundo o marcador molecular, 26 plantas *IgIg*, 51 plantas *Igig* e 14 plantas *igig*. A família 91202 apresentou 27 plantas *IgIg*, 50 plantas *Igig* e 18 plantas *igig*. A família 91207 apresentou 24 plantas *IgIg*, 41 plantas *Igig* e 14 plantas *igig*. Todas as plantas provindas da linhagem temperada W23 foram homocigotas para o gene *igig*. A porcentagem de sementes defeituosas, dentre as famílias em

---

<sup>1</sup>Comitê Orientador: Edilson Paiva – Embrapa Milho e Sorgo (Orientador) e Ubiraci Gomes de Paula Lana – EMBRAPA (Coorientador)

F<sub>3</sub> foi de 1,46% para o gene *IgIg*, 11,45% para o gene *Igig* e 19,36% para o gene *igig*. A porcentagem de sementes poliembrionicas, para as mesmas famílias foi de 0% para espigas homozigotas para o gene *IgIg*, 3,32% para espigas de plantas heterozigotas e 8,08% para espigas homozigotas para o gene *igig* mutante. Trinta e quatro plantas macho-estéreis foram encontradas em campo, mas somente nas famílias tropicalizadas. Portanto, acredita-se que neste caso, não se pode vincular a macho-esterilidade com a presença do mutante *ig*. Os marcadores moleculares mostraram-se eficientes para a identificação do gene *ig1*, os quais podem ser utilizados como ferramenta para seleção assistida em programas de melhoramento visando à produção de genótipos haploides.

## ABSTRACT

SILVA, Glacy Jaqueline da. **Development of molecular markers for identification of *indeterminate gametophyte1(ig1)* gene in maize.** 2009. 48p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG<sup>2</sup>.

The duplicated haploids (doubled haploids) technology is an alternative to generate lines to be used in the maize hybrids breeding production programs. This technique allows one to obtain inbred lines in a shorter time than conventional breeding. The haploids in maize are obtained using androgenetic or gynogenetic inducer maize lines. However, these lines are adapted to temperate climates, and in tropical climates they suffer with temperature and are susceptible to several diseases. Wisconsin-23 (W23) is a maize line that induce androgenetic haploids (derived from the male parental), which has a mutant gene called *indeterminate gametophyte1 (ig1)*. This gene, among other effects, causes degeneration of the embryo sac in maize grains, which results in seeds with defects, poliembryonic seeds and up to 3% of haploid seeds. An alternative to increase the percentage of haploid seeds obtained from the temperate maize line W23, and at the same time, solve the problem of non-adaptation to tropical conditions, would be the incorporation of *ig1* gene, and the morphologic marker r-navajo into a tropical maize line. The objectives of this work were to develop a co-dominant and specific molecular marker for the *indeterminate gametophyte1(ig1)* gene, to characterize the presence or absence of the gene in 3 tropical family in F<sub>3</sub> obtained from the crossing of the simple hybrid BRS1010 with W23 line, to evaluate the segregation of the *ig1* gene in a stock of W23 line in plants that came from poliembryonic seeds, and to evaluate morphologic abnormalities described as result of the presence of the mutant gene (*ig1*), such as poliembryony, defective and unfertilized seeds, and male-sterile plants. Among the tropical family, the expected 1:2:1 Mendelian segregation was confirmed with the Qui-square test (P=0.05). The molecular markers Ed2/Ed4 and Igc/Igf were efficient in the identification of the *ig* gene. Screening using the above molecular markers showed that the family 90109 produced 26 plants *IgIg*, 51 plants *Igig* and 14 plants *igig*. The family 91202 exhibited 27 plants *IgIg*, 50 plants *Igig* and 18 plants *igig*. In the family 91207 were found 24 plants *IgIg*, 41

---

<sup>2</sup> Guidance Committee: Edilson Paiva – Embrapa Milho e Sorgo (Adviser) e Ubiraci Gomes de Paula Lana – EMBRAPA (Coadviser)

plants *Igig* and 14 plants *igig*. All the plants that came from the W23 temperate stock were homozygote to the *igig* gene. Among the tropical family, the percentage of defective seeds varied from 1.46% for *IgIg*, 11.45% for the *Igig* and 19.36% for the *igig* genotypes. In the same family, the percentage of poliembryonic seeds varied from 0% on ears of homozygote plants for the *Ig* gene, 3.32% on ears that came from heterozygote plants and 8.08% on ears of homozygote plants for the *ig* gene. Thirty four male-sterile plants were found in the field, but only in tropical families. Our results indicate that in this case, the male-sterility may not be linked with the presence of the mutant *igl* gene. The Ed2/Ed4 and IgC/Igf molecular markers proved to be a reliable selection tool in breeding programs aiming the production of haploids genotypes.

## 1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays ssp. mays*) é uma espécie da família das gramíneas, sendo o único cereal nativo do Novo Mundo. A mais antiga espiga de milho foi encontrada no vale do Tehucan, na região onde hoje se localiza o México, datada de 7.000 a.C. Ao longo do tempo, o homem promoveu uma crescente domesticação do milho por meio da seleção visual no campo, considerando importantes características, tais como produtividade, resistência a doenças e capacidade de adaptação, dentre outras, dando origem às variedades hoje conhecidas (Paterniani, 1993; Ranere et al., 2009).

O desenvolvimento de linhagens endogâmicas utilizada na produção de cultivares híbridos, foi responsável pelo grande impulso que o melhoramento genético convencional tomou no início do século passado, pois facilitou aos programas de melhoramento, introduzir novas características ao milho, como resistência a doenças e pragas, maior proteção dos grãos (empalhamento), maior resposta às práticas de manejo, melhor qualidade nutricional e menor tombamento e quebraimento de plantas. Essas características fizeram com que o milho se adaptasse a diferentes regiões, condições de clima, solo e finalidade de uso, tanto que hoje, ele é produzido e consumido em todos os continentes, e só perde em produção para o trigo e o arroz, sendo quase 100% da produção, provinda do cultivo de milho híbrido (Paterniani, 1993).

Em um programa de melhoramento de milho híbrido, a etapa mais onerosa e demorada é a obtenção e avaliação das linhagens endogâmicas. Uma alternativa disponível para aperfeiçoar a obtenção de linhagens puras consiste na obtenção de linhagens homocigotas instantâneas pelo uso de haploides duplicados, relatado por Chase (1952).

O processo de obtenção de linhagens homozigotas instantâneas diminui o tempo para obtenção de linhagens endogâmicas, linhagens essas necessárias para a produção de milho híbrido.

Kermicle (1969) relatou uma mutação no alelo do gene *ig*, presente na linhagem Wisconsin 23 (W23) denominada por *gametófito indeterminado*. Essa mutação produz haploides de origem paterna (androgenético) e causa alterações significativas na estrutura de embriões de grãos de milho. Foi observado que a presença do gene *ig* permite a ocorrência de um número variável de divisões mitóticas, resultando em um saco embrionário com 16 núcleos ou mais ao invés dos oito núcleos observados normalmente, exibindo hetero-fertilização, poliembrião e variação no nível de ploidia do endosperma depois da fertilização. Esta mutação afeta também a migração nuclear e a diferenciação celular (Kermicle, 1971; Lin, 1981; Sheridan & Huang, 1996; Guo et al., 2004).

Uma maneira de identificar os haploides provindos da linhagem W23 seria a incorporação do gene *r-navajo* como marcador morfológico. As sementes são caracterizadas pelo desenvolvimento de um profundo pigmento púrpuro no embrião. Sementes com a pigmentação do endosperma e a não pigmentação do embrião são consideradas sementes haploides (Chase & Nanda, 1966). Porém, o marcador fenotípico sofre variações ambientais, o que pode resultar em faltas identificações de possíveis haploides.

Uma outra opção para a identificação de grãos de milho haploide, seria através da análise por marcadores moleculares do tipo microssatélites. Os marcadores moleculares são utilizados no melhoramento assistido, pois permite reduzir o tempo da seleção.

Um método mais preciso capaz de identificar o gene *gametófito indeterminado1*, responsável por produzir haploides androgenéticos, é a identificação do gene, através da construção de marcadores moleculares

específicos, desenhados a partir de informações obtidas em banco de dados públicos.

A utilização da linhagem W23 para a obtenção de haploides de milho não é viável nas condições tropicais de cultivo, já que esta linhagem é temperada, apresentando sensibilidade ao foto-período e temperatura, além de ser muito susceptível ao ataque de doenças. Uma alternativa seria transferir o gene *gametófito indeterminado1* e o gene *r-navajo* para uma linhagem tropical.

Assim, os objetivos desse trabalho foram desenvolver marcadores moleculares específicos para a identificação dos alelos do gene *ig1* visando acelerar a obtenção de genótipos tropicais de milho indutores de haploidia. Avaliar a presença do gene *gametófito indeterminado1* em uma fonte da linhagem temperada W23, em plantas providas de sementes poliembriônicas da mesma linhagem temperada Wisconsin-23, e validar o gene em três famílias em F<sub>3</sub> vindas do cruzamento da linhagem W23 com o híbrido simples BRS1010. Foram analisadas também, características fenotípicas em plantas como macho-esterilidade, sementes defeituosas, abortadas e poliembriônicas, que segundo vários autores, são indicativos da presença do gene mutante *gametófito indeterminado1*.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Histórico e importância do milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma espécie da família das gramíneas e é o terceiro cereal mais cultivado no planeta, perdendo apenas para o trigo e o arroz.

Originário da América, provavelmente da região onde hoje se situa o México, o milho foi domesticado num período entre 7.000 e 10.000 anos atrás. Índícios de pólen de milho foram encontrados em San Andres, na costa Caribenha, que datam de 7.300 anos (Pope, 2001).

Como resultado da seleção, tanto artificial, praticada pelo homem, como natural, para adaptação às diferentes condições ecológicas, o homem civilizado herdou dos povos mais antigos cerca de 300 raças de milho, caracterizadas pelas mais diversas adaptações, tanto para condições climáticas, como para os vários usos do cereal. Acrescenta-se ainda a diversidade de variedades intra-raciais e a enorme quantidade de genes identificados, o que torna o milho a espécie botânica de maior diversidade genética existente na natureza (Paterniani, 1993; Ranere et al., 2009).

O mundo planta cerca de 150 milhões de hectares de milho com uma produção que oscila entre 550 a 600 milhões de toneladas, tendo como principais produtores os Estados Unidos, China, Brasil, México, França, Argentina e Índia. (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE, 2007)

A produção de milho no Brasil vem crescendo ano após ano, pois passou dos 20 a 25 milhões de toneladas na década de 80, para 30 a 35 milhões nos anos 90 (Peixoto, 2002). Na safra 2007/08, a colheita foi de cerca de 58,59 milhões de toneladas, 14% (7,21 milhões t) superior à safra de 2006/07 (Companhia Nacional de Abastecimento-CONAB, 2008).

Os maiores consumidores de milho no Brasil são os criadores de aves (de corte e de postura) e suínos, que utilizam o milho para a produção de ração. (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-Ibge, 2006). Seu uso industrial não se restringe à indústria alimentícia, sendo largamente utilizado na produção de elementos espessantes e colantes e na produção de óleos. Recentemente, a Europa e EUA tem incentivado seu uso para produção de etanol. Na alimentação humana, o milho é comumente empregado na forma *in natura*, como milho verde; e na forma de subprodutos, como pão, farinha e massas (Pinazza & Alimandro, 1998).

## **2.2 Milho híbrido**

George Harrison Shull (1909) foi o primeiro a sugerir um método de melhoramento de milho visando à produção de milho híbrido (Miranda Filho & Viégas, 1978).

Os trabalhos de melhoramento com milho híbrido no Brasil tiveram início em 1932 no Instituto Agrônomo de Campinas - IAC, no Estado de São Paulo, e em 1935 na Universidade Federal de Viçosa - UFV, em Minas Gerais, sendo o Brasil o segundo país a adotar a produção de milho híbrido (Krug et al., 1943; Magnavaca & Silva, 1974).

O milho híbrido representa, sem dúvida, uma notável contribuição para o avanço da agricultura do país, especialmente considerando-se o desenvolvimento de uma vigorosa e competitiva indústria de sementes. De todas as regiões tropicais e subtropicais, onde este tipo de milho tem sido utilizado, é o Brasil o país onde se pode constatar efetivamente a sua contribuição mais significativa para a agricultura (Paterniani, 1993).

O método de milho híbrido baseia-se na produção de linhagens endogâmicas que são obtidas após sucessivas autofecundações de uma planta, onde o pólen de cada uma é coletado da parte masculina (pendão) e depositado

sobre a parte feminina (os estigmas) da mesma. Em geral, após seis a sete autofecundações, que levam em torno de 3 a 4 anos, obtém-se uma nova linhagem. (Bueno et al., 2001).

Paterniani (1974) relatou vantagens e desvantagens na utilização de milho híbrido. Entre as vantagens tem-se: A associação de características de distintos progenitores; obtenção de genótipos superiores em um prazo relativamente curto; utilização de interações gênicas na geração híbrida; produção de genótipos uniformes e maior homeostasia em F1. Como desvantagens, o mesmo autor descreve que somente parte dos genes úteis existentes no milho é utilizada se não existir métodos que permitam aumento da frequência de alelos favoráveis; a heterose é explorada de modo aleatório, atingindo um teto difícil de ser ultrapassado; a produção da semente híbrida só é viável onde houver facilidade para seu processamento e distribuição.

### **2.3 Obtenção de híbridos comerciais de milho**

Em um programa de híbridos, a etapa mais onerosa e demorada é a obtenção e avaliação das linhagens endogâmicas. Para a obtenção de híbridos, vários métodos podem ser utilizados (Miranda Filho & Viégas, 1978).

O método padrão consiste de sucessivas autofecundação na população fonte de linhagens. As plantas são selecionadas por suas características fenotípicas, como vigor, resistência a doenças e bons caracteres agrônômicos. Selecionam-se individualmente as melhores famílias e os melhores indivíduos, dentro de cada família, para serem novamente autofecundados. O processo se repete até que a homozigose virtualmente completa seja atingida em S<sub>6</sub> ou em gerações mais avançadas de autofecundações.

O método de cova única difere do método padrão pelo fato de cada progênie ser representada por uma única cova com três plantas, em vez de uma

linha com várias plantas, reduzindo assim a área plantada, permitindo aumentar o número de progênies a serem avaliadas.

O método genealógico consiste na escolha de duas linhagens que se combinam bem, e tenta-se o isolamento de novas linhagens de segundo ciclo do híbrido resultante por endogamia, como no método padrão.

Segundo Hallauer (1967), o método do híbrido críptico consiste na avaliação de famílias de irmãos germanos (híbridos duplos crípticos), obtidos pelo cruzamento entre plantas prolíficas e não endogâmicas ( $S_0$ ). Simultaneamente ao cruzamento, a segunda espiga é autofecundada. As famílias de irmãos germanos ( $S_0 \times S_0$ ) são avaliadas em ensaios com repetição, para identificar os melhores cruzamentos. As progênies  $S_1$  correspondentes às melhores combinações são plantadas aos pares e cruzadas para se obter a geração seguinte. Esse processo é repetido até que se obtenha a homozigose desejada nas linhagens a serem usadas na produção de híbridos simples ( $S_n \times S_n$ ).

O método de seleção zigótica é uma variação do método de híbrido críptico. As plantas da população são cruzadas com a linhagem padrão (L) e ao mesmo tempo autofecundadas. As progênies de irmãos germanos ( $S_0 \times L$ ) são avaliadas da mesma forma que o método de híbrido críptico. As progênies  $S_1$  correspondentes aos melhores cruzamentos são cruzadas novamente com a linhagem padrão e autofecundadas até que se consiga o grau de endogamia desejado para a obtenção de um híbrido.

Uma outra alternativa disponível na cultura de milho para aperfeiçoar a obtenção de linhagens puras é a técnica de obtenção de linhagens homozigotas instantâneas pelo uso de haplóides duplicados, também conhecidos como duplo-haploides (Chase, 1952).

## 2.4 Plantas haploides

O primeiro relato de plantas haploides na natureza foi descrito em *Datura stramonium*, por Blakeslle et al. (1922). Desde então, o interesse na haploidia como uma ferramenta para o melhoramento genético de plantas tem aumentado com o desenvolvimento de métodos mais eficientes para a sua produção (Silva et al., 2002).

O uso de indução de haploidia para a obtenção de linhas puras permite obter linhagens após o cruzamento de um híbrido com um indutor de haploidia. Empresas de melhoramento genético de milho vêm trabalhando para aumentar a porcentagem de plantas haploides geradas por esse tipo de cruzamento. Alguns cruzamentos chegam a produzir de 10% a 20% de plantas de natureza haploide.

Após a obtenção e identificação de plantas haploides, ainda é necessário que seja feito o tratamento dessas plantas haploides, na fase de plântula, para dobrar o número de cromossomos e restabelecer a fertilidade das mesmas. Para isso, alguns métodos foram desenvolvidos, e consistem basicamente em emergir a plântula em colchicina (Deimling et al., 1997). A colchicina atua na organização das fibras do fuso durante a metáfase celular, impedindo a sua formação e a conseqüente disjunção dos cromossomos filhos, resultando em um dobramento dos cromossomos. Deimling et al. (1997) conseguiram uma taxa de 67% de plântulas com a fertilidade restaurada após o processo de duplicação de cromossomos com colchicina.

Em um processo normal de autofecundação em espécies de flores perfeitas, onde os genitores diferem em apenas dois pares de locos independentes, o genótipo recessivo *aabb* tem a probabilidade de ser encontrado na proporção de 1/16 na população F2. Entretanto, se for utilizada a haploidia o mesmo genótipo terá a probabilidade de ocorrência de 1/4. Isso devido à ausência dos heterozigotos, prevalecendo apenas quatro genótipos homozigotos. Com a obtenção de linhas homozigotas a variância aditiva é maximizada, os efeitos de

dominância são neutralizados e as vantagens em caracteres quantitativos podem ser maiores, uma vez que a seleção é realizada somente com base na aditividade, não havendo interferência dos efeitos de dominância e epistasia (Silva et al., 2002).

Esse processo permite reduzir significativamente o tempo para a obtenção de linhagens endogâmicas.

A tecnologia de duplicação de haploides pode ser utilizada para facilitar acesso ao germoplasma de parentais, já que necessitam de menos recombinação e segregação comparada com plantas normais (Heckenberger et al., 2005). Também aumenta a eficiência de seleção, pois aumenta a discrepância genética entre famílias e diminui a discrepância residual (Bordes et al., 2007). Além disso, linhagens provenientes de culturas duplo-haploides tendem a ter uma menor variância (causada por mutações) do que linhagens desenvolvidas por métodos convencionais, o que demonstra mais uma vantagem da utilização de culturas haplóides (Chase & Nanda, 1965).

O primeiro relato de milho haploide foi feito concorrentemente por L.F. Randolph e L.J. Standler em papers não publicados no ano de 1929, antes da reunião anual da *American Association for the Advancement of Science* (Chase, 1974). Nos anos seguintes, esses mesmos autores fizeram publicações a respeito de indução de milho haploide.

Dois tipos de produção de haploides são utilizados. Um é baseado em indução genética (*in vivo*) e a outra por meio de técnicas de cultura de tecido (*in vitro*). Os chineses foram os primeiros a obterem plantas androgenéticas de milho através de cultura de tecido, e desde então, pesquisadores de vários países vem analisando os fatores genéticos e ambientais que levam ao surgimento de deste fenômeno (Beckert, 1994). Porém, a cultura de anteras em milho e outras leguminosas tem se mostrado uma metodologia bastante complexa e cara

(Beckert, 1994; Santos & Zanettini, 2002). Geralmente, a obtenção de milho duplo-haplóide está ligada a um fator genético específico (Beckert, 1994).

Em milho, a obtenção de haploides espontaneamente ocorre em uma frequência <1/1000 (Chase, 1963, 1974). Para aumentar a frequência de indução de haplóides, métodos como indução *in vivo* foram desenvolvidas. A indução *in vivo* baseia-se na utilização de linhagens indutoras. A maioria dessas linhagens é derivada de duas linhagens temperadas, a Stock 6 que gera haplóides gimnogenéticos, ou de origem materna (Coe Junior, 1959) e W23 que gera haplóides androgenéticos e possui uma mutação no alelo do gene *IG*, produzindo o alelo *ig*, nomeado de *gametófito indeterminado1* (Kermicle, 1969).

A frequência de haploides desenvolvidos com o sistema W23 - *ig1* varia de 1 a 3% (Kermicle, 1969, 1973). Já o sistema Stock 6 possui uma frequência de 3,23% (Sarkar & Coe Junior, 1966). Atualmente, empresas de melhoramento genético de milho vêm tentando aumentar a frequência de indução de haploides em seus programas. Lashermes & Beckert (1988) cruzaram a linhagem W23 com a linhagem Stock6 e obtiveram a linha indutora WS14, com uma taxa de indução de 3 a 5%. Sarkar et al. (1994) obtiveram uma taxa de indução de 6% nos cruzamentos realizados.

O mecanismo molecular de indução de milho haploide não foi totalmente compreendido, porém, há indícios de que em linhas haploides, dois espermatozoides são desenvolvidos com diferentes velocidades (Bylich & Chalyk, 1996). Como resultado, um dos espermatozoides desenvolve-se em um estágio pronto para a fertilização, enquanto que o outro não. A existência de somente um espermatozoides normal em um grão de pólen pode ser a razão para a quebra da fertilização dupla e o desenvolvimento de grãos haploides (Enaleeva & Tyrnov, 1996).

Em milho, como em muitas outras plantas, o citoplasma é de ascendência materna, isto é, na formação do zigoto, o espermatozoides contribui

apenas com o material nuclear, enquanto que o oócito contribui tanto com núcleo quanto com citoplasma. Na androgênese, é provável que o núcleo masculino utilize o citoplasma do oócito, sem participação do núcleo feminino, para formar o zigoto androgenético. A frequência de que a androgênese ocorra em milho na natureza é de 1/80000 (Chase, 1963).

#### **2.4.1 Gene $R^{nj}$**

Para diferenciar haploides de diploides ainda no estágio embrionário, Chase & Nanda (1965) desenvolveram um sistema que utiliza um parental masculino denominado “*Purple embryo Marker*” ou “PEM” que utiliza um conjunto de genes *b*, *pl A*, *C R<sup>nj:Cudu</sup>*, *pr*, *P<sup>wr</sup>*. O marcador e os híbridos são caracterizados pelo desenvolvimento de um profundo pigmento púrpuro no embrião (Chase & Nanda, 1966). Plantas com a pigmentação do endosperma e a não pigmentação do embrião são consideradas plantas haploides (Chase & Nanda, 1966; Eder & Chalyk, 2002). O gene *RI-nj* está presente no loco R do cromossomo 10. O gene *RI-nj* tem algumas limitações, como a dificuldade em se isolar alguns genótipos haplóides devido a presença de genes dominantes existentes em milho (*C1-I*, *C2-I<sup>df</sup>* e *I<sup>nl</sup>-ID*) que inibem a síntese de antocianina, a mesma que seleciona os grãos haploides (Coe Junior, 1994; Eder & Chalyk, 2002). Outro fator que pode influenciar negativamente, mascarando a expressão do gene *RI-nj* é a coloração vermelha no pericarpo, quando este estiver presente (Chase, 1952).

#### **2.4.2 Sistema gametófito indeterminado (*ig1*)**

O gene denominado como *gametófito indeterminado (ig1)* é utilizado para aumentar a frequência na produção de haploides androgenéticos em alta frequência (Chase, 1974), ou seja, produção de embriões haploides de origem

paterna. O mesmo restringe o potencial embriogênico das células, que produz somente um dos dois parentais genômicos (Kermicle, 1969; Evans, 2007).

Ele foi identificado como causador de alterações significativas na estrutura dos embriões de milho (Kermicle, 1969). Observou-se que a presença do gene *igl* permite a ocorrência de um número variável de divisões mitóticas, resultando em um saco embrionário com 16 núcleos ou mais ao invés dos oito núcleos observados normalmente (Lin, 1981; Sheridan & Huang, 1996) (Figura 1). Como resultado destas divisões mitóticas extras, o indivíduo mutante (que apresenta o alelo *igl*) exibe hetero-fertilização, poliembrionia e variação no nível de ploidia do endosperma depois da fertilização. O saco embrionário possui sinergia múltipla, oócitos múltiplos e várias células centrais (Kermicle, 1971; Lin, 1981; Huang & Sheridan, 1996; Guo et al., 2004). Esta mutação afeta também a migração nuclear e a diferenciação celular (Lin, 1981; Sheridan & Huang, 1996).

O saco embrionário da planta que apresenta o gene *igl* mutante, exibe um comportamento anormal e variação na formação dos micro-tubos, durante e após a terceira divisão mitótica. Sheridan & Huang (1996) observaram o desenvolvimento de cinco padrões anormais: (a) divisão dessincronizada de pares de núcleos ocorridos em ambos os pólos calazal e micropilar; (b) posicionamento anormal de núcleos; (c) Divisão adicional ocorrendo no pólo nuclear; (d) oito núcleos livres se expandem ao longo do saco embrionário; (e) uma quarta mitose ocorre em todos os núcleos da região micropilar e calazal. No saco embrionário do mutante *igl*, a fase proliferativa é prolongada, sugerindo que a função do tipo selvagem *igl* promova uma interrupção da proliferação da diferenciação no saco embrionário (Lin, 1981).

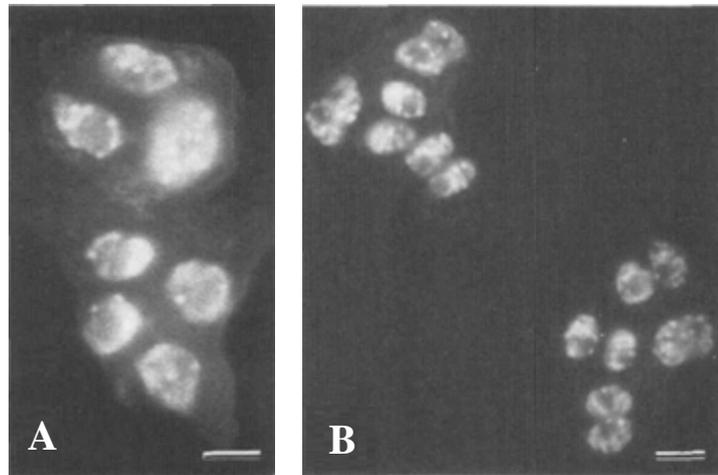


FIGURA 1 Comparação de um saco embrionário normal e um saco embrionário de um mutante contendo o gene *igl*.

(A) Saco embrionário normal, contendo oito núcleos polares (1 núcleo polar não pode ser visualizado devido ao ângulo da fotografia), após a megagametogenese.

(B) Saco embrionário de um mutante contendo o gene *igl*. Dezesesseis núcleos estão presentes no saco embrionário acima. Oito núcleos estão localizados no pólo micropilar (dois estão mais centralizados), e outros oito núcleos estão localizados no pólo calazal.

Microfotografia eletrônica de transmissão (Huang & Sheridan, 1996).

A habilidade das células extras e núcleos funcionarem como células ovo ou núcleos polares, parecem depender da sua posição no saco embrionário. Devido a sua estrutura anormal, muitos desses embriões defeituosos dão origem a sementes anormais, que permitem a identificação do alelo que possui o gene *igl* (Evans, 2007).

O mutante *igl* não condiciona um processo em particular. Sua interferência ocorre anteriormente à formação do saco embrionário e altera a atividade de outros genes durante a formação deste, portanto seus efeitos

pleiotrópicos parecem ser independentes, não tendo relações uns com os outros (Lin, 1981; Huang & Sheridan, 1996).

O alelo *ig* se posiciona no braço longo do cromossomo três a 90 cM do locus *lg*<sup>2</sup>, o mais distal do braço curto (Kermicle & Demopulos-Rodrigues, 1980).

Segundo Evans (2007), o gene *igl* é amplamente expresso em uma variedade de tecidos em plantas de milho, como folhas, primórdios folheares, espigas imaturas, pendão imaturo, cabelo e palha jovem. O gene *igl* apresenta baixa expressão no endosperma, em raízes e grãos de pólen maduro e se expressa em várias partes florais, em vários estágios.

## **2.5 Marcadores moleculares**

Marcadores genéticos ou moleculares são todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdadas geneticamente (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A partir dos marcadores moleculares, tornou-se possível uma análise mais detalhada do genoma dos mais diversos organismos. Por meio desses marcadores, tornou-se possível correlacionar as estimativas de divergências genéticas entre linhagens com a produtividade dos híbridos, com a heterose manifestada por estes ou com a capacidade específica de combinação (Guimarães et al., 2006).

Os marcadores moleculares podem ser utilizados no melhoramento genético a curto, médio e longo prazo. Em curto prazo, incluem basicamente a identificação de origem parietal, identificação e proteção de cultivares, incorporação de linhas em grupos heteróticos, certificação de pureza genética, controle de cruzamento e estudos de diversidade e distancia genética. O médio e longo prazo permite quantificar a variabilidade genética existente em nível de

seqüências de DNA e correlacionar com a expressão fenotípica em mapeamento genético (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Bueno et al., 2001).

Até meados da década de 60, os marcadores utilizados em estudos de genética e melhoramento eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos, de fácil identificação visual (Ferreira & Grattapaglia, 1996) porém, o processo de avaliação destes marcadores é demorado, pois sua expressão depende do desenvolvimento da planta que pode estar sujeita às variações ambientais (Borém, 2001).

Os diferentes tipos de marcadores moleculares disponíveis atualmente permitem uma excelente amostragem do genoma dos mais diversos tipos de organismos.

Quatro tipos de marcadores têm sido utilizados em plantas: morfológicos, citológicos, bioquímicos e moleculares (Bueno et al., 2001). Enquanto os marcadores citológicos são de difícil monitoramento, os bioquímicos ou também chamados de isoenzimáticos, têm sido utilizados na caracterização de germoplasma e de forma mais limitada, na seleção indireta. Ambos apresentam baixo nível de polimorfismo (Bueno et al., 2001).

O primeiro tipo de marcador molecular que permitiu detectar as diferenças entre indivíduos diretamente no DNA surgiu no início dos anos 70. Tais marcadores, denominados RFLP (*Restriction Frangment Length Polymorphism*) surgiram após a descoberta das enzimas de restrição.

Na década de 80, a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ou reação em cadeia da polimerase foi desenvolvida e destacou-se pela facilidade de uso, rapidez, versatilidade e sensibilidade. A técnica envolve a síntese enzimática “*in vitro*” de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença de enzima e posterior visualização em gel de agarose ou poli-acrilamida sob eletroforese (Bueno et al., 2001). Com a criação da técnica de

PCR, marcadores moleculares baseados na amplificação do DNA foram desenvolvidos.

Welsh & McClelland (1990) e Williams et al. (1990) propuseram, independentemente, a utilização de pequenos iniciadores aleatórios oligonucleotídicos na reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) como um método de geração de marcadores moleculares polimórficos. Esta técnica, conhecida como RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), utiliza-se de um oligonucleotídeo sintético como iniciador do processo de amplificação, que produz um polimorfismo detectado na presença ou ausência de bandas discretas de DNA, sendo, portanto, de expressão dominante.

Os genomas eucariotos são densamente povoados por sequências simples repetidas, as quais consistem em um a seis nucleotídeos repetidos em tandem. Essas regiões são denominadas microssatélites, SSR (*Simple Sequence Repeats*) ou STR (*Short Tandem Repeat*). As seqüências de DNA que flanqueiam os microssatélites são geralmente conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, permitindo seleção de *primers* específico que amplificam, via PCR, fragmentos contendo o DNA repetitivo em todos os genótipos. Cada microssatélite constitui um loco genético altamente variável, multi-alélico, de grande conteúdo informativo.

Os mais recentes marcadores moleculares desenvolvidos, os SNPs (*Single-nucleotide polymorphism*), baseiam na detecção de polimorfismos resultantes da alteração de uma única base no genoma. Eles passaram a ter maior importância com o seqüenciamento dos genomas. Os marcadores SNPs possuem natureza bi-alélica e são abundantes no genoma, podendo ocorrer tanto em regiões expressas como regiões não expressas. Esse tipo de marcador genético é estável do ponto de vista evolucionário (Caixeta et al., 2006).

### **2.5.1 Sequenciamento de ácidos nucleicos e bioinformática**

O sequenciamento de ácidos nucleicos é um método que determina a ordem dos nucleotídeos de um fragmento de ácido nucleico (DNA ou RNA), para um posterior estudo nas mais diversas áreas da genética e biologia molecular. Esta técnica evoluiu rapidamente nos últimos 20 anos, partindo do sequenciamento manual, o qual é realizado em grandes cubas eletroforéticas, empregando marcadores radioativos e leitura manual das sequências de DNA, para sistemas automatizados de alto desempenho, com a utilização de sequenciadores automáticos de DNA, que sequenciam até cerca de 3GB de sequências em uma única corrida (Vilas-Boas & Vilas-Boas, 2006).

O sequenciamento da bactéria *Xylella fastidiosa* (Simpson et al., 2000), por pesquisadores brasileiros, incentivou o governo federal, através do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) a fazer investimentos significativos na formação de uma rede nacional de sequenciamento de genomas, tornando o Brasil, membro de um seleto grupo de países detentores desta tecnologia, tendo sequenciado o genoma de mais de uma dezena de organismos entre procariotos e eucariotos, desenvolvendo tecnologias próprias e direcionadas a problemas brasileiros (Vilas-Boas & Vilas-Boas, 2006).

Com a rápida expansão do volume de sequências biológicas na última década, produzidas pela automatização do sequenciamento de DNA e o acúmulo de outras informações, uma demanda por recursos cada vez mais modernos e especializados para a manipulação e análise computacional dos dados foi necessária, e com isso, surgiu a bioinformática (Binneck, 2006).

A bioinformática envolve o desenvolvimento de banco de dados (a maioria *on-line*) e algoritmos para contribuir com a pesquisa biológica no sentido de produzir informação útil e conhecimento. A utilização de computadores no manuseio e análise dos dados biológicos é indispensável,

devido à velocidade de processamento, poder de resolução de problemas através de programas apropriados e pela necessidade da comunicação dos dados através da internet (Binneck, 2006).

A partir do advento da bioinformática e do sequenciamento genômico, disponibilizou-se à comunidade científica dados de DNA dos mais diferentes organismos, possibilitando a construção de primers específicos para determinado gene ou fragmento de gene, caracterizado nos bancos de dados.

A partir da análise de sequências disponíveis em banco de dados, utilizando-se de recursos computacionais, é possível identificar o fragmento de interesse, e construir primers que flanqueiam esta mesma região. Essa estratégia elimina a necessidade de sequenciamento de DNA e é relativamente simples, além de ser extremamente específica, pois trabalha diretamente com o gene de interesse.

O gene *gametófito indeterminado1* foi sequenciado, e as informações acerca do mesmo estão disponíveis no banco de dados PUBMED (<http://www.pubmed.gov/>), com a identificação 17209126, ou pode ser acessado pelo código GI:120431390, através do banco de dados americano de sequências de DNA e proteínas, GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

### 3 MATERIAL E MÉTODO

Os trabalhos foram desenvolvidos no Núcleo de Biologia Aplicada (NBA), no campo experimental da Embrapa Milho e Sorgo, na cidade de Sete Lagoas - Minas Gerais.

#### 3.1 Material genético

Neste trabalho foram utilizadas 3 famílias em F<sub>3</sub> desenvolvidas pelo programa de melhoramento de milho da Embrapa milho e sorgo, que vieram do cruzamento da linhagem W23 com o híbrido simples BRS1010. Deste cruzamento foram encontradas 2 espigas em F<sub>1</sub> que possuíam 4 haploides (Belicuas, 2004). Essas espigas em F<sub>1</sub> foram inter-cruzadas, e com base no marcador  $R^{-nj}$ , as melhores espigas foram selecionadas para prosseguir em F<sub>2</sub>. Obteve-se haploides em 3 famílias. A indução variou de 0,4 até 0,6% (Rabel, 2008).

Foi utilizado também uma fonte da linhagem temperada indutora de haploidia Wisconsin-23 (W23) e plantas provenientes de sementes poliembriônicas obtidas a partir da seleção dentro da W23 (Tabela 1).

Foi plantado um total de 540 sementes, sendo 440 no campo e 100 em casa de vegetação. As sementes plantadas no campo tiveram um espaçamento de 20 centímetros entre plantas e 80 centímetros entre linhas, para melhor desenvolvimento e manejo. Para as sementes plantadas em casa de vegetação foram utilizados 50 vasos contendo 22 kg de pó substrato orgânico.

Vinte e cinco dias após a germinação das sementes coletou-se o tecido foliar para posterior extração de DNA e análise molecular, com marcadores moleculares específicos para o gene *igl*.

TABELA 1 Descrição do material genético utilizado no presente trabalho.

<b>Quantidade</b>	<b>Identificação</b>	<b>Local de Plantio</b>
100 sementes	SIB ⊗ Wisconsin 23	Casa de vegetação
100 sementes	SIB ⊗ Wisconsin 23	Campo
50 sementes	Poliembrionicas W23	Campo
90 sementes	F <sub>3</sub> - ⊗ (W23xBR1010) - 91207	Campo
100 sementes	F <sub>3</sub> - ⊗ (W23xBR1010) - 91202	Campo
100 sementes	F <sub>3</sub> - ⊗ (W23xBR1010) - 90109	Campo

### 3.2 Extração e amplificação do DNA genômico

A extração de DNA foi realizada utilizando o protocolo descrito por Saghai-Marooft et al. (1984) com modificações. Para isso, 500 mg de material vegetal foi macerado em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino, esse foi transferido para microtubos de 1,5 mL no qual adicionou-se 600 µL de tampão CTAB (2% (m/v) CTAB; 0,2 M Tris-HCl (pH 7,5); 1,4 M NaCl; 0,02 M EDTA (pH 8,0); 2% (v/v) β-mercaptoetanol. A mistura foi mantida em banho-maria a 65°C por 1 hora, com homogeneizações a cada 15 minutos. Posteriormente, realizou-se lavagem com mesmo volume de solução de clorofórmio-octanol (24:1 v/v), com homogeneizações constantes por 20 minutos. O material foi então centrifugado a 16.000 x g por 10 minutos e o sobrenadante transferido para novo micro-tubo onde se adicionou 800 µL de isopropanol a -20°C. Os microtubos foram mantidos a -20°C por 60 minutos. Após este período, os microtubos foram novamente centrifugados a 16.000 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 600 µL de etanol 70% (v/v) gelado. Os tubos foram novamente centrifugados a mesma velocidade por cinco minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado secado em centrífuga a vácuo por 5 minutos e ressuspensão em 100 µL de tampão

TE contendo RNase A (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA (pH 8,0); 0,1µg/µL RNase A).

As amostras de DNA foram quantificadas em gel de agarose 0,8% (m/v) em tampão TAE (40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA, pH 8,0), comparando-se com um padrão de DNA de concentração conhecida. Posteriormente foi realizada a eletroforese a 100V durante 1 hora, o gel incubado em solução de brometo de etídio (1 µg/mL) por 15 minutos, visualizado sob luz ultravioleta e fotografado no equipamento Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA). O DNA estoque foi diluído em água ultrapura na concentração de trabalho de 10 ng/µL e armazenado a -20°C.

As reações de amplificação foram realizadas em um termociclador modelo 9600 (Applied Biosystems®), em volume final de 10 µL, contendo 30 ng de DNA, solução tampão (10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 50 mM KCl; 0,01% m/v gelatina; 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>) 125 µM de cada um dos dNTPs; 0,25 µM de cada primer e 0,05 unidades da enzima Taq DNA polimerase da marca Invitrogen. Os ciclos de PCR constituirão de uma desnaturação inicial a 95°C por dois minutos, nove ciclos de 94°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos com redução de 1°C a cada ciclo e 72°C por 60 segundos, seguidos de 35 ciclos de amplificação. Finalmente a reação foi submetida a um período de extensão a 72°C por 10 minutos. Os fragmentos amplificados foram resolvidos em gel de agarose 2% (m/v) com eletroforese a 100V por 2 horas. O gel posteriormente tratado com brometo de etídio (1mg/mL), visualizado em UV e fotografado pelo Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA). Os fragmentos gerados foram avaliados considerando o tamanho dos alelos encontrados para cada combinação de primers, e avaliados quanto à homozigose e heterozigose.

Os primers específicos empregados no presente trabalho foram desenhados a partir da seqüência do gene *IgI*, a qual está disponível no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e a partir de informações obtidas

em trabalho realizado por Evans (2007). Este autor identificou um transposon denominado Hopscotch<sup>3</sup> (White et al., 1994) no alelo mutante do gene *Ig1*, inserido no códon 120, 14 bases antes do final da proteína do domínio LOB (Lateral organ boundaries), codificada pelo gene *Ig1*.

O autor disponibilizou em banco de dados publico, somente a sequencia do alelo sem o mutante, assim foi necessário desenhar a sequência do alelo mutante, ou seja, o gene *Ig1* juntamente com o transposon inserido. Com as informações da posição do transposon dentro do gene *Ig1*, juntamente com a informação dos sítios de restrição da enzima *Eco*-RI utilizada para digerir o DNA genômico das plantas contendo o alelo mutante *ig1* (Evans, 2007) foi possível realizar um trabalho *in-silico*, inserindo o retrotransposon na região proposta pelo autor.

Segundo essas informações, sugere-se que, como exemplifica a figura 2, a inserção do retrotransposon está no exon 2 e é composta por 4.828pb. O gene *Ig1* sem o retrotransposon possui 5.431 pares de base e possui 4 exons. O primeiro com 176 pb, o segundo com 422pb, o terceiro com 412pb e o quarto com 264pb.

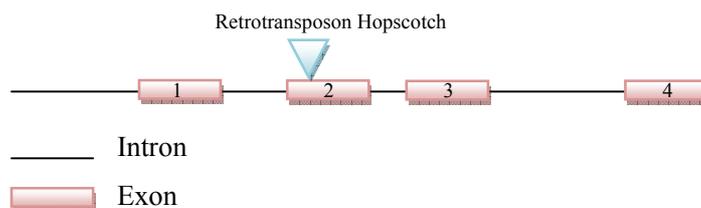


FIGURA 2 Esquema do gene *gametófito indeterminado1*, com a inserção do transposon hopscotch. O gene é composto por 4 exons. O hopscotch está inserido no exon 2.

<sup>3</sup> Hopscotch: Retrotransposon do tipo LTR. Descrito por White et al. (1994), como causador de uma mutação denominada *wx-K* no gene *wx*.

### 3.3 Identificação dos marcadores moleculares específicos para o gene *Ig1*

Para a amplificação dos fragmentos correspondentes aos alelos do gene *Ig1*, foram construídos diversos primers, porém, como havia poucas opções, se fossem levadas em consideração parâmetros como *melting temperature*, ausência da capacidade de dimerização, inexistência de sítios secundários de anelamento dos primers e baixa especificidade na ligação na extremidade 3', alguns desses iniciadores foram construídos desrespeitando um ou outro critério (Tabela 2).

Foram construídos *primers* para amplificar a região do gene com a mutação (inserção do retrotransposon). Um primer amplificando o gene e outro amplificando o retrotransposon. Para amplificar o DNA de amostras sem o mutante, foram construídos pares de primers em regiões do gene que estariam um acima do retrotransposon, e outro abaixo do mesmo, caso existisse o mutante na amostra (Figura 3).

TABELA 2 Primers construídos para a amplificação de fragmentos referentes ao gene *gametófito indeterminado1*.

<b>Primer</b>	<b>Região</b>	<b>Seqüência (5' - 3')</b>	<b>Bases</b>
IGA F	Gene <i>Ig1</i>	gaaagcgagcacacaacaaa	20
IGB F	Gene <i>Ig1</i>	ttttaggctcaggtcgctac	20
IGC F	Gene <i>Ig1</i>	cgagcacacaacaaacccta	20
IGD R	Gene <i>Ig1</i>	cgctacaaggaagaagagc	20
IGE R	Gene <i>Ig1</i>	ggacgtagctccaactagca	21
IGF R	Gene <i>Ig1</i>	tcatgcataattgtcctctacc	23
Ed1 F	Gene <i>Ig1</i>	gtcatctccatcctccagcacaac	24
Ed2 R	Gene <i>Ig1</i>	aactctgccatcgcttgagg	20
Ed3 R	Hopscotch	aaatcaaggagatcctgtgctatctacgt	29
Ed4 F	Hopscotch	acgtagatagcacaggatccttgattt	29

Para o sequenciamento parcial do gene *Ig1*, os diversos primers (Tabela 2) foram combinados entre si, para gerar fragmentos de diferentes tamanhos, e verificar a eficiência dos mesmos.

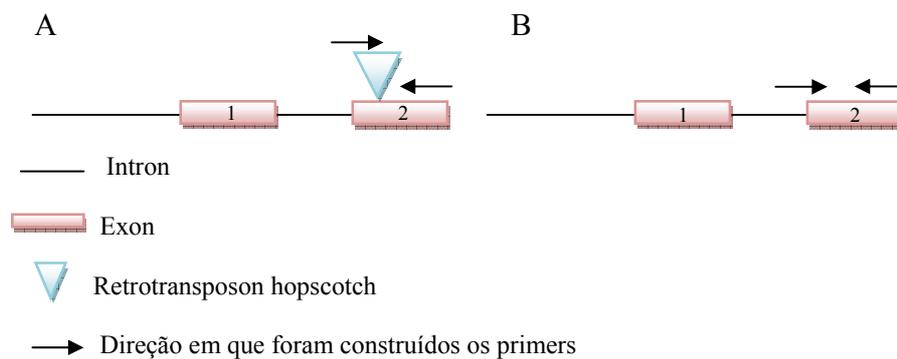


FIGURA 3 Esquema dos iniciadores construídos para amplificar as regiões de interesse do gene *gametófito indeterminado1*. A. Região correspondente a amplificação do mutante. B. Região correspondente a amplificação do gene sem o mutante.

As reações de amplificação por PCR foram preparadas em um volume final de 40  $\mu$ L, consistindo de 60 ng de DNA; 20 mM Tris-HCl (pH 8,4); 50 mM KCl; 2 mM  $MgCl_2$ ; 1 U Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0,125 mM dNTPs e 20 pmols de cada iniciador. Os ciclos de amplificação foram: desnaturação inicial a 95  $^{\circ}C$  por 2 minutos, 35 ciclos de 94  $^{\circ}C$  por 30 segundos, 55  $^{\circ}C$  por 30 segundos e 72  $^{\circ}C$  por 90 segundos, seguido por uma elongação final de 72  $^{\circ}C$  por 5 minutos, mantendo a reação à 4  $^{\circ}C$ .

Ao produto de PCR foram adicionados 5  $\mu$ L de tampão de amostra [0,15 % (m/v) azul de bromofenol; 0,15 % (m/v) xileno cianol; 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 5 mM EDTA pH 8,0; 50 % (v/v) glicerol e 0,5 % (m/v) SDS], sendo toda a mistura aplicada em gel de agarose 1 % (m/v) em tampão TAE. Após a eletroforese

realizada a 100 V durante uma hora, o gel foi incubado em solução de brometo de etídio (1 µg/mL) por 15 minutos, visualizado sob luz ultravioleta e fotografado no equipamento Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA). Os fragmentos amplificados foram removidos do gel e purificados com “QIAquick Gel Extraction Kit” (Qiagen, Valencia, CA) segundo as recomendações do fabricante. As amostras foram então eluídas em 50 µL de tampão EB (Qiagen, Valencia, CA), liofilizadas em centrífuga a vácuo e ressuspensas em 10 µL de água ultra-pura.

As reações de sequenciamento foram preparadas utilizando-se entre 50 e 100 ng do DNA purificado; 2 µL de Big Dye V3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA); 2 µL do tampão 5X (Applied Biosystems, Foster City, CA) e 5 pmols do iniciador, em um volume final de 10 µL. As reações foram submetidas a 96 °C por 20 segundos, 50 °C por 15 segundos, 60 °C por 4 minutos, repetidos por 30 vezes.

Posteriormente, 40 µL de isopropanol 75 % (v/v) foram adicionados a cada amostra, sendo incubadas durante 20 minutos no escuro e centrifugadas por 20 minutos a 16000 x g, descartando-se o sobrenadante. Foram adicionados 100 µL de etanol 70 % (v/v) ao precipitado, sendo os microtubos centrifugados a 16000 x g por 20 minutos, o sobrenadante removido e as amostras secas à temperatura ambiente no escuro. Em seguida, foram ressuspensas em 10 µL de formamida HiDi (Applied Biosystems, Foster City, CA), desnaturadas a 95 °C por 5 minutos e mantidas no gelo até a injeção no equipamento ABI3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

A qualidade das sequências foi avaliada pelo programa Seqman 3.57 (DNASTar, Madison, WI) e as sequências selecionadas foram alinhadas pelo programa ClustalW (Thompson et al., 1994).

### 3.4 Florescimento

Durante o florescimento, as plantas de milho foram avaliadas segundo a característica fenotípicas de macho esterilidade. Segundo Kermicle (1969) e Evans (2007), na presença do alelo mutante *ig*, a planta pode apresentar essa anormalidade.

Foi realizado autofecundação em todas as plantas que atingiram maturação fisiológica, com exceção das plantas das famílias em F<sub>3</sub> que apresentaram macho esterilidade. Para estas, foi realizado a polinização com pólen de plantas da mesma família (SIB), que apresentaram, segundo o marcador molecular, heterozigose ou homozigose recessiva para o gene *Ig1*.

Ao atingir a maturação fisiológica coletou-se 5 espigas de cada família de plantas em F<sub>3</sub> que ostentaram homozigose recessiva para o gene *ig1* mutante, 5 espigas de plantas que exibiram o alelo em heterozigose, 5 plantas que se apresentaram homozigotas dominantes, e 5 espigas da linhagem temperada W23, homozigotas recessivas para o gene, através da identificação pelo marcador molecular específico, desenvolvido para o gene *Ig1*, totalizando 50 espigas. As mesmas foram analisadas quanto à presença de sementes defeituosas e poliembriônicas<sup>4</sup> conforme descrição realizada por Kermicle (1969).

---

<sup>4</sup> A poliembriõnia (mais de um embrião numa semente) ocorre em algumas espécies, como *Poa alpina* - Poaceae, *Opuntia spp.* - Cactaceae, sendo comum em frutas cítricas (*Citrus spp.* - Rutaceae) e em manga (*Mangifera indica* - Anacardiaceae). O fenômeno da poliembriõnia pode ocorrer por clivagem da oosfera fecundada formando várias células iniciais zigóticas, ou por desenvolvimento de uma ou mais sinérgides, ou pela existência de vários sacos embrionários, ou ainda por várias formas de apomixia e embriõnia adventícia (a partir de células diplóides do nucelo). No linho (*Linum usitatissimum* - Linaceae) e em outras espécies, alguns dos embriões formados por poliembriõnia são haploides.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Marcadores Moleculares específicos para o gene *gametófito indeterminado1*

Inicialmente, os primers ED1, ED2, ED3 e ED4 foram combinados, entre si. A combinação ED2/ED4, gerou um fragmento de 443pb, (Tabela 3) referente ao alelo *ig*. A combinação ED1/ED2 gerou um fragmento de 287pb, referente ao alelo *Ig*, como mostra a tabela 3.

Após o sequenciamento e alinhamento destes fragmentos, foi verificado que a combinação ED1/ED2, apesar de corresponder a um fragmento do gene *ig1*, estava amplificando em todas as amostras testadas. Verificou-se que o produto amplificado era referente a uma região do genoma de milho que não correspondia ao gene *ig1*.

Posteriormente, para encontrar o melhor par de *primers* que amplificassem o alelo *Ig1*, foram realizadas combinações com os iniciadores IGA, IGB, IGC, IGD, IGE e IGF. Foram realizadas oito combinações (Tabela 3) e os fragmentos observados, corresponderam aos tamanhos esperados, de acordo com simulação *in silico*.

TABELA 3 Combinação de primers testados para a amplificação de fragmentos de DNA correspondentes ao gene *Ig1*. Fragmentos de DNA com o mutante e fragmentos sem o mutante

Combinação de iniciadores	Tamanho dos fragmentos gerados em pares de base	Combinação de iniciadores	Tamanho dos fragmentos gerados em pares de base
IGA/IGD	785 pb	IGC/IGD	780 pb
IGA/IGE	1.403 pb	IGC/IGF	1.342 pb
IGA/IGF	1.330 pb	ED1/ED2	287 pb
IGB/IGD	887 pb	ED2/ED4	443 pb
IGB/IGE	1.504 pb	ED1/ED3	4.705 pb
IGB/IGF	1.431 pb		

Para excluir a possibilidade de amplificação em regiões duplicadas do genoma, foi realizado um teste *in silico* com os primers correspondentes ao alelo *ig1* para verificar, segundo o programa BLAST N, quais seriam as melhores combinações, levando em consideração os genes ou regiões homologas aos mesmos. As melhores combinações foram dos iniciadores IGA/IGD, IGA/IGF, IGC/IGD e IGC/IGF, que apresentaram somente o gene *ig1* homólogo.

Esses fragmentos foram amplificados, sequenciados, e o que obteve o maior índice de similaridade com o genótipo depositado no banco de dados (Evans, 2007), foi o escolhido para amplificar toda a população, ou seja, o fragmento gerado a partir dos iniciadores IGC/IGF, com 97% de identidade com a seqüência do gene *gametófito indeterminado1* (Figura 4 e 5) depositado em banco de dados e com um valor de *e-value* igual a 0.0, segundo análise realizada através do programa BLAST-N.

Os resultados obtidos mostraram que todas as 72 plantas provindas de sementes poliembrionicas possuíam o gene *ig1* em homozigose recessiva, sugerindo, que o evento da poliembrionia é um indicativo seguro da presença do gene *ig1* em homozigose. Todas as plantas da linhagem temperada W23 apresentaram homozigose para o gene *ig1* (mutante). No principio acreditava-se que a baixa taxa de indução de haploides obtida por Rabel (2008), que utilizou esta mesma fonte da linhagem W23, resultasse de uma possível perda ou diluição do alelo *ig1* dentro da linhagem indutora utilizada, o que os resultados aqui contestam.

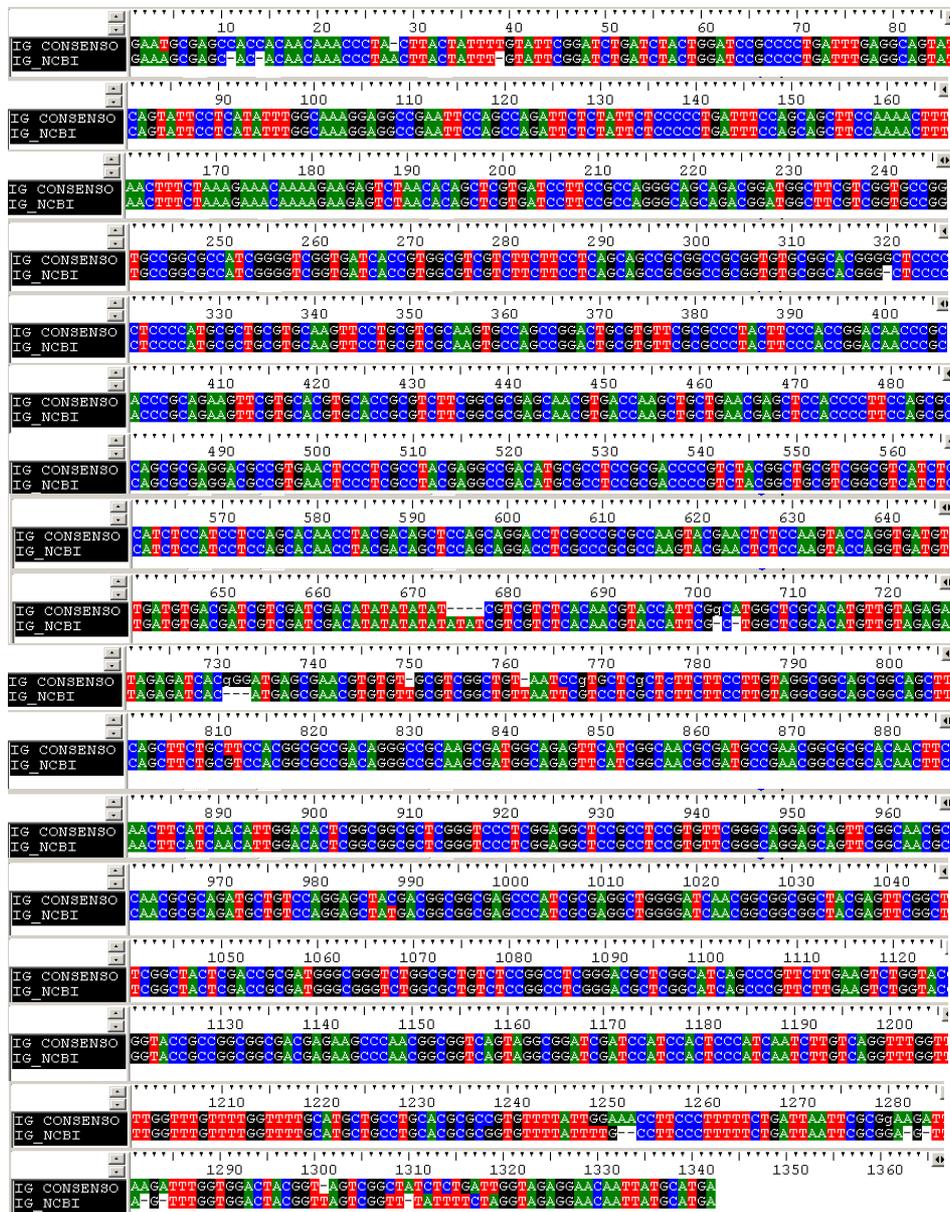


FIGURA 4 Resultado do alinhamento através do programa BioEdit, a partir da fita consenso do sequenciamento parcial do gene *gametófito indeterminado1*, com o mesmo gene depositado em banco de dados. O fragmento utilizado (IGC/IGF) apresentou um total de 1342pb, e apresentou 97% de similaridade com o respectivo gene.

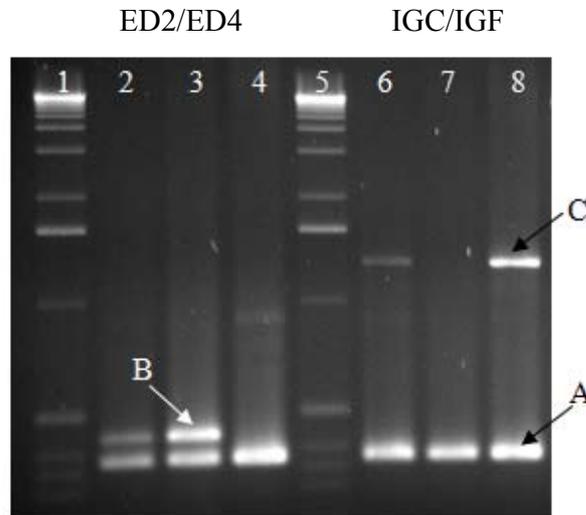


FIGURA 5 Perfil molecular dos indivíduos analisados em relação ao marcador molecular desenvolvido para o gene *IgI*. Canaletas 2, 3 e 4: Marcador molecular específico para o alelo recessivo (mutante) do gene (ED2/ED4). Canaletas 6, 7 e 8: Marcador molecular específico para o alelo dominante do gene (IGC/IGF). Canaletas 1 e 5: Marcador de peso molecular de 1Kb. Canaletas 2 e 6: Indivíduo heterozigoto para o gene *Igig*. Canaletas 3 e 7: Indivíduo homozigoto recessivo para o gene *igig*. Canaletas 4 e 8: indivíduo homozigoto dominante para o gene *IGI*. A: primer desenhado a partir de uma EST de milho, servido como controle para as reações, com 376 pares de base B: Fragmento de 436 pares de base, referente ao alelo recessivo do gene *ig1*. C: Fragmento de 1.311 pares de base, referente ao alelo dominante do gene *IG1*.

É sugerido, portanto, que o efeito de indução de haploides androgenéticos, através da presença do gene *ig1*, pode sofrer um efeito de penetrância incompleta, ou seja, não depende apenas de presença do alelo causador da mutação, mas sim, de algum fator de regulação desse gene, ou algum fator de crescimento, podendo envolver expressão diferenciada do mesmo.

Evans (2007) descreveu características fenotípicas na folha do mutante *igl*, sugerindo que o mesmo apresenta penetrância incompleta.

Penetrância incompleta em milho foi descrita também por Barret et al. (2008) que relatou que o alelo PK6 presente no locus *ggi1* (*gynogenesis inducer1*) que controla a gimnogênese *in situ* em milho, resulta em grãos de pólen com capacidade de formação de embriões femininos haploides e indica que o mesmo apresenta expressão gametofítica com caráter de penetrância incompleta. Outros genes com penetrância incompleta são descritos inclusive na espécie humana, como o gene *Gdf6* (CoaKwell et al., 2009) e o gene *RBI* (Mitter et al., 2009), ambos caracterizando doenças oculares.

As três famílias de plantas em F<sub>3</sub> mostraram os seguintes resultados para o alelo *Ig*: A família 91202 apresentou 27 plantas com o gene *Ig1* em homozigose dominante, 50 plantas heterozigotas e 18 plantas com o gene em homozigose recessiva, a família 91207 apresentou 24 plantas homozigotas dominantes, 41 plantas heterozigotas e 14 homozigotas recessivas. Já na família 90109, foram obtidas 26 plantas homozigotas dominantes para o gene *Ig1*, 51 plantas heterozigotas e 14 plantas homozigotas recessivas (Tabela 4). Esses resultados, após calcular o Qui-quadrado, mostram que a segregação mendeliana<sup>5</sup> esperada (1:2:1) foi alcançada, a 5% de probabilidade.

---

<sup>5</sup> Segregação mendeliana: ou segregação monofatorial, estabelece que os genes alelos de um zigoto não se misturam, mas segregam para gametas diferentes durante a meiose. Assim, os mesmos podem ser recuperados nas gerações seguintes (Paterniani, 1963).

TABELA 4 Resultado referente a análise molecular, separando as plantas em homozigotas e heterozigotas dentro dos seus referidos estoques.

Genótipos	<i>IgIg</i>	<i>Igig</i>	<i>igig</i>	Total
F <sub>3</sub> - $\otimes$ (W23xBR1010) - 90109	26	51	14	91
F <sub>3</sub> - $\otimes$ (W23xBR1010) - 91202	27	50	18	95
F <sub>3</sub> - $\otimes$ (W23xBR1010) -91207	24	41	14	79
Poliembrionicas - W23	00	00	72	72
Wisconsin 23	00	00	194	194

#### 4.2 Plantas no campo

As famílias em F<sub>3</sub> se mostraram superiores as plantas da linhagem W23 quanto ao seu potencial agrônomo, resistência a patógenos, apresentando espigas maiores e com maior número de grãos. As plantas da linhagem W23 composta somente por plantas poliembriônicas foram as que exibiram um desempenho agrônomo mais baixo, apresentando plantas fracas, e a maioria não apresentou espigas.

Em campo, foi visualizado um total de 34 plantas macho estéreis (Tabela 5) somente nas famílias em F<sub>3</sub>. Na linhagem W23, nenhuma situação de macho-esterilidade foi observada. (Figura 6).

O fenômeno de macho-esterilidade encontrado em algumas plantas em F<sub>3</sub>, eflui do fato de que um dos parentais da cultivar BR1010, progenitor das mesmas, possui macho-esterilidade, com espigas semelhantes às encontradas aqui, e não tem relação direta com a presença do gene *igl*, já que, de acordo com o marcador molecular, nem todas as plantas macho estéreis eram homozigotas recessivas para o gene.

TABELA 5 Quantidade de plantas macho-estéreis encontradas nos estoques das linhagens tropicalizadas e nos estoques da linhagem temperada W23

Nome	Plantas macho-estéreis
F3- 90109 X W23xBRS1010	7 plantas
F3- 91202 X W23xBRS1010	16 plantas
F3- 91207 X W23xBRS1010	11 plantas
Poliembrionicas - W23	0 plantas
Wisconsin 23	0 plantas

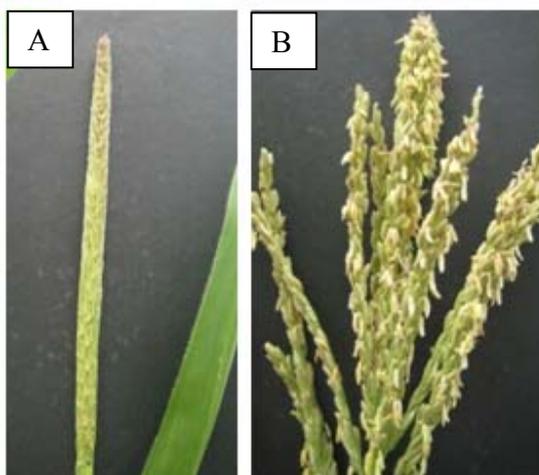


FIGURA 6 Diferença entre uma planta macho estéril encontrada no campo, e uma planta macho fértil. A: Planta apresentando macho esterilidade. B: Planta macho fértil.

As plantas da linhagem W23 apresentaram-se precoces em relação às famílias em  $F_3$  cerca de 25 a 30 dias. Belicuas (2004) observou uma diferença de 25 dias de florescimento entre a linhagem temperada W23 e um híbrido simples

comercial, nas condições tropicais de cultivo. Rabel (2008) observou uma diferença de duas semanas no florescimento da linhagem W23 em relação a um híbrido simples comercial, nas condições tropicais de cultivo.

Após o fim do ciclo, foi colhido um total de 265 espigas em todos os grupos avaliados (linhagem e famílias em  $F_3$ ) com grãos sadios. Porém, muitas espigas apresentaram começo de apodrecimento.

Todas as espigas obtidas neste trabalho apresentaram o marcador morfológico  $R\text{-}^{navajo}$ . No entanto, a intensidade do mesmo variou muito devido à condições ambientais, havendo muita variação inclusive dentro de uma mesma família. Em algumas espigas, o marcador se manifestou mais intenso na base e em outras a distribuição foi normal em todos os grãos. Em algumas espigas o marcador se expressou somente em uma pequena superfície do endosperma e expressou-se bem no embrião. Após as espigas serem debulhadas, foi constatado que algumas sementes apresentavam a coloração roxa no endosperma, e uma coloração muito fraca no embrião, o que poderia confundir as análises, já que, como as plantas foram retrocruzadas, todas as sementes deveriam apresentar o marcador tanto no endosperma, como no embrião. (Figura 7). Rabel (2008) encontrou uma porcentagem de até 82% de possíveis haploides em seu trabalho, levando em consideração apenas o marcador morfológico, porém auferido provavelmente devido à variação ambiental que o mesmo sofre. Já Kermicle (1969) afirma que a porcentagem alcançada, neste caso, é de 3%.

Apesar de o marcador  $RI\text{-}nj$  ser ineficiente, sua incorporação em uma linhagem tropicalizada é importante porque este marcador ajuda na pré seleção de sementes haplóides, excluindo um grande número de sementes diplóides.



FIGURA 7 Diferença da manifestação da cor roxa, devido à pigmentação de antocianina nos grãos de milho. As 6 sementes são provindas da família em F3-91202  $\otimes$  W23xBRS1010, porém de espigas diferentes.

#### 4.3 Contagem de sementes e análise visual

Após as espigas serem separadas em suas referidas linhagem e famílias, quanto a homozigose dominante, heterozigose e homozigose recessiva, foram escolhidas aleatoriamente, 5 espigas de cada representante (*IgIg*, *Igig*, e *igig*) as quais foram avaliadas determinando o número de sementes abortadas, defeituosas e poliembriônicas, que, segundo Kermicle (1969, 1971), seriam um indicativo da presença do alelo recessivo do gene *gametófito indeterminado1* (Tabela6).

TABELA 6 Resultado da avaliação visual feita em 49 espigas das famílias em F<sub>3</sub> (90109, 91202 e 91207) e da linhagem temperada W23, identificando sementes defeituosas e poliembriônicas.

<b>Gene</b>	<b>Genótipos</b>	<b>% de sementes defeituosas</b>	<b>% de sementes poliembriônicas</b>
<i>IgIg</i>	91207	1,60	0
	90109	1,52	0
	91202	1,27	0
	<b>Média</b>	<b>1,46</b>	<b>0</b>
<i>Igig</i>	91207	11	2,57
	90109	12,8	2,78
	91202	10,57	4,62
	<b>Média</b>	<b>11,45</b>	<b>3,32</b>
<i>Igig</i>	91207	25	9,26
	90109	12,6	5
	91202	20,5	10
	<b>Média</b>	<b>19,36</b>	<b>8,08</b>
<i>Igig</i>	W23		
	<b>Média</b>	<b>11,28</b>	<b>6,55</b>

Como pode ser observado na Tabela 6, dentre as 3 famílias em F<sub>3</sub> de plantas tropicalizadas, foi encontrado um número muito baixo de sementes defeituosas e abortadas nas espigas que não possuíam o mutante *igI*. Somente 1,46% de todas as sementes analisadas. Sementes abortadas e defeituosas (Figura 8 e 9) geralmente podem aparecer por diversos fatores como radiação solar, que pode causar danos ao material genético, oscilações térmicas e mesmo da ação de fungos ou bactérias. Não foram encontradas sementes poliembriônicas em nenhuma das 15 espigas identificadas como homozigotas dominantes para o gene *IgI*, resultado esse dentro do esperado, já que a poliembrião é uma característica própria da ação do mutante *igI*.

Analisando as espigas identificadas como heterozigotas (Figura 8), foi observado uma média de 11,45% de sementes abortadas e defeituosas e 3,32% de sementes poliembriônicas em 15 espigas provindas das 3 famílias em F<sub>3</sub>. Somente 14 espigas viáveis foram obtidas contendo o gene *ig1*. Portanto, a contagem de sementes foi realizada com 14 e não com 15 espigas para esta classe. Como apresentado na tabela 6, as espigas homozigotas recessivas para o gene *ig1*, apresentaram uma média de 19,39% de sementes defeituosas e abortadas, e 8,08% de sementes poliembriônicas.

Kermicle (1971), em seu estudo, identificou uma média de 1,93% de sementes defeituosas em grãos com o gene *IgIg* em homozigose, 15,92% para o gene *Igig* em heterozigose e 36,40% para o gene *igig* em homozigose.

Kermicle (1969) relatou o aparecimento de cerca de 6,6% (cerca de 6% ou em torno de 6,6%) de sementes poliembriônicas em espigas contendo o gene *gametófito indeterminado1*.

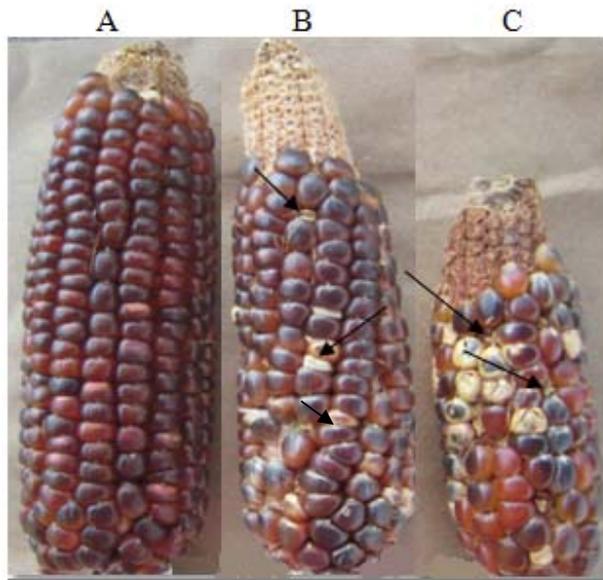


FIGURA 8 Foto representativa com três espigas de milho contendo o gene *gametófito indeterminado1*. A: contem o gene em homozigose dominante. B: Espiga contendo o gene em heterozigose. C: Espiga contendo o gene em homozigose recessiva. Sementes defeituosas

A associação de sementes defeituosas, abortadas e poliembriônicas podem ser importantes na identificação de plantas que possuem o gene *ig1*. (Figura 9). Os resultados mostram claramente uma porcentagem relevante desses tipos de sementes em espigas com o gene, tanto em homozigose recessiva, quanto em heterozigose.

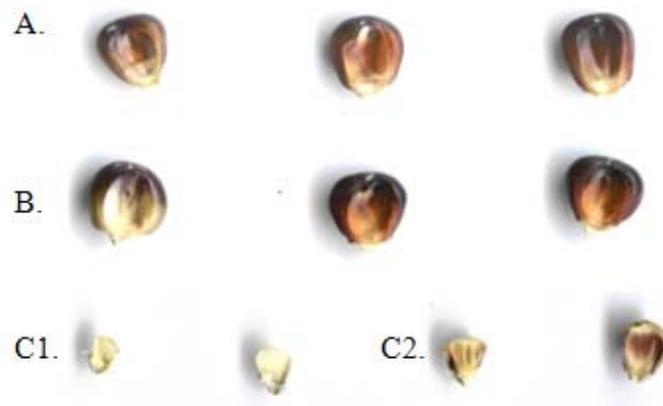


FIGURA 9 A e B: Sementes poliembriônicas. C1: Sementes abortadas. C2: sementes defeituosas. Todas encontradas nas espigas heterozigotas e homozigotas para o gene *igl* dentro das famílias em F<sub>3</sub> tropicalizadas (com características tropicais).

Todas as sementes provindas das 14 espigas que apresentaram homozigose recessiva para o gene *igl* (Figura 10) foram armazenadas para um possível cruzamento. As mesmas possuem potencial para serem utilizadas no programa de melhoramento genético da Embrapa Milho e Sorgo, em trabalhos com citoplasma macho estéril, avaliação da expressão gênica do gene *igl* e em cruzamentos para se obter uma linhagem tropicalizada, que induza haploides androgenéticos em alta frequência.

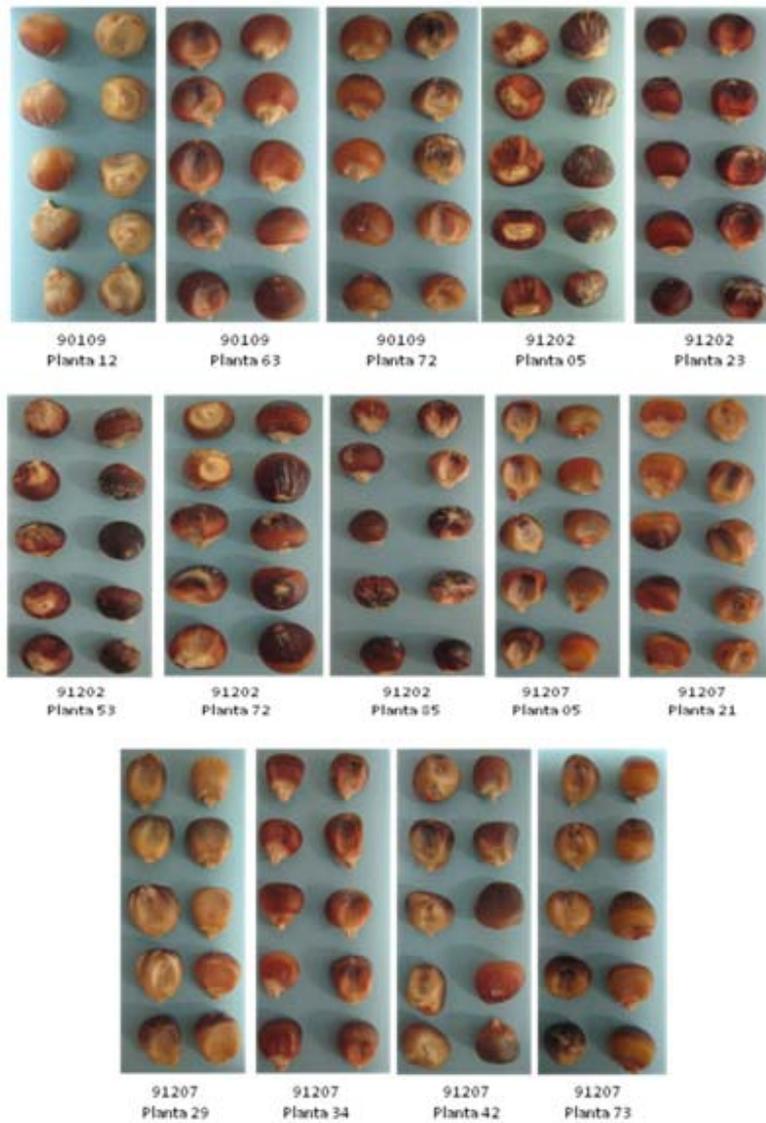


FIGURA 10 Sementes das espigas que apresentaram o gene *gametófito indeterminado1* em homozigose recessiva.

## 5 CONCLUSÕES

Os marcadores moleculares específicos co-dominantes ED2/ED4 e IGC/IGF foram eficientes na identificação das plantas que possuíam o gene *gametófito indeterminado1*.

Espigas com o gene *igl* em homozigose recessiva possui uma porcentagem maior de sementes defeituosas e poliembriônicas que as espigas com o gene em heterozigose, o que pode ter utilizado como marcador fenotípico, para identificação das plantas com o gene *igl*.

A manifestação fenotípica do marcador morfológico *r-navajo* não é precisa, pois apresenta variações de coloração tanto do endosperma quanto do embrião, provocadas por efeitos ambientais.

Neste trabalho, a presença de macho-esterilidade não pode ser associada com a presença do gene *gametófito indeterminado1*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARRET, P.; BRINKMANN, M.; BECKERT, M. A major locus expressed in the male gametophyte with incomplete penetrance is responsible for in situ gynogenesis in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.117, n.4, p.581-594, Aug. 2008.
- BECKERT, M. A advantages and disadvantages of the use of in vitro/in situ produced DH maize plants. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry: maize**. Berlin: Springer-Verlag, 1994. p.201-213.
- BELICUAS, P.R. **Obtenção, identificação e caracterização de haplóides androgenéticos em milho**. 2004. 52p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica/Agrobioquímica)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- BINNECK, E. Bioinformática aplicada a análise genômica. In: PÍPOLO, V.C.; GARCIA, J.E. (Ed.). **Biotechnologia na Agropecuária: aplicações e biossegurança**. Londrina: COODETEC, 2006. p.157-185.
- BLAKESLEE, A.F.; BELLING, M.E.; FARNHAM, M.E.; BERGNER, A.D. A haploid mutant in the jimson weed *Datura stramonium*. **Science**, New York, v.55, n.1433, p.646-647, June 1922.
- BORDES, J.; CHARMET, G.; VAULX, R.D. de; LAPIERRE, A.M.; BECKERT, M.; GALLAIS, A. Doubled-haploid versus single-seed descent and S1-family variation for testcross performance in a maize population. **Euphytica**, Wageningen, v.154, n.1, p.41-51, Feb. 2007.
- BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. 3. ed. Viçosa, MG: UFV, 2001. 500p.
- BUENO, L.C.S.; MENDES, A.N.G.; CARVALHO, S.P. **Melhoramento genético de plantas**. Lavras: UFLA, 2001. 262p.
- BYLICH, V.G.; CHALYK, C.T. Existence of pollen grains with a pair of morphologically different sperm nuclei in the ZMS line. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v.70, p.33, 1996.
- CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Ed.). **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG: UFV, 2006. p. 9-78.

CHASE, S.S. Production of homozygous diploids of maize from monoploids. **Agronomy Journal**, Madison, v.44, n.5, p.263-267, 1952.

CHASE, S.S. Androgenesis: its use for transfer of maize cytoplasm. **Indian Journal of Heredity**, Uttar Pradesh, v.54, n.4, p.152-158, July 1963.

CHASE, S.S. Utilization of haploids in plant breeding: breeding diploid species. In: KASHA, K.J. (Ed.). **Haploids in higher plants: advances and potential**. Guelph: University of Guelph, 1974. p.211-230.

CHASE, S.S.; NANDA, D.K. Comparison of variability in inbred lines and monoploid-derived lines of maize (*Zea mays* L.). **Crop Science**, Madison, v.5, n.1, p.275-276, Jan. 1965.

CHASE, S.S.; NANDA, D.K. An embryo marker for detecting monoploids of maize (*zea mays* L.). **Crop Science**, Madison, v.6, n.1, p.213-215, Jan. 1966.

COAKWELL, M.A.; FRENCH, C.R.; KAMAL GARCHA, M.Y.; BIGOT, K.; PERERA, A.G.; STAEHLING-HAMPTON, K.; MEMA, S.C.; CHANDA, B.; MUSHEGIAN, A.; BAMFORTH, S.; DOSCHAK, M.R.; LI, G.; DOBBS, M.B.; GIAMPIETRO, P.F.; BROOKS, B.P.; VIJAYALAKSHMI, P.; SAUVE, Y.; ABITBOL, M.; HEYNINGEN, V.V.; POURQUIÉ, O.; UNDERHILL, T.M.; WASKIEWICZ, A.J.; LEHMANN, O.J. Incomplete penetrance and phenotypic variability characterize Gdf6-attributable oculo-skeletal phenotypes. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v.18, n.6, p.1110-1121, Jan. 2009.

COE JUNIOR, E.H. A line of maize with high haploid frequency. **American Naturalist**, Chicago, v.93, n.873, p.381-382, Nov./Dec. 1959.

COE JUNIOR, E.H. Anthocyanin genetics. In: FREELING, M.; WALBOT, V. (Ed.). **The maize handbook**. New York: Springer-Verlag, 1994. p.279-281.

COMPANHIA NACIONAL DO ABASTECIMENTO. **Central de informações agropecuárias**. Disponível em:

<<http://www.conab.gov.br/conabweb/index.php?PAG=73&NSN=755>>.

Acesso em: 8 set. 2008.

DEIMLING, S.; ROBER, F.; GEIGER, H.H. Methodik und genetic der in-vivo haploideninduktion bei mais. **Vortr Pflanzenzuchtung**, Berlin, v.38, p.203-204, 1997.

EDER, J.; CHALYK, S. In vivo haploid induction in maize. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v.104, n.4, p.703-708, Mar. 2002.

ENALEEVA, N.K.H.; TYRNOV, V.S. Single fertilization and the problem of haploidy induction in maize. **Doklady Biol Science**, v.353, p.225-226, May 1996.

EVANS, M.M.S. The indeterminate gametophyte1 gene of maize encodes a LOB domain protein required for embryo sac and leaf development. **The plant Cell**, Rockville, v.19, n.1, p.46-62, Jan. 2007.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2.ed. Brasília, DF: MA/Embrapa/Cenargen, 1996. 220p.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético**. Brasília, DF: MA/Embrapa/Cenargen, 1998. 220p.

GREENBLATT, I.M.; BOCK, M. A commercially desirable procedure for detection of monoploids in maize. **The Journal of Heredity**, Uttar Pradesh, v.58, n.1, p.9-13, Jan. 1967.

GUIMARÃES, C.T.; SOUZA, J.R.; SCHUSTER, I.; MAGALHÃES, J.V. Marcadores moleculares no melhoramento de plantas. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.E. (Ed.). **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG: UFV, 2006. p.107-144.

GUO, F.; HUANG, B.Q.; HAN, Y.; ZEE, S.Y. Fertilization in maize *indeterminate gametophyte1* mutant. **Protoplasma**, New York, v.223, n.2/4, p.111-120, June 2004.

HALLAUER, A.R. Development of single-cross hybrids from two eared populations. **Crop Science**, Madison, v.7, n.7, p.192-195, July 1967.

HECKENBERGER, M.; BOHN, M.; MELCHINGER, A.E. Identification of essentially derived varieties obtained from biparental crosses of homozygous lines: i. simple sequence repeat data from maize inbreds. **Crop Science**, Madison, v.45, n.3, p.1120-1131, May 2005.

HUANG, B.; SHERIDAN, W.F. Embryo sac development in the maize *indeterminate gametophyte 1* mutant: abnormal nuclear behavior and defective microtubule organization. **The Plant Cell**, Rockville, v.8, n.8, p.1391-1407, Aug. 1996.

KERMICLE, J.L. Androgenesis conditioned by a mutation in maize. **Science**, Washington, DC, v.166, n.3911, p.422-1424, Dec. 1969.

KERMICLE, J.L. Pleiotropic effects on seed development of the indeterminate gametophyte gene in maize. **American Journal of Botany**, Baltimore, v.58, n.1, p.1-7, Jan. 1971.

KERMICLE, J.L. Androgenesis and the *indeterminate gametophyte (ig)* mutation: influence of pollen parent on androgenese frequency. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v.47, n.1, p.207-208, Jan. 1973.

KERMICLE, J.L.; DEMOPULOS-RODRIGUEZ, J. Location of indeterminate gametophyte (ig) on chromosome 3. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v.54, n.1, p.84-85, Jan. 1980.

KRUG, C.A.; VIEGAS, G.P.; PAOLIERI, L. Híbridos comerciais de milho. **Bragantia**, Campinas, v.3, n.2, p.367-551, 1943.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 3 jun. 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA. **Sistema IBGE de recuperação automática**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 1 jun. 2009.

LASHERMES, P.; BECKERT, M. Genetic control of maternal haploidy in maize (*Zea mays* L.) and selection of haploid inducing lines. **Theoretical Applied Genetic**, Berlin, v.76, n.3, p.405-410, Sept. 1988.

LIN, B.Y. Megagametogenetic alterations associated with the indeterminate gametophyte (*ig*) mutation in maize. **Revista Brasileira de Biologia**, São Paulo, v.41, n.3, p.557-563, maio/jun. 1981.

MAGNAVACA, R.; SILVA, J. **Melhoramento de milho normal em Minas Gerais**. Sete Lagoas: PIPAEMG, 1974. 3p.

MIRANDA FILHO, J.B.; VIÉGAS, G.P. Milho híbrido. In: PATERNIANI, E. **Melhoramento e produção do milho no Brasil**. Campinas: Fundação Cargill, 1978. p.257-309.

MITTER, M.; RUSHLOW, D.; NOWAK, I.; RESCHER, B.A.; GALLIE, B.L.; LOHMANN, D.R. Identification of a mutation in exon 27 of the RB1 gene associated with incomplete penetrance retinoblastoma. **Familial Cancer**, New York, v.8, n.1, p.55-58, Mar. 2009.

PATERNIANI, E. Genética e melhoramento de plantas. In: \_\_\_\_\_. **Genética: aspectos modernos da genética pura e aplicada**. São Paulo: Nacional/Edusp, 1963. p.430-469.

PATERNIANI, E. Effective maize pollen dispersed in the field. **Euphytica**, Wageningen, v.23, n.1, p.129-134, Feb. 1974.

PATERNIANI, E. Métodos tradicionais de melhoramento de milho. In: BULL, L.T.; CANTARELLA, H. (Ed.). **Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: Potafos, 1993. p.22-43.

PEIXOTO, C.M. O milho: o rei dos cereais: da sua descoberta há 8.000 anos até as plantas transgênicas: cultura do milho. **Seed News**, Pelotas, ano 2, n.2, mar. 2002. Disponível em: <[www.seednews.inf.br](http://www.seednews.inf.br)>. Acesso em: 10 fev. 2009.

PINAZZA, L.A.; ALIMANDRO, R. Cenário atípico. **Agroanalysis**, São Paulo, n.18, n.8, p.12-17, ago. 1998.

POPE, K.O. Origin and environmental setting of ancient agriculture in the lowlands of Mesoamerica. **Science**, New York, v.292, n.5520, p.1370-1373, May 2001.

RABEL, M. **Haplóides androgenéticos em milho tropical**. 2008. 69p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Biotecnologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

RANERE, A.J.; PIPERNO, D.R.; HOLST, I.; DICKAU, R.; IRIARTE, J. The cultural and chronological context of early holocene maize and squash domestication in the Central Balsas River Valley, Mexico. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, DC, v.106, n.13, p.5014-5021, Mar. 2009.

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, DC, v.81, n.24, p.8014-8018, Dec. 1984.

SANTOS, E.K.; ZANETTINI, M.H.B. Androgênese: uma rota alternativa no desenvolvimento do pólen. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.1, p.165-173, jan. 2002.

SARKAR, K.R.; COE JUNIOR, E.H. A genetic analysis of the origin of maternal haploids in maize. **Genetics**, Austin, v.54, n.2, p.453-464, Aug. 1966.

SARKAR, K.R.; PANDEY, A.; GAYEN, P.; MANDAN, J.K.; KUMAR, R.; SACHAN, J.K.S. Stabilization of high haploid inducer lines. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v.68, n.1, p.64-65, Jan. 1994.

SHERIDAN, W.F.; HUANG, B.Q. Embryo sac development in the maize *indeterminate gametophyte* mutant: abnormal nuclear behavior and defective microtubule organization. **The plant Cell**, Rockville, v.8, n.8, p.1391-1407, Aug. 1996.

SILVA, J.A.G.; CARVALHO, F.I.F.; SILVA, S.A.; BARBIERI, R.L.; MARCHIORO, V.S.; LORENCETTI, C.; BENIN, G.; SIMPSON, A.; DOCENA, C.; SE, T.X.C.O.T.O.F.N. Temperatura e seus efeitos na polinização para a obtenção de embriões haplóides de trigo em cruzamento intergenético. **Revista Brasileira de Agrobiologia**, Pelotas, v.8, n.2, p.97-102, abr. 2002.

SIMPSON, A.; DOCENA, C.; SE, T.X.C.O.T.O.F.N. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, London, v.406, n.13, p.151-159, oct. 2000.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.22, n.11, p.4673-4680, Nov. 1994.

VILAS-BOAS, L.A.; VILAS-BOAS, G.T. Genômica: desvendando os genomas. In: PÍPOLO, V.C.; GARCIA, J.E. (Ed.). **Biotecnologia na agropecuária: aplicações e biossegurança**. Londrina: COODETEC, 2006. p.157-185.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, n.24, p.7213-7218, Dec. 1990.

WHITE, S.E.; HABERA, L.F.; WESSLER, S.R. Retrotransposons in the flanking regions of normal plant genes: a role for copia-like elements in the evolution of gene structure and expression. **Genetics**, Austin, v.91, n.25, p.11792-11798, Dec. 1994.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetics markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, n.25, p.6531-6535, Nov. 1990.