

**CONVERSÃO DE LINHAGENS ELITES EM  
MILHO DE ALTA QUALIDADE PROTÉICA  
(QPM)**

**JAIR MOURA DUARTE**

**2003**

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

Duarte, Jair Moura

Conversão de linhagens elites em milho de alta qualidade protéica  
(QPM) / Jair Moura Duarte. -- Lavras : UFLA, 2003.

129 p. : il.

Orientador: Edílson Paiva.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Milho.
  2. Melhoramento genético vegetal.
  3. Marcador molecular.
  4. Linhagem.
  5. Retrocruzamento.
  6. Híbridação.
- I. Universidade Federal de

**JAIR MOURA DUARTE**

**CONVERSÃO DE LINHAGENS ELITES EM MILHO DE ALTA  
QUALIDADE PROTÉICA (QPM)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de “Doutor”.

**Orientador**

Dr. Edilson Paiva

**LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2003**

**JAIR MOURA DUARTE**

**CONVERSÃO DE LINHAGENS ELITES EM MILHO DE ALTA  
QUALIDADE PROTÉICA (QPM)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 28 de abril de 2003

Dra. Cláudia Teixeira Guimarães	Embrapa Milho e Sorgo
Dr. Cleso Antônio Patto Pacheco	Embrapa Milho e Sorgo
Dr. Glóverson Lamego Moro	Syngenta Seeds Ltda
Prof. Dr. Renzo Garcia Von Pinho	UFLA

Dr. Edilson Paiva  
Embrapa Milho e Sorgo  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2003

*Aos meus pais, Antônio e Ilza*

**OFEREÇO**

*Para Luiza e Mariana*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por todas as oportunidades que esta tem me oferecido.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade e pela excelência do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas.

À Embrapa Milho e Sorgo, pela acolhida e excelente estrutura oferecida para o desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao orientador Dr. Edilson Paiva, pelos ensinamentos, incentivo e suporte constante em todos os momentos do curso de doutorado.

Ao Dr. Cleso Antônio Patto Pacheco e à Dra. Cláudia Teixeira Guimarães, que, no papel de co-orientadores, exerceram uma valiosa e constante participação neste trabalho.

Ao Ubiraci Gomes de Paula Lana, laboratorista da Embrapa Milho e Sorgo, pela disponibilidade e suporte constante nas análises laboratoriais.

Ao Dr. Newton Portilho Carneiro, pela oportunidade e pela contribuição oferecida ao trabalho.

Ao prof. Dr. Renzo Von Pinho e ao Dr. Glóverson Moro, pelo apoio e sugestões apresentadas.

A Kátia Bernardeli, pelo apoio nas análises realizadas no Laboratório de Genética Molecular da Syngenta Seeds.

A todos os amigos do Núcleo de Biologia Aplicada (NBA) e do Núcleo de Recursos Genéticos e Desenvolvimento de Cultivares (NRGC) da Embrapa Milho e Sorgo, pelo convívio e colaboração.

A todos os amigos e professores da pós-graduação, pela boa amizade e pelos momentos de crescimento pessoal e profissional.

Aos colegas de trabalho da Syngenta Seeds, pela boa convivência e incentivos constantes.

Aos meus pais, irmãos e sobrinhos, que mesmo distante sempre me forneceram o suporte e a confiança necessários para que eu pudesse atingir os meus objetivos.

À minha esposa, Luiza, e à minha filha, Mariana, pelo amor e por estarem sempre presentes e me apoiarem em todos os momentos.

## SUMÁRIO

	Página
<b>RESUMO</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iii</b>
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>1</b>
1 INTRODUÇÃO GERAL .....	2
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	4
2.1 Histórico e melhoramento do milho QPM .....	4
2.2 Aspectos genéticos e bioquímicos do milho QPM .....	10
2.3 Avaliação nutricional e utilização do milho QPM .....	14
2.4 Conversão de linhagens elites como estratégia de melhoramento .....	18
2.5 Utilização de marcadores moleculares em programas de conversão de linhagens .....	23
2.6 Marcadores moleculares e o melhoramento do milho QPM .....	28
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	31
<b>CAPÍTULO 2: Marcadores SSRs associados ao gene <i>opaco-2</i> em linhagens e populações segregantes de milho de alta qualidade protéica (QPM) .....</b>	<b>40</b>
RESUMO .....	41
ABSTRACT .....	41
1 INTRODUÇÃO .....	42
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	44
2.1 Marcadores microssatélites .....	44
2.2 Linhagens e populações segregantes avaliadas .....	44
2.3 Obtenção do DNA genômico .....	45
2.4 Genotipagem com marcadores SSR .....	45
2.5 Seqüenciamento dos alelos <i>opaco-2</i> .....	48
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	49
4 CONCLUSÕES .....	60
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	60
<b>CAPÍTULO 3: Retrocruzamento assistido por marcadores moleculares para conversão de linhagens de milho normal em QPM .....</b>	<b>62</b>
RESUMO .....	63
ABSTRACT .....	63
1 INTRODUÇÃO .....	64
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	66

2.1 Metodologia de conversão .....	66
2.2 Projetos de conversão .....	67
2.3 Condução das populações a campo.....	68
2.4 Seleção assistida por marcadores moleculares para obtenção das plantas da próxima geração.....	69
2.5 Similaridade genética entre as gerações $MRC_3F_2$ e respectivos genitores	75
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	76
3.1 Utilização de marcadores RFLP para identificação das plantas $O_2o_2$ nas gerações de retrocruzamento .....	76
3.2 Utilização de marcadores SSRs para acelerar a recuperação dos genótipos dos genitores recorrentes .....	80
3.3 Similaridade genética entre as gerações $MRC_3F_2$ e respectivos genitores	91
4 CONCLUSÕES .....	100
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100
<b>CAPÍTULO 4: Avaliação de híbridos experimentais QPM obtidos pela conversão de linhagens elites normais.....</b>	<b>105</b>
RESUMO.....	106
ABSTRACT .....	106
1 INTRODUÇÃO .....	107
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	108
2.1 Híbridos avaliados .....	108
2.2 Procedimentos experimentais .....	109
2.3 Características avaliadas no ensaio.....	110
2.4 Análises estatísticas .....	113
2.5 Similaridade genética entre os híbridos avaliados .....	113
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	114
4 CONCLUSÕES .....	127
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	127

## RESUMO

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

No presente trabalho foi avaliada a potencialidade do método dos retrocruzamentos modificados proposto por Guimarães et al. (2000) e dos marcadores moleculares no aumento da eficiência dos processos de conversão linhagens elites de milho normal em QPM. Inicialmente, investigou-se a associação dos marcadores *umc1066*, *phi057* e *phi112* com o gene *opaco-2*, verificando a efetividade dos mesmos para diferenciação dos genótipos  $O_2O_2$ ,  $O_2o_2$  e  $o_2o_2$  em populações segregantes derivadas de algumas das linhagens de milho normais e QPM estudadas. Assim, foi demonstrado que os marcadores SSR foram capazes de identificar o alelo recessivo *opaco-2*, e que sua utilização efetiva no melhoramento assistido dependerá das linhagens envolvidas nos cruzamentos e dos objetivos de cada projeto. Adicionalmente, avaliou-se a aplicabilidade dos marcadores RFLP e SSRs em projetos de conversão de linhagens de milho normal em QPM, cuja seleção foi realizada nas gerações  $RC_2F_1$  e  $RC_3F_1$  em duas etapas. Inicialmente, as plantas heterozigotas foram identificadas em cada geração de retrocruzamento pelo padrão de RFLP, sendo, em seguida, genotipadas por SSRs visando a identificação daquelas com maior proporção de recuperação do genótipo do genitor recorrente. Esta estratégia foi comparada com outros projetos de conversão onde apenas seleção fenotípica foi realizada. Verificou-se que o marcador RFLP (enzima *EcoRI* + sonda 968 pb gene *opaco-2*) foi eficiente para identificação e seleção precoce dos genótipos heterozigotos nas populações de retrocruzamento. Por outro lado, considerando-se a estratégia de seleção e o tamanho das populações analisadas, a identificação das plantas com maior proporção de recuperação do genótipo do genitor recorrente por SSRs não proporcionou uma maior eficiência ao processo de conversão de milho normal em QPM, quando comparado aos projetos onde apenas a seleção fenotípica foi utilizada. Adicionalmente, constatou-se a ocorrência de arraste devido à ligação (“*linkage drag*”) nas regiões genômicas flanqueando os genes *opaco-2* e modificadores do endosperma. Em um terceiro trabalho, foram avaliados híbridos experimentais QPM obtidos a partir da conversão parcial de três linhagens elites. Os resultados demonstraram que os híbridos QPM obtidos pela conversão parcial de linhagens normais apresentaram

---

\* Comitê Orientador: Dr. Edilson Paiva – Embrapa Milho e Sorgo (Orientador); Dra. Cláudia Teixeira Guimarães – Embrapa Milho e Sorgo; Dr. Cleso Antônio Patto Pacheco – Embrapa Milho e Sorgo.

uma melhor qualidade protéica, e comportamento semelhante para a maioria das características agronômicas, incluindo a produtividade de grãos, quando comparados aos híbridos originais. Entretanto, alguns dos problemas geralmente associados aos híbridos QPM, como uma maior porcentagem de acamamento e quebramento, sabugos mais grossos e grãos mais curtos, mantiveram-se até esta fase do processo. Tanto as versões normais quanto os híbridos QPM convertidos apresentaram piores desempenhos em termos de produtividade de grãos, quando comparados com os híbridos utilizados como testemunhas, indicando uma perda de competitividade em relação a estes híbridos mais recentes.

## ABSTRACT

DUARTE, J.M. **Conversion of elite inbred lines into Quality Protein Maize (QPM)**. 2003. 129 p. Thesis (Doctorate in Agronomy – Plant Genetics and Breeding). Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

The current study was developed to evaluate the potential of the modified backcross procedure proposed by Guimarães et al. (2000), and the molecular markers to increase the efficiency in conversion projects of elite inbred lines into Quality Protein Maize. First, it was evaluated the association of the SSR markers umc1066, phi057 and phi112 with the *opaque-2* gene, testing their effectiveness to distinguish  $O_2O_2$ ,  $O_2o_2$  and  $o_2o_2$  genotypes in segregating populations derived from normal and QPM maize inbred lines. Thus, it was showed that the SSR markers were able to identify the recessive allele *opaque-2*, and that their effective use in marker-assisted selection will depend on the inbred lines used in the crosses and on the objectives of each project. Second, it was evaluated the applicability of RFLP and SSR markers in conversion projects of normal inbred lines into QPM, in which selection was employed in the  $BC_2F_1$  and  $BC_3F_1$  generations in two stages. First, heterozygous plants were identified by RFLP in each backcross generation, and then these plants were genotyped by SSRs in order to identify those with a higher proportion of the recurrent parental genome. This strategy was compared with conversion projects where only phenotypic selection was carried out. It was verified that the RFLP marker (*EcoRI* enzyme + probe 968 pb *Opaque-2* gene) was efficient to identify and to early select the heterozygous genotypes in the backcross populations. However, considering the selection strategy and the population size evaluated, the identification of plants with higher recovery of the recurrent parental genome using SSRs did not increased the conversion efficiency, when compared to the projects where only phenotypic selection was employed. Furthermore, linkage drag was detected in the genomic regions flanking the *opaque-2* and endosperm modifier genes. In a third study, experimental QPM hybrids obtained from the partial conversion of three elite inbred lines were evaluated. The results indicated that the QPM hybrids obtained by partial conversion of normal inbred lines presented a better protein quality and similar performance for most of the agronomic traits evaluated, including grain yield, when compared with the original hybrids. However, some of the problems specifically associated with QPM hybrids, such as higher lodging, thicker cobs and shorter grains, still

---

\* Guidance Committee: Dr. Edilson Paiva – Embrapa Milho e Sorgo (Advisor); Dra. Cláudia Teixeira Guimarães – Embrapa Milho e Sorgo; Dr. Cleso Antônio Patto Pacheco – Embrapa Milho e Sorgo.

remained up to this phase of the process. Both the normal versions and the converted QPM hybrids displayed a worst grain yield performance, when compared to the checks hybrids, indicating a loss in competitiveness in relation to these more recent hybrids.

## **CAPÍTULO 1**

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O milho (*Zea mays* L.) é o terceiro cereal mais cultivado globalmente, constituindo-se em uma das mais importantes fontes de energia, proteínas e outros nutrientes na alimentação humana e de animais (FAO, 2003). Embora seja uma das culturas alimentícias mais importantes do mundo, o milho possui valor nutricional limitado para humanos e outros animais monogástricos, por ser deficiente em aminoácidos essenciais, especialmente lisina (Nelson, 1969).

Mertz et al. (1964) demonstraram que a mutação *opaco-2* ( $o_2$ ) praticamente dobrava o conteúdo de lisina no endosperma do milho, mas os efeitos negativos causados por esta nas propriedades físicas do endosperma e outras características agrônômicas importantes impediram sua ampla utilização para o desenvolvimento de milhos com melhor qualidade nutricional.

A identificação de genes modificadores capazes de superar os efeitos negativos da mutação *opaco-2* (Paez et al., 1969) levou ao desenvolvimento de genótipos *opaco-2* modificados, designados *Quality Protein Maize* ou simplesmente QPM (Villegas et al., 1992; Gevers & Lake, 1992). Grãos QPM apresentam a dureza e a vitreosidade dos genótipos normais, enquanto mantêm o elevado conteúdo de lisina dos mutantes *opaco-2*. Eles representam duas décadas de melhoramento realizado no Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo (CIMMYT, México) visando ao desenvolvimento de genótipos de milho com desempenho agrônômico aceitável e com concentrações de lisina nutricionalmente balanceadas (Bjarnason & Vasal, 1992).

Um programa de melhoramento de milho QPM apresenta-se como um processo complexo porque requer a manipulação simultânea de três sistemas genéticos: o gene *opaco-2*, os genes modificadores do endosperma e os genes que controlam o conteúdo de lisina (Moro, 1996). Considerando estes aspectos, é um sistema ideal para se beneficiar das modernas técnicas de biologia

molecular que atualmente podem ser utilizadas como ferramentas de auxílio ao processo seletivo.

Atualmente, uma parte dos esforços destes programas concentra-se na conversão de linhagens elites, visando à obtenção de versões QPM de híbridos normais de desempenho agrônômico superior. O método originalmente utilizado para conversão de milho normal em QPM foi proposto por Vasal et al. (1980). Estes autores desenvolveram uma combinação de retrocruzamento seguido por seleção recorrente em populações segregantes para converter populações de milho normal em QPM. Este procedimento permitiu o desenvolvimento de um grande número de populações QPM, embora requerendo muitas gerações para recuperação do genótipo do genitor recorrente e oferecendo a oportunidade para seleção de características QPM somente nas gerações segregantes de cada geração de retrocruzamento.

Mais recentemente, Guimarães et al. (2000) propuseram um método modificado de retrocruzamento com o objetivo de diminuir o tempo necessário à recuperação do genótipo do genitor recorrente, fornecer a oportunidade de seleção para características QPM em todas as gerações de 'retrocruzamento modificado' ou MRC, podendo ainda ser empregado por programas que utilizem apenas seleção fenotípica ou possam dispor de outras técnicas mais elaboradas, como os marcadores moleculares, para a identificação dos fenótipos e genótipos desejáveis. Uma primeira avaliação de híbridos experimentais QPM gerados pela conversão de linhagens utilizando esta metodologia foi realizada neste trabalho.

Segundo Ferreira & Grattapaglia (1998), a utilização de marcadores moleculares em programas de retrocruzamentos é, talvez, a aplicação mais efetiva desta tecnologia no melhoramento de plantas.

No contexto dos programas de conversão de linhagens normais em QPM, a utilização de marcadores moleculares para identificação precoce das

plantas heterozigotas ( $O_2o_2$ ) pode aumentar a sua eficiência por vários motivos: a avaliação das progênies pode ser dispensada, o tamanho da população pode ser reduzido a poucas plantas por geração e, devido ao fenótipo alvo ser identificado em plantas jovens, características do grão e da planta podem ser selecionadas simultaneamente. Esta identificação molecular do alelo  $o_2$  é atualmente favorecida pelo amplo conhecimento disponível a respeito do gene *opaco-2* e suas interações. Adicionalmente, marcadores moleculares podem ainda ser utilizados para identificação das plantas com maior proporção de recuperação do genótipo do genitor recorrente, tornando o processo de conversão mais rápido e eficiente.

Considerando-se a potencialidade do método dos retrocruzamentos modificados para geração de germoplasma QPM e que os marcadores moleculares podem tornar os processos de conversão de linhagens mais eficientes, avaliaram-se, neste trabalho, a aplicabilidade dos marcadores moleculares e o método dos retrocruzamentos modificados (Guimarães et al., 2000) em projetos de conversão de linhagens elites de milho normal em QPM.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Histórico e melhoramento do milho QPM**

A mutação *opaco-2* ( $o_2$ ) em milho foi primeiro descrita por Jones e Singleton na década de 1930 (Emerson et al., citados por Vasal, 2000). A textura macia e propriedades opacas dos grãos mutantes foram amplamente usadas como um marcador genético fenotípico para o braço curto do cromossomo 7. Os efeitos bioquímicos da mutação no acúmulo de proteínas foram estabelecidos quase 30 anos mais tarde por Mertz et al. (1964), os quais observaram que sementes opacas apresentavam os aminoácidos lisina e triptofano em

quantidades duas vezes maiores que as normalmente encontradas em milho. Esses autores demonstraram que o alelo recessivo *o<sub>2</sub>* tinha o efeito de gerar um melhor balanço de aminoácidos na proteína do grão, com um significativo aumento na porcentagem de lisina quando comparado ao encontrado no milho normal.

Após a descoberta do alelo *o<sub>2</sub>*, vários outros foram encontrados, os quais reduzem o conteúdo de zeína. Entre estes, o *floury-2*, *opaco-5*, *opaco-6*, *opaco-7*, *floury-3*, *B-30 defectivo* e *mucronato* (Lopes, 1993), coletivamente denominados por mutantes de alta lisina. O valor, uso e características de herança de tais mutantes, entretanto, variam tremendamente (Vasal, 2000).

A pesquisa por novos mutantes ocorreu de forma continuada, mas, de todos os mutantes conhecidos, os dois usados extensivamente em programas de melhoramento foram *opaco-2* e *floury-2*. O *floury-2* foi praticamente abandonado em anos recentes, quando as pesquisas revelaram não haver nenhuma vantagem no uso deste mutante em relação ao *opaco-2* (Vasal, 2000).

Os esforços de melhoramento para o desenvolvimento de milhos de alta qualidade protéica começaram no início dos anos 1960. A descoberta desses mutantes coincidiu com as discussões de má nutrição e problemas de alimentação, principalmente nos países em desenvolvimento. Estes fatores levaram os programas de melhoramento de milho a iniciar projetos de melhoria da qualidade dos grãos, como forma de amenizar os problemas de nutrição de populações cuja base alimentícia era este cereal.

A introdução do alelo *opaco-2* em linhagens elites de milho levou a uma redução na produtividade dos híbridos mais competitivos em 10% ou mais. Além disso, o grão gastava um maior tempo para secagem, o que, conseqüentemente, o tornava mais suscetível a infecções fúngicas. Também, o endosperma mole e farináceo tornava os grãos quebradiços e dificultava a colheita mecânica. Finalmente, o conteúdo de lisina mostrou-se suscetível a

flutuações ambientais e, para formular uma ração eficiente, os produtores necessitam possuir uma previsão estável do conteúdo de lisina. Por estas razões, as pesquisas com o gene *opaco-2* declinaram e foram quase totalmente abandonadas. Apenas umas poucas instituições, como o CIMMYT, México, a Universidade de Purdue, EUA, a empresa de sementes Crows Hybrids Seed Company, EUA e a Universidade de Natal, África do Sul, prosseguiram no trabalho de escolher, entre as várias opções disponíveis, uma linha de pesquisa que permitisse o desenvolvimento de cultivares de melhor qualidade nutricional com desempenho agrônômico comparável ao milho normal (Vasal, 2000, 2002; Crow & Kermicle, 2002).

Após muitas tentativas frustradas de vários métodos e estratégias de melhoramento para desenvolver milho de alto teor de lisina e triptofano, os pesquisadores do CIMMYT finalmente obtiveram populações com características agrônômicas aceitáveis por meio da combinação do alelo *o<sub>2</sub>* com modificadores genéticos do endosperma (Vasal, 2000). Este germoplasma que combina os efeitos químicos deste alelo com características físicas dos grãos normais foi denominado *Quality Protein Maize* ou QPM.

Os esforços iniciais da obtenção do milho QPM datam de antes de 1970, quando os melhoristas do CIMMYT começaram a selecionar grãos parcialmente modificados dentro de compostos e de populações *opaco-2* derivadas de retrocruzamento. O forte suporte laboratorial do CIMMYT permitiu o progresso para dureza do endosperma sem prejudicar a qualidade da proteína.

Um esforço maior foi iniciado para selecionar espigas parcialmente modificadas de tantas diferentes conversões *opaco-2* quanto possíveis em germoplasma tropical, subtropical e de terras altas. Estoques doadores de opacos-modificados foram desenvolvidos por duas estratégias: 1) desenvolvimento de compostos *opaco-2* brancos e amarelos de base genética ampla e subsequente seleção para tipos modificados com boa qualidade de

proteína; 2) seleção intrapopulacional para modificação do grão em populações de base genética estreita, as quais tinham variabilidade suficiente para esta característica.

Os estoques doadores foram posteriormente usados de forma extensiva na conversão de uma grande quantidade de germoplasma a tipos *opaco-2* com endosperma duro por meio de um esquema de retrocruzamento em conjunto com seleção recorrente (Vasal et al., 1980). Tanto no melhoramento das populações como no programa de conversão, um procedimento de seleção multicaracterísticas foi empregado para acumular modificadores, mantendo a elevada qualidade protéica e outros fenótipos desejáveis (Vasal, 2000).

Terminado este processo, todo o germoplasma QPM do CIMMYT foi sistematicamente consolidado em 10 populações e 13 conjuntos gênicos. Estes materiais foram submetidos a métodos de melhoramento intrapopulacionais. Em 1980, iniciou-se o programa de desenvolvimento de híbridos QPM do CIMMYT (Vasal, 2000, 2002).

Outros programas de melhoramento de milho QPM foram iniciados, empregando-se, fundamentalmente, o germoplasma do CIMMYT. Atualmente, em função deste trabalho pioneiro, cultivares QPM têm sido utilizadas na América Latina, Ásia e África (Crow & Kermicle, 2002).

Como reconhecimento a este trabalho, Surinder K. Vasal, que coordenou o programa de melhoramento de milho QPM do CIMMYT, juntamente com Evangelina Villegas, pesquisadora responsável pelas análises químicas do mesmo programa, dividiram, no ano de 2000, o *World Food Prize* (Bourlag Award), como reconhecimento por seus esforços no desenvolvimento do milho QPM durante as décadas de 1970 e 80.

O programa brasileiro teve início na Embrapa Milho e Sorgo em 1983, a partir das 10 populações e 13 conjuntos gênicos que foram introduzidos do CIMMYT. Estes materiais foram testados em condições de campo em muitas

regiões do Brasil para avaliação de seu desempenho agrônomo. Baseando-se nos resultados dessas avaliações, a população 64-blanco dentado 2 QPM-tropical foi selecionada para iniciar um programa de melhoramento intrapopulacional que permitiu seu lançamento, em 1988, como a variedade BR451 (Magnavaca, 1992; Pacheco et al., 1999).

Após o lançamento da BR451, os esforços foram direcionados para o desenvolvimento de uma variedade QPM de grãos amarelos, preferidos pelos agricultores no Brasil. O resultado deste esforço foi o desenvolvimento da BR473, uma variedade sintética lançada em 1994 (Guimarães et al., 1994). Na safra 96/97, a BR473 ocupou cerca de 11 mil ha de área de plantio (ABRASEM, 1999). Atualmente, esta variedade tem sido utilizada por pequenos produtores e comunidades de assentamentos rurais.

Em 2000/2001, foi lançada a variedade BRS Assum Preto. Esta variedade apresenta grãos amarelos semiduros de alta qualidade protéica, característica que, associada à superprecocidade, a torna uma importante opção para os agricultores do semi-árido nordestino. Na safra 2002/2003, foram produzidas 280 toneladas de sementes desta variedade, as quais foram adquiridas pelo governo federal para distribuição aos pequenos agricultores nordestinos, permitindo a semeadura de aproximadamente 14.000 ha\*.

Na safra 92/93, foram avaliados os primeiros híbridos duplos de cuja composição participaram algumas linhagens introduzidas do CIMMYT. O híbrido duplo 92HD1QPM destacou-se por sua competitividade em relação aos híbridos BR201, BR205 e BR206. Nos anos subsequentes, apresentou boa estabilidade de produção, de modo que foi lançado em 1997 com o nome de BR2121 (Pacheco et al., 1999). A partir de 92/93, foi estabelecida uma rede de avaliação de cultivares QPM, representativa das regiões Centro-Oeste e Sul do

---

\* Pacheco, C.A.P. (Comunicação pessoal) (Pesquisador – Embrapa Milho e Sorgo)

país. Nos últimos anos, enfatizou-se a obtenção e avaliação de híbridos triplos para atender a uma faixa de agricultores mais tecnificados.

Vasal (2002) e Córdova & Listman (2002) relatam que uma rede internacional de experimentação de variedades e híbridos QPM tem sido montada e os resultados são promissores. Muitos países têm identificado variedades e híbridos QPM que são competitivos com as cultivares normais. Na África, no ano 2000, mais de 200 ensaios de avaliação de híbridos QPM foram conduzidos, envolvendo 11 países.

Nos últimos quatro anos, no mínimo 22 países lançaram cultivares QPM incluindo a China, a Índia e o Vietnã. Na China, recentemente foram desenvolvidos híbridos simples QPM de potencial igual ou um pouco superior aos híbridos normais comerciais. No ano de 1994, aproximadamente 100 mil hectares foram plantados com híbridos QPM (Zhang, 2002).

O desenvolvimento de híbridos QPM superiores requer um desempenho satisfatório, tanto em termos de qualidade do grão como também para as outras características agronômicas de interesse. Isto acrescenta complexidade ao trabalho do melhorista, pois, além dos muitos desafios encontrados em um programa de melhoramento de milho normal, necessita monitorar constantemente a qualidade nutricional do germoplasma selecionado.

No Brasil, Paschoalick (1998) avaliou duas cultivares QPM em comparação com três cultivares normais para várias características agronômicas e de qualidade nutricional. Este autor verificou que as cultivares normais foram superiores no rendimento de grãos (10%), teor de proteína nos grãos (3%), massa de mil grãos (5%) e produção de proteína por área (13%), enquanto que as cultivares QPM foram superiores na densidade do grão (0,24%), teores de óleo (32%), triptofano (50%) e lisina (39%) no grão, teores de triptofano (52%) e lisina (46%) na proteína, produções de triptofano (32%), lisina (27%) e óleo (19%) por área. Conforme comentado por Pacheco et al. (1999), alguns dos

resultados obtidos neste trabalho, mais do que apenas apresentarem deficiências dos materiais QPM estudados, indicam pontos importantes que devem ser considerados pelos programas de melhoramento de milho QPM. Dentre estes pontos destacam-se, principalmente, uma maior pressão de seleção contra acamamento e quebramento e uma melhoria da qualidade do grão (quantidade e qualidade da proteína, grau de modificação do endosperma e sanidade).

## **2.2 Aspectos genéticos e bioquímicos do milho QPM**

As proteínas do endosperma do milho têm sido tradicionalmente fracionadas com base na sua solubilidade em diferentes solventes (Osborne e Mendel, 1914). As frações resultantes deste processo têm sido referidas como albuminas (extraídas com água), globulinas (extraídas com soluções salinas), prolaminas (extraídas em solução alcoólica) e glutelinas (extraídas em soluções ácidas ou alcalinas). As prolaminas, designadas de zeínas em milho, são a maior fração das proteínas de reserva em grãos de cereais. Este método convencional de fracionamento não é muito informativo, devido às dificuldades para se definir funcionalmente as diferentes frações de solubilidade. Wallace et al. (1990) desenvolveram um método para extrair e caracterizar as proteínas do endosperma do milho, com apenas duas frações resultantes: as zeínas (solúveis em álcool) e as não-zeínas. Como consequência desse processo, a precisão da quantificação de cada grupo é melhorada e, desde que apenas duas frações são obtidas, a análise dos resultados é facilitada.

As zeínas correspondem a aproximadamente 50% a 70% das proteínas totais do endosperma, sendo classificadas em quatro grupos ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ), de acordo com o seu peso molecular quando fracionadas em géis de SDS-PAGE (Habben et al., 1994). Análise da seqüência dos genes das zeínas evidenciou que as proteínas codificadas são basicamente desprovidas de lisina (Shotwell &

Larkins, 1989). Conseqüentemente, as proteínas que possuem lisina ocorrem na outra classe de solubilidade, as quais são coletivamente chamadas de não-zeínas.

Durante mais de 30 anos, muitos pesquisadores trabalharam na identificação de mutantes que pudessem produzir uma maior quantidade de lisina e triptofano no grão do milho, culminando na mutação *opaco-2*, que foi isolada e bem caracterizada por Mertz et al. (1964). Esta mutação é recessiva, está localizada no braço curto do cromossomo 7 (Soave et al., 1981) e praticamente dobra o conteúdo de lisina do endosperma do milho, melhorando significativamente a qualidade protéica do grão.

O nível elevado de lisina nos mutantes  $o_2$  é decorrência de muitos fatores (Wang & Larkins, 2001): (a) a síntese de zeínas é reduzida e estas não contêm lisina; (b) há um aumento na síntese de um número de outras proteínas (não-zeínas), muitas das quais contêm lisina; e (c) há um aumento geral no nível de aminoácidos livres (FAA), incluindo lisina. A extensão do quanto o conteúdo de lisina é aumentado nos mutantes  $o_2$  é genótipo dependente (Moro, 1996).

Os mecanismos pelos quais o alelo *opaco-2* aumenta o conteúdo de lisina no endosperma do milho são ainda parcialmente entendidos. O alelo normal  $O_2$  codifica um ativador transcricional que regula a expressão de um número de genes, incluindo as  $\alpha$ -zeínas de 22-kD (Schmidt, 1993). A redução na síntese de  $\alpha$ -zeína é associada com vários graus de aumento na acumulação de muitas proteínas não zeínas, as quais são responsáveis pela maior porcentagem de lisina (Moro, 1996). Habben et al. (1995) identificaram que o endosperma do milho *opaco-2* mostra níveis aumentados do fator de elongação 1 alpha (EF-1 $\alpha$ ), uma proteína que é 10% lisina. Alta variabilidade dentro e grandes diferenças entre dois grupos de linhagens normais e QPM foi observada para conteúdo de lisina e concentração de EF-1 $\alpha$  (Moro, 1996). Wang et al. (2001) cruzaram algumas linhagens de milho que diferem no conteúdo de EF-1 $\alpha$ , encontrando dois QTLs que explicaram 25% da variação para o conteúdo desta proteína. Um

dos QTLs está ligado a um loco complexo que codifica as  $\alpha$ -zeínas de 22 kD no braço curto do cromossomo 4, enquanto o outro está próximo ao centrômero no braço longo do cromossomo 7.

Bernard et al. (1994) realizaram uma caracterização molecular ao nível de DNA, RNA e proteínas de vários alelos *opaco-2* e verificaram a ocorrência de polimorfismo tanto entre os alelos selvagens ( $O_2$ ) como entre os mutantes ( $o_2$ ). Estes resultados permitiram uma precisa identificação e classificação dos vários alelos  $O_2$  e  $o_2$  estudados e também a sugestão de mecanismos adicionais e/ou alternativos que podem estar envolvidos no controle da atividade do produto do gene *opaco-2* na regulação da transcrição dos genes das zeínas. Altas razões de polimorfismo e recombinação no loco *opaco-2* de milho cultivado também foram reportadas por Henry & Damerval (1997), os quais sequenciaram 1.933 pares de base (pb) deste gene em um conjunto representativo de 21 linhagens. Os dados obtidos por estes autores indicam que um número surpreendentemente grande de eventos de recombinação contribuiu para a diversificação, sugerindo que o loco *opaco-2* pode se constituir em uma região de alta frequência de recombinação.

Os efeitos indesejáveis provocados pelo alelo  $o_2$  em algumas características agronômicas impediram o desenvolvimento de genótipos comerciais utilizando apenas este alelo (Vasal, 2000). A identificação de genes que alteram o fenótipo dos genótipos opacos, dando-lhe uma aparência normal, criou a possibilidade de usar estes chamados "genes modificadores do *opaco-2*" para superar os efeitos negativos desta mutação (Paez et al., 1969).

Bioquimicamente, o processo de modificação do endosperma parece estar associado com o aumento nos níveis da proteína  $\gamma$ -zeína de 27 kD. Grãos QPM têm de duas a três vezes mais  $\gamma$ -zeína (Wallace et al., 1990), tendo sido demonstrado ainda que o grau de modificação e um aumento no conteúdo de  $\gamma$ -zeína são altamente correlacionados e dependentes da dosagem de genes

modificadores do endosperma (Lopes, 1993). Estes estudos claramente sugerem que a proteína  $\gamma$ -zeína está envolvida no desenvolvimento do endosperma vítreo em genótipos *opaco-2* e que os genes modificadores, de algum modo, promovem altos níveis desta proteína.

Alguns autores têm sugerido que o alelo AB do loco da  $\gamma$ -zeína é necessário, mas não suficiente, para a modificação do endosperma (Lopes, 1993). Entretanto, uma planta  $o_2o_2$  homocigota recombinante para o alelo rA da  $\gamma$ -zeína foi encontrada por Moro (1996), na qual os grãos têm um fenótipo uniformemente vítreo e um elevado conteúdo de  $\gamma$ -zeína. Isto indica que a formação do endosperma vítreo em genótipos  $o_2o_2$  não necessita do alelo AB da  $\gamma$ -zeína e que o nível elevado da proteína  $\gamma$ -zeína em genótipos *opaco-2* modificados não é dependente da presença de duas sequências codificadoras da  $\gamma$ -zeína.

Burnett & Larkins (1999) analisaram muitos aspectos da regulação transcricional e pós-transcricional da expressão do gene da  $\gamma$ -zeína em genótipos normais, *opaco-2* e *opaco-2* modificados, para investigar os mecanismos pelos quais os genes modificadores do  $o_2$  influenciam a expressão dos genes da  $\gamma$ -zeína. Seus resultados são consistentes com um modelo no qual dois locos modificadores do  $o_2$  influenciam a expressão do gene da  $\gamma$ -zeína por diferentes mecanismos, os quais são tanto de natureza transcricional como também pós-transcricional.

Alguns autores têm considerado que a modificação segue um tipo de herança multigênica, devido principalmente a efeitos gênicos aditivos. Outros têm postulado que só uns poucos genes estão envolvidos na modificação do endosperma. Em cruzamentos entre genótipos *opaco-2* e *opaco-2* modificados, grãos que apresentam o fenótipo de ambos os pais podem ser recuperados em uma única espiga  $F_2$ , sugerindo que o número de genes controlando a modificação do endosperma não é grande (Lopes, 1993). Este autor, por análise

de segregação, sugeriu a existência de dois principais locos modificadores. Análise de *bulks* segregantes entre genótipos *opaco-2* e *opaco-2* modificados revelou dois marcadores RFLPs associados à modificação do endosperma. Ambos os locos foram mapeados no braço longo do cromossomo 7, um próximo ao telômero e o outro fortemente ligado ao loco da  $\gamma$ -zeína, próximo ao centrômero.

Para Vasal (2000), informações sobre a herança dos modificadores de endosperma são limitadas e diferentes tipos de modificadores são prováveis de existir em diferentes genótipos. Dessa forma, o sistema genético controlando os genes modificadores pode ser simples, moderadamente complexo envolvendo uns poucos genes ou talvez altamente complexo. Este autor comenta ainda que os genes modificadores podem ser afetados por influência materna. Outros fatores, tais como a composição genética e a textura do grão, também podem alterar a manifestação fenotípica dos genes modificadores, com genótipos *flint* geralmente exibindo uma maior frequência de grãos modificados.

### **2.3 Avaliação nutricional e utilização do milho QPM**

O milho fornece aproximadamente 20% das calorias e 15% das proteínas vegetais que são consumidas no mundo (National Research Council, 1988). Em termos nutricionais, a deficiência do milho em relação aos aminoácidos essenciais lisina e triptofano é um fator a considerar, particularmente para pessoas com altas necessidades de proteínas, como crianças, mulheres em gestação ou amamentando, e doentes, principalmente em países onde o milho é base da alimentação e uma fonte importante de proteína.

Algumas pesquisas têm comparado a composição química do milho QPM em relação ao milho normal (Ortega et al., 1986; Sproule et al., 1988; Osei et al., 1999). Nestes trabalhos verifica-se que os conteúdos de lisina e triptofano

do milho QPM são aproximadamente 50% maiores que o conteúdo destes aminoácidos no milho normal.

Devido ao aumento na concentração destes dois aminoácidos, e também ao aumento na digestibilidade e na assimilação de nitrogênio em relação ao milho normal, o valor biológico (quantidade de N que é retida no corpo) do milho QPM é de aproximadamente 80%, enquanto que o do milho normal está situado entre 40% a 57% (Bressani, 1992). O milho QPM apresenta, em média, 90% do valor biológico do leite de vaca (National Research Council, 1988).

Apesar destes benefícios comprovados, existe um debate a respeito do potencial impacto do milho QPM para aliviar os problemas de má nutrição humana, principalmente em relação à falta de definição se tais problemas são causados por deficiência de calorias ou de proteínas (Hamaker & Rahmanifar, 1994). No entanto, existem amplas evidências de que o consumo do milho QPM pode ajudar a combater os problemas de má nutrição, especialmente em regiões onde o milho é base da alimentação (Bressani, 1992; 1994; National Research Council, 1988; Hamaker & Rahmanifar, 1994; Peixoto et al., 1990; Vasal, 2002; Zhang, 2002).

Estudos de nutrição infantil, conduzidos no Instituto de Investigação Nutricional de Lima, Peru, compararam a influência do uso do milho QPM e milho normal como única fonte de proteína na dieta de crianças desnutridas. Observou-se que, apesar da absorção de N pelo organismo ser a mesma nas duas fontes, a retenção do N proveniente do milho QPM é 50% maior que no milho comum, o que significa que um grama de proteína proveniente de um milho QPM equivale a, pelo menos, 1,5 g de proteína de um milho normal (Peixoto et al., 1990). Young et al. (1989) atestam que, da mesma forma que crianças, os adultos também podem se beneficiar de uma alimentação baseada no milho QPM.

Argumentos contra a necessidade de cereais de alta qualidade protéica ou suplementação com aminoácidos são baseados principalmente na noção de que as deficiências em aminoácidos em grãos normais, milho em particular, serão suplementadas por outros alimentos consumidos em conjunto com estes, ou por um maior consumo destes cereais. Para Hamaker & Rahmanifar (1994), na avaliação do impacto da suplementação de aminoácidos ou do uso de cereais de alta qualidade protéica, como o milho QPM na alimentação humana, é importante focalizar regiões onde o consumo do milho é alto e o consumo de alimentos de origem animal e hortaliças é baixo.

Em relação à utilização na alimentação animal, vários experimentos têm sido realizados visando demonstrar a superioridade do milho QPM para formulação de rações. Vasal (2002) comenta que nos experimentos conduzidos nas últimas três décadas, há uma clara evidência de que o milho QPM é melhor para alimentação animal quando comparado ao milho normal, devido as suas proteínas serem melhores balanceadas, apresentando grande potencial de utilização principalmente para suínos e aves.

Moreira et al., citados por Guimarães & Lopes (1995), comparando o desempenho da cultivar BR451 e de milho normal em rações para suínos sem concentrado protéico, observaram que a dieta com o BR451 resultou em animais com 70% a mais de ganho de peso e com uma conversão alimentar 30% melhor.

Na Colômbia, em ensaios utilizando o milho como única fonte de proteína para alimentação de leitões, verificou-se que aqueles alimentados somente com o milho *opaco-2* cresceram 3,5 vezes mais rápido que os alimentados com o milho comum. Ensaio conduzido na Guatemala comparando milho normal e milho *opaco-2* na alimentação de frangos de corte mostraram que o *opaco-2* produzia um grande aumento na eficiência da conversão alimentar, 3,5:1 contra 8,2:1 para milho normal. Para animais ruminantes, como bois e ovelhas, a qualidade da alimentação não é tão

importante quanto para os animais monogástricos, já que os ruminantes conseguem sintetizar aminoácidos essenciais a partir de outros aminoácidos. Entretanto, em ensaio conduzido na África do Sul, com alimentação de bezerras desmamadas, observou-se que o ganho de peso dos animais foi 28% superior ao do lote testemunha alimentado com milho normal. Isso mostra que milhos de alta qualidade protéica podem ser usados com sucesso também na alimentação de ruminantes (Peixoto et al., 1990).

Uma série de experimentos relatados por Qi et al. (2002), realizados na China, onde foram comparados o milho normal e o QPM na alimentação de frangos de corte, frangos de postura e porcos, o milho QPM apresentou melhor balanço de aminoácidos e composição de nutrientes, tornando-se uma alternativa mais econômica em relação à utilização de farinha de peixe ou à utilização de lisina sintética na ração. Cerca de 15 experimentos envolvendo formulação de rações para suínos com milho QPM foram realizados na China desde 1981 (Zhang, 2002). Os resultados obtidos demonstram que o ganho de peso diário de suínos alimentados com milho QPM foi entre 30% e 124% maior comparado à utilização do milho normal. Estes experimentos mostraram ainda que o milho QPM proporcionou uma economia de 0,47 a 2,13 kg de alimento consumido para se obter um ganho de um kg de peso.

Uma certa vantagem econômica na utilização do milho QPM nas formulações de rações também foi relatada por Lima & Bellaver (2000). Estes autores comentam que as diferenças em desempenho animal, quando da utilização na ração do milho normal ou QPM, não são esperadas quando estas rações são formuladas atendendo aos princípios nutricionais. Ocorrem, entretanto, diferenças de preços, basicamente resultantes de vantagens diferenciais de um ingrediente sobre o outro. No caso relatado, o milho QPM apresenta uma energia digestível maior do que o milho normal, o que pode ser considerado um bônus energético. Esse bônus é resultante do menor teor de fibra

do milho QPM e um pequeno aumento no teor de extrato etéreo. Cultivares que salientem estas características apresentam, portanto, uma vantagem diferencial.

Uma dificuldade esperada na utilização do milho QPM diz respeito aos custos relacionados à manutenção da identidade preservada destes materiais durante a produção e o processamento. Caso estes custos sejam elevados, a vantagem econômica de sua utilização na formulação de rações será perdida. Não existem informações na literatura a respeito dos custos de preservação de identidade do milho QPM.

#### **2.4 Conversão de linhagens elites como estratégia de melhoramento**

Um dos principais objetivos dos programas de melhoramento de milho é a introgressão em linhagem elites de um ou mais alelos de interesse de um genitor doador. Esta estratégia permite a manutenção do genótipo de uma boa linhagem enquanto incorporam-se características de interesse para as quais esta é deficiente. A utilização de retrocruzamentos sucessivos constitui-se no método clássico utilizado para conversão de linhagens. O valor deste método de melhoramento de plantas foi sugerido por Harlan e Pope desde 1922 (Fehr, 1991).

Basicamente, o procedimento consiste no cruzamento de um genitor doador (GD), o qual possui a característica de interesse, com o genitor recorrente (GR), uma linhagem elite que não possui esta característica. A geração  $F_1$  é cruzada com o GR para produzir a geração  $RC_1F_1$ . Na geração  $RC_1F_1$  e nas subsequentes gerações de retrocruzamento, os indivíduos selecionados, possuindo o alelo sendo transferido, são retrocruzados ao GR. A proporção esperada do genótipo do GD é reduzida pela metade em cada geração de retrocruzamento. Ignorando-se os efeitos de “*linkage drag*” ou arraste devido à ligação no alelo do GD sendo transferido, a porcentagem do genótipo do GR

(%GR) em cada geração de retrocruzamento é calculada como:  $\%GR = 100 [1 - (0.5)^{n+1}]$ , sendo n o número de retrocruzamentos (Fehr, 1991). De acordo com esta fórmula, após seis gerações de retrocruzamentos, a proporção média esperada de recuperação do genótipo do GR é maior que 99%.

Até recentemente, discussões a respeito da recuperação do genótipo do GR durante o processo de retrocruzamento enfatizavam os valores esperados para %GR de acordo com esta fórmula, e ignoravam largamente a variação genética para %GR que existe ao redor da média esperada. Com o desenvolvimento de marcadores genéticos capazes de fornecer boa cobertura do genoma, o interesse em aproveitar esta variação para aumentar a eficiência do método tem aumentado. O emprego de marcadores moleculares em programas de conversão de linhagens é discutido posteriormente.

O melhoramento por retrocruzamentos tem sido usado amplamente para transferir características de herança simples para linhagens elites. Geralmente, a característica a ser transferida é controlada por um único gene, embora características de herança mais complexa, mas que apresentam uma alta herdabilidade, têm sido transferidas com sucesso por retrocruzamento, como, por exemplo, precocidade em milho (Shaver, 1976). Para estas características com herança mais complexa, geralmente modificações do método são necessárias visando à sua transferência mais efetivamente.

Atualmente, o método de retrocruzamento tem sido muito utilizado em programas de melhoramento para conversão de linhagens elites para eventos transgênicos de interesse, haja vista que métodos de transformação são amplamente disponíveis, mas a eficiência do processo de transformação é ainda germoplasma dependente (Ribaut & Hoisington, 1998). De forma que este método de melhoramento convencional constitui-se no procedimento técnica e economicamente mais viável para transferência desses eventos para um conjunto amplo de linhagens.

Nos programas de melhoramento de milho QPM, a estratégia de conversão de populações e linhagens de milho normal tem sido utilizada visando aproveitar as características desejáveis presentes neste germoplasma, de forma a se obter versões QPM de variedades e híbridos superiores. Este processo de conversão torna-se complexo porque requer a manipulação simultânea de três sistemas genéticos: o gene *opaco-2*, os genes modificadores do endosperma e os genes que controlam o conteúdo de lisina (Moro, 1996).

O método originalmente utilizado para conversão de milho normal em QPM foi proposto por Vasal et al. (1980), que desenvolveram uma combinação de retrocruzamento seguido por seleção recorrente em populações segregantes para converter populações de milho normal em QPM. Neste procedimento, a próxima geração de retrocruzamento inicia-se quando um nível desejável de modificação do endosperma  $o_2$  é obtido. A conversão das populações usualmente requer o avanço da geração  $F_2$  para  $F_3$ , ou mesmo  $F_4$ , para encontrar sementes QPM desejáveis. Este procedimento é eficiente e permitiu o desenvolvimento de um grande número de populações QPM, mas necessita muitas gerações para recuperação do genótipo do genitor recorrente e oferece a oportunidade para seleção de características QPM somente nas gerações de autofecundação que são obtidas após cada geração de retrocruzamento.

Guimarães et al. (2000) propuseram um método modificado de retrocruzamento que diminui o tempo necessário à recuperação do genótipo do genitor recorrente, fornece a oportunidade para seleção para características QPM em todas as gerações MRC (retrocruzamento modificado) e pode ser usado por programas de melhoramento com diferentes facilidades (tradicional ou com análises de marcadores moleculares) para identificar os genótipos e fenótipos desejáveis.

O procedimento consiste da obtenção dos pais heterozigotos ( $O_2o_2$ )  $RC_1F_1$ ,  $RC_2F_1$ ,  $RC_3F_1$ ,  $RC_4F_1$ ,  $RC_5F_1$ , e  $RC_6F_1$ , e então cruzar estes pais

selecionados como machos com uma sequência de fêmeas homozigotas ( $o_2o_2$ ) para obter as gerações MRC. A geração  $MRC_1F_1$  é obtida pela seleção de sementes  $o_2$  com características QPM desejáveis no cruzamento  $F_2$  ( $o_2o_2$ ) x  $RC_1F_1$  ( $O_2o_2$ ).  $MRC_2F_1$  é obtida selecionando-se sementes  $o_2$  com características QPM desejáveis no cruzamento  $MRC_1F_1$  ( $o_2o_2$ ) x  $RC_2F_1$  ( $O_2o_2$ ).  $MRC_3F_1$  é obtido selecionando-se sementes com características QPM desejáveis no cruzamento  $MRC_2F_1$  ( $o_2o_2$ ) x  $RC_3F_1$  ( $O_2o_2$ ). Seguindo este procedimento, as gerações  $MRC_4F_1$ ,  $MRC_5F_1$ , e  $MRC_6F_1$  são obtidas. Em cada geração MRC é possível selecionar sementes  $o_2$  com características QPM desejáveis (modificação do endosperma).

O método dos retrocruzamentos modificados tem potencial para facilitar o desenvolvimento e lançamento de cultivares e híbridos QPM e pode também ser usado em outros programas para incorporar múltiplas características da semente governadas por um alelo recessivo e modificadores (Guimarães et al., 2000).

Meyer (2002) apresentou uma nova proposta de conversão de linhagens elites em QPM, a qual vem sendo utilizada pelo CIMMYT. Na metodologia proposta, a geração  $F_2$  é cruzada com o genitor recorrente para obtenção da geração  $RC_1F_1$ . Esta população é autofecundada, dando origem à população  $RC_1F_2$ . Nesta geração  $RC_1F_2$ , grãos  $o_2$  modificados são selecionados e estes são retrocruzados com o genitor recorrente para obtenção sucessiva das gerações  $RC_2F_1$  e  $RC_3F_1$ . A geração  $RC_3F_1$  é autofecundada, dando origem à geração  $RC_3F_2$ , na qual grãos  $o_2$  modificados são selecionados, originando uma nova linhagem QPM. Esta metodologia foi utilizada para obtenção das linhagens CML264Q e CML273Q.

Comparando-se os três processos de conversão apresentados, considerando-se o mesmo número de gerações (sete ciclos), as estimativas teóricas para proporção de recuperação do genótipo do genitor recorrente são de

87,50% (geração  $RC_2F_1$ ) para a metodologia utilizada por Vasal et al. (1980), 94,53% (geração  $MRC_3F_1$ ) para a metodologia dos retrocruzamentos modificados proposta por Guimarães et al. (2000) e 93,75% para a metodologia proposta pelo CIMMYT (Meyer, 2002).

Em relação à metodologia proposta por Guimarães et al. (2000), a metodologia do CIMMYT apresenta vantagem em relação à facilidade da condução das populações e cruzamentos no campo. A desvantagem é um menor número de gerações segregantes que permitam seleção para modificação do endosperma, necessitando ainda de um grande número de plantas para obtenção das gerações  $RC_2F_1$  e  $RC_3F_1$ , visando à garantia da transferência do alelo  $o_2$  e modificadores para a geração  $RC_3F_2$ .

Em todas as metodologias apresentadas, dependendo do nível de conversão desejado e da qualidade do doador utilizado, o melhorista pode tomar a decisão de finalizar o processo de conversão em gerações anteriores ao originalmente proposto. Populações de retrocruzamento com diferentes proporções de recuperação do genótipo do genitor recorrente também representam fontes importantes de germoplasma que podem ser utilizadas para extração de linhagens com características agronômicas e qualidade do grão QPM superiores. Esta combinação de retrocruzamentos com reciclagem constitui-se em um procedimento bastante promissor para obtenção de linhagens QPM.

O desenvolvimento de linhagens convertidas pode permitir a síntese de três tipos de híbridos: formados somente com linhagens QPM tradicionais (extraídas dos materiais QPM), formados com linhagens tradicionais e convertidas e formados apenas com linhagens convertidas.

Visando um monitoramento da qualidade protéica dos grãos selecionados, análises regulares de laboratório para determinação dos conteúdos de lisina, triptofano e proteína garantem a manutenção da qualidade protéica do doador original.

Em todos os processos propostos, os marcadores moleculares podem ser um instrumento de auxílio ao processo seletivo.

## **2.5 Utilização de marcadores moleculares em programas de conversão de linhagens**

Os marcadores moleculares surgiram com o advento das técnicas de biologia molecular. Em um primeiro momento, um dos marcadores mais utilizados em análise genética foi o RFLP, que se baseia no polimorfismo de comprimento de fragmentos obtidos pela clivagem do DNA com enzimas de restrição. RFLPs são marcadores codominantes e ricos em diversidade alélica (Guimarães, 2001; Carneiro, 2002). Atualmente, o seu emprego tem sido reduzido pela disponibilidade de outros sistemas de marcadores com maiores vantagens operacionais e econômicas para sua utilização.

O desenvolvimento destes novos sistemas de marcadores moleculares tem sido uma das mais dinâmicas áreas em genética molecular aplicada durante os últimos 15 anos. O desenvolvimento do processo de amplificação em cadeia, utilizando uma DNA polimerase, levou à descrição de outras classes de marcadores moleculares. Atualmente, um número virtualmente ilimitado de marcadores altamente polimórficos pode ser obtido em qualquer organismo vivo, empregando-se diversas técnicas.

Dentre estes novos marcadores, a grande disponibilidade dos marcadores microssatélites ou SSRs (Seqüências Simples Repetidas) para a cultura do milho tem facilitado bastante os estudos que necessitam de uma ampla amostragem do genoma, por ser um método baseado em PCR e necessitar de uma pequena quantidade de DNA. SSRs são seqüências curtas de nucleotídeos, usualmente de 2 a 6 bases de extensão, que são repetidas em *tandem* (Smith et al., 1997). Estes funcionam como marcadores genéticos codominantes e altamente reproduzíveis,

tornando-se ideais para utilização em análise genética de ligação e avaliação de diversidade. Os marcadores SSRs são relativamente abundantes no genoma do milho, existindo atualmente mais que 1.500 SSRs cujas seqüências dos *primers* e posição no genoma são publicamente disponíveis no "*Maize Genome Database - MaizeDB*" (<http://www.agron.missouri.edu/ssr.html>).

O surgimento dos marcadores moleculares abriu muitas possibilidades para sua utilização em programas de conversão baseados no método dos retrocruzamentos. Para Hospital & Charcosset (1997), os marcadores moleculares podem ser usados em programas de retrocruzamentos, principalmente de duas maneiras, as quais denominaram de seleção "*foreground*" e seleção "*background*".

No primeiro método, a presença de um alelo alvo em um indivíduo é diagnosticada monitorando-se o genótipo do doador para marcadores que flanqueiam este alelo alvo. Este é um poderoso instrumento para manipulação de características oligogênicas sob numerosas situações no melhoramento de plantas (Melchinger, 1990), manipulação de QTL (Stuber, 1995), bem como para reduzir o arraste devido à ligação ou "*linkage drag*" (Frisch e Melchinger, 2001 a,b; Hospital, 2001).

Esta redução no arraste devido à ligação torna-se particularmente importante quando o doador da característica de interesse é não adaptado ou exótico. Utilizando um procedimento teórico, Stam & Zeven (1981) consideraram a proporção do genótipo do doador no mesmo cromossomo do alelo de interesse sendo introgridido, em um programa regular de retrocruzamento sem o auxílio de marcadores moleculares. Eles deduziram que nas plantas  $RC_6F_1$ , em média, 32% dos alelos neste cromossomo serão de origem do genitor doador. Estes resultados teóricos foram confirmados com dados experimentais apresentados por Young & Tanksley (1989b), que encontraram segmentos de até 51 cM do cromossomo doador associados a um

alelo de resistência introgridido em tomate, após seis gerações de retrocruzamentos.

O segundo método (seleção “*background*”), proposto por Tanksley et al. (1989), acelera a recuperação do genótipo do genitor recorrente. Indivíduos são selecionados, os quais são homozigotos para os alelos do genitor recorrente em um grande número de locos marcadores distribuídos pelo genoma. Ragot et al. (1995) demonstraram experimentalmente a eficiência deste tipo de procedimento para introgressão do transgene Bt em diferentes linhagens de milho.

Ribaut & Hoisington (1998) ressaltam duas vantagens do método de retrocruzamento assistido por marcadores moleculares em relação ao método tradicional: recuperação mais rápida do genótipo do genitor recorrente e seleção mais eficiente de indivíduos que apresentem eventos de recombinação próximos ao alelo alvo.

Em um programa de conversão assistido por marcadores moleculares, uma organização adequada dos dados disponíveis é parte fundamental do processo. Idealmente, os marcadores moleculares utilizados fornecem dados que podem ser representados como alelos de locos com posição conhecida. Young & Tanksley (1989a) descreveram uma aplicação para visualização de dados de marcadores moleculares, introduzindo o conceito de ‘genótipos gráficos’. Estes genótipos gráficos apresentam a origem parental e a composição alélica em todo o genoma de uma maneira que é simples de visualizar, compreender e utilizar. Alguns softwares são capazes de fazer a análise e apresentação destes genótipos gráficos. O GGT – *Graphical Genotypes*, desenvolvido por Van Berloo (1999), é de domínio público e pode ser obtido pela seguinte URL: <http://www.dpw.wau.nl/pv/PUB/ggt/>.

Muitos autores têm contribuído no desenvolvimento das teorias e estratégias de utilização dos marcadores moleculares em programas de retrocruzamento.

Hospital et al. (1992) avaliaram, em programas de introgressão, os efeitos do tempo, da intensidade de seleção, do tamanho da população e do número e posição de marcadores selecionados na proporção esperada do genótipo do genitor recorrente. Os resultados demonstraram que a seleção por marcadores pode conduzir a um ganho de tempo de aproximadamente duas gerações e que a seleção para recombinantes próximos ao alelo de interesse deve ser preferida em um primeiro estágio da seleção, embora a seleção para marcadores distribuídos pelo restante do genoma também deva ser considerada.

A redução no número de gerações pela utilização de marcadores moleculares também tem sido constatada em outras situações. Openshaw et al. (1994), por simulação, concluíram que, para uma espécie com um genoma constituído de 10 cromossomos com 200 cM cada e utilizando 80 marcadores para a seleção em população com 100 progênies, é possível reduzir o número de retrocruzamentos de sete para três e recuperar aproximadamente 99% do genitor recorrente. Dados experimentais apresentados por estes autores concordaram com os resultados da simulação. Cinquenta plantas  $RC_1F_1$  que apresentavam o alelo de interesse foram avaliadas com 83 marcadores RFLP. A média de recuperação do genótipo do genitor recorrente das cinco melhores plantas  $RC_1F_1$  foi de 82,64%.

Visscher et al. (1996) investigaram por simulação o ganho relativo em um programa de retrocruzamento usando apenas marcadores, apenas seleção fenotípica ou um índice de marcadores e fenótipos. Estes concluíram que marcadores espaçados de 10 a 20 cM apresentaram uma vantagem seletiva de uma a duas gerações de retrocruzamento, quando comparados à seleção fenotípica ou ao acaso.

O tamanho da população de retrocruzamento avaliada tem sido reportado por vários autores como o mais importante fator a afetar a eficiência da seleção assistida por marcadores (Hospital et al., 1997; Frisch et al., 1999). Frisch et al.

(1999), trabalhando com simulação, verificaram que um aumento no tamanho da população da geração  $RC_1F_1$  para a geração  $RC_3F_1$  reduziu o número de marcadores necessários à avaliação em 50%, sem afetar a proporção de recuperação do genótipo do genitor recorrente. Estes autores comentam, ainda, que a conversão assistida pode ser finalizada após quatro gerações de retrocruzamento, mesmo com um pequeno tamanho da população e um limitado número de marcadores avaliados.

Todos os trabalhos apresentados referem-se ao caso em que apenas um alelo de interesse é introgridido. Frisch & Melchinger (2001b) estenderam seus estudos com simulação para casos em que o objetivo é a introgressão de dois alelos simultaneamente. Estes autores verificaram que, em um programa de conversão planejado para três gerações de retrocruzamento, um número mínimo de marcadores foi necessário quando foram aplicadas estratégias consistindo de três ou quatro etapas de seleção; o tamanho da população aumentou nas gerações avançadas em relação às iniciais e a junção dos alelos de interesse em uma mesma população ocorreu nos estágios iniciais do processo de conversão.

Os vários resultados obtidos a partir de simulação e também os dados experimentais evidenciam que a definição de uma estratégia eficiente de conversão de linhagens auxiliada por marcadores moleculares não é um procedimento simples e direto, haja vista o número de parâmetros envolvidos.

Ribaut et al. (2002) recomendam que, antes de qualquer experimento ser iniciado, o número de alelos alvo envolvidos no processo de seleção, assim como o nível desejável de conversão da linhagem sejam definidos. Em seguida, deve-se identificar em cada geração o tamanho da população a ser analisado, o número, posição e natureza dos marcadores moleculares utilizados e o número de genótipos que serão selecionados. O planejamento do processo inclui, ainda, uma avaliação dos recursos disponíveis e uma avaliação do germoplasma trabalhado (ex. desempenho agrônomico e número de linhagens no programa de

conversão). Considerando estes parâmetros, e em função da experiência já acumulada na literatura, torna-se evidente que a identificação da mais eficiente estratégia para um processo de conversão de linhagens auxiliado por marcadores moleculares deve ser um planejamento caso a caso, em função da realidade dos programas de melhoramento e das particularidades do projeto a ser iniciado.

## **2.6 Marcadores moleculares e o melhoramento do milho QPM**

A complexidade dos processos envolvidos em um programa de melhoramento de milho QPM o torna um sistema ideal para se beneficiar das modernas técnicas de biologia molecular que atualmente podem ser utilizadas como ferramentas de auxílio ao processo seletivo. A utilização de marcadores moleculares como instrumento de seleção vem progredindo no contexto da pesquisa e melhoramento do milho QPM.

Uma parte dos esforços atuais dos programas de melhoramento de milho QPM concentra-se na conversão de linhagens elites, visando à obtenção de versões QPM de híbridos de sucesso tradicionais. Nestas conversões, o uso de marcadores moleculares para a identificação precoce de plantas que apresentam o alelo  $o_2$  antes dos cruzamentos pode aumentar a eficiência do processo por vários motivos: a avaliação das progênies pode ser dispensada; o tamanho da população pode ser reduzido a poucas plantas por geração e, devido ao alelo alvo ser identificado em plantas jovens, características do grão e da planta podem ser selecionadas simultaneamente.

O esforço para a identificação molecular do alelo  $o_2$  é atualmente beneficiado pelo amplo conhecimento disponível a respeito do gene *opaco-2* e suas interações. Dessa forma, sistemas de marcadores baseados em hibridação ou PCR têm sido desenvolvidos, visando à diferenciação dos genótipos  $O_2O_2$ ,  $O_2o_2$  e  $o_2o_2$  em populações segregantes para este gene.

Kata et al. (1994) testaram a efetividade da identificação de genótipos *opaco-2* em populações segregantes de milho QPM pela análise de marcadores RFLP. Nesta identificação foi usada uma sonda de cDNA do gene *opaco-2* e a enzima de restrição *HindIII*, para avaliação de plantas de populações F<sub>2</sub> e de retrocruzamentos. Uma comparação dos genótipos identificados pelos marcadores RFLP com o fenótipo das sementes das progênies descendentes indicou que o procedimento foi acurado, com uma perfeita diferenciação a partir da análise de folhas jovens por RFLP dos genótipos *O<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*, *O<sub>2</sub>*o*<sub>2</sub>* e *o<sub>2</sub>*o*<sub>2</sub>*, nas populações segregantes estudadas.

O gene *opaco-2* está localizado no braço curto do cromossomo 7 (Soave et al., 1981), especificamente no bin 7.01 e, em função dos resultados de seqüenciamento deste gene, alguns *primers* SSR têm sido obtidos a partir desta seqüência, estando associados ao gene *opaco-2* e publicamente disponíveis no *Maize Genome Database – MaizeDB*. Estes marcadores são os SSRs phi057, phi112 e umc1066.

A utilização prática destes marcadores para diferenciação de populações segregantes de milho QPM para o alelo *o<sub>2</sub>* tem sido procurada por alguns grupos de pesquisa que trabalham com o melhoramento do milho QPM. Dreher et al. (2000) e Meyer (2002) relatam a utilização de marcadores SSRs para identificação do alelo *o<sub>2</sub>* nos processos de conversão de linhagens elite em milho QPM do CIMMYT. Nenhuma referência é feita nestes trabalhos a um marcador específico ou a um conjunto de marcadores utilizados nesta diferenciação.

Em processos de conversão de linhagens para QPM, os marcadores moleculares podem ainda maximizar a eficiência dos programas de retrocruzamento, aumentando a proporção de conversão dos indivíduos e reduzindo o tempo requerido para obter uma recuperação aceitável do genitor recorrente.

Os genes modificadores do endosperma (modificadores do  $o_2$ ) representam o sistema mais difícil de manipular nestes programas de conversão, devido à sua natureza complexa e multigênica e à sua expressão instável em alguns genótipos (Belousov, 1987). Por estes motivos, a identificação de marcadores moleculares que aumentem a eficiência de seleção para vitreosidade pode proporcionar um impacto significativo nestes programas. Lopes (1993) encontrou dois marcadores RFLP altamente associados com a modificação do endosperma em populações QPM, um mapeado próximo ao centrômero do cromossomo 7 e o outro mapeado próximo ao telômero do braço longo deste mesmo cromossomo. Ambos os marcadores foram localizados próximos aos genes relacionados à síntese de gama-zeína, uma proteína que é altamente correlacionada com a modificação do endosperma. Nenhuma evidência foi obtida de que apenas estes dois locos estejam envolvidos no processo de modificação.

A seleção de modificadores do endosperma poderá, ainda, ser beneficiada pela seleção dos genótipos  $o_2o_2$  via marcadores moleculares, haja vista que, dessa forma, pode-se aumentar a pressão de seleção para grãos com alto grau de modificação (notas 1 e 2 em uma escala de 1 a 5, em que 1 corresponde ao grão totalmente modificado e 5 corresponde ao grão totalmente opaco), pois o caráter QPM destes materiais pode ser posteriormente confirmado pelos marcadores.

No programa de melhoramento QPM do CIMMYT, os custos associados com os métodos tradicionais e a conversão assistida por marcadores foram comparados por Dreher et al. (2000). Os resultados destes autores sugerem que, para a realidade daquele programa, nos casos em que é possível identificar materiais segregantes pela inspeção visual de espigas no campo, os métodos convencionais oferecem vantagens econômicas sobre a seleção assistida. Nos casos em que a seleção visual não é possível ou dificultada, o uso de marcadores

moleculares é vantajoso do ponto de vista econômico, com potencial de uso em casos em que o *screening* fenotípico é particularmente caro ou difícil. Isto inclui projetos que envolvem a seleção para múltiplos genes, alelos recessivos, expressão tardia do gene de interesse e considerações ambientais ou geográficas. A complexidade genética envolvendo o processo de conversão de linhagens normais em milho QPM a enquadra nestes casos potenciais que podem se beneficiar efetivamente de um programa de seleção assistida.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRASEM. A produção de sementes no Brasil. MA/Embrapa Sementes Básicas/ABRASEM, 1999. Relatório da safra 1996/1997.

BELOUSOV, A. A. Genetic analysis of modified endosperm texture in *opaque2* maize. **Genetika**, Moscow, v. 23, n. 4, p. 677-685, 1987.

BERNARD, L.; CICERI, P.; VIOTTI, A. Molecular analysis of wild type and mutant alleles at the *Opaque-2* regulatory locus of maize reveals different mutations and types of *O2* products. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 24, n. 6, p. 949-959, Mar. 1994.

BJARNASON, M. VASAL, S. K. Breeding of Quality Protein Maize (QPM). **Plant Breeding Reviews**, New York, v. 9, p. 181-216, 1992.

BRESSANI, R. Nutritional value of High-Lysine maize in humans. In: MERTZ, E. T. (Ed.). **Quality protein maize**. St. Paul: American Association of Cereal Chemists, 1992, p. 205-224.

BRESSANI, R. Opaque-2 corn in human nutrition and utilization. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON QUALITY PROTEIN MAIZE, 1994, Sete Lagoas, **Proceedings...** Sete Lagoas, 1994. p. 41-64.

BURNETT, R. J.; LARKINS, B. A. *Opaque2* modifiers alter transcription of the 27-kDa  $\gamma$ -zein genes in maize. **Molecular General Genetics**, New York, v. 261, n. 6, p. 908-916, July 1999.

CARNEIRO, N. P. Tipos de marcadores utilizados no melhoramento de plantas In: SIMPÓSIO DE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 6., 2002, Lavras. Disponível em: <http://www.nucleoestudo.ufla.br/gen/eventos/simposios/5simpo/5simpo.htm>. Acessado em: 18 nov. 2002.

CÓRDOVA, H.; LISTMAN, M. Quality Protein Maize: Improved nutrition and livelihoods for the poor. In: **FAO Expert Consultation and Workshop on Protein Sources for the Animal Feed Industry**. Bangkok, 2002. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/aga/workshop/feed/papers.htm>. Acessado em: 30 out. 2002.

CROW, J. F.; KERMICLE, J. Oliver Nelson and Quality Protein Maize. **Genetics**, Baltimore, v. 160, n. 3, p. 819-821, Mar. 2002.

DREHER, K.; MORRIS, M.; KHAIRALLAH, M.; RIBAUT, J. M.; PANDEY, S.; SRINIVASAN, G. Is marker-assisted selection cost-effective compared to conventional plant breeding methods? The case of quality protein maize. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL CONSORTIUM ON AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY RESEARCH (ICABR), 4., 2000, Ravello. **Anais...** Ravello, 2000. 25 p.

FAO. **FAO Statistics Database 2003 (FAOSTAT)**. Disponível em: <http://apps.fao.org/>. Acessado em: 12 mar. 2003.

FEHR, W. R. **Principles of cultivars development**. Ames: Macmillan, 1991. 536 p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa Cenargem, 1998. 220 p.

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

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

FRISCH, M.; MELCHINGER, A. E. Marker-assisted backcrossing for simultaneous introgression of two genes. **Crop Science**, Madison, v. 41, n. 6, p. 1716-1725, Nov./Dec. 2001b.

GEVERS, H. O.; LAKE, J. K. Development of modified *opaque2* maize in South Africa. In: MERTZ, E. T. (Ed). **Quality protein maize**. St. Paul: The American Society of Cereal Chemists, 1992. p. 49-78.

GUIMARÃES, C. T. Técnicas moleculares aplicadas ao melhoramento do milho. In: SIMPÓSIO DE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 5., 2001, Lavras. Disponível em: <<http://www.nucleoestudo.ufla.br/gen/eventos/simposios/5simpo/5simpo.htm>> Acessado em 02 de nov. 2002.

GUIMARÃES, P. E. O.; LOPES, M. A. Melhoramento da qualidade protéica do milho. **Óleos e Grãos**, São Paulo, v. 23, p. 45-8, 1995.

GUIMARÃES, P. E. O.; LOPES, M. A.; GAMA, E. E. G.; SANTOS, M. X.; PARENTONI, S. N.; PAES, M. C.; VIEIRA JÚNIOR, P. A.; SILVA, A. E.; PAIVA, E.; CORREIA, L. A.; PACHECO, C. A. P. Quality protein maize improvement at the national maize and sorghum research center CNPMS/EMBRAPA/BRAZIL. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON QUALITY PROTEIN MAIZE, 1994, Sete Lagoas. **Proceedings...** Sete Lagoas, 1994. p. 185-204.

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

HABBEN, J. E.; MORO, G. L.; HUNTER, B. G.; HAMAKER, B. R.; LARKINS, B. A. Characterization of the proteins that define the nutritional quality of maize endosperm. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON QUALITY PROTEIN MAIZE, 1994, Sete Lagoas, **Proceedings...** Sete Lagoas, 1994. p. 121-132.

HABBEN, J. E.; MORO, G. L.; HUNTER, B. G.; HAMAKER, B. R.; LARKINS, B. A. Elongation factor 1 $\alpha$  concentration is highly correlated with the lysine content of maize endosperm. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 92, n. 19, p. 8640-8644, Sept. 1995.

HAMAKER, B. R.; RAHMANIFAR, A. QPM and nutritional needs of children in poor communities In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON QUALITY PROTEIN MAIZE, 1994, Sete Lagoas, **Proceedings...** Sete Lagoas, 1994. p. 27-40.

HENRY, A. M.; DAMERVAL, C. High rates of polymorphisms and recombination at the *Opaque-2* locus in cultivated maize. **Molecular General Genetics**, New York, v. 256, n. 2, p. 147-157, Sept. 1997.

HOSPITAL, F. Size of donor chromosome segments around introgressed loci and reduction of linkage drag in marker-assisted backcross program. **Genetics**, Baltimore, v. 158, n. 3, p. 1363-1379, July 2001.

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

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

HOSPITAL, F.; MOREAU, L.; LACOUDRE, F.; CHARCOSSET, A.; GALLAIS, A. More on the efficiency on marker-assisted selection. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 95, n. 8, p. 1181-1189, Dec. 1997.

KATA, S. R.; TAYLOR, B. H.; BOCKHOLT, A. J.; SMITH, J. D. Identification of opaque-2 genotypes in segregating populations of Quality Protein Maize by analysis of restriction fragment length polymorphisms. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 89, n. 4, p. 407-412, Oct. 1994.

LIMA, G. J. M. M. de; BELLAVER, C. Tendências de especialização de milho na alimentação de suínos e aves. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E MILHO E SORGO, 23., 2000, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia: ABMS/EMBRAPA Milho e Sorgo/UFU, 2000. 1 CD-ROM.

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

MAGNAVACA, R. Quality protein maize development in Brazil. In: MERTZ, E. T. (Ed.). **Quality protein maize.** St. Paul: American Association of Cereal Chemists, 1992. p. 98.

MELCHINGER, A. E. Use of molecular markers in breeding for oligogenic disease resistance. **Plant Breeding**, Berlin, v. 104, n. 1, p. 1-19, Mar. 1990.

MERTZ, E. T.; BATES, L. S.; NELSON, O. E. Mutant gene that changes the protein composition and increases the lysine content of maize endosperm. **Science**, Washington, v. 145, n. 3629, p. 279-280, July 1964.

MEYER, J. QPM - Summary of line conversion from normal to QPM. México, 2002. Disponível em: <<http://www.cimmyt.cgiar.org/qpm/breeding/convnormlinetoqpm/conversion%20%20summary.htm>>. Acessado em: 13 nov. 2002.

MORO, G. L. **The biochemical genetics of quality protein maize**. 1996. 187 p. Thesis (Agronomy and Plant Genetics) – University of Arizona, Tucson.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Quality protein maize**. Washington: National Academy Press, 1988, 100 p.

NELSON, O. E. Genetic modification of protein quality in plants. **Advances in Agronomy**, New York, v. 21, p. 171-194, 1969.

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

ORTEGA, E. I.; VILLEGAS, E.; VASAL, S. K. A comparative study of protein changes in normal and quality maize during tortilla making. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 63, n. 5, p. 446-451, Sept./Oct. 1986.

OSBORNE, T. B.; MENDEL, L. B. Nutritive properties of protein of the maize kernel. **Journal Biological Chemistry**, Baltimore, v. 18, n. 1, p. 1-6, 1914.

OSEI, S. A.; DEI, H. K.; TUAH, A. K. Evaluation of quality protein maize as a feed ingredient for layer pullet. **Journal Animal Feed Science**, Jablonna, v. 8, n. 2, p. 181-189, 1999.

PACHECO, C. A. P.; GUIMARÃES, P. E. O.; PARENTONI, S. N.; LOPES, M. A.; SANTOS, M. X. dos; GAMA, E. E. G.; VASCONCELOS, M. J. V.; CORREA, L. A.; MEIRELLES, W. F. O desenvolvimento de milho de alta qualidade nutricional no Brasil. In: REUNIÓN LATINOAMERICANA DEL MAIZ, 28., 1999, Sete Lagoas. **Memórias...** Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS; México: CIMMYT, 1999. p. 13-26.

PAEZ, A. V.; HELM, J. L.; ZUBER, M. S. Lysine content of *opaque2* maize kernels having different phenotypes. **Crop Science**, Madison, v. 9, p. 251-252, 1969.

PASCHOALICK, H. N. S. **Efeito da época de aplicação do nitrogênio na produção, teor de óleo e na qualidade protéica de cultivares de milho (*Zea mays L.*) normal e QPM.** 1998. 107 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – UNESP, Jaboticabal.

PEIXOTO, M. J. V. V. D.; PARENTONI, S. N.; GAMA, E. E. G.; MAGNAVACA, R.; PAIVA, E.; REGO, M. M. Perspectiva de utilização de milhos de alta qualidade protéica no Brasil. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 14, n. 165, p. 23-24, 1990.

QI, G. H.; DIAO, Q. Y.; TU, Y.; WU, S. G.; ZHANG, S. H. Nutritional evaluation and utilization of quality protein maize (QPM) in animal feed. In: **FAO Expert Consultation and Workshop on Protein Sources for the Animal Feed Industry.** Bangkok, 2002. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/aga/workshop/feed/papers.htm>>. Acessado em: 30 out. 2002.

RAGOT, M.; BIASIOLLI, M.; DELBUT, M. F.; DELL'ORCO, A.; MALGARINI, L.; THEVENIN, P.; VERNROY, J.; VIVANT, J.; ZIMMERMANN, R.; GAY, G. Marker-assisted backcrossing: a practical example. In: **TECHNIQUES ET UTILISATIONS DES MARQUEURS MOLECULAIRES**, 1994, Montpellier. **Proceedings...** Paris: INRA, 1995.

RIBAUT, J. M.; HOISINGTON, D. Marker-assisted selection: New tools and strategies. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 3, n. 6, p. 236-239, June 1998.

RIBAUT, J. M.; JIANG, C.; HOISINGTON, D. Simulations experiments on efficiencies of gene introgression by backcrossing. **Crop Science**, Madison, v. 42, n. 2, p. 557-565, Mar./Apr. 2002.

SCHMIDT, R. J. *Opaque2* and zein gene expression. In: VERMA, D. P. S. (Ed). **Control of plant gene expression**. Boca Raton: CRC Press, 1993. p. 337-355.

SHAVER, D. L. Conversions for earliness in maize inbreds. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Ithaca, v. 50, n. 1, p. 20-23, 1976.

SHOTWELL, M. A.; LARKINS, B. A. The biochemistry and molecular biology of seed storage proteins. In: MRCUS, A. (Ed.) **The biochemistry of plants: a comprehensive treatise**. San Diego: Academic Press, 1989. v. 15, p. 297-345.

SMITH, J. S. C.; CHIN, E. C. L.; SHU, H.; SMITH, O. S.; WALL, S. J.; SENIOR, M. L.; MITCHELL, S. E.; KRESOVICH, S.; ZIEGLE, J. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): Comparisons with data from RFLPs and pedigree. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 95, n.1/2, p. 163-173, July 1997.

SOAVE, C.; REGGIANI, R.; DI FONZO, N.; SALAMINI, F. Clustering of genes for 20 kD zein subunits in the short arm of maize chromosome 7. **Genetics**, Baltimore, v. 97, n. 2, p. 363-377, 1981.

SPROULE, A. M.; SALDIVAR, S. O.; BOCKHOLT, A. J.; ROONEY, L. W.; KNABE, D. A. Nutritional evaluation of tortillas and tortilla chips from quality protein maize. **Cereal Foods World**, St. Paul, v. 33, n. 2, p. 233-236, Feb. 1988.

STAM, P.; ZEVEN, A. C. The theoretical proportion of the donor genome in near-isogenic lines of self-fertilizers bred by backcrossing. **Euphytica**, Dordrecht, v. 30, n. 2, p. 227-238, 1981.

STUBER, C. W. Mapping and manipulating quantitative traits in maize. **Trends Genetics**, Oxford, v. 11, n. 12, p. 477-481, Dec. 1995.

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

VAN BERLOO, R. GGT: Software for the display of Graphical Genotypes. **Journal of Heredity**, Cary, v. 90, n. 2, p. 328-329, Mar./Apr. 1999.

VASAL, S. K.; VILLEGAS, E.; BJARNASON, M.; GELAW, B.; GOETZ, P. Genetic modifiers and breeding strategies in developing hard endosperm opaque-2 materials. In: POLLMER, W. G.; PHILLIPS, R. (Ed.). **Improvement of quality traits of maize for grain and silage use**. The Hague: Nijhoff, 1980. p. 37-71.

VASAL, S. K. High Quality protein corn. In: HALLAUER, A. R. (Ed.). **Specialty corns**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2000. p. 85-129.

VASAL, S. K. The role of high lysine cereals in animal and human nutrition in Asia. In: **FAO Expert Consultation and Workshop on Protein Sources for the Animal Feed Industry**. Bangkok, 2002. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/aga/workshop/feed/papers.htm>>. Acessado em: 30 out. 2002.

VILLEGAS, E.; VASAL, S. K.; BJARNASON, M. Quality Protein Maize - What is it and how was it developed. In: Mertz, E. T. (Ed.). **Quality protein maize**. St. Paul: The American Society of Cereal Chemists, 1992. p. 27-48.

VISSCHER, P. M.; HALEY, C. S.; THOMPSON, R. Marker-assisted introgression in backcross breeding programs. **Genetics**, Baltimore, v. 144, n. 4, p. 1923-1932, Dec. 1996.

WALLACE, J. C.; LOPES, M. A.; PAIVA, E.; LARKINS, B. A. New method for extraction and quantitation of zeins reveal a high content of gamma-zein in modified opaque-2 maize. **Plant Physiology**, Rockville, v. 92, n. 1, p. 191-196, Jan. 1990.

WANG, X.; LARKINS, B. A. Genetic analysis of amino acid accumulation in *opaque-2* maize endosperm. **Plant Physiology**, Rockville, v. 125, n. 4, p. 1766-1777, Apr. 2001.

WANG, X.; WOO, Y.; KIM, C. S.; LARKINS, B. A. Quantitative trait locus mapping of loci influencing elongation factor 1 $\alpha$  content in maize endosperm. **Plant Physiology**, Rockville, v. 125, n. 3, p. 1271-1282, Mar. 2001.

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

YOUNG, N. D.; TANKSLEY, S. D. RFLP analysis of the size of chromosomal segments retained around the *Tm-2* locus of tomato during backcross breeding. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 77, n. 3, p. 353-359, 1989b.

YOUNG, V. R.; BIER, D. M.; PELLETE, P. L. A theoretical basis for increasing current estimates of the amino acid requirements in adult man, with experimental support. **American Journal Clinical Nutritional**, Bethesda, v. 50, n. 1, p. 80, July 1989.

ZHANG, S. H. QPM research and development in China. In: **FAO Expert Consultation and Workshop on Protein Sources for the Animal Feed Industry**. Bangkok, 2002. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/aga/workshop/feed/papers.htm>>. Acessado em: 30 out. 2002.

**CAPÍTULO 2: Marcadores SSRs associados ao gene *opaco-2* em linhagens e populações segregantes de milho de alta qualidade protéica (QPM)**

**MARCADORES SSRs ASSOCIADOS AO GENE *OPACO-2* EM  
LINHAGENS E POPULAÇÕES SEGREGANTES DE MILHO DE ALTA  
QUALIDADE PROTÉICA (QPM)**

**RESUMO**

A identificação precoce do alelo  $o_2$  em populações segregantes por marcadores moleculares constitui uma importante ferramenta de auxílio ao processo seletivo nos programas de melhoramento de milho QPM. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a associação dos marcadores SSRs umc1066, phi057 e phi112 com o gene *opaco-2*, testando a efetividade dos mesmos para diferenciação dos genótipos  $O_2O_2$ ,  $O_2o_2$  e  $o_2o_2$  em linhagens e populações segregantes de milho de alta qualidade protéica. As análises com os três marcadores SSRs ligados ao gene *opaco-2* foram realizadas em um conjunto de 36 linhagens, sendo 29 normais e 7 QPM. O marcador umc1066 foi ainda avaliado em um conjunto de três populações segregantes  $RC_5F_1$ . A confirmação da co-segregação foi realizada a partir da autofecundação das plantas  $RC_5F_1$  analisadas, com posterior análise da segregação fenotípica nas espigas  $RC_5F_2$  descendentes. Verificou-se que os três marcadores SSRs foram eficientes na diferenciação da maioria das linhagens normais e QPM estudadas, demonstrando potencial de utilização no melhoramento assistido. A utilização efetiva destes marcadores, isolados ou em conjunto, na seleção precoce dos genótipos  $O_2O_2$ ,  $O_2o_2$  e  $o_2o_2$  dependerá das linhagens envolvidas nos cruzamentos e dos objetivos de cada projeto.

**SSRS MARKERS ASSOCIATED TO THE *OPAQUE-2* GENE IN  
QUALITY PROTEIN MAIZE (QPM) INBRED LINES AND  
SEGREGATING POPULATIONS**

**ABSTRACT**

Early identification of the  $o_2$  allele in segregating populations by molecular markers is an important selection tool in QPM breeding programs. In this context, the objective of this study was to evaluate the association of the SSR markers umc1066, phi057 and phi112 with the *opaque-2* gene, testing its effectiveness to discriminate  $O_2O_2$ ,  $O_2o_2$  and  $o_2o_2$  genotypes in QPM inbred lines and segregating populations. The analyses with the three SSR markers linked to the *opaque-2* gene were carried out on a set of 36 inbred lines, 19 normal and 7 QPM. The umc1066 marker was also evaluated in a set of three segregating

BC<sub>5</sub>F<sub>1</sub> populations, followed by selfing and analysis of the phenotypic segregation in the BC<sub>5</sub>F<sub>2</sub> ears, in order to confirm its co-segregation with the target gene. It was detected that the three SSR markers were efficient in differentiating most of the normal and QPM inbred lines studied, showing potential for use in marker-assisted selection. The effective use of these markers, alone or together, in early selection of the  $O_2O_2$ ,  $O_2o_2$  and  $o_2o_2$  genotypes, will depend on the inbred lines involved in the crosses and of the objectives of each project.

## 1 INTRODUÇÃO

Um programa de melhoramento de milho QPM é um processo complexo porque requer a manipulação simultânea de três sistemas genéticos: o gene *opaco-2*, os genes modificadores do endosperma e os genes que controlam o conteúdo de lisina (Moro, 1996). Considerando-se estes aspectos, é um sistema ideal para se beneficiar das modernas técnicas de biologia molecular que atualmente podem ser utilizadas como ferramentas de auxílio ao processo seletivo.

Dentre as possibilidades para utilização de técnicas moleculares em um programa de melhoramento de milho QPM, uma das mais promissoras constitui-se na identificação precoce por marcadores moleculares do alelo recessivo  $o_2$  em populações segregantes. Especialmente em programas de conversões de linhagens, o uso destes marcadores para a identificação de plantas que apresentam o alelo  $o_2$  antes dos cruzamentos pode aumentar a eficiência do processo por vários motivos: a avaliação das progênes pode ser dispensada, o tamanho da população pode ser reduzido a poucas plantas por geração e, devido ao alelo alvo ser identificado em plantas jovens, características do grão e da planta podem ser selecionadas simultaneamente. A identificação de marcadores moleculares associados ao alelo  $o_2$  pode ainda assegurar uma melhor seleção fenotípica de grãos com um alto grau de modificação do endosperma, haja vista

a possibilidade da condição QPM destes grãos ser posteriormente confirmada por estes marcadores.

O esforço para a identificação molecular do alelo  $o_2$  é atualmente beneficiado pelo amplo conhecimento disponível a respeito do gene *opaco-2* e suas interações. Dessa forma, sistemas de marcadores baseados em hibridação ou PCR têm sido desenvolvidos, visando à diferenciação dos genótipos  $O_2O_2$ ,  $O_2o_2$  e  $o_2o_2$  em populações segregantes. A utilidade dos marcadores RFLP para realizar esta diferenciação foi demonstrada por Kata et al. (1994). Embora eficaz, a utilização de marcadores RFLP para esta finalidade apresenta limitações relativas ao custo da técnica e dificuldades operacionais, de forma que outros sistemas de marcadores, como os microssatélites ou SSRs, tornam-se mais adequados para serem utilizados nesta identificação.

No *Maize Genome Database – MaizeDB*, os marcadores SSRs umc1066, phi057 e phi112, localizados no bin 7.01, estão descritos como associados ao gene *opaco-2*. A utilização prática de marcadores SSRs para diferenciação de populações segregantes de milho QPM foi sugerida por Dreher et al. (2000) e Meyer (2002). Entretanto, nenhuma referência à eficiência de um marcador SSR específico ou a um conjunto de marcadores para realização desta diferenciação é feita por estes autores.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a associação dos marcadores SSRs umc1066, phi057 e phi112 com o gene *opaco-2*, testando a efetividade dos mesmos para diferenciação dos genótipos  $O_2O_2$ ,  $O_2o_2$  e  $o_2o_2$  em linhagens e populações segregantes de milho de alta qualidade protéica.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Biologia Aplicada (NBA) da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, MG.

### 2.1 Marcadores microssatélites

De acordo com estudos prévios, três marcadores SSRs estão descritos no *Maize Genome Database – MaizeDB* (<http://www.agron.missouri.edu/ssr.html>) como associados ao gene *opaco-2*, os quais foram analisados no presente trabalho (Tabela 1).

### 2.2 Linhagens e populações segregantes avaliadas

As análises com os três marcadores SSRs ligados ao gene *opaco-2* foram realizadas em um conjunto de 36 linhagens, sendo 29 normais e sete QPM, pertencentes ao programa de melhoramento de milho da Embrapa Milho e Sorgo (Tabela 2). Em função dos resultados obtidos com esta caracterização inicial, o marcador *umc1066* foi ainda avaliado em um conjunto de três populações segregantes  $RC_5F_1$ , compostas por 18 plantas cada e advindas do programa de conversão de linhagens de milho normal em QPM da Embrapa Milho e Sorgo. As populações apresentam uma segregação esperada de 50% de indivíduos  $O_2O_2$  (homozigotos dominantes) e 50% de indivíduos  $O_2o_2$  (heterozigotos), sendo, dessa forma, adequadas para avaliação da co-segregação do marcador com o gene *opaco-2*. A confirmação da co-segregação foi realizada pela autofecundação das plantas  $RC_5F_1$  e posterior análise da segregação fenotípica nas espigas  $RC_5F_2$  descendentes.

TABELA 1. Marcadores SSRs associados ao gene *opaco-2* utilizados na avaliação das linhagens e populações segregantes.

Marcador	Bin	Seqüência repetida	Seqüência dos <i>primers</i> F e R
umc1066	7.01	GCCAGA	ATGGAGCACGTCATCTCAATGG // AGCAGCAGCAACGTCTATGACT
phi057	7.01	GCC	CTCATCAGTGCCGTCGTCCAT // CAGTCGCAAGAAACCGTTGCC
phi112	7.01	AG	TGCCCTGCAGGTTACATTGAGT // AGGAGTACGCTTGGATGCTCTTC

### 2.3 Obtenção do DNA genômico

A extração do DNA das linhagens foi realizada em um conjunto de 10 plântulas para cada material. Nas populações segregantes de retrocruzamento a extração ocorreu a partir de folhas de plantas individuais, ambas utilizando a metodologia descrita por Saghai-Marroof et al. (1984). O DNA foi quantificado em gel de agarose 0,8%, utilizando um padrão de DNA de concentração conhecida. O DNA estoque foi mantido a -20°C e o DNA diluído, na concentração de trabalho de 10 ng/μL, foi armazenado a 4°C.

### 2.4 Genotipagem com marcadores SSR

Em função da disponibilidade dos *primers* marcados ou não e do polimorfismo obtido entre os indivíduos, as reações de SSR e a separação dos fragmentos amplificados foram realizadas com diferentes metodologias, conforme descrito a seguir.

TABELA 2. Linhagens normais e QPM caracterizadas pelos marcadores SSRs associados ao gene *opaco-2*.

Linhagem	Pedigree/população de origem	Tipo do endosperma	Qualidade do endosperma
L1	BR105	Duro	Normal
L2	BR105	Duro	Normal
L3	CMS14	Duro	Normal
L4	Sintético – BR106	Dentado	Normal
L5	BR106	Dentado	Normal
L6	Sintético – BR106	Dentado	Normal
L7	CMS28	Dentado	Normal
L8	CMS28	Dentado	Normal
L9	CMS455 (QPM)	Duro	QPM
L10	BR105	Duro	Normal
L11	CMS14	Duro	Normal
L12	CMS14	Duro	Normal
L13	BR106	Dentado	Normal
L14	BR106	Dentado	Normal
L15	Sintético 14	Duro	Normal
L16	CMS455 (QPM)	Duro	QPM
L17	BR106	Dentado	Normal
L18	CMS456 (QPM)	Dentado	QPM
L19	CMS456 (QPM)	Dentado	QPM
L20	BR105	Duro	Normal
L21	CMS14	Duro	Normal
L22	CMS12	Duro	Normal
L23	CMS453 (QPM)	Duro	QPM
L24	CMS03	Duro	Normal
L25	BR106	Dentado	Normal
L26	BR105	Duro	Normal
L27	CMS50	Duro	Normal
L28	CMS50 x CMS14	Duro	Normal
L29	BR105	Duro	Normal
L30	Híbrido comercial	Dentado	Normal
L31	CMS455 (QPM)	Duro	QPM
L32	CMS03 x BR105	Duro	Normal
L33	CMS28	Dentado	Normal
L34	CMS453 (QPM)	Duro	QPM
L35	BR106	Dentado	Normal
L36	CMS28	Dentado	Normal

#### **2.4.1 Primers fluorescentes**

As reações de SSR fluorescentes foram realizadas apenas para o marcador umc1066, sendo o *primer forward* marcado na extremidade 5' com o fluorocromo 6-FAM (azul). As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 10 µL contendo 30 ng de DNA; 20 mM tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 125 µM de cada um dos dNTPs; 0,2 µM de cada um dos *primers* e 1U da enzima taq DNA polimerase. Os ciclos da reação de PCR consistiram de uma desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, nove ciclos de 94°C por 20s, 68°C por 20s com a redução de 1°C a cada ciclo e 72°C por 20s, seguidos de 25 ciclos de amplificação a 94°C por 20s, 60°C por 20s e 72°C por 20s. Finalmente, a reação foi submetida a um período de extensão a 72°C por 5 minutos.

O produto final da reação de PCR foi diluído na proporção de 1:50. Um volume de 3 µL da diluição foi misturado com 1,0 µL de formamida, 0,4 µL do corante (50 mg/ml de *blue dextran*, 25 mM de EDTA pH 8,0) e 0,1 µL do padrão GS-500 ROX (Applied Biosystems, Foster City, CA). As amostras foram desnaturadas a 95°C durante 3 minutos e mantidas no gelo até sua aplicação no gel desnaturante de poliacrilamida 5%. Foi aplicado 1,5 µL da amostra desnaturada e os produtos amplificados foram separados por eletroforese a 3000 V durante 2 horas no seqüenciador ABI Prism 377. Os dados foram analisados pelo programa GeneScan (Applied Biosystems, Foster City, CA).

#### **2.4.2. Primers não marcados**

As reações de amplificação foram realizadas no termociclador modelo 9600 (Applied Biosystems), em um volume final de 10 µL contendo 30 ng de DNA; 10 mM tris-HCl pH 8,6; 50 mM KCl; 0,1% gelatina; 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>; 125

$\mu\text{M}$  de cada um dos dNTPs;  $0,6 \mu\text{M}$  de cada um dos *primers* e 1U da enzima taq DNA polimerase. Os ciclos da reação de PCR foram os mesmos descritos na seção 2.4.1. Os fragmentos amplificados foram resolvidos em géis de agarose 4% sob eletroforese a 110 V por 2,5 horas. O gel foi tratado com brometo de etídio ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) e a imagem capturada pelo Eagle-Eye II (Stratagene, La Jolla, CA) sob luz UV.

Visando obter uma melhor separação dos fragmentos amplificados, alguns produtos de amplificação foram resolvidos em géis de poliacrilamida 10% sob eletroforese a 150 V por 4 horas. O gel foi tratado com solução de brometo de etídio ( $1\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e a imagem capturada pelo Eagle-Eye II (Stratagene, La Jolla, CA) sob luz UV.

## **2.5. Seqüenciamento dos alelos *opaco-2* amplificados pelo *primer umc1066***

Visando um melhor entendimento do polimorfismo gerado pelo *primer umc1066*, realizou-se o seqüenciamento dos alelos amplificados por este SSR nas linhagens L7, L4 e L34. Os produtos da amplificação foram purificados do gel de agarose com kit Gel Extraction kit, seguindo as recomendações do fabricante (Qiagen, Hilden, Alemanha). As reações de seqüenciamento foram realizadas com o kit “*Big Dye terminator ready reaction kit*” (Applied Biosystems, Foster City, CA), utilizando cada um dos *primers umc1066* separadamente, e analisadas no sequenciador ABI Prism 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA), de acordo com recomendações do fabricante.

As seqüências de DNA dos fragmentos foram analisadas e alinhadas pelo módulo SeqMan do programa DNASTar (Lasergene, Madison, WI). As seqüências foram comparadas por meio do programa BLAST (Altschul et al., 1997) com as seqüências do gene *opaco-2* depositadas no *GenBank Nucleotide Database* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O objetivo principal da caracterização das linhagens e populações segregantes com os três marcadores SSRs associados ao gene *opaco-2* foi verificar a possibilidade de utilização destes marcadores como instrumento de seleção precoce em programas de melhoramento e conversão de milho normal em QPM. Para atender a essa finalidade, o loco SSR necessita apresentar um polimorfismo nítido entre as linhagens normais e QPM. Adicionalmente, o marcador deve apresentar uma co-segregação perfeita com o gene *opaco-2* nas populações segregantes provenientes do cruzamento entre tais linhagens.

Observa-se, na Figura 1, que todas as linhagens QPM amplificaram uma mesma banda de 138 pb, quando analisadas com o *primer* umc1066. As linhagens normais avaliadas apresentaram três alelos distintos, sendo um deles igual ao das linhagens QPM e dois polimórficos com 150 pb e 156 pb. Das 29 linhagens normais avaliadas, 19 apresentaram alelos iguais aos das linhagens QPM e apenas 6 linhagens (20%) tiveram alelos polimórficos com relação às linhagens QPM. Três linhagens normais (L8, L13 e L25) apresentaram o loco umc1066 em heterozigose, o que pode ser resultante de uma heterozigosidade residual ou de uma contaminação. A análise utilizando *primer* fluorescente com os fragmentos analisados no seqüenciador automático de DNA ABI Prism 377 permitiu a identificação precisa dos alelos entre as linhagens normais e QPM.

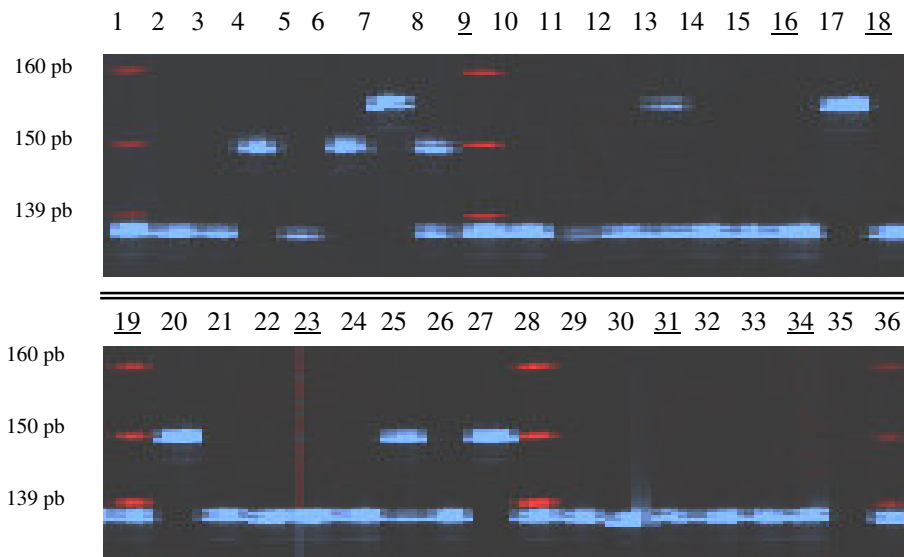


FIGURA 1. Análise de SSR das linhagens de milho normal e QPM com o *primer* *umc1066* marcado com fluorescência 6-FAM. Os fragmentos foram separados em gel de poliacrilamida a 5% e analisados pelo seqüenciador ABI Prism 377. A identificação das linhagens está de acordo com a Tabela 2; as sublinhadas representam as linhagens QPM. O marcador de peso molecular GS-500 ROX foi adicionado nas canaletas 1, 9, 19, 28 e 36.

A análise do *primer* *phi057* revelou um único alelo de tamanho aproximado de 165 pb para todas as linhagens QPM e, novamente, três alelos para o conjunto das linhagens normais avaliadas, sendo dois polimórficos (tamanho aproximado entre 150 pb e 156 pb) e um monomórfico em relação ao alelo apresentado pelas linhagens QPM (Figura 2). Duas linhagens normais (L11 e L13) apresentaram duas bandas para o loco *phi057*, também sugerindo uma heteroziguidade residual nas linhagens. Das 29 linhagens normais avaliadas, 23 (80%) apresentaram alelos polimórficos em relação às linhagens QPM.

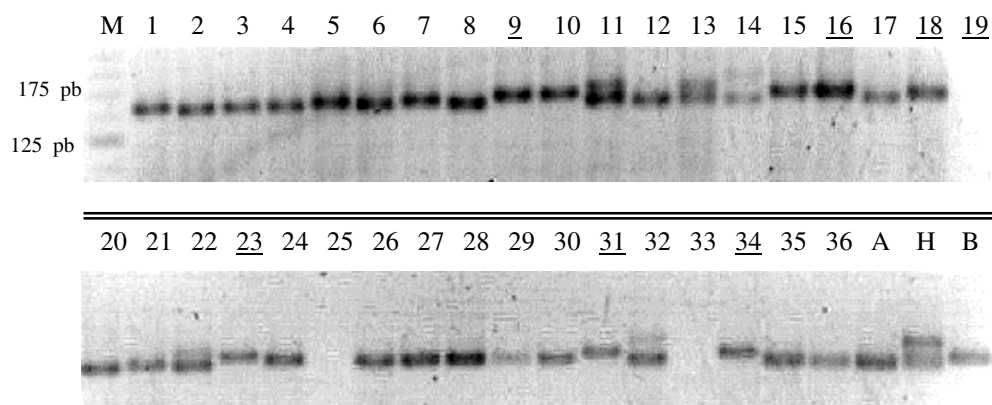


FIGURA 2. Análise de SSR de diferentes linhagens de milho com o *primer* phi057. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 4% corado com brometo de etídio. A identificação das linhagens está de acordo com a Tabela 2; as sublinhadas representam as linhagens QPM. A =  $O_2O_2$ ; H =  $O_2o_2$ ; B =  $o_2o_2$ ; M = marcador de peso molecular 25 pb *ladder*.

Todas as linhagens que foram polimórficas para o *primer* umc1066 também o foram para o *primer* phi057, demonstrando o potencial deste marcador para discriminação e confirmação dos genótipos normais e QPM.

Observa-se que a separação dos fragmentos amplificados pelo *primer* phi057 em gel de agarose 4% corado com brometo de etídio não permitiu uma nítida separação dos alelos amplificados, necessitando de sistemas que permitam uma melhor separação como gel de poliacrilamida. A repetição de trinucleotídeos deste microssatélite pode justificar a pequena diferença no tamanho dos alelos obtidos. Na Figura 4, em que um subgrupo de linhagens é analisado com o *primer* phi057 em gel de poliacrilamida a 10%, demonstra-se com maior nitidez o polimorfismo entre as linhagens normais e QPM, permitindo sua utilização posterior no melhoramento assistido.

Na Figura 3 encontra-se o resultado da análise das 36 linhagens com o *primer* phi112 em gel de agarose 4%. Observa-se que todas as linhagens QPM

apresentaram alelo nulo, enquanto que a maioria das linhagens normais apresentou um alelo de tamanho aproximado de 165 pb. Nota-se, ainda, que as linhagens L10, L15 e L30 apresentaram alelos diferenciados do restante do conjunto das linhagens normais e que na L13 duas bandas foram amplificadas. A análise de um subgrupo de linhagens com o mesmo *primer* phi112 em gel de poliacrilamida demonstrou que as linhagens QPM possuíam, de fato, o mesmo alelo presente na maioria das linhagens normais, embora como um fragmento bem menos intenso que os demais (Figura 4). A separação da maioria das linhagens normais e QPM pode ser feita apenas com base na intensidade da banda, utilizando-se o marcador phi112, o que torna sua aplicação mais restritiva para avaliação das populações segregantes, especialmente em programas de conversão de conversão de linhagens, em que o polimorfismo com base na intensidade da banda não é útil para separação dos indivíduos  $O_2O_2$  e  $O_2o_2$ .

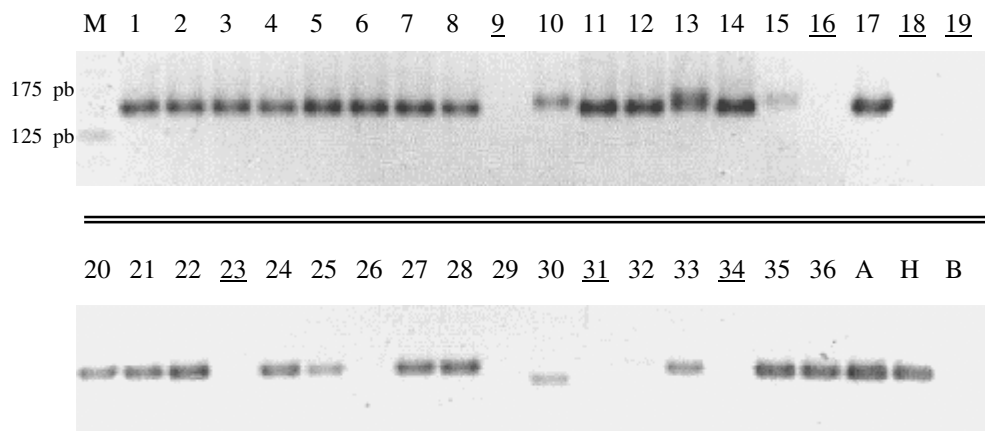


FIGURA 3. Análise de SSR de diferentes linhagens de milho com o *primer* phi112. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 4% corado com brometo de etídio. A identificação das linhagens está de acordo com a Tabela 2; as sublinhadas representam as linhagens QPM. A =  $O_2O_2$ ; H =  $O_2o_2$ ; B =  $o_2o_2$ ; M = Marcador de peso molecular 25 pb *ladder*.

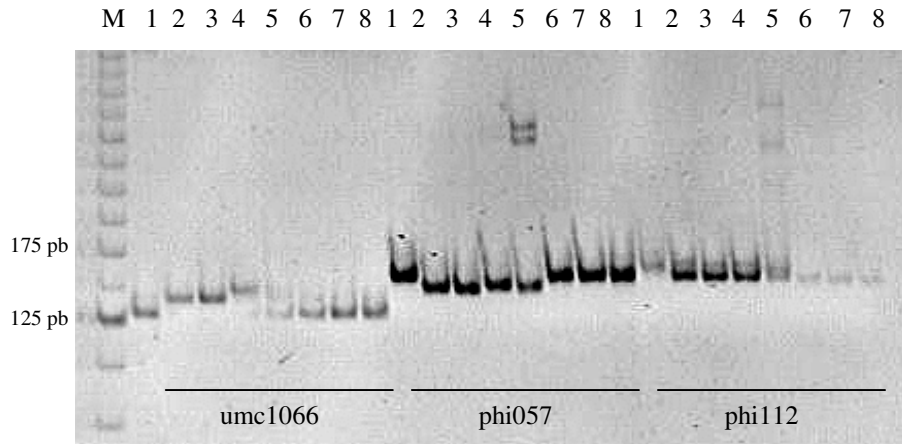


FIGURA 4. Análise de SSR de um subgrupo de 8 linhagens de milho com os *primers* umc1066, phi057 e phi112. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% corado com brometo de etídio. 1 a 5 = linhagens normais (L15, L6, L4, L7 e L13); 6 a 8 = linhagens QPM (L9, L19 e L34); M = marcador de peso molecular 25 pb *ladder*.

A análise dos três *primers* associados ao gene *opaco-2* evidenciou que todas as linhagens QPM avaliadas apresentaram o mesmo padrão de amplificação, sugerindo que tais linhagens representam uma origem comum do alelo recessivo  $o_2$ .

Bernard et al. (1994) propuseram três principais grupos de classificação para o alelo  $o_2$ , de acordo com os padrões de restrição por RFLP, transcritos e produtos de amplificação dos vários alelos avaliados em um amplo conjunto de linhagens. Os três principais grupos de alelos recessivos propostos foram  $o_2R$ ,  $o_2It$  e  $o_2T$ . O padrão de amplificação deste grupo de linhagens QPM avaliado sugere que estas apresentam um mesmo alelo recessivo comum, de acordo com esta classificação proposta.

Com relação às linhagens normais avaliadas, os diferentes padrões de alelos encontrados para estes *primers* associados ao gene *opaco-2* podem ser

justificados por alguns estudos. Bernard et al. (1994) também encontraram polimorfismo entre os alelos selvagens *opaco-2*, os quais foram caracterizados em, pelo menos, três tipos e produziram diferentes transcritos. Hartings et al. (1995) verificaram que mapas de restrição e seqüenciamento do primeiro exon do loco *opaco-2* revelaram um alto nível de polimorfismo e a presença de uma região hipervariável na parte N-terminal da proteína *opaco-2*.

Estes resultados foram confirmados com o seqüenciamento dos alelos amplificados pelo *primer* umc1066 nas linhagens normais L7 e L4 e na linhagem QPM L34, onde se percebe que a diferença entre estas linhagens correspondem aos diferentes números de repetições do microsatélite GCCAGA (Figura 5). Esta deleção provavelmente não afeta a atividade do gene *opaco-2*, uma vez que as linhagens que apresentam quatro repetições do microsatélite apresentam padrão normal de zeínas. Muitas linhagens normais também amplificaram o mesmo tamanho de alelo presente nesta linhagem QPM seqüenciada, o que sugere que estas também possuem apenas duas repetições do microsatélite, reforçando o argumento que esta deleção não afeta a atividade do gene.

Henry & Damerval (1997) também relataram uma alta razão de polimorfismo e recombinação no loco *opaco-2*, com o seqüenciamento do mesmo em 21 linhagens representativas de progenitores de variedades cultivadas. Para estes autores, o alto nível de polimorfismo observado para o loco *opaco-2* sugere que o tamanho efetivo da população ancestral foi muito grande e/ou que este gene evoluiu sob a influência de uma alta razão de mutação ou foi sujeito a algum tipo de seleção balanceada, sendo que a distribuição de polimorfismo dentro da seqüência não foi uniforme. Ainda, este padrão pode estar relacionado a um aparentemente grande número de eventos de recombinação, os quais podem ter sido uma característica intrínseca da amostra estudada e/ou implicam que o loco *opaco-2* é uma região de alta freqüência de

recombinação. A presença do microssatélite dentro do exon também pode ter contribuído para o elevado nível de polimorfismo do loco *opaco-2*.

A co-segregação do *primer* umc1066 com o loco *opaco-2* foi ainda confirmada pela avaliação de indivíduos de duas populações segregantes RC<sub>5</sub>F<sub>1</sub>, cujas linhagens recorrente e doadora apresentaram polimorfismo para este loco (Figura 6). Para a população A (L7 x L9), dos 18 indivíduos avaliados 8 apresentaram uma banda associada ao genótipo  $O_2O_2$  e 10 apresentaram duas bandas, associadas aos indivíduos heterozigotos  $O_2o_2$ . Para a população B (L4 x L34), dos 18 indivíduos avaliados, 7 apresentaram uma banda associada ao genótipo  $O_2O_2$  e 11 apresentaram duas bandas, associadas aos indivíduos heterozigotos.

```

1: ATG GAG CAC GTC ATC TCA ATG GAG GAG ATC CTC GGG CCC TTC TGG GAG CTG CTA
2: ATG GAG CAC GTC ATC TCA ATG GAG GAG ATC CTC GGG CCC TTC TGG GAG CTG CTA
3: ATG GAG CAC GTC ATC TCA ATG GAG GAG ATC CTC GGG CCC TTC TGG GAG CTG CTA
4: M E H V I S M E E I L G P F W E L L

1: CCA CCG CCA GCG CCA GAG CCA GAG CCA GAG CCA GAG CCA GAG CCA GAG CGA GAG CAG CCT
2: CCA CCG CCA GCG CCA GAG CCA GAG CCA GAG CCA GA. . . . . CGA GAG CAG CCT
3: CCA CCG CCA GCG CCA GAG CCA GA. . . . . . . . . . . CGA GAG CAG CCT
4: P P P A P E P E P E P E P E R E Q P

1: CCG GTA ACC GGC ATC GTC GTC GGC AGT GTC ATA GAC GTT GCT GCT GCT
2: CCG GTA ACC GGC ATC GTC GTC GGC AGT GTC ATA GAC GTT GCT GCT GCT
3: CCG GTA ACC GGC ATC GTC GTC GGC AGT GTC ATA GAC GTT GCT GCT GCT
4: P V T G I V V G S V I D V A A A

```

FIGURA 5. Seqüência de um fragmento inicial do primeiro exon do gene *opaco-2* amplificado pelo *primer* umc1066 flanqueando um microssatélite GCCAGA, que se encontra sublinhado e em negrito. Os sítios de anelamento estão em itálico, sendo o ATG em negrito aquele que codifica para a primeira metionina do transcrito. As seqüências dos fragmentos clonados referem-se a: 1 - alelo normal presente na linhagem L7, contendo cinco repetições do microssatélite; 2 - alelo normal presente na linhagem L4, contendo quatro repetições do microssatélite; 3 - alelo recessivo presente na linhagem L34, contendo duas repetições do microssatélite. Este último alelo está presente em todas as linhagens QPM estudadas. 4 – seqüência de aminoácidos predita, sendo que o microssatélite codifica para uma seqüência repetitiva de prolina (P) e ácido glutâmico (E).

Em ambos os casos, os resultados obtidos encontram-se dentro da segregação esperada de 1  $O_2O_2$  : 1  $O_2o_2$  ( $\chi^2 = 0,22^{NS}$  para a população A e  $\chi^2 = 0,89^{NS}$  para a população B). Além disso, a avaliação das espigas  $RC_5F_2$  obtidas pela autofecundação das plantas analisadas pelo marcador umc1066, em ambas as populações, confirmou fenotipicamente todos os genótipos preditos precocemente pela análise do marcador molecular.

A análise das linhagens normais pelos três marcadores revelou que algumas linhagens apresentaram mais de um alelo amplificado, sugerindo uma heterozigosidade residual ou contaminação. Para a L13, isto ocorreu para os três *primers* avaliados, de forma que esta foi estudada mais detalhadamente.

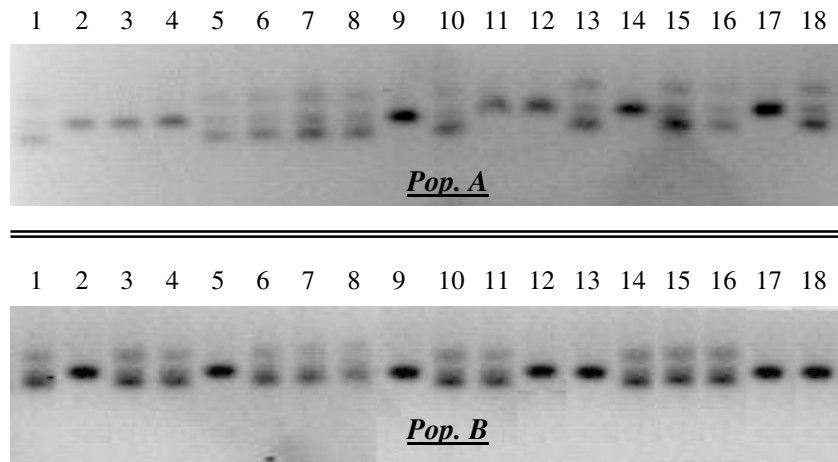


FIGURA 6. Análise de SSR com o *primer* umc1066, cujos fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 4% corado com brometo de etídio, em duas populações segregantes  $RC_5F_1$ . Pop. A = obtida pelo cruzamento entre as linhagens L7 (normal recorrente) x L9 (QPM doadora). Pop. B = obtida pelo cruzamento entre as linhagens L4 (normal recorrente) x L34 (QPM doadora). Os números de 1 a 18 representam plantas individuais em cada população.

Na Figura 7 observa-se que a geração  $RC_5F_1$  do cruzamento da L13 (normal recorrente) com a L34 (QPM doadora) apresentou uma segregação diferente da esperada para uma geração de retrocruzamento, confirmando que a linhagem recorrente apresentava os dois alelos. A análise de plantas individuais desta linhagem (Figura 8) confirmou que esta ainda encontrava-se segregando para este loco.

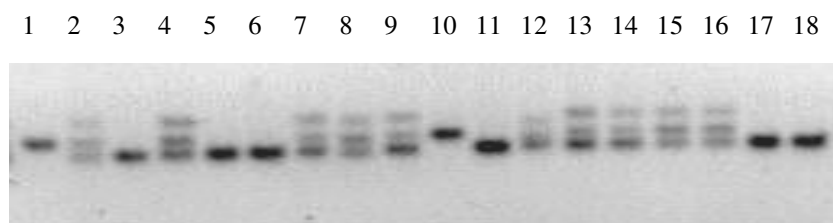


FIGURA 7. Análise de SSR com o *primer* umc1066, cujos fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 4% corado com brometo de etídio, em uma população segregante  $RC_5F_1$  do projeto de conversão L13 (linhagem normal recorrente) x L34 (linhagem QPM doadora). Os números de 1 a 18 representam plantas individuais nesta população.

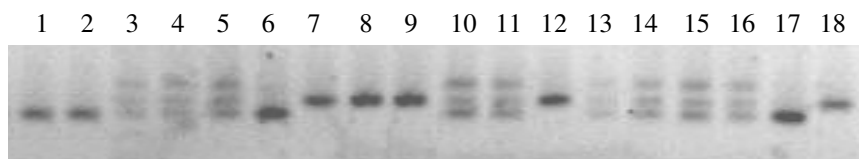


FIGURA 8. Análise de SSR com o *primer* umc1066, cujos fragmentos foram separados por eletroforese em gel agarose 4% corado com brometo de etídio, em 18 plantas individuais da linhagem normal L13, a qual apresenta uma heterozigidade residual para este loco.

Heterozigidade residual para alguns locos específicos em linhagens com alto grau de endogamia avaliadas por SSRs também foi observada por Smith et al. (1997) e Senior et al. (1998).

A Tabela 3 apresenta um resumo da utilização dos três marcadores para discriminação das linhagens normais e QPM. Observa-se que, excetuando-se os casos onde foi encontrada uma possível heterozigidade residual ou falha na reação, basicamente todas as linhagens puderam ser discriminadas por estes marcadores, podendo os mesmos ser utilizados isolados ou em conjunto, dependendo das linhagens envolvidas. Ressalta-se que, para o sucesso da utilização destes marcadores, é fundamental que sejam estabelecidas condições ideais para a metodologia de análise de SSR, principalmente quanto à visualização e separação dos fragmentos amplificados. A escolha do(s) marcador(es) a ser(em) utilizado(s) para seleção nas populações segregantes deverá ainda ser baseada em testes prévios com os genitores e a geração F<sub>1</sub>.

A expressão dos genes modificadores do endosperma nos grãos sob seleção em projetos de melhoramento de milho QPM é genótipo específico (Belousov, 1987; Vasal, 2000), o que, de uma certa maneira, torna a seleção fenotípica difícil de ser realizada com segurança. A identificação dos genótipos  $O_2O_2$ ,  $O_2o_2$  e  $o_2o_2$  por marcadores microssatélites apresenta-se, dessa forma, como uma alternativa complementar a este processo, tornando-o mais eficiente.

TABELA 3. Padrão de polimorfismo apresentado pelas linhagens normais avaliadas em relação às linhagens QPM, considerando os *primers* umc1066, phi057 e phi112.

Linhagem	umc1066	phi057	phi112
L1	M	P	I
L2	M	P	I
L3	M	P	I
L4	P	P	I
L5	M	P	I
L6	P	P	I
L7	P	P	I
L8	H	P	I
L10	M	M	P*
L11	M	H	I
L12	M	P	I
L13	H	H	I
L14	M	P	I
L15	M	M	P*
L17	P	P	I
L20	P	P	I
L21	M	P	I
L22	M	P	I
L24	M	P	I
L25	H	-	I
L26	M	P	-
L27	P	P	I
L28	M	P	I
L29	M	P	-
L30	M	P	P*
L32	M	P	-
L33	M	-	I
L35	-	P	I
L36	M	P	I

M = Monomórfico.

P = Polimórfico.

P\* = Polimórfico com difícil visualização em poliacrilamida 10%.

I = Diferença na intensidade da banda (gel de poliacrilamida 10%).

H = Apresentando heteroziguidade residual

- = Falha na reação

## 4 CONCLUSÕES

Os três marcadores SSRs foram eficientes na diferenciação da maioria das linhagens normais e QPM estudadas, demonstrando potencial de utilização no melhoramento assistido.

A utilização efetiva destes marcadores, isolados ou em conjunto, na seleção precoce dos genótipos  $O_2O_2$ ,  $O_2o_2$  e  $o_2o_2$ , dependerá das linhagens envolvidas nos cruzamentos e dos objetivos de cada projeto.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

BELOUSOV, A. A. Genetic analysis of modified endosperm texture in *opaque2* maize. **Genetika**, Moscow, v. 23, n. 4, p. 677-685, 1987.

BERNARD, L.; CICERI, P.; VIOTTI, A. Molecular analysis of wild type and mutant alleles at the *Opaque-2* regulatory locus of maize reveals different mutations and types of *O2* products. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 24, n. 6, p. 949-959, Mar. 1994.

DREHER, K.; MORRIS, M.; KHAIRALLAH, M.; RIBAUT, J. M.; PANDEY, S.; SRINIVASAN, G. Is marker-assisted selection cost-effective compared to conventional plant breeding methods? The case of quality protein maize. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL CONSORTIUM ON AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY RESEARCH (ICABR), 4., 2000, Ravello. **Anais...** Ravello, 2000. 25 p.

HARTINGS, H.; LAZZARONI, N.; ROSSI, V.; RIBOLDI, G. R. THOMPSON R. Molecular analysis of *opaque-2* alleles from *Zea mays* L. reveals the nature of mutational events and the presence of hypervariable region in the 5' part of the gene. **Genetic Resources**, New York, v. 65, n. 1, p. 11-19, Feb. 1995.

HENRY, A. M.; DAMERVAL, C. High rates of polymorphisms and recombination at the *Opaque-2* locus in cultivated maize. **Molecular General Genetics**, New York, v. 256, n. 2, p. 147-157, Sept. 1997.

KATA, S. R.; TAYLOR, B. H.; BOCKHOLT, A. J.; SMITH, J. D. Identification of opaque-2 genotypes in segregating populations of Quality Protein Maize by analysis of restriction fragment length polymorphisms. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 89, n. 4, p. 407-412, Oct. 1994.

MEYER, J. QPM - Summary of line conversion from normal to QPM. México, 2002. Disponível em: <<http://www.cimmyt.cgiar.org/qpm/breeding/convnormlinetoqpm/conversion%20%20summary.htm>>. Acesso em: 13 nov. 2002.

MORO, G. L. **The biochemical genetics of quality protein maize**. 1996. 187 p. Thesis (Agronomy and Plant Genetics) – University of Arizona, Tucson.

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

SENIOR, M. L.; MURPHY, J. P.; GOODMAN, M. N.; STUBER, C. W. Utility of SSRs for determining genetic similarities and relationships in maize using an agarose gel system. **Crop Science**, Madison, v. 38, n. 4, p. 1088-1098, July/Aug. 1998.

SMITH, J. S. C.; CHIN, E. C. L.; SHU, H.; SMITH, O. S.; WALL, S. J.; SENIOR, M. L.; MITCHELL, S. E.; KRESOVICH, S.; ZIEGLE, J. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): Comparisons with data from RFLPs and pedigree. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 95, n.1/2, p. 163-173, July 1997.

VASAL, S. K. High Quality protein corn. In: HALLAUR, A. R. (Ed.). **Specialty corns**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2000. p. 85-129.

**CAPÍTULO 3: Retrocruzamento assistido por marcadores moleculares  
para conversão de linhagens de milho normal em QPM**

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

### **RESUMO**

Avaliou-se a aplicabilidade de marcadores RFLP e SSRs em projetos de conversão de linhagens de milho normal em QPM desenvolvidos utilizando a metodologia dos retrocruzamentos modificados. A seleção utilizando marcadores foi empregada nas gerações RC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> e RC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> em duas etapas. Inicialmente, foi realizada a identificação por RFLP das plantas heterozigotas (*O<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*) em cada geração de retrocruzamento estudada e, em seguida, as plantas heterozigotas foram genotipadas por SSRs, visando à identificação daquelas com maior proporção do genótipo do genitor recorrente. Esta estratégia foi comparada com outros projetos de conversão, em que apenas seleção fenotípica foi realizada, a partir de uma análise da similaridade genética entre as gerações MRC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> dos projetos de conversão. Verificou-se que o marcador RFLP (enzima *EcoRI* + sonda 968 pb gene *opaco-2*) foi eficiente para identificação e seleção precoce dos genótipos heterozigotos nas populações de retrocruzamento. Entretanto, considerando a estratégia de seleção e o tamanho das populações analisadas, a identificação das plantas com maior proporção de recuperação do genótipo do genitor recorrente por SSRs não proporcionou uma maior eficiência ao processo de conversão de milho normal em QPM, quando comparado aos projetos em que apenas a seleção fenotípica foi utilizada. Adicionalmente, constatou-se a ocorrência de arraste devido à ligação (“*linkage drag*”) nas regiões genômicas flanqueando os genes *opaco-2* e modificadores do endosperma.

## **MARKER-ASSISTED BACKCROSS TO CONVERT NORMAL INBRED LINES INTO QUALITY PROTEIN MAIZE (QPM)**

### **ABSTRACT**

It was evaluated the applicability of RFLP and SSR markers in conversion projects of normal inbred lines to QPM, using the modified backcross procedure. Selection using markers was employed in the BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> and BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> generations in two stages. First, heterozygous plants were identified by RFLP in each backcross generation, and then these plants were genotyped by SSRs, to identify those with a higher proportion of the recurrent parental genome. The marker-assisted backcross was compared with the conversion

projects where only phenotypic selection was carried out, using the genetic similarity analysis among the  $MBC_3F_2$  generations of the conversion projects. It was verified that RFLP marker (*EcoRI* enzyme + probe 968 pb *opaque-2* gene) was efficient to identify and to early select the heterozygous genotypes in the backcross populations. However, considering the selection strategy and the population size evaluated, the identification of plants with higher recovery of the recurrent parental genome using SSRs did not increased the conversion efficiency, when compared to the projects where only phenotypic selection was employed. Furthermore, linkage drag was detected in the genomic regions flanking the *opaque-2* and endosperm modifier genes.

## 1 INTRODUÇÃO

O surgimento dos marcadores moleculares abriu muitas possibilidades para a sua utilização em programas de conversão de linhagens baseados no método dos retrocruzamentos. A presença de um alelo alvo em um indivíduo pode ser diagnosticada por marcadores que flanqueiam ou identificam este alelo. Adicionalmente, podem ser selecionados indivíduos homocigotos para os alelos do genitor recorrente em um grande número de locos marcadores distribuídos pelo genoma, como uma forma de acelerar a recuperação do genótipo do genitor recorrente (Hospital & Charcosset, 1997). Segundo Ferreira & Grattapaglia (1998), a utilização destes marcadores em programas de conversão via retrocruzamento talvez seja a aplicação mais efetiva da tecnologia de marcadores moleculares no melhoramento de plantas.

Parte dos esforços atuais dos programas de melhoramento de milho QPM concentra-se na conversão de linhagens elites, visando a obtenção de versões QPM de híbridos normais. Dessa forma, por meio da introgressão do alelo *opaque-2* (*o<sub>2</sub>*) e de genes modificadores do endosperma, procura-se reunir em um único genótipo as boas qualidades agronômicas dos híbridos normais e a melhor qualidade nutricional dos QPM.

Uma das metodologias propostas para se realizar este trabalho de conversão é a dos retrocruzamentos modificados (Guimarães et al., 2000), a qual

pode ser utilizada por quaisquer programas de melhoramento que utilizem apenas seleção fenotípica ou, adicionalmente, possam dispor de marcadores moleculares para a identificação dos fenótipos e genótipos desejáveis.

A utilização de marcadores na identificação precoce das plantas heterozigotas ( $O_2o_2$ ) pode aumentar a eficiência do processo por vários motivos: a avaliação das progênes pode ser dispensada, o tamanho da população pode ser reduzido a poucas plantas por geração e, devido ao fenótipo alvo ser identificado em plantas jovens, características do grão e da planta podem ser selecionadas simultaneamente. Dreher et al. (2000) denominaram este tipo de procedimento de seleção assistida por marcadores do tipo parcial. Adicionalmente, marcadores moleculares podem ainda ser utilizados para identificação das plantas com maior proporção de recuperação do genótipo do genitor recorrente, tornando o processo de retrocruzamento mais rápido e eficiente. Este procedimento foi proposto por Tanksley et al. (1989) e sua eficiência demonstrada experimentalmente por Ragot et al. (1995) quando da introgressão do transgene Bt em diferentes linhagens de milho.

A complexidade genética envolvida no processo de conversão de milho normal em QPM o situa entre os casos potenciais que podem efetivamente se beneficiar de um programa de seleção assistida. Dessa forma, neste trabalho avaliou-se a viabilidade da utilização dos marcadores RFLP para identificação dos genótipos heterozigotos ( $O_2o_2$ ) e dos marcadores SSRs para identificação das plantas com maior proporção de recuperação do genótipo da linhagem recorrente, em projetos de conversão desenvolvidos utilizando a metodologia dos retrocruzamentos modificados (Guimarães et al., 2000). Uma comparação com outros projetos em que apenas seleção fenotípica foi empregada também foi realizada.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Núcleo de Recursos Genéticos e Desenvolvimento de Cultivares (NRGC) e no Núcleo de Biologia Aplicada (NBA) da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, MG.

### 2.1 Metodologia de conversão

A metodologia de conversão utilizada foi a dos retrocruzamentos modificados, proposta por Guimarães et al. (2000).

O procedimento consiste da obtenção de populações de retrocruzamentos heterozigotas ( $O_2o_2$ )  $RC_1F_1$ ,  $RC_2F_1$ ,  $RC_3F_1$ , etc., cruzando-se então as plantas selecionadas nestas populações, como machos, com uma seqüência de fêmeas homozigotas ( $o_2o_2$ ) provenientes de grãos modificados das gerações  $F_2$  e  $MRC_n$ , selecionados em caixa de luz, para obtenção das gerações de “retrocruzamentos modificados” ou MRC. Assim, a geração  $MRC_1F_1$  é obtida pela seleção de sementes  $o_2o_2$  com características QPM desejáveis no cruzamento  $F_2 (o_2o_2) \times RC_1F_1 (O_2o_2)$ . A geração  $MRC_2F_1$  é obtida selecionando-se sementes  $o_2o_2$  com características QPM desejáveis no cruzamento  $MRC_1F_1 (o_2o_2) \times RC_2F_1 (O_2o_2)$ . A geração  $MRC_3F_1$  é obtida selecionando-se sementes com características QPM desejáveis no cruzamento  $MRC_2F_1 (o_2o_2) \times RC_3F_1 (O_2o_2)$ , e assim sucessivamente até se chegar ao nível de recuperação do genótipo recorrente desejável. A nomenclatura das populações de retrocruzamentos está de acordo com Fehr (1991). Na Tabela 1 são apresentadas as fases que foram executadas neste trabalho. Cada fase consistiu de uma época de cultivo, sendo realizadas duas épocas em cada ano.

TABELA 1. Descrição das fases da metodologia de retrocruzamentos modificados para conversão de linhagens de milho normal em QPM, para cada uma dos projetos estudados.

Fase	Atividade realizada
1	Obtenção das populações $F_1 (O_2o_2)$
2	Obtenção das populações $F_2 (o_2o_2)$ e $RC_1F_1 (O_2O_2:O_2o_2)$
3	Cruzamento das populações $F_2 (o_2o_2)$ e $RC_1F_1 (O_2O_2:O_2o_2)$ para obtenção das populações $MRC_1F_1 (o_2o_2)$  Cruzamento das linhagens recorrentes ( $O_2O_2$ ) com as populações $RC_1F_1 (O_2O_2:O_2o_2)$ para obtenção das populações $RC_2F_1 (O_2O_2:O_2o_2)$
4	Cruzamento das populações $MRC_1F_1 (o_2o_2)$ e $RC_2F_1 (O_2O_2:O_2o_2)$ para obtenção das populações $MRC_2F_1 (o_2o_2)$  Cruzamento das linhagens recorrentes ( $O_2O_2$ ) com as populações $RC_2F_1 (O_2O_2:O_2o_2)$ para obtenção das populações $RC_3F_1 (O_2O_2:O_2o_2)$
5	Cruzamento das populações $MRC_2F_1 (o_2o_2)$ e $RC_3F_1 (O_2O_2:O_2o_2)$ para obtenção das populações $MRC_3F_1 (o_2o_2)$  Cruzamento das linhagens recorrentes ( $O_2O_2$ ) com as populações $RC_3F_1 (O_2O_2:O_2o_2)$ para obtenção das gerações $RC_4F_1 (O_2O_2:O_2o_2)$

## 2.2 Projetos de conversão

Foram avaliados cinco projetos de conversão de linhagens que fazem parte do programa de melhoramento de milho QPM da Embrapa Milho e Sorgo. Em dois desses projetos foi empregada a seleção assistida por marcadores moleculares RFLP e SSR para identificação dos genótipos desejáveis, enquanto que nos outros três apenas a seleção fenotípica foi empregada para esta finalidade. Um detalhamento das linhagens envolvidas em cada um dos projetos estudados é apresentado na Tabela 2.

TABELA 2. Projetos de conversão de linhagens de milho normal em QPM.

Projeto	Linhagem recorrente <sup>1</sup>	Linhagem doadora <sup>1</sup>	Tipo de seleção
A	L4	L34	Assistida por MM
B	L7	L9	Assistida por MM
C	L13	L34	Fenotípica
D	L5	L34	Fenotípica
E	L2	L45	Fenotípica

<sup>1/</sup> As linhagens envolvidas nos projetos são as mesmas descritas na Tabela 2 do Capítulo 2, com a exceção da L45.

### 2.3 Condução das populações a campo

O plantio das populações a campo foi realizado manualmente em linhas de 5 metros com espaçamento de 90 cm entre elas, tendo sido semeadas 25 sementes em cada linha. Para a obtenção das gerações MRC foi plantada uma linha da geração RC (macho) para cada três linhas da geração F<sub>2</sub> ou MRC anterior (fêmeas), com duas repetições desta disposição. Dessa forma, o número esperado de plantas MRC no campo para cada geração foi de 150 plantas. Para a obtenção das gerações RC foi plantada uma linha da geração RC anterior (macho) para cada três linhas da linhagem recorrente (fêmeas), com um total de 75 plantas da linhagem.

Em cada fileira RC utilizada como macho, foram selecionadas 12 plantas por fileira, sendo 24 plantas para originar a geração MRC e 12 plantas para originar a geração RC seguintes, totalizando 36 por projeto e fase de conversão. Cada planta selecionada foi autofecundada e cruzada com três plantas das fileiras MRC ou das fileiras das linhagens recorrentes subseqüentes, originando a próxima geração de conversão. Estas plantas selecionadas em cada fileira foram submetidas a análises de marcadores moleculares para identificação de plantas heterozigotas e seleção do genótipo da linhagem recorrente, nos

processos com seleção assistida. A autofecundação das plantas RC foi realizada para confirmação e/ou identificação do genótipo  $O_2o_2$ , nos processos com e sem o auxílio dos marcadores moleculares, respectivamente.

A identificação das plantas RC no campo e nas posteriores análises moleculares foi realizada de forma a identificar a geração de retrocruzamento (RC), o projeto de conversão (A, B, C, D ou E) e o número da planta (1 a 36), de forma seqüencial. Plantas numeradas de 1 a 24 originaram a nova geração MRC e plantas numeradas de 25 a 36 originaram a nova geração RC. Dessa forma, a planta RC2-A-1 representa a primeira planta da geração  $RC_2F_1$  do projeto de conversão L4 x L34, a qual foi cruzada com três plantas das fileiras da geração  $MRC_1F_1$ , originando espigas  $MRC_2F_1$ .

Os tratos culturais para condução das populações estavam de acordo com os normalmente empregados na região, em sistema de plantio convencional. A colheita das plantas selecionadas foi realizada manualmente.

#### **2.4 Seleção assistida por marcadores moleculares para obtenção das plantas da próxima geração**

A seleção utilizando marcadores moleculares foi empregada nas gerações  $RC_2F_1$  e  $RC_3F_1$ , nos projetos de conversão A e B. A estratégia de seleção foi a seguinte:

- 1) etapa 1: foi realizada a identificação por marcadores RFLP das plantas heterozigotas ( $O_2o_2$ ) em cada geração de retrocruzamento estudada;
- 2) etapa 2: em seguida, as plantas heterozigotas foram avaliadas por marcadores SSRs, visando à identificação daquelas com maior proporção de recuperação do genótipo do genitor recorrente. As três espigas selecionadas para avanço das gerações MRC e RC subseqüentes foram aquelas que receberam pólen das duas melhores plantas da

geração RC anterior, de acordo com a informação dos marcadores moleculares.

Um detalhamento da metodologia de seleção das plantas por marcadores moleculares é feito a seguir.

#### **2.4.1 Etapa 1: utilização de marcadores RFLP para identificação das plantas $O_2o_2$ nas gerações de retrocruzamento**

A partir da fase 4 (obtenção das gerações  $RC_3F_1$  e  $MRC_2F_1$ ), marcadores RFLP foram empregados para diferenciação das plantas homozigotas ( $O_2O_2$ ) das heterozigotas ( $O_2o_2$ ), nas populações de retrocruzamento descritas na Tabela 3.

##### **2.4.1.1 Extração de DNA**

Nas análises iniciais dos genitores e das populações  $F_1$ , um conjunto de folhas jovens foi utilizado para extração do DNA de cada material. Nas populações segregantes de retrocruzamento, a extração ocorreu a partir de folhas de plantas individuais, selecionadas e identificadas no campo de conversão.

O DNA genômico foi extraído segundo a metodologia descrita por Saghai-Marroof et al. (1984) e quantificado em géis de agarose 0,8% utilizando um padrão de DNA de concentração conhecida.

##### **2.4.1.2 Reação de RFLP**

Aproximadamente 50  $\mu\text{g}$  de DNA genômico de cada indivíduo foi digerido, separadamente, com as enzimas de restrição *EcoRI* ou *HindIII*.

TABELA 3. Populações de retrocruzamento analisadas por marcadores RFLP para diferenciação dos indivíduos homocigotos ( $O_2O_2$ ) e heterocigotos ( $O_2o_2$ ) para o loco *opaco-2*.

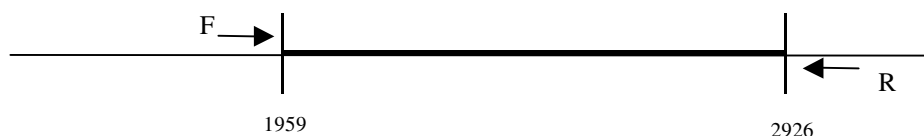
População	Projeto	Geração	NPA**	Segregação esperada
(L4* x L34)RC2	A	RC <sub>2</sub> F <sub>1</sub>	36	1 $O_2O_2$ : 1 $O_2o_2$
(L7* x L9)RC2	B	RC <sub>2</sub> F <sub>1</sub>	36	1 $O_2O_2$ : 1 $O_2o_2$
(L4* x L34)RC3	A	RC <sub>3</sub> F <sub>1</sub>	36	1 $O_2O_2$ : 1 $O_2o_2$
(L7* x L9)RC3	B	RC <sub>3</sub> F <sub>1</sub>	36	1 $O_2O_2$ : 1 $O_2o_2$

\* Linhagem recorrente

\*\* NPA = Número de plantas avaliadas em cada população

Os fragmentos do DNA digerido foram separados por eletroforese em gel de agarose e transferidos para membranas de *nylon*. Os protocolos de *Southern Blot* e marcação da sonda não radioativa por PCR, usando digoxigenina-11-dUTP (Boehringer Mannheim, Alemanha), seguiram os procedimentos descritos por Ragot & Hoisington (1993), modificados por Torres et al. (1997). A sonda utilizada correspondeu a um clone de aproximadamente 1 kb, derivado do clone genômico do gene *opaco-2*, obtido do laboratório do Dr. Brian Larkins (*University of Arizona*, Tucson, AZ, EUA). Este clone foi seqüenciado no laboratório do Núcleo de Biologia Aplicada da Embrapa Milho e Sorgo, e as seqüências obtidas foram comparadas por meio do programa BLAST (Altschul et al., 1997) com as seqüências do gene *opaco-2* depositadas no *GenBank Nucleotide Database* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Na Figura 1 está representado o alinhamento do clone utilizado em relação ao gene *opaco-2*, com as regiões *forward* e *reverse* que foram seqüenciadas.

**A) Clone do gene *opaco-2* de 968 pb**



**B) Esquema parcial dos exons e introns do gene *opaco-2*  
(Acesso NCBI gi22387)**

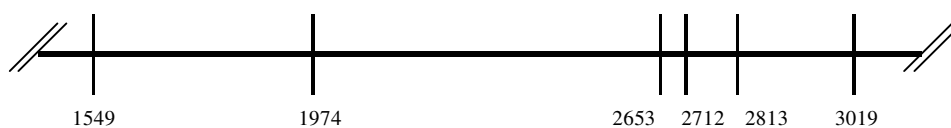


FIGURA 1. A) representação esquemática do fragmento genômico do gene *opaco-2* utilizado nas análises de RFLP, clonado no plasmídio pBluescript (Stratagene, La Jolla, CA). Os números abaixo das linhas indicam a posição em pb correspondente à sequência do gene *opaco-2* depositada no *GeneBank Nucleotide Database* (acesso gi22387). B) esquema parcial dos exons e introns do gene *opaco-2*, onde o fragmento clonado se alinha.

Nas análises iniciais dos genitores e das populações  $F_1$ , visando o estabelecimento da melhor combinação sonda-enzima que diferenciase os indivíduos homozigotos ( $O_2O_2$  e  $o_2o_2$ ) dos heterozigotos ( $O_2o_2$ ) para o loco *opaco-2*, foram testadas as enzimas *EcoRI* e *HindIII*.

Nas populações de retrocruzamentos, a diferenciação dos indivíduos homozigotos ( $O_2O_2$ ) dos heterozigotos ( $O_2o_2$ ) foi realizada utilizando a enzima *EcoRI*, que apresentou melhores resultados nos testes prévios.

### **2.4.1.3 Confirmação do genótipo predito pelo marcador RFLP**

Uma análise de  $\chi^2$  (qui-quadrado) foi realizada para avaliar o quanto as frequências preditas pela análise de RFLP desviaram significativamente das frequências esperadas nas populações de retrocruzamento (1  $O_2O_2$  : 1  $O_2o_2$ ).

Cada planta das gerações  $RC_2F_1$  e  $RC_3F_1$  analisada com o marcador RFLP foi autofecundada, permitindo a confirmação do genótipo observado pela classificação das espigas descendentes como segregantes (provenientes de uma planta heterozigota  $O_2o_2$ ) ou normais (provenientes de uma planta homozigota  $O_2O_2$ ).

### **2.4.2 Etapa 2: Utilização de marcadores SSRs para acelerar a recuperação dos genótipos das linhagens recorrentes**

As plantas selecionadas das gerações  $RC_2F_1$  e  $RC_3F_1$  foram genotipadas por um conjunto de marcadores SSRs, visando à identificação e seleção das plantas com maior proporção de recuperação do genótipo das linhagens recorrentes em cada população.

#### **2.4.2.1 Reação de SSR**

As reações de SSR foram realizadas de acordo com os procedimentos descritos no Capítulo 2, empregando-se *primers* específicos para o genoma do milho, adquiridos da Research Genetics Inc., e cujas seqüências estão publicamente disponíveis no *Maize Genome Database - MaizeDB* (<http://agron.missouri.edu/ssr.htm>). Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose 4%, visualizados sob luz UV em presença de

brometo de etídio e fotodocumentados no *Eagle Eye II* (Stratagene, La Jolla, CA).

Nas duas gerações de retrocruzamentos, foram empregados marcadores SSRs polimórficos entre os genitores de cada projeto. Para o projeto de conversão A (L4 x L34), foram utilizados 24 SSRs para avaliação da população RC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> e 32 para a RC<sub>3</sub>F<sub>1</sub>. Para o projeto de conversão B (L7 x L9), foram utilizados 29 SSRs para avaliação da população RC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> e 30 para a RC<sub>3</sub>F<sub>1</sub>.

#### **2.4.2.2 Análises dos dados moleculares**

Os dados moleculares foram organizados codificando-se os locos em homozigose para a linhagem recorrente como 'A' e os em heterozigose como 'H'. A posição dos marcadores em cM ao longo do genoma do milho foi obtida de acordo com o mapa de consenso para marcadores SSRs publicado no *MaizeDB*. Estas informações foram utilizadas para a genotipagem gráfica das plantas nas diferentes gerações de retrocruzamento, conforme proposto por Young & Tanksley (1989a), utilizando o programa *Graphical GenoTypes – GGT* (Van Berloo, 1999).

O teste de normalidade de Shapiro-Wilk (Shapiro et al., 1968) foi realizado com as proporções de recuperação do genótipo do genitor recorrente em cada população utilizando o programa Statistica, versão 4.3.

#### **2.4.2.3 Seleção das plantas da próxima geração**

Para cada um dos projetos de conversão, na fase 4 foram selecionadas sementes das gerações MRC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> e RC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> provenientes de espigas que tiveram como genitor masculino as plantas *O<sub>2</sub>O<sub>2</sub>* com maior proporção de recuperação da linhagem recorrente entre as avaliadas na geração RC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>. Na fase 5 foram selecionadas sementes das gerações MRC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> e RC<sub>4</sub>F<sub>1</sub> provenientes de espigas

que tiveram como genitor masculino as plantas  $O_2O_2$  de maior proporção de recuperação da linhagem recorrente entre as avaliadas na geração  $RC_3F_1$ .

Nos outros três projetos, em que apenas seleção fenotípica foi empregada, foram selecionadas sementes provenientes de espigas saudáveis e bem desenvolvidas.

## **2.5 Similaridade genética entre as gerações $MRC_3F_2$ e respectivos genitores**

Foi realizada uma análise comparativa da similaridade genética das gerações  $MRC_3F_2$  em relação aos genitores que originaram estas populações, nos cinco projetos de conversão estudados, com o objetivo de verificar o quanto a seleção assistida por marcadores SSRs nas gerações  $RC_2F_1$  e  $RC_3F_1$  dos projetos A e B, representou um aumento da eficiência do processo de conversão da geração subsequente (geração  $MRC_3F_2$  geneticamente mais similar à respectiva linhagem recorrente), quando comparados aos projetos C, D e E, onde apenas seleção fenotípica foi empregada.

Adicionalmente, foram também analisadas subpopulações normais e QPM selecionadas dentro das gerações  $RC_2F_2$  em quatro dos cinco projetos estudados.

### **2.5.1 Análises de SSRs**

Foram avaliados 22 materiais, os quais representavam as gerações  $MRC_3F_2$ ,  $RC_2F_2$ ,  $RC_2F_2.O_2$ , linhagens recorrentes e doadoras, dos cinco projetos de conversão. O DNA foi extraído a partir de um bulk de folhas representativo de cada uma das populações estudadas, conforme descrito no item 2.4.1.1. As análises de SSR foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular da Syngenta Seeds Ltda, Uberlândia, MG. As reações foram realizadas de acordo com os procedimentos descritos por Mayor (2001), em volume final de 10  $\mu$ L,

empregando-se 32 *primers* específicos bem distribuídos por todo o genoma do milho.

Os fragmentos amplificados foram resolvidos em gel de agarose SFR® 3% sob eletroforese a 170 V por 1,5 h. O gel foi tratado com brometo de etídio (0,5 µL/mL) e visualizado sob luz UV.

### 2.5.2 Análise da similaridade genética

A avaliação dos géis de agarose foi realizada visualmente. Cada alelo foi tratado como um caráter único e a sua presença em um material foi designada por 1 e a ausência por 0. A estimativa da similaridade genética ( $sg_{ij}$ ) entre cada par de materiais foi efetuada pelo coeficiente de similaridade de Dice (Dice, 1945), usando-se a expressão  $sg_{ij} = 2a/(2a+b+c)$ . Nesta expressão,  $a$  corresponde à presença de um certo alelo nos indivíduos  $i$  e  $j$ ;  $b$  à presença do alelo em  $i$  e ausência em  $j$ ; e  $c$  à ausência do alelo em  $i$  e presença em  $j$ .

A representação simplificada das similaridades foi feita a partir de um dendrograma obtido pelo método hierárquico aglomerativo da média aritmética entre pares não ponderados (UPGMA), utilizando-se o programa NTSYSpc, versão 2.02i.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Utilização de marcadores RFLP para identificação das plantas $O_2o_2$ nas gerações de retrocruzamento

Os resultados apresentados na Figura 2 demonstram que os genótipos normais, QPM e  $F_1$  foram diferenciados pela sonda do gene *opaco-2*, utilizando as enzimas *EcoRI* e *HindIII*. Para a enzima *EcoRI* foi gerada uma banda de aproximadamente 8,8 kb para os genótipos  $O_2O_2$  e uma banda de

aproximadamente 5,8 kb para os genótipos  $o_2o_2$ . Para a enzima *Hind*III foi gerada uma banda de aproximadamente 32 kb para os genótipos  $O_2O_2$  e uma banda de aproximadamente 7,9 kb para os genótipos  $o_2o_2$ . Para as duas combinações sonda-enzima, os indivíduos  $F_1$  apresentaram ambas as bandas, demonstrando a eficiência para diferenciação dos genótipos avaliados. A diferenciação desses genótipos por RFLP utilizando um cDNA do gene *opaco-2* como sonda também foi demonstrada por Kata et al. (1994), avaliando 14 enzimas de restrição, das quais 10 foram polimórficas entre os alelos  $O_2$  e  $o_2$ .

Como ambas as enzimas foram polimórficas entre os genitores, decidiu-se por utilizar a enzima *Eco*RI, devido à melhor intensidade das bandas e da maior disponibilidade desta enzima no laboratório. Assim, 36 plantas em cada uma das gerações  $RC_2F_1$  e  $RC_3F_1$  para os dois projetos de conversão foram analisadas pela combinação sonda *opaco-2* e enzima *Eco*RI.

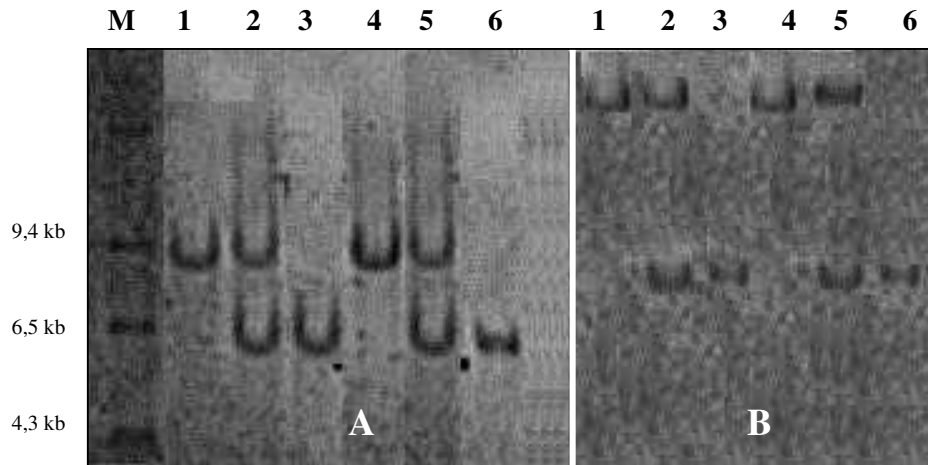


FIGURA 2. Análise de RFLP utilizando um fragmento de 968 pb do gene *opaco-2* como sonda, para diferenciação das linhagens normais, QPM e seus respectivos  $F_1$ , cujo DNA foi digerido com as enzimas *Eco*RI (A) e *Hind*III (B). M = DNA Lambda digerido com a enzima *Hind*III.; 1 = L4; 2 =  $F_1$  (L4 x L34); 3 = L34; 4 = L7; 5 =  $F_1$  (L7 x L9); 6 = L9.

Na Tabela 4 é demonstrado que, para todas as populações de retrocruzamentos avaliadas, a frequência dos indivíduos  $O_2O_2$  e  $O_2o_2$  não diferiu estatisticamente da proporção esperada de 1:1 a 5% de probabilidade, confirmando a segregação mendeliana do marcador RFLP.

A eficiência do marcador para diferenciação dos indivíduos segregantes para o loco *opaco-2* foi confirmada pela autofecundação de cada uma das plantas  $RC_2F_1$  e  $RC_3F_1$ , com posterior avaliação do fenótipo das sementes das gerações  $RC_2F_2$  e  $RC_3F_2$ . As espigas foram classificadas como segregantes (apresentando grãos com manchas opacas) ou normais (grãos totalmente vítreos), a partir de um exame visual por ocasião da colheita. Todos os genótipos preditos pelo marcador RFLP em plantas jovens foram validados pela avaliação fenotípica. A Figura 3 apresenta a diferenciação dos indivíduos na população  $RC_2F_1$  do projeto de conversão A (L4 x L34).

TABELA 4. Número de plantas analisadas pelo marcador RFLP (*EcoRI* + sonda *opaco-2*), sua classificação entre os genótipos ( $O_2O_2$  ou  $O_2o_2$ ) e a razão genotípica em cada população.

Projeto	População	Genótipos		Total	FO <sup>1</sup>	FE <sup>2</sup>	$\chi^2$
		$O_2O_2$	$O_2o_2$				
A	(L4* x L34)RC2	22	14	36	1,57:1	1:1	1,78 <sup>NS</sup>
B	(L7* x L9)RC2	22	14	36	1,57:1	1:1	1,78 <sup>NS</sup>
A	(L4* x L34)RC3	14	22	36	1:1,57	1:1	1,78 <sup>NS</sup>
B	(L7* x L9)RC3	18	18	36	1:1	1:1	0,00 <sup>NS</sup>

<sup>1</sup>FO = frequência obtida; <sup>2</sup>FE = frequência esperada; NS = não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste qui-quadrado.

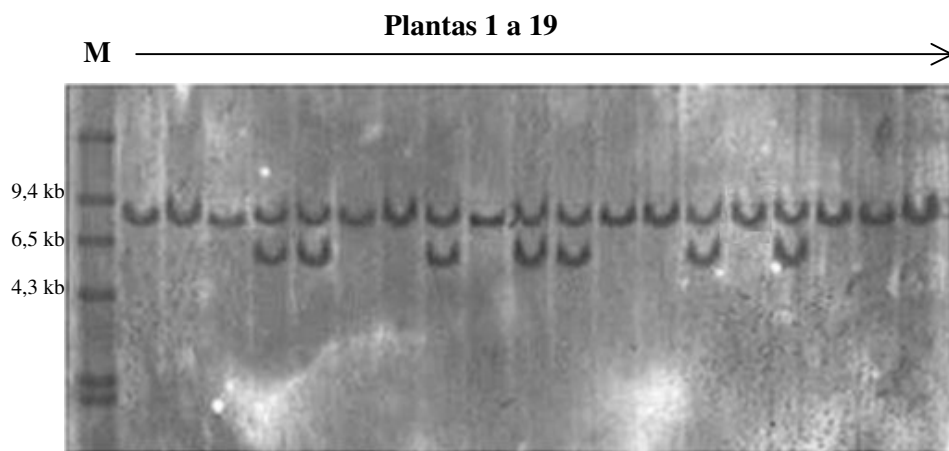


FIGURA 3. Avaliação das plantas RC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> do projeto de conversão A (L4 x L34) por RFLP com a combinação da enzima *EcoRI* e a sonda de 968 pb derivada do gene *opaco-2*. M = DNA Lambda digerido com a enzima *HindIII*.

Considerando-se o alto nível de polimorfismo do loco *opaco-2* (Henry & Damerval, 1997), bem como os diferentes padrões de restrição obtidos por Bernard et al. (1994) para este loco, sugere-se que a eficiência da identificação precoce por RFLP irá variar dependendo do tipo de alelo *opaco-2* presente nos genitores doadores e recorrentes.

Em programas de conversões de linhagens normais para QPM, utilizando o método proposto por Guimarães et al. (2000), a identificação precoce dos indivíduos que possuem o alelo *o<sub>2</sub>* apresenta como principal vantagem a redução de aproximadamente 50% no número de cruzamentos necessários para obtenção das próximas gerações RC e MRC, além de dispensar as autofecundações das plantas das gerações RC para confirmação do genótipo heterozigoto. Tendo em vista a complexidade dos cruzamentos a campo quando da utilização desta metodologia, a redução do número de plantas trabalhadas torna-se uma vantagem significativa. Outra vantagem a ser considerada é que a

expressão dos modificadores do endosperma nos grãos é genótipo específica (Belousov, 1987; Vasal, 2000), o que torna a seleção fenotípica difícil de ser realizada com eficiência e segurança em algumas populações trabalhadas. Kata et al. (1994) e Dreher et al. (2000) enumeram, ainda, como uma vantagem desta identificação precoce, o fato de que, devido ao genótipo alvo ser identificado em plantas jovens, características do grão e da planta podem ser selecionadas simultaneamente nos processos de conversão, aumentando a eficiência do processo seletivo.

A identificação das plantas heterozigotas ( $O_2o_2$ ) constituiu-se na primeira etapa da conversão de linhagens normais para QPM utilizando-se marcadores moleculares e representa um tipo de seleção assistida por marcadores moleculares do tipo parcial, conforme relatado por Dreher et al. (2000). Nestes casos, um marcador molecular é empregado para identificar a presença ou a ausência de um alelo específico que, caso contrário, teria necessariamente de ser identificado fenotipicamente.

Os marcadores RFLP apesar de apresentarem resultados altamente confiáveis e reproduzíveis, são operacionalmente trabalhosos, apresentam um custo relativamente elevado e necessitam de uma grande quantidade de DNA de boa qualidade (Guimarães, 2001; Carneiro, 2002). No entanto, a disponibilidade de marcadores SSRs, já extensivamente discutida no Capítulo 2, pode substituir os marcadores RFLP na diferenciação dos alelos  $O_2$  e  $o_2$ , apresentando vantagens em termos de rapidez e facilidade de obtenção.

### **3.2 Utilização de marcadores SSRs para acelerar a recuperação dos genótipos dos genitores recorrentes**

As plantas heterozigotas selecionadas por RFLP nas gerações  $RC_2F_1$  e  $RC_3F_1$ , nos dois projetos de conversão, foram genotipadas por um conjunto de

marcadores SSRs, visando à identificação e seleção das plantas com maior proporção de recuperação do genótipo dos genitores recorrentes.

Os dados dos marcadores SSRs gerados nas populações de retrocruzamento foram utilizados para obtenção das proporções de recuperação do genótipo do genitor recorrente e construção dos genótipos gráficos (Young & Tanksley, 1989a) de cada indivíduo. As proporções de recuperação do genitor recorrente nas duas gerações ( $RC_2F_1$  e  $RC_3F_1$ ) e nos dois projetos de conversão (A e B) estudados (Figuras 4 e 5) seguiram um padrão de distribuição normal, de acordo com o teste de Shapiro-Wilk (Shapiro et al., 1968).

Na Tabela 5, observa-se que a proporção média de recuperação do genótipo do genitor recorrente nas gerações  $RC_2F_1$  foi de 86,5% com desvio padrão de 4,0% para o projeto A e 85,8% com desvio padrão de 4,6% para o projeto B, valores muito próximos à estimativa média teórica esperada em populações  $RC_2$ , que é de 87,5%.

No projeto A, para obtenção da geração  $MRC_2F_2$ , selecionaram-se sementes QPM entre as três espigas que tiveram como genitor masculino a planta RC2-A-14, que apresentou a maior recuperação do genótipo da linhagem recorrente L4 (93%) entre as plantas que deram origem a esta geração. A geração  $RC_3F_1$  foi obtida a partir de sementes das três espigas que receberam pólen da planta RC2-A-33, que também apresentou 93% de recuperação do genótipo da linhagem recorrente L4. Nesta população, a planta com menor porcentagem de recuperação do genótipo recorrente foi a RC2-A-11, com 79,2% (Tabela 5). As representações gráficas genótípicas das plantas RC2-A-33 e RC2-A-11 são apresentadas na Figura 6, em que as diferenças entre a melhor e a pior planta correspondem a segmentos em heterozigose nos cromossomos 5, 6, 7 e 9.

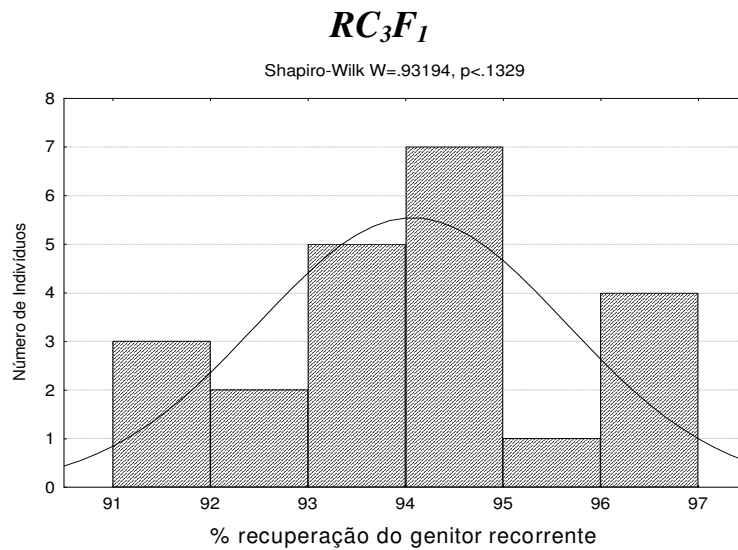
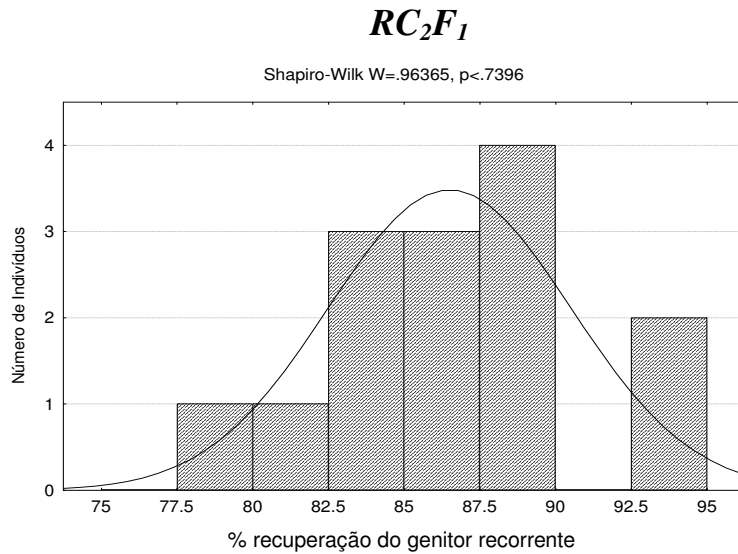


FIGURA 4. Distribuições das porcentagens de recuperação do genótipo do genitor recorrente entre os indivíduos heterozigotos selecionados do projeto de conversão A, nas gerações  $RC_2F_1$  e  $RC_3F_1$ . A curva apresentada representa a distribuição normal esperada.

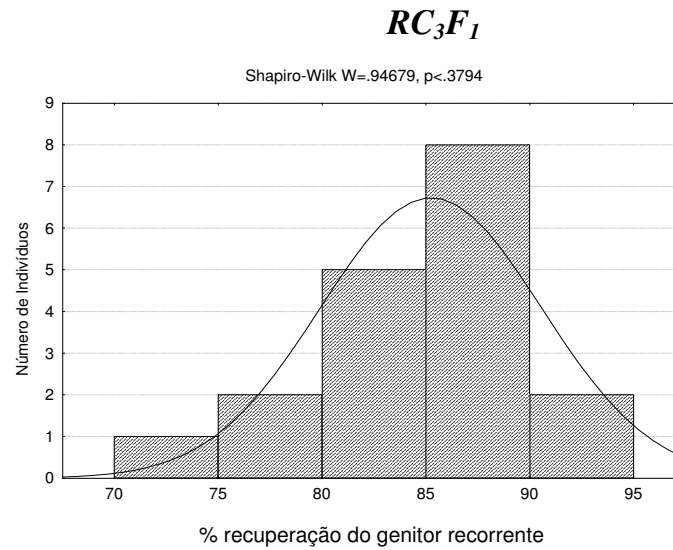
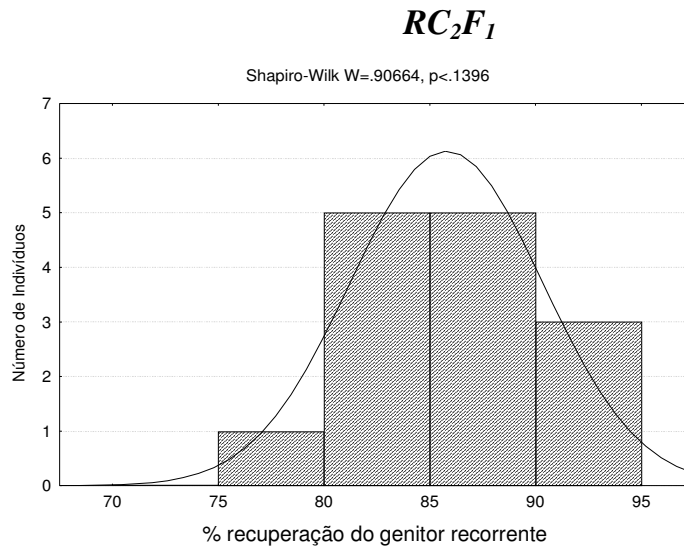


FIGURA 5. Distribuições das porcentagens de recuperação do genótipo do genitor recorrente entre os indivíduos heterozigotos selecionados do projeto de conversão B, nas gerações  $RC_2F_1$  e  $RC_3F_1$ . A curva apresentada representa a distribuição normal esperada.

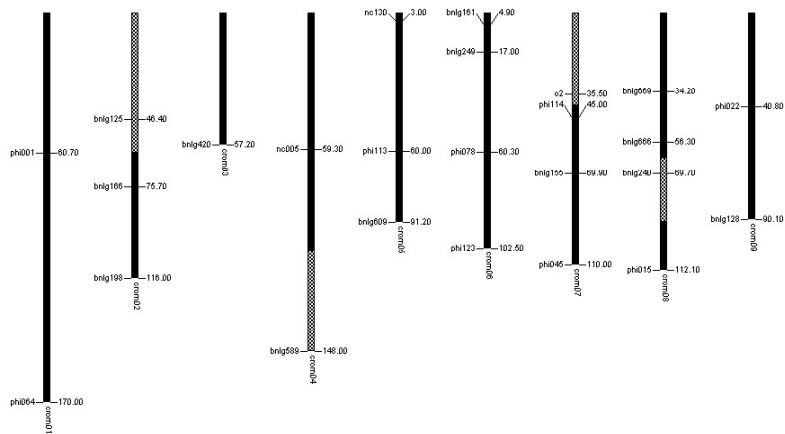
TABELA 5. Proporções médias de recuperação do genótipo do genitor recorrente obtidas nas populações avaliadas, de acordo com os marcadores SSRs, com as melhores e piores plantas em cada população.

População	NP <sup>1</sup>	ME <sup>2</sup>	MO <sup>3</sup>	DP <sup>4</sup>	PM <sup>5</sup>	PL <sup>6</sup>	MR <sup>7</sup>
(L4* x L34)RC2	14	87,5	86,5	4,0	93,0	79,2	6,5
(L7* x L9)RC2	14	87,5	85,8	4,6	91,3	75,2	5,5
(L4* x L34)RC3	22	93,8	94,1	1,6	96,5	91,7	2,4
(L7* x L9)RC3	18	93,8	85,2	5,3	94,2	73,4	9,0

<sup>1</sup>NP = número de plantas avaliadas por marcadores SSRs; <sup>2</sup>ME = porcentagem média esperada de recuperação de acordo com as estimativas teóricas; <sup>3</sup>MO = porcentagem média de recuperação com base nos dados de SSR; <sup>4</sup>DP = desvio padrão obtido; <sup>5</sup>PM = porcentagem do genitor recorrente da planta com a maior proporção de recuperação; <sup>6</sup>PL = porcentagem do genitor recorrente da planta com menor proporção de recuperação; <sup>7</sup>MR = diferença em porcentagem de recuperação do genitor recorrente entre a melhor planta e a média obtida na população.

No projeto B, para obtenção da geração MRC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>, selecionaram-se sementes QPM entre as três espigas que tiveram como genitor masculino a planta RC2-B-8, que apresentou a maior porcentagem de recuperação do genótipo da linhagem recorrente L7 (91,3%). A geração RC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> foi obtida a partir de sementes das três espigas que receberam pólen da planta RC2-B-33, a qual representou a melhor planta entre as que deram origem a esta geração, com 90,2% de recuperação do genótipo da linhagem recorrente. Nesta população, a planta com menor porcentagem de recuperação foi a RC2-B-29, com 75,2% (Tabela 5). As representações gráficas genotípicas das plantas RC2-B-8 e RC2-B-29 são apresentadas na Figura 7, em que as diferenças entre a melhor e a pior planta correspondem a segmentos em heterozigose nos cromossomos 1, 3, 4, 6, 7 e 9.

### Planta RC2-A-33



### Planta RC2-A-11

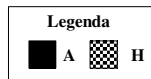
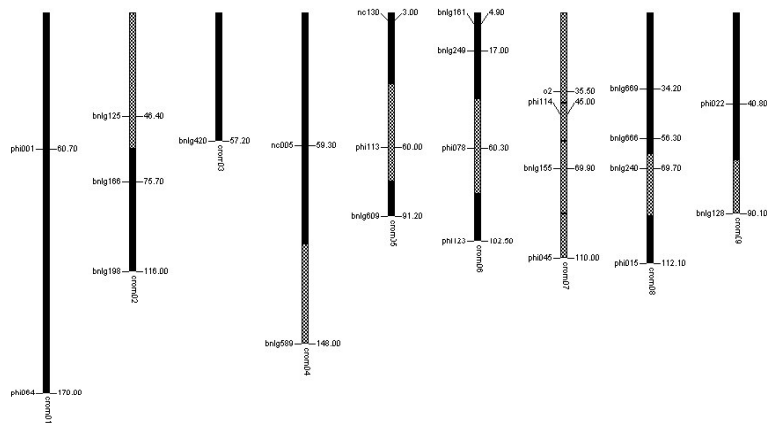
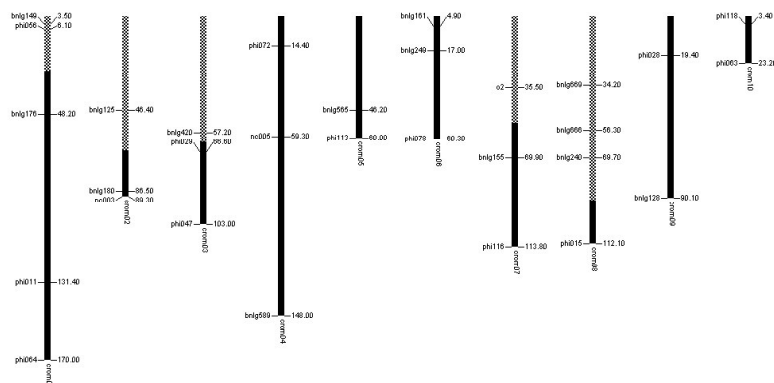


FIGURA 6. Representação gráfica genotípica das plantas com maior (RC2-A-33 = 93,0%) e menor (RC2-A-11 = 79,2%) proporção de recuperação do genótipo do genitor recorrente na geração  $RC_2F_1$  do projeto de conversão A (L4 x L34). A = representação dos segmentos cromossômicos pertencentes à linhagem L4. H = representação dos segmentos cromossômicos em heterozigose.

### Planta RC2-B-8



### Planta RC2-B-29

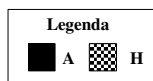
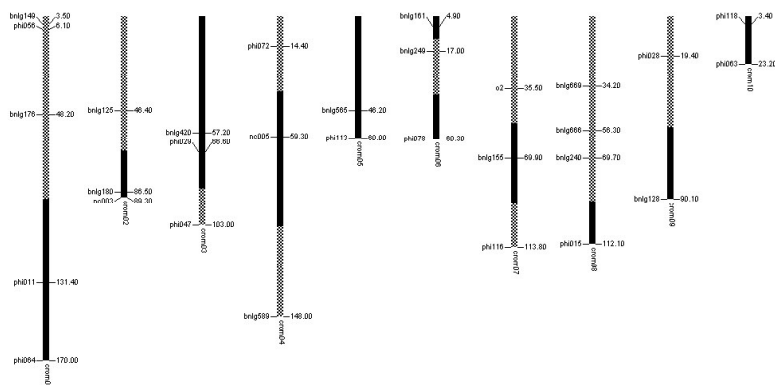
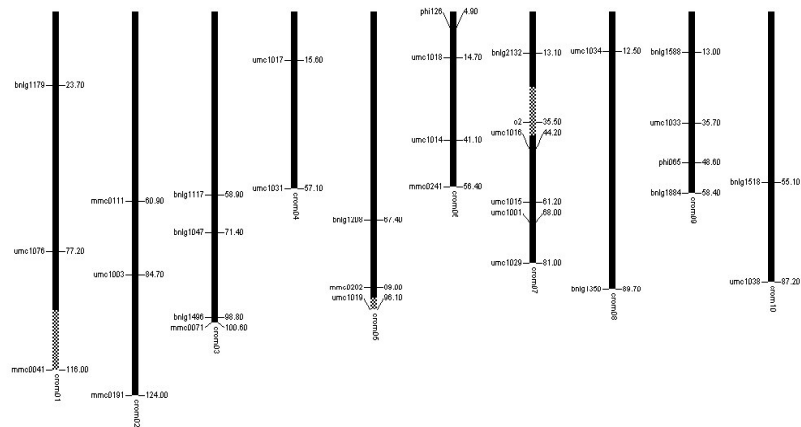


FIGURA 7. Representação gráfica genotípica das plantas com maior (RC2-B-8 = 91,3%) e menor (RC2-B-29 = 75,2%) proporção de recuperação do genótipo do genitor recorrente na geração RC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> do projeto de conversão B (L7 x L9). A = representação dos segmentos cromossômicos pertencentes à linhagem L7. H = representação dos segmentos cromossômicos em heterozigose.

Na Tabela 5 observa-se ainda que as diferenças entre as melhores plantas das gerações  $RC_2F_1$ , de 6,5% para o projeto A e 5,5% para o projeto B, em relação às médias de recuperação obtidas nestas populações, equivalem basicamente ao ganho obtido com um novo ciclo de retrocruzamento, em que a média esperada de recuperação da linhagem recorrente é de 93,8% para a geração  $RC_3$ , um acréscimo de 6,25% em relação à média da geração  $RC_2$  anterior.

Este ganho, entretanto, não foi confirmado quando foram avaliadas as médias de recuperação obtidas nas gerações  $RC_3F_1$ , em ambos os projetos de conversão estudados (Tabela 5). Para o projeto A, a proporção média obtida de recuperação do genótipo da linhagem recorrente foi de 94,1%, sendo este valor ligeiramente superior à porcentagem média esperada de 93,8% para uma geração  $RC_3$  e não reflete o ganho de 6,5% que seria esperado nesta geração de retrocruzamento pela seleção da melhor planta  $RC_2$  entre as avaliadas. No projeto B, a proporção média obtida de recuperação do genótipo da linhagem recorrente, de acordo com os dados dos marcadores SSRs, foi de 85,2%, inferior ao valor médio esperado nesta geração, mesmo desconsiderando-se a seleção realizada na geração anterior. Os genótipos gráficos das melhores e piores plantas avaliadas nas gerações  $RC_3F_1$  dos projetos A e B estão apresentados nas Figuras 8 e 9, respectivamente.

### Planta RC3-A-1



### Planta RC3-A-5

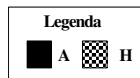
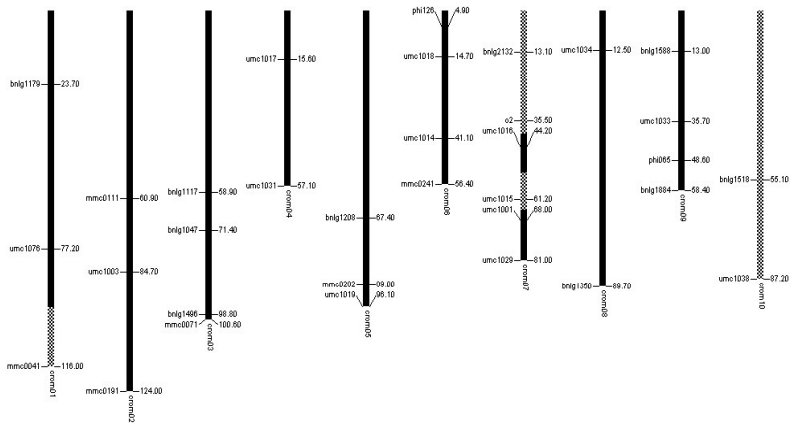
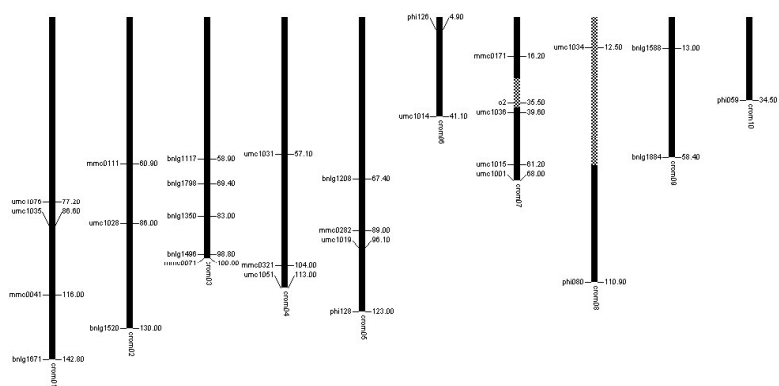


FIGURA 8. Representação gráfica genotípica das plantas com maior (RC3-A-1 = 96,5%) e menor (RC3-A-5 = 91,7%) proporção de recuperação do genótipo do genitor recorrente na geração RC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> do projeto de conversão A (L4 x L34). A = representação dos segmentos cromossômicos pertencentes à linhagem L4. H = representação dos segmentos cromossômicos em heterozigose.

### Planta RC3-B-28



### Planta RC3-B-11

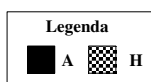
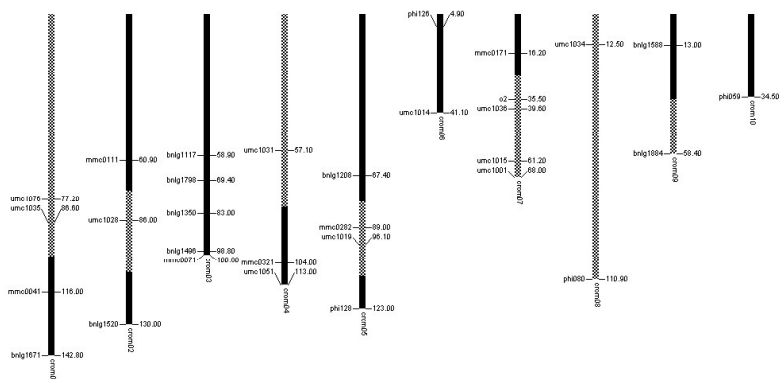


FIGURA 9. Representação gráfica genotípica das plantas com maior (RC3-B-28 = 94,2%) e menor (RC3-B-11 = 73,4%) proporção de recuperação do genótipo do genitor recorrente na geração RC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> do projeto de conversão B (L7 x L9). A = representação dos segmentos cromossômicos pertencentes à linhagem L7. H = representação dos segmentos cromossômicos em heterozigose.

Estes resultados demonstram que, nas condições estabelecidas no presente trabalho, embora tenha sido possível identificar plantas com diferentes proporções de recuperação do genótipo do genitor recorrente, o que permitiu a seleção genotípica em todas as populações estudadas, esta seleção não se refletiu em ganhos para a população de retrocruzamento seguinte (gerações  $RC_2F_1$  em relação às gerações  $RC_3F_1$ ), considerando-se as proporções de recuperação do genótipo do genitor recorrente. Estes resultados contradizem os disponíveis na literatura, obtidos principalmente por simulação, os quais atestam que a análise molecular das plantas constituintes de uma população segregante de retrocruzamento permite a identificação daquelas com as maiores proporções de recuperação do genótipo do genitor recorrente, constituindo-se atualmente em uma das aplicações mais efetivas da tecnologia dos marcadores moleculares em programas de melhoramento de plantas (Young & Tanksley, 1989a,b; Hospital et al., 1992; Openshaw et al., 1994; Ragot et al., 1995; Ribaut & Hoisington, 1998; Frisch et al., 1999; Frisch & Melchinger, 2001a,b; Hospital, 2001; Ribaut et al., 2002).

Nas quatro populações de retrocruzamento estudadas, o número de plantas analisadas por marcadores SSRs foi relativamente baixo, variando de 14 para as gerações  $RC_2F_1$  de ambos os projetos até 22 para a geração  $RC_3F_1$  do projeto A. O tamanho da população analisada tem sido reportado, em estudos de simulação, como o fator mais importante a afetar a eficiência da seleção assistida por marcadores moleculares (Hospital et al., 1997; Frisch et al., 1999), principalmente quando esta envolve a seleção de genótipos desejáveis em marcadores pré-determinados. Este fator provavelmente contribuiu para estes resultados contraditórios, considerando-se a avaliação dos ganhos obtidos com uma etapa de seleção assistida por marcadores moleculares.

Outro aspecto a ser considerado é que o número de marcadores analisados em cada população (média de 3 marcadores por cromossomo)

representa uma amostragem relativamente pequena do genoma. Dados da literatura sugerem que um número adequado de marcadores a serem utilizados neste tipo de seleção varia de dois (Openshaw et al., 1994) a três (Hospital et al., 1992) para cada 100 cM. Quanto maior o número de marcadores analisados, mais confiável se tornará a identificação das melhores plantas em cada geração. Ainda, os marcadores utilizados em cada uma das gerações ( $RC_2F_1$  e  $RC_3F_1$ ) foram independentes, de forma que marcadores representando locos segregantes nas gerações  $RC_2F_1$  foram desconsiderados na análise das gerações  $RC_3F_1$  seguintes. Uma análise incluindo estes locos segregantes das gerações anteriores poderia ter melhorado a representatividade da amostragem do genoma nestas gerações subseqüentes. Adicionalmente, o início da seleção assistida apenas na geração  $RC_2F_1$  pode ter prejudicado a identificação das melhores plantas com os marcadores SSRs, em função do nível mais elevado de homozigose encontrado nesta geração.

### **3.3 Similaridade genética entre as gerações $MRC_3F_2$ e respectivos genitores**

Uma análise de similaridade genética das gerações  $MRC_3F_2$  em relação aos respectivos genitores, nos diferentes projetos de conversão, foi realizada como um procedimento de comparação dos projetos com e sem seleção assistida por marcadores SSRs.

Foram utilizados 32 locos SSRs, os quais produziram pelo menos uma banda polimórfica entre os materiais avaliados, sendo gerado um total de 82 alelos, com uma média de 2,6 alelos por loco. Estes 82 alelos foram utilizados na obtenção de uma matriz de similaridade genética utilizando-se o coeficiente de similaridade de Dice (1945), apresentada na Tabela 6.

TABELA 6. Matriz de similaridades genéticas obtidas a partir do coeficiente de similaridade de Dice, entre as gerações MRC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>, RC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>, RC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> o<sub>2</sub> e seus respectivos genitores, de cinco projetos de conversão de linhagens normais em QPM.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
<b>1</b>	<b>1,00</b>																						
<b>2</b>	<b>0,68</b>	<b>1,00</b>																					
<b>3</b>	<b>0,82</b>	<b>0,76</b>	<b>1,00</b>																				
<b>4</b>	<b>0,75</b>	<b>0,90</b>	<b>0,84</b>	<b>1,00</b>																			
<b>5</b>	0,29	0,29	0,27	0,18	<b>1,00</b>																		
<b>6</b>	0,39	0,44	0,36	0,34	<b>0,75</b>	<b>1,00</b>																	
<b>7</b>	0,35	0,38	0,33	0,29	<b>0,82</b>	<b>0,72</b>	<b>1,00</b>																
<b>8</b>	0,33	0,39	0,31	0,29	<b>0,79</b>	<b>0,85</b>	<b>0,75</b>	<b>1,00</b>															
<b>9</b>	0,45	0,61	0,58	0,54	0,36	0,39	0,42	0,34	<b>1,00</b>														
<b>10</b>	0,53	0,67	0,59	0,59	0,34	0,54	0,41	0,39	<b>0,78</b>	<b>1,00</b>													
<b>11</b>	0,33	0,52	0,48	0,46	0,34	0,34	0,41	0,29	<b>0,91</b>	<b>0,71</b>	<b>1,00</b>												
<b>12</b>	0,45	0,63	0,56	0,57	0,28	0,47	0,31	0,32	<b>0,83</b>	<b>0,91</b>	<b>0,79</b>	<b>1,00</b>											
<b>13</b>	0,54	0,58	0,50	0,53	0,39	0,44	0,52	0,48	0,55	0,56	0,41	0,45	<b>1,00</b>										
<b>14</b>	0,55	0,68	0,51	0,61	0,34	0,50	0,49	0,49	0,49	0,61	0,42	0,50	<b>0,76</b>	<b>1,00</b>									
<b>15</b>	0,61	0,67	0,57	0,63	0,35	0,53	0,49	0,49	0,49	0,67	0,39	0,57	<b>0,81</b>	<b>0,84</b>	<b>1,00</b>								
<b>16</b>	0,34	0,43	0,35	0,41	0,32	0,41	0,41	0,44	0,41	0,40	0,33	0,36	0,30	0,39	0,37	<b>1,00</b>							
<b>17</b>	0,36	0,51	0,43	0,49	0,37	0,43	0,42	0,48	0,45	0,45	0,38	0,45	0,39	0,47	0,44	<b>0,77</b>	<b>1,00</b>						
<b>18</b>	0,36	0,45	0,44	0,43	0,37	0,43	0,43	0,49	0,43	0,39	0,35	0,39	0,36	0,41	0,39	<b>0,82</b>	<b>0,92</b>	<b>1,00</b>					
<b>19</b>	0,39	0,52	0,44	0,50	0,29	0,36	0,36	0,42	0,43	0,45	0,34	0,45	0,43	0,48	0,45	<b>0,85</b>	<b>0,91</b>	<b>0,89</b>	<b>1,00</b>				
<b>20</b>	<b>0,44</b>	<b>0,59</b>	<b>0,48</b>	<b>0,55</b>	0,41	0,41	0,44	0,46	<b>0,53</b>	<b>0,63</b>	<b>0,43</b>	<b>0,55</b>	<b>0,48</b>	<b>0,49</b>	<b>0,56</b>	0,48	0,55	0,49	0,57	1,00			
<b>21</b>	0,40	0,45	0,34	0,39	<b>0,44</b>	<b>0,57</b>	<b>0,49</b>	<b>0,56</b>	0,46	0,46	0,32	0,42	0,47	0,41	0,45	0,43	0,47	0,45	0,48	0,53	1,00		
<b>22</b>	0,36	0,52	0,37	0,46	0,54	0,63	0,58	0,60	0,52	0,46	0,45	0,42	0,58	0,48	0,45	<b>0,36</b>	<b>0,51</b>	<b>0,48</b>	<b>0,41</b>	0,35	0,48	1,00	

1 = L4; 2 = L4 MRC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>; 3 = L4 RC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>; 4 = L4 RC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> o<sub>2</sub>; 5 = L7; 6 = L7 MRC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>; 7 = L7 RC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>; 8 = L7 RC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> o<sub>2</sub>; 9 = L13; 10 = L13 MRC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>; 11 = L13 RC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>; 12 = L13 RC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> o<sub>2</sub>; 13 = L5; 14 = L5 MRC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>; 15 = L5 RC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>; 16 = L2; 17 = L2 MRC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>; 18 = L2 RC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>; 19 = L2 RC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> o<sub>2</sub>; 20 = L34; 21 = L9; 22 = L45.

Nesta Tabela, observa-se que a menor similaridade entre as linhagens avaliadas correspondeu à comparação entre as linhagens normais L4 e L7, com um valor de 0,29, enquanto que a maior similaridade foi verificada entre as linhagens L5 e L45 (QPM), com um valor de 0,58. De maneira geral, embora com um menor número de locos avaliados, os resultados do relacionamento entre as linhagens estão coerentes com os obtidos por Padilha (2002), avaliando um grupo de 35 linhagens tropicais de milho utilizando marcadores SSRs e AFLP.

Comparando-se as similaridades das gerações  $MRC_3F_2$  em relação às linhagens recorrentes, nos cinco projetos estudados, observa-se que esta foi maior no projeto de conversão C (0,78), seguida dos projetos E (0,77), D (0,76), B (0,75) e A (0,68). No geral, estes resultados indicam que a seleção assistida por marcadores SSR nas gerações  $RC_2F_1$  e  $RC_3F_1$  não proporcionou uma vantagem na proporção de recuperação do genótipo do genitor recorrente para as gerações  $MRC_3F_2$  (projetos A e B), quando comparados a outros projetos em que apenas a seleção fenotípica foi realizada (projetos C, D e E).

Na análise destes resultados, um aspecto a ser considerado é o grau de relacionamento genético existente entre os dois genitores. Quanto maior for a similaridade genética inicial, mais rápido será completado o processo de conversão.

Ainda na Tabela 6 observa-se que os genitores com um maior nível de similaridade genética são os do projeto de conversão C (L13 x L34), com um valor de 0,53, enquanto os genitores do projeto de conversão E (L2 x L45) apresentam a menor similaridade entre si, com um valor de 0,36. Dessa forma, os projetos de conversão A e B, mesmo com um relacionamento genético inicial maior entre os genitores e seleção assistida por marcadores moleculares nas gerações  $RC_2F_1$  e  $RC_3F_1$ , não apresentaram uma maior similaridade genética

entre as gerações  $MRC_3F_2$  e as linhagens recorrentes, quando comparados ao projeto de conversão E.

Uma representação simplificada dos resultados é apresentada na Figura 10. Mais uma vez constata-se que não houve vantagem diferencial, tendo em vista a similaridade genética com a linhagem recorrente, das gerações  $MRC_3F_2$  dos projetos onde foi praticada a seleção assistida por marcadores, em relação aos outros projetos de conversão. Observa-se, ainda neste dendrograma, que as análises de similaridade confirmaram a tendência das gerações  $RC_2$  com uma proporção ligeiramente maior de recuperação do genótipo do genitor recorrente quando comparadas às gerações  $MRC_3$ . De acordo com as estimativas teóricas, as proporções médias de recuperação do genótipo do genitor recorrente são de 87,5% e 84,4% para as gerações  $RC_2$  e  $MRC_3$ , respectivamente.

No caso das gerações  $RC_2F_2$  selecionadas para grãos QPM ( $RC_2F_2-o_2$ ), em três dos quatro projetos estudados estas se mostraram geneticamente mais próximas das gerações  $MRC_3F_2$  que das gerações  $RC_2F_2$  selecionadas para grãos normais. Isto demonstra que na transferência e seleção do alelo  $o_2$  e modificadores do endosperma, provavelmente ocorreu, simultaneamente, uma transferência de outros segmentos do genótipo do doador por arraste devido à ligação (*linkage drag*).

Este efeito do arraste devido à ligação também pode ser constatado na avaliação dos genótipos gráficos representados nas Figuras 6, 7, 8 e 9. As piores plantas nas quatro populações de retrocruzamento estudadas apresentaram segmentos em heterozigose no cromossomo 7, onde está localizado o gene *opaco-2* (bin 7.01) e onde foram mapeados dois genes modificadores da textura do endosperma (Lopes, 1993).

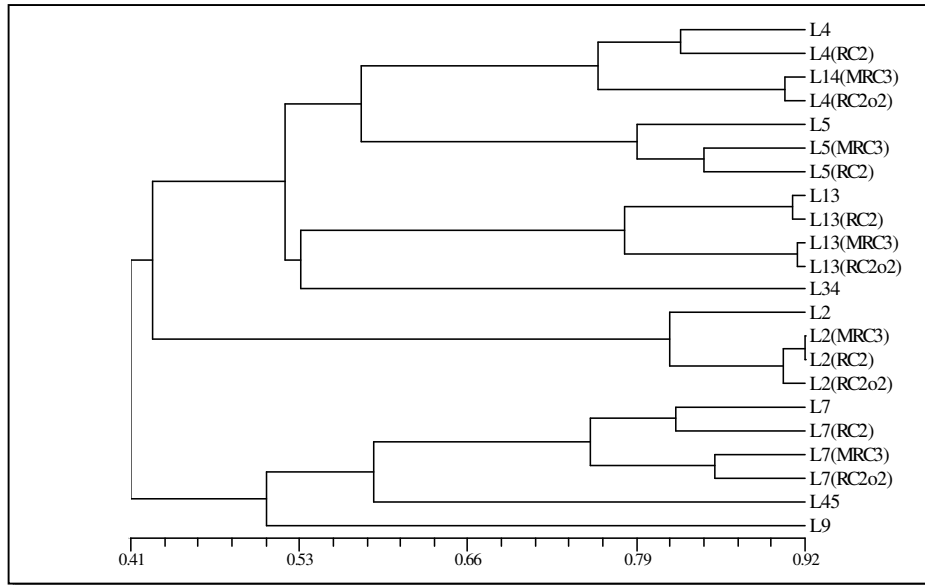


FIGURA 10. Dendrograma representativo das similaridades genéticas obtidas a partir do coeficiente de similaridade de Dice, entre as gerações  $MRC_3F_2$ ,  $RC_2F_2$ ,  $RC_2F_2 o2$  e seus respectivos genitores, de cinco projetos de conversão de linhagens normais em QPM.

As similaridades genéticas médias entre as diferentes populações estudadas nos cinco projetos de conversão estão apresentadas na Tabela 7. Para obtenção desta matriz, foram obtidos valores médios de similaridade entre as diferentes gerações, ou seja, a similaridade média entre a geração  $MRC_3F_2$  e a linhagem doadora (LD), por exemplo, representa uma média obtida pela soma dos valores de similaridade entre estas duas gerações dentro de cada projeto de conversão específico. Para a obtenção de todas as outras estimativas foi adotado o mesmo procedimento.

TABELA 7. Matriz de similaridades genéticas médias entre as diferentes populações estudadas nos projetos de conversão de linhagens de milho normal em QPM.

<b>População</b>	<b>LR</b>	<b>MRC<sub>3</sub>F<sub>2</sub></b>	<b>RC<sub>2</sub>F<sub>2</sub></b>	<b>RC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> o<sub>2</sub></b>	<b>LD</b>
<b>LR</b>	1,00				
<b>MRC<sub>3</sub>F<sub>2</sub></b>	0,75	1,00			
<b>RC<sub>2</sub>F<sub>2</sub></b>	0,84	0,79	1,00		
<b>RC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> o<sub>2</sub></b>	0,81	0,89	0,82	1,00	
<b>LD</b>	0,45	0,56	0,49	0,52	1,00

Os resultados obtidos também apresentam a geração RC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>-o<sub>2</sub> geneticamente mais próxima da geração MRC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> que da própria geração RC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> (0,89 contra 0,79), o que demonstra o efeito da seleção do alelo o<sub>2</sub> e modificadores na transferência de uma porção do genótipo do genitor doador por arraste devido à ligação. A representação simplificada destas similaridades médias é apresentada na Figura 11.

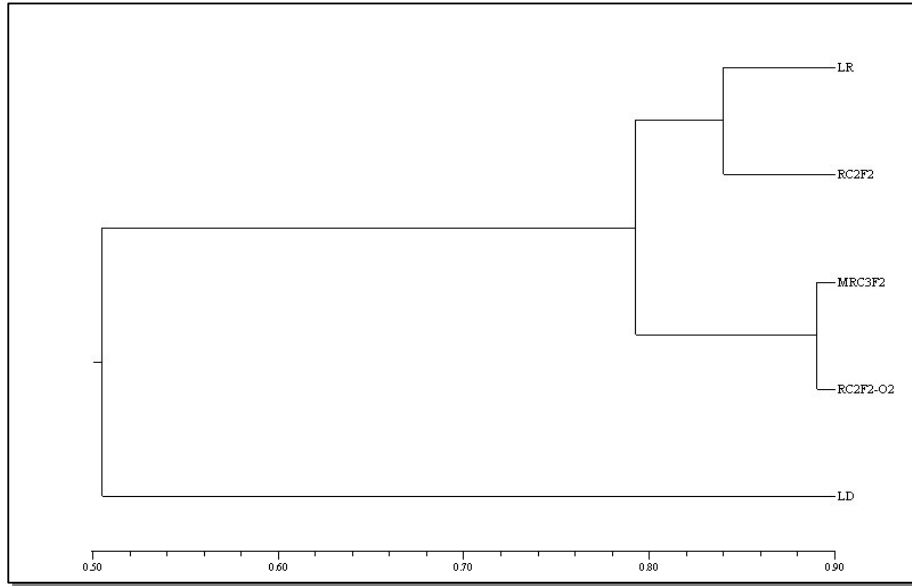


FIGURA 11. Dendrograma representativo das similaridades genéticas médias das diferentes populações estudadas nos projetos de conversão de linhagens de milho normal em QPM.

Este efeito observado do arraste devido à ligação, em programas de conversão de linhagens, é amplamente discutido na literatura. Openshaw et al. (1994) consideram que, com o uso de marcadores genéticos, a porção do genótipo do genitor recorrente que não está ligada ao alelo que está sendo transferido pode ser recuperada facilmente. Esta recuperação será menor no cromossomo que possui o alelo de interesse, haja vista o arraste devido à ligação. Hanson (1959) reporta que, para um loco localizado no meio de um cromossomo de 200 cM, o tamanho do segmento cromossômico do genitor doador que acompanha a seleção deste loco é esperado ser de 126, 63 e 28 cM nas gerações RC<sub>1</sub>, RC<sub>3</sub> e RC<sub>7</sub>, respectivamente. Para Stam & Zeven (1981), uma média de 32% dos alelos no cromossomo que possui o alelo de interesse será de

origem do genitor doador, em uma geração RC<sub>6</sub> de um programa regular de retrocruzamento sem o auxílio de marcadores moleculares. Todos estes resultados teóricos também foram confirmados com dados experimentais apresentados por Young & Tanksley (1989b), que encontraram segmentos de até 51 cM do cromossomo doador associados a um alelo de resistência introgridido em tomate, após seis gerações de retrocruzamentos. Os resultados obtidos neste trabalho também suportam estas considerações e reforçam a argumentação que uma estratégia eficiente de seleção assistida por marcadores para conversão de linhagens deve considerar a obtenção de recombinantes em marcadores que flanqueiam o alelo alvo, principalmente nas gerações iniciais do programa de retrocruzamento (Hospital et al., 1992).

Considerando-se a estratégia de seleção assistida por marcadores moleculares que foi utilizada neste trabalho, observa-se que os marcadores RFLP foram eficientes para realização da primeira etapa do processo seletivo, ou seja, a identificação dos indivíduos heterozigotos ( $O_2o_2$ ) em plantas jovens, reduzindo aproximadamente pela metade o número de cruzamentos necessários para a obtenção das próximas gerações. Na segunda etapa do processo, entretanto, o qual representou a identificação das plantas com maior proporção de recuperação do genótipo do genitor recorrente por marcadores SSR, nenhuma vantagem significativa desta seleção por marcadores ficou claramente demonstrada.

Os vários resultados obtidos a partir de simulação disponíveis na literatura e também os dados experimentais evidenciam que a definição de uma eficiente estratégia de conversão de linhagens auxiliada por marcadores moleculares não é um procedimento simples e direto, em função do número de parâmetros envolvidos. Estes são particularmente complexos em se tratando da conversão de linhagens de milho normal em QPM, em que, no processo seletivo, atenção deve ser dada não somente à identificação do alelo  $o_2$  ou à recuperação

do genótipo do genitor recorrente, mas também e com o mesmo ou maior nível de importância à seleção de grãos com alto grau de modificação do endosperma e elevados teores dos aminoácidos lisina e triptofano.

A metodologia dos retrocruzamentos modificados (Guimarães et al., 2000), requer um trabalho elaborado no campo (identificação de plantas individuais e cruzamentos dirigidos). Por causa disso, um processo de conversão que utilize esta metodologia deve ser planejado com um número de plantas bem dimensionado, sendo operacionalmente difícil o manuseio de grandes populações.

Considerando estes aspectos, sugere-se que em um programa de conversão de linhagens para QPM, principalmente ao utilizar esta metodologia, a estratégia de seleção assistida por marcadores moleculares priorize a identificação dos indivíduos portadores do alelo  $o_2$ , com o resto do processo seletivo ocorrendo a partir da identificação fenotípica das melhores plantas e grãos, em que uma atenção maior deverá ser dada à qualidade nutricional e ao grau de modificação do endosperma. Isto é especialmente verdadeiro quando a escolha da linhagem doadora no início do processo de conversão é feita de maneira acertada, escolhendo-se uma linhagem até certo ponto adaptada e que apresente um desempenho agrônômico relativamente satisfatório. Dessa forma, uma conversão até mesmo parcial já será suficiente para que os objetivos de geração de um germoplasma superior e com utilidade no programa de melhoramento sejam atendidos, reforçando os argumentos que, para estes projetos de conversão específicos, a identificação das plantas com maior proporção de recuperação do genótipo do genitor recorrente não é um fator determinante para o sucesso do programa.

## 4 CONCLUSÕES

O marcador RFLP (enzima *EcoRI* + sonda 968 pb gene *opaco-2*) foi eficiente para identificação e seleção precoce dos genótipos heterozigotos ( $O_2O_2$ ) nas populações de retrocruzamento.

Considerando a estratégia de seleção e o tamanho das populações analisadas, a identificação das plantas com maior proporção de recuperação do genótipo do genitor recorrente por SSRs não proporcionou uma maior eficiência ao processo de conversão de milho normal em QPM, quando comparado aos projetos onde apenas a seleção fenotípica foi utilizada.

Adicionalmente, constatou-se a ocorrência de arraste devido à ligação (“*linkage drag*”) nas regiões genômicas flanqueando os genes *opaco-2* e modificadores do endosperma.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

BELOUSOV, A. A. Genetic analysis of modified endosperm texture in *opaque2* maize. **Genetika**, Moscow, v. 23, n. 4, p. 677-685, 1987.

BERNARD, L.; CICERI, P.; VIOTTI, A. Molecular analysis of wild type and mutant alleles at the *Opaque-2* regulatory locus of maize reveals different mutations and types of  $O_2$  products. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 24, n. 6, p. 949-959, Mar. 1994.

CARNEIRO, N. P. Tipos de marcadores utilizados no melhoramento de plantas In: SIMPÓSIO DE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 6., 2002, Lavras. Disponível em: <http://www.nucleoestudo.ufla.br/gen/eventos/simposios/5simpo/5simpo.htm>. Acessado em: 18 nov. 2002.

DICE, L. Measures of the amount of ecological association between species. **Ecology**, Washington, v. 26, p. 297-302, 1945.

DREHER, K.; MORRIS, M.; KHAIRALLAH, M.; RIBAUT, J. M.; PANDEY, S.; SRINIVASAN, G. Is marker-assisted selection cost-effective compared to conventional plant breeding methods? The case of quality protein maize. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL CONSORTIUM ON AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY RESEARCH (ICABR), 4., 2000, Ravello. **Anais...** Ravello, 2000. 25 p.

FEHR, W. R. **Principles of cultivars development**. Ames: Macmillian, 1991. 536 p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa Cenargem, 1998. 220 p.

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

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

FRISCH, M.; MELCHINGER, A. E. Marker-assisted backcrossing for simultaneous introgression of two genes. **Crop Science**, Madison, v. 41, n. 6, p. 1716-1725, Nov./Dec. 2001b.

GUIMARÃES, C. T. Técnicas moleculares aplicadas ao melhoramento do milho. In: SIMPÓSIO DE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 5., 2001, Lavras. Disponível em: <<http://www.nucleoestudo.ufla.br/gen/eventos/simposios/5simpo/5simpo.htm>>. Acessado em: 02 nov. 2002.

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

HANSON, W. D. Early generation analysis of length of heterozygous chromosome segments around a locus held heterozygous with backcrossing or selfing. **Genetics**, Baltimore, v. 4, n. 5, p. 843-847, 1959.

HENRY, A. M.; DAMERVAL, C. High rates of polymorphisms and recombination at the *Opaque-2* locus in cultivated maize. **Molecular General Genetics**, New York, v. 256, n. 2, p. 147-157, Sept. 1997.

HOSPITAL, F. Size of donor chromosome segments around introgressed loci and reduction of linkage drag in marker-assisted backcross program. **Genetics**, Baltimore, v. 158, n. 3, p. 1363-1379, July 2001.

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

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

KATA, S. R.; TAYLOR, B. H.; BOCKHOLT, A. J.; SMITH, J. D. Identification of opaque-2 genotypes in segregating populations of Quality Protein Maize by analysis of restriction fragment length polymorphisms. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 89, n. 4, p. 407-412, Oct. 1994.

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

MAYOR, P. J. **Identificación de marcadores microsatélites ligados a la tolerancia a mal de río cuarto (MRCV) em maíz (Zea mays L.)**. 2001. 108 p. Tesis (Maestría em Genética Vegetal) – Universidad Nacional de Rosario – INTA, Rosario, Argentina.

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

PADILHA, L. **Marcadores moleculares semi-automatizados na caracterização e determinação da diversidade genética entre linhagens de milho tropical.** 2002. 78 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

RAGOT, M.; BIASIOLLI, M.; DELBUT, M. F.; DELL'ORCO, A.; MALGARINI, L.; THEVENIN, P.; VERNON, J.; VIVANT, J.; ZIMMERMANN, R.; GAY, G. Marker-assisted backcrossing: a practical example. In: **TECHNIQUES ET UTILISATIONS DES MARQUEURS MOLECULAIRES**, 1994, Montpellier. **Proceedings...** Paris: INRA, 1995.

RAGOT, M.; HOISINGTON, D. Molecular markers for plant breeding. Comparisons of RFLP and RAPD genotyping cost. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 86, n. 8, p. 975-984, Sept. 1993.

RIBAUT, J. M.; HOISINGTON, D. Marker-assisted selection: New tools and strategies. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 3, n. 6, p. 236-239, June 1998.

RIBAUT, J. M.; JIANG, C.; HOISINGTON, D. Simulations experiments on efficiencies of gene introgression by backcrossing. **Crop Science**, Madison, v. 42, n. 2, p. 557-565, Mar./Apr. 2002.

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

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B.; CHEN, H. J. A comparative study of various tests for normality. **Journal of the American Statistical Association**, v. 63, p. 1343-1372, 1968.

STAM, P.; ZEVEN, A. C. The theoretical proportion of the donor genome in near-isogenic lines of self-fertilizers bred by backcrossing. **Euphytica**, Dordrecht, v. 30, n. 2, p. 227-238, 1981.

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

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

VAN BERLOO, R. GGT: Software for the display of Graphical Genotypes. **Journal of Heredity**, Cary, v. 90, n. 2, p. 328-329, Mar./Apr. 1999.

VASAL, S. K. High Quality protein corn. In: HALLAUER, A. R. (Ed.). **Specialty corns**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2000. p. 85-129.

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

YOUNG, N. D.; TANKSLEY, S. D. RFLP analysis of the size of chromosomal segments retained around the *Tm-2* locus of tomato during backcross breeding. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 77, n. 3, p. 353-359, 1989b.

**CAPÍTULO 4: Avaliação de híbridos experimentais QPM obtidos pela  
conversão de linhagens elites normais**

## **AValiação de HÍBRIDOS EXPERIMENTAIS QPM OBTIDOS PELA CONVERSÃO DE LINHAGENS ELITES NORMAIS**

### **RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi avaliar dois híbridos experimentais QPM obtidos a partir da conversão parcial de três linhagens elites, utilizando a metodologia dos retrocruzamentos modificados, em comparação com as versões normais destes mesmos híbridos. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos completos casualizados, com seis repetições. Foram avaliadas 13 características agronômicas e 12 características de qualidade dos grãos. Adicionalmente, os diferentes híbridos também foram analisados por marcadores moleculares SSRs, como uma forma de se inferir sobre o relacionamento genético entre os mesmos. Os resultados demonstraram que os híbridos QPM obtidos pela conversão parcial de linhagens normais apresentaram uma melhor qualidade protéica, e comportamento semelhante para a maioria das características agronômicas avaliadas, incluindo a produtividade de grãos, quando comparados aos híbridos originais. Entretanto, alguns dos problemas geralmente associados aos híbridos QPM, como uma maior porcentagem de acamamento e quebraamento, sabugos mais grossos e grãos mais curtos, mantiveram-se até esta fase do processo. Tanto as versões normais como os híbridos QPM convertidos apresentaram os piores desempenhos em termos de produtividade de grãos, quando comparados com os híbridos utilizados como testemunhas, indicando uma perda de competitividade em relação a estes híbridos mais recentes.

## **EVALUATION OF QPM EXPERIMENTAL HYBRIDS OBTAINED FROM CONVERSION OF ELITE INBRED LINES**

### **ABSTRACT**

The objective of this study was to evaluate two experimental QPM hybrids obtained from the partial conversion of three elite inbred lines using the modified backcross procedure, in comparison with the normal version of these hybrids. A randomized complete block design was used with six replications. Thirteen agronomic and 12 grain quality traits were evaluated. The different hybrids were also analysed by SSR markers to infer on the genetic relationship among them. The results indicated that the QPM hybrids obtained by partial conversion of normal inbred lines presented a better protein quality and similar

performance for most of the agronomic traits, including grain yield, when compared with the original hybrids. However, some of the problems specifically associated with QPM hybrids, such as higher lodging, thicker cobs and shorter grains, remained up to this phase of the process. Both normal versions and converted QPM hybrids displayed a worst grain yield performance, when compared to the checks hybrids, indicating a loss in competitiveness in relation to these more recent hybrids.

## 1 INTRODUÇÃO

Um dos principais objetivos dos programas de melhoramento de milho é a introgressão, em linhagens elites, de um ou mais alelos de interesse de um genitor doador. A utilização de retrocruzamentos sucessivos constitui-se no método clássico utilizado para conversão de linhagens. Nos programas de melhoramento de milho QPM, a estratégia de conversão de populações e linhagens de milho normal tem sido utilizada visando aproveitar as características desejáveis presentes neste germoplasma, de forma a se obter versões QPM de variedades e híbridos superiores. O método originalmente utilizado para conversão de milho normal em QPM foi proposto por Vasal et al. (1980). Guimarães et al. (2000) propuseram um método modificado de retrocruzamento que diminui o tempo necessário à recuperação do genótipo do genitor recorrente e fornece a oportunidade para seleção de características QPM em todas as gerações MRC (retrocruzamento modificado), quando comparado ao método anterior.

Uma etapa importante do processo de conversão diz respeito à avaliação dos híbridos convertidos. Esta avaliação é tradicionalmente realizada em ensaios com repetições, em que a versão convertida é comparada à versão original para um amplo conjunto de características de interesse. O processo é considerado bem sucedido quando o desempenho do híbrido convertido é igual ou supera o híbrido isogênico original, com o adicional da expressão da característica de

interesse que foi introgridida. Estes ensaios comparativos podem ainda ser realizados em fases intermediárias do processo, servindo, dessa forma, como uma avaliação preliminar do trabalho de conversão que está sendo desenvolvido.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar híbridos experimentais QPM obtidos a partir da conversão parcial de três linhagens elites utilizando a metodologia dos retrocruzamentos modificados, em comparação com as versões normais destes mesmos híbridos.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

O ensaio foi instalado na área experimental da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, que está localizada a 19° 27' de latitude sul, 44° 14' de longitude oeste e 730 m de altitude.

### **2.1 Híbridos avaliados**

Foram avaliados dois híbridos experimentais QPM obtidos a partir da conversão parcial de três linhagens elites utilizando a metodologia dos retrocruzamentos modificados (Guimarães et al., 2000), os quais foram comparados com as versões normais destes mesmos híbridos. O híbrido simples HS200Q foi obtido pelo cruzamento das gerações  $MRC_3F_1$  QPM dos projetos de conversão das linhagens L13 e L5. O cruzamento deste híbrido HS200Q com a geração  $MRC_3F_1$  QPM do projeto de conversão da linhagem L2 originou o híbrido triplo BR3123Q. Foram ainda avaliados no ensaio quatro híbridos da Embrapa Milho e Sorgo, sendo dois normais e dois QPM. Uma descrição dos híbridos avaliados é apresentada na Tabela 1.

TABELA 1. Híbridos avaliados no ensaio de avaliação de híbridos experimentais QPM. Sete Lagoas, 2001/2002.

<b>Tratamento</b>	<b>Descrição</b>	<b>Tipo de híbrido</b>	<b>Ciclo</b>
1	HS200	Híbrido Simples Normal	Normal
2	HS200Q	Híbrido Simples QPM	Normal
3	BR3123	Híbrido Triplo Normal	Precoce
4	BR3123Q	Híbrido Triplo QPM	Precoce
5	97HT129Q	Híbrido Triplo QPM	Normal
6	CMS00Q-03	Híbrido Simples QPM	Precoce
7	BRS3060	Híbrido Triplo Normal	Normal
8	BRS1001	Híbrido Simples Normal	Precoce

## 2.2 Procedimentos experimentais

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos completos casualizados (DBC) com seis repetições. Cada parcela foi constituída de duas linhas de 4 metros, com espaçamento de 0,90 m entre linhas. A população de plantas planejada para o ensaio foi de 55.000 plantas/ha.

O plantio foi efetuado em 29/11/2001 e a colheita em 30/04/2002.

O plantio e a colheita foram realizados manualmente e os tratos culturais de acordo com os normalmente empregados na região, em sistema de plantio convencional. A adubação de plantio consistiu de 400 kg/ha da fórmula 4-14-8 + Zn, enquanto que a adubação de cobertura foi realizada aos 40 dias após a emergência, com 100 kg/ha de uréia.

## **2.3 Características avaliadas no ensaio**

### **2.3.1 Características agronômicas**

- a) florescimento feminino (FL): número de dias do plantio até 50% das plantas na parcela com emissão de inflorescência feminina;
- b) altura da planta (AP): distância em centímetros entre a superfície do solo contígua ao colo da planta e a inserção da inflorescência masculina com a folha bandeira, avaliada em cinco plantas representativas da parcela;
- c) altura da espiga (AE): distância em centímetros entre a superfície do solo contígua ao colo da planta e o nó de inserção da espiga superior, avaliada em cinco plantas representativas da parcela;
- d) acamamento + quebraimento (AQ): número de plantas acamadas e quebradas na parcela, sendo os dados transformados em porcentagem do estande;
- e) espigas doentes (ED): número de espigas que apresentavam grãos ardidos na parcela, sendo os dados transformados em porcentagem do estande;
- f) diâmetro do colmo (DC): espessura do colmo, em cm, avaliada no primeiro entrenó acima do colo da planta, representando o valor médio de cinco plantas representativas da parcela;
- g) comprimento da espiga (CE): comprimento da espiga despilhada por ocasião da colheita, em cm, representando o valor médio de cinco espigas representativas da parcela;
- h) número de fileiras de grãos (NF): número de fileiras de grãos da espiga, representando o valor médio de cinco espigas representativas da parcela;
- i) diâmetro da espiga (DE): diâmetro, em cm, medido no meio da espiga, representando o valor médio de cinco espigas representativas da parcela;

- j) diâmetro do sabugo (DS): diâmetro, em cm, medido no meio do sabugo, representando o valor médio de cinco espigas representativas da parcela;
- k) comprimento de grãos (CG): determinado em cm por meio da fórmula:  
 $CG = (DE - DS)/2$ ;
- l) população de plantas (POP): número de plantas por ha, obtido a partir da contagem do número de plantas (estande) da parcela por ocasião da colheita;
- m) produtividade de grãos (PROD): obtida a partir da pesagem dos grãos da parcela, corrigido para o teor de água de 14,5%, com os valores expressos em kg/ha.

### **2.3.2. Características de qualidade do grão**

Para avaliação das características de qualidade nutricional dos grãos, cinco plantas representativas de cada parcela foram autofecundadas em duas repetições e as análises realizadas em uma amostra dos grãos destas espigas. Dessa forma, o efeito de pólen pôde ser isolado. As análises de qualidade nutricional foram realizadas no Laboratório de Bromatologia da Embrapa Milho e Sorgo. As características avaliadas foram as seguintes:

- a) densidade dos grãos (DEN): obtida a partir de duas amostras de 200 grãos, pelo método descrito por Wessel-Beaver et al. (1984), com os dados expressos em  $g/cm^3$ ;
- b) peso de 100 sementes (PCS): obtido a partir de uma amostra dos grãos, em g;
- c) teor de proteína do grão (TPG): determinado conforme Pommer (1979), por meio do método Micro-Kjeldahl (A.O.A.C., 1970), com os resultados expressos em porcentagem;

- d) teor de triptofano na proteína (TRIP): determinado segundo o método colorimétrico descrito por Villegas et al. (1984), com os resultados expressos em porcentagem;
- e) teor de triptofano no grão (TRIG): obtido pela relação entre os teores de proteína no grão e de triptofano na proteína, com os resultados expressos em porcentagem;
- f) teor de lisina na proteína (LISP): determinado segundo o método descrito por Hernandez & Bates (1969), que estima a porcentagem de lisina na proteína pela equação de regressão:  $y = 0,3601 + 4,074x$ , em que  $y$  = teor de lisina na proteína e  $x$  = teor de triptofano na proteína. Os resultados são expressos em porcentagem;
- g) teor de lisina no grão (LISG): obtido pela relação entre os teores de proteína no grão e de lisina na proteína, com os resultados expressos em porcentagem;
- h) produção de proteína (PRP): produção de proteína em kg/ha, obtida a partir do teor de proteína do grão e da produtividade de grãos da parcela em kg/ha;
- i) produção de triptofano (PRT): produção de triptofano em kg/ha, obtida a partir do teor de triptofano do grão e da produtividade de grãos da parcela em kg/ha;
- j) produção de lisina (PRL): produção de lisina em kg/ha, obtida a partir do teor de lisina do grão e da produtividade de grãos da parcela em kg/ha;
- k) teor de óleo do grão (TOG): determinado segundo o método descrito por Silva (1981), com os resultados expressos em porcentagem;
- l) produção de óleo (PRO): produção de óleo em kg/ha, obtida a partir do teor de óleo do grão e da produtividade de grãos da parcela em kg/ha.

## 2.4 Análises estatísticas

A análise dos dados foi realizada empregando-se o programa Genes (Cruz, 1997). Utilizou-se o seguinte modelo estatístico para a ANAVA individual, considerando-se o efeito de genótipo como fixo:

$$Y_{ij} = u + t_i + b_j + e_{ij}$$

Em que:

$Y_{ij}$ : observação referente ao tratamento 'i' na repetição 'j';

u: média geral;

$t_i$ : efeito do genótipo 'i', sendo  $i = 1, \dots, n$ ;

$b_j$ : efeito do bloco 'j', sendo  $j = 1, \dots, r$ ;

$e_{ij}$ : erro experimental,  $e \sim N(0, \sigma^2)$ .

A comparação entre as médias para todas as características estudadas foi realizada a partir do teste de Skott & Knott (1974), a 5% de probabilidade.

## 2.5 Similaridade genética entre os híbridos avaliados

Adicionalmente à avaliação agrônômica e de qualidade nutricional realizada no ensaio, os diferentes híbridos também foram analisados por marcadores SSRs, como uma forma de se avaliar o relacionamento genético entre os mesmos.

Os procedimentos para extração do DNA e reações de SSR foram os descritos no Capítulo 3, seção 2.5.1. A estimativa da similaridade genética ( $sg_{ig}$ ) entre cada par de híbridos foi efetuada pelo coeficiente de similaridade de Dice (Dice, 1945) e a representação simplificada destas similaridades realizada a partir de um dendrograma obtido pelo método UPGMA, utilizando-se o programa NTSYSpc, versão 2.02i.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve significância para a fonte de variação tratamentos, a 5% pelo teste F, para todas as características agronômicas avaliadas, exceto a população de plantas (Tabela 2). A significância verificada para estas características reflete as diferenças no comportamento dos híbridos, enquanto que a mesma população de plantas apresentada por todos os híbridos avaliados permite que a avaliação de características importantes e correlacionadas com a densidade populacional, como a produtividade de grãos, possam ser analisadas sem a influência da mesma.

As estimativas dos coeficientes de variação experimental variaram de 1,34% a 42,62% para as características florescimento feminino e porcentagem de acamamento + quebramento, respectivamente. De maneira geral, o coeficiente de variação para todas as características agronômicas avaliadas foi de baixo a médio, a exceção das características porcentagem de acamamento + quebramento e espigas doentes, refletindo a inexistência de maiores problemas na condução do experimento, e boa precisão nas avaliações realizadas (Scapim et al., 1995).

Em experimentos com a cultura do milho, os coeficientes de variação encontrados para as características porcentagem de acamamento + quebramento e porcentagem de espigas doentes são geralmente elevados, evidenciando as dificuldades para uma correta estimação destes parâmetros, principalmente por serem características altamente influenciadas por outros fatores como ataque de insetos e patógenos, os quais apresentam uma incidência não necessariamente uniforme dentro da área experimental.

TABELA 2. Resumo da análise de variância, estimativas de média geral e coeficiente de variação (CV) relativos às características agronômicas avaliadas – Ensaio de avaliação de híbridos experimentais QPM. Sete Lagoas, MG 2001/2002.

Fonte de variação	GL	QM						
		FL <sup>1</sup>	AP <sup>2</sup>	AE <sup>3</sup>	AQ <sup>4</sup>	ED <sup>5</sup>	DC <sup>6</sup>	CE <sup>7</sup>
Blocos	5	0,70	188,33	55,83	5,16	6,45	0,021	1,53
Tratamentos	7	11,41**	913,09**	628,27**	68,22*	60,04**	0,021*	7,14**
Erro	35	0,73	104,52	114,88	7,63	3,82	0,008	1,34
<b>Média geral</b>		<b>63,87</b>	<b>212,08</b>	<b>121,45</b>	<b>6,48</b>	<b>4,62</b>	<b>1,56</b>	<b>16,40</b>
<b>CV (%)</b>		<b>1,34</b>	<b>4,82</b>	<b>8,82</b>	<b>42,62</b>	<b>42,30</b>	<b>6,04</b>	<b>7,06</b>

TABELA 2. Cont.

Fonte de variação	GL	QM					
		NF <sup>8</sup>	DE <sup>9</sup>	DS <sup>10</sup>	CG <sup>11</sup>	POP <sup>12</sup>	PROD <sup>13</sup>
Blocos	5	0,92	0,03	0,03	0,0030	8174421,38	164006,67
Tratamentos	7	16,08**	0,16**	0,24**	0,0224**	5735102,57 <sup>NS</sup>	12199891,78**
Erro	35	1,09	0,02	0,01	0,0035	5308213,27	225766,48
<b>Média geral</b>		<b>14,95</b>	<b>4,53</b>	<b>2,64</b>	<b>0,95</b>	<b>54600,91</b>	<b>6282,64</b>
<b>CV (%)</b>		<b>6,98</b>	<b>3,55</b>	<b>5,19</b>	<b>6,32</b>	<b>4,21</b>	<b>7,56</b>

<sup>1/</sup> FL= florescimento feminino (dias); <sup>2/</sup> AP= altura da planta (cm); <sup>3/</sup> AE= altura da espiga (cm); <sup>4/</sup> AQ= acamamento + quebramento (%); <sup>5/</sup> ED= espigas doentes (%); <sup>6/</sup> DC= diâmetro do colmo (cm); <sup>7/</sup> CE = comprimento da espiga (cm); <sup>8/</sup> NF= número de fileiras de grãos; <sup>9/</sup> DE= diâmetro da espiga (cm); <sup>10/</sup> DS= diâmetro do sabugo (cm); <sup>11/</sup> CG = comprimento de grãos (cm); <sup>12/</sup> POP= população de plantas por ha; <sup>13/</sup> PROD= produtividade de grãos em kg/ha.

\* e \*\* = significativo a 5% e 1% de probabilidade pelo teste de F, respectivamente; NS= não significativo pelo teste de F.

A média geral da produtividade de grãos foi de 6.282 kg/ha, significativamente superior à média do estado de Minas Gerais, que foi de 4.020 kg/ha na safra 2001/2002 (CONAB, 2003). Isto demonstra um satisfatório potencial produtivo destes híbridos quando cultivados com bom nível de tecnologia. De acordo com o teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, o híbrido simples BRS1001 foi significativamente superior a todos os outros híbridos avaliados, com uma produtividade média de 8.534 kg/ha (Tabela 3).

A comparação entre os híbridos QPM convertidos (HS200Q e BR3123Q) em relação às suas versões normais demonstra que as versões normais e QPM se comportaram de modo semelhante para produtividade de grãos. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi também observada em relação aos híbridos BR3123 e BR3123Q, de acordo com os resultados do ensaio preliminar de milho QPM em 2001/2002, na região central do Brasil, conduzido pela Embrapa Milho e Sorgo em 12 locais.

Paschoalick (1998) relatou que os genótipos QPM foram em média 10% menos produtivos que os genótipos normais. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que, quando comparadas versões normais e QPM de um mesmo híbrido, os genótipos QPM podem ser igualmente competitivos com relação à produtividade bruta de grãos, desconsiderando-se outros fatores.

TABELA 3. Valores médios e teste de Scott-Knott para as características agronômicas dos diferentes híbridos avaliados no ensaio de avaliação de híbridos experimentais QPM. Sete Lagoas, MG. 2001/2002.

Híbridos	Características avaliadas*						
	FL <sup>1</sup>	AP <sup>2</sup>	AE <sup>3</sup>	AQ <sup>4</sup>	ED <sup>5</sup>	DC <sup>6</sup>	CE <sup>7</sup>
HS200	66 a	199 b	113 b	1,86 c	0,00 c	1,63 a	14,6 b
HS200Q	66 a	196 b	107 b	6,01 b	5,69 b	1,59 a	15,6 b
BR3123	63 c	201 b	120 b	5,98 b	7,17 a	1,51 b	16,2 b
BR3123Q	63 c	208 b	129 a	12,12 a	8,91 a	1,65 a	15,9 b
97HT129Q	63 c	228 a	119 b	6,92 b	5,69 b	1,50 b	17,7 a
CMS00Q-03	63 c	223 a	132 a	6,71 b	4,99 b	1,50 b	16,3 b
BRS3060	65 b	223 a	116 b	9,68 a	0,00 c	1,61 a	16,7 a
BRS1001	63 c	218 a	137 a	2,55 c	4,54 b	1,56 b	18,0 a

TABELA 3. Cont.

Híbridos	Características avaliadas*					
	NF <sup>8</sup>	DE <sup>9</sup>	DS <sup>10</sup>	CG <sup>11</sup>	POP <sup>12</sup>	PROD <sup>13</sup>
HS200	15 c	4,3 c	2,3 c	0,99 b	56.250 a	4.764 e
HS200Q	15 c	4,4 c	2,6 b	0,90 c	55.324 a	4.555 e
BR3123	16 b	4,4 c	2,7 b	0,89 c	53.009 a	5.355 d
BR3123Q	18 a	4,8 a	2,9 a	0,95 c	54.861 a	5.614 d
97HT129Q	16 b	4,7 b	2,9 a	0,90 c	54.398 a	6.702 c
CMS00Q-03	14 c	4,6 b	2,8 a	0,92 c	54.630 a	7.233 b
BRS3060	13 d	4,6 b	2,5 c	1,07 a	53.703 a	7.501 b
BRS1001	13 d	4,6 b	2,6 b	0,98 b	53.009 a	8.534 a

<sup>1/</sup> FL= florescimento feminino (dias); <sup>2/</sup> AP= altura da planta (cm); <sup>3/</sup> AE= altura da espiga (cm); <sup>4/</sup> AQ= acamamento + quebramento (%); <sup>5/</sup> ED= espigas doentes (%); <sup>6/</sup> DC= diâmetro do colmo (cm); <sup>7/</sup> CE = comprimento da espiga (cm); <sup>8/</sup> NF= número de fileiras de grãos; <sup>9/</sup> DE= diâmetro da espiga (cm); <sup>10/</sup> DS= diâmetro do sabugo (cm); <sup>11/</sup> CG = comprimento de grãos (cm); <sup>12/</sup> POP= população de plantas por ha; <sup>13/</sup> PROD= produtividade de grãos em kg/ha.

\* Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5%, pelo teste de Skott-Knott.

Considerando-se o conjunto de todas as características agronômicas avaliadas, a comparação entre os híbridos HS200 e HS200Q demonstrou que os mesmos foram estatisticamente semelhantes com relação ao florescimento, altura da planta, altura da espiga, diâmetro do colmo, comprimento da espiga, número de fileiras de grãos, diâmetro da espiga e produtividade de grãos. Estes se mostraram diferentes com relação às características porcentagem de acamamento + quebramento e porcentagem de espigas doentes, no qual a versão QPM apresentou um desempenho inferior, e também com relação ao diâmetro do sabugo e comprimento dos grãos, com a versão QPM apresentando um sabugo mais grosso e grãos mais curtos em relação à sua versão normal.

A comparação entre os híbridos BR3123 e BR3123Q demonstrou que os mesmos foram estatisticamente semelhantes com relação ao florescimento, altura da planta, espigas doentes, comprimento da espiga, comprimento do grão e produtividade de grãos. Estes se mostraram diferentes com relação às características altura da espiga, porcentagem de acamamento + quebramento e diâmetro do sabugo, em que a versão normal apresentou comportamento superior e também com relação às características diâmetro do colmo, número de fileiras de grãos e diâmetro da espiga, tendo a versão QPM apresentado comportamento superior.

Na análise das diferenças observadas entre a versão normal e QPM dos híbridos HS200 e BR3123, vale ressaltar que as versões QPM avaliadas neste ensaio foram obtidas a partir da geração  $MRC_3F_1$ , cuja estimativa teórica de porcentagem de recuperação do genótipo da linhagem recorrente é de 84,38%. Dessa forma, algumas diferenças observadas nas características agronômicas encontram-se dentro do esperado. Apesar disso, algumas das dificuldades freqüentemente encontradas no melhoramento do milho QPM, como uma maior porcentagem de acamamento + quebramento, sabugos mais grossos e grãos mais curtos (Guimarães et al., 1994b; Paschoalick, 1998; Pacheco et al., 1999),

também ficaram evidenciadas neste ensaio e aparentemente não foram solucionadas até a presente fase com o trabalho de conversão, sugerindo algum efeito pleiotrópico ou de alta ligação do alelo  $o_2$  com estas características negativas. Ensaio posteriores de comparação de versões de híbridos normais e QPM com as linhagens QPM totalmente convertidas poderão evidenciar estas associações de uma maneira mais objetiva.

Para a cadeia produtiva do milho, características como alto teor de grãos ardidos e alta porcentagem de acamamento + quebramento são altamente indesejáveis, haja vista reduzirem a produtividade bruta e a qualidade dos grãos. Dessa forma, na análise da produtividade de grãos em ensaios de avaliação de híbridos torna-se importante levar em consideração as eventuais perdas ocasionadas pelas plantas acamadas e quebradas e por grãos ardidos. Neste ensaio, embora em termos de produtividade de grãos não existam diferenças estatisticamente significativas entre as versões normais e QPM dos híbridos avaliados, a maior porcentagem de acamamento + quebramento dos híbridos QPM os tornam relativamente menos competitivos em relação aos híbridos normais.

Em um programa de melhoramento de milho QPM, além das características agrônômicas tradicionalmente avaliadas em milho normal, atenção especial também deve ser dispensada às características de qualidade do grão. Observa-se na Tabela 4 que houve diferenças significativas, pelo teste F a 5% de probabilidade, para todas as características relacionadas à qualidade do grão avaliadas no ensaio, exceto teor de óleo no grão e produção de óleo.

TABELA 4. Resumo da análise de variância, estimativas de média geral e coeficiente de variação (CV) relativos às características de qualidade do grão – Ensaio de avaliação de híbridos experimentais QPM. Sete Lagoas, MG. 2001/2002.

Fonte de variação	GL	QM					
		DEN <sup>1</sup>	PCS <sup>2</sup>	TPG <sup>3</sup>	TRIG <sup>4</sup>	TRIP <sup>5</sup>	LISG <sup>6</sup>
Blocos	1	0,0003	2,65	1,107	0,0004	0,0042	0,0053
Tratamentos	7	0,0066**	84,06**	1,115*	0,0013**	0,1655**	0,0212**
Erro	7	0,0001	6,21	0,262	0,0001	0,0110	0,0016
<b>Média geral</b>		<b>1,23</b>	<b>24,20</b>	<b>9,20</b>	<b>0,09</b>	<b>1,01</b>	<b>0,41</b>
<b>CV (%)</b>		<b>0,81</b>	<b>10,30</b>	<b>5,56</b>	<b>10,28</b>	<b>10,49</b>	<b>9,82</b>

TABELA 4. Cont.

Fonte de variação	GL	QM					
		LISP <sup>7</sup>	PRP <sup>8</sup>	PRT <sup>9</sup>	PRL <sup>10</sup>	TOG <sup>11</sup>	PRO <sup>12</sup>
Blocos	1	0,0689	3228,22	0,7832	8,62	0,0976	99,50
Tratamentos	7	2,7363**	61232,98**	7,4443**	126,16**	0,5928 <sup>NS</sup>	6222,16 <sup>NS</sup>
Erro	7	0,1808	3054,41	0,3406	5,14	0,3547	1357,92
<b>Média geral</b>		<b>4,45</b>	<b>567,83</b>	<b>5,49</b>	<b>24,69</b>	<b>3,61</b>	<b>219,94</b>
<b>CV (%)</b>		<b>9,56</b>	<b>9,73</b>	<b>10,62</b>	<b>9,18</b>	<b>16,50</b>	<b>16,75</b>

<sup>1/</sup> DEN= densidade dos grãos (g/cm<sup>3</sup>); <sup>2/</sup> PCS= peso de 100 sementes (g); <sup>3/</sup> TPG= teor de proteína no grão (%); <sup>4/</sup> TRIG= teor de triptofano no grão (%); <sup>5/</sup> TRIP= teor de triptofano na proteína (%); <sup>6/</sup> LISG= teor de Lisina no grão (%); <sup>7/</sup> LISP = teor de lisina na proteína (%); <sup>8/</sup> PRP= produção de proteína em kg/ha; <sup>9/</sup> PRT= produção de triptofano em kg/ha; <sup>10/</sup> PRL= produção de lisina em kg/ha; <sup>11/</sup> TOG= teor de óleo no grão (%); <sup>12/</sup> PRO= produção de óleo em kg/ha.

\* e \*\* = significativo a 5% e 1% de probabilidade pelo teste de F, respectivamente; NS = não significativo pelo teste de F.

A avaliação da densidade dos grãos demonstrou que os híbridos QPM convertidos apresentaram uma densidade inferior às suas versões normais. Os outros híbridos QPM avaliados no ensaio apresentaram densidade de grãos semelhante aos híbridos normais, a exceção do híbrido BRS1001, o qual apresentou uma densidade superior a todos os outros híbridos avaliados no ensaio (Tabela 5). A baixa densidade geralmente está associada a um baixo rendimento de grãos, sendo ainda um indicador da opacidade do endosperma (falta de modificação). Guimarães et al. (1994a) avaliaram as diferenças nas densidades dos grãos de 22 híbridos QPM, quando classificados de acordo com a modificação do endosperma. Os autores verificaram que os grãos mais opacos foram 4% menos densos e 11% menos pesados em relação aos mais vítreos. Neste ensaio, embora a modificação do endosperma não tenha sido avaliada diretamente por uma escala de notas, a diferença na densidade entre as versões QPM e normais dos híbridos convertidos é um forte indicativo de que o processo de conversão utilizado não conseguiu manter o grau de modificação do endosperma nas versões convertidas. Esta qualidade foi inferior, inclusive, a outros híbridos QPM utilizados como testemunhas no ensaio e desenvolvidos por outros métodos de melhoramento. Considerando que uma das vantagens proporcionadas pela metodologia de conversão proposta por Guimarães et al. (2000) é permitir a seleção para modificação do endosperma em todas as gerações MRC, estes resultados indicam que este objetivo não foi atingido, pelo menos até o grau de conversão avaliado.

Os teores de triptofano no grão e na proteína, e de lisina no grão e na proteína, foram superiores para todos os híbridos QPM em relação aos híbridos normais (Tabela 5). Estes teores são comparáveis aos resultados de outras avaliações de híbridos normais e QPM (Pixley & Bjarnason, 1994; Paschoalick, 1998; Zarkadas et al., 2000; Pixley & Bjarnason, 2002).

TABELA 5. Valores médios e teste de Scott-Knott para as características de qualidade dos grãos dos diferentes híbridos avaliados no ensaio de avaliação de híbridos experimentais QPM. Sete Lagoas, MG. 2001/2002.

Híbridos	Características avaliadas*					
	DEN <sup>1</sup>	PCS <sup>2</sup>	TPG <sup>3</sup>	TRIG <sup>4</sup>	TRIP <sup>5</sup>	LISG <sup>6</sup>
HS200	1,25 b	17,6 b	9,48 a	0,07 b	0,73 b	0,31 b
HS200Q	1,13 d	19,1 b	9,74 a	0,11 a	1,17 a	0,50 a
BR3123	1,26 b	20,3 b	8,76 a	0,07 b	0,76 b	0,30 b
BR3123Q	1,15 c	21,9 b	9,01 a	0,11 a	1,25 a	0,50 a
97HT129Q	1,26 b	29,7 a	8,97 a	0,11 a	1,17 a	0,46 a
CMS00Q-03	1,26 b	33,6 a	8,61 a	0,13 a	1,45 a	0,54 a
BRS3060	1,26 b	32,1 a	8,36 a	0,06 b	0,77 b	0,29 b
BRS1001	1,29 a	19,4 b	10,68 a	0,08 b	0,74 b	0,36 b

TABELA 5. Cont.

Híbridos	Características avaliadas*					
	LISP <sup>7</sup>	PRP <sup>8</sup>	PRT <sup>9</sup>	PRL <sup>10</sup>	TOG <sup>11</sup>	PRO <sup>12</sup>
HS200	3,32 b	423,51 c	2,90 d	13,81 c	2,88 a	128,60 a
HS200Q	5,12 a	414,93 c	4,69 c	21,33 b	4,33 a	185,69 a
BR3123	3,45 b	459,80 c	3,42 d	15,76 c	3,86 a	202,65 a
BR3123Q	5,44 a	481,78 c	5,84 b	26,27 a	4,12 a	221,27 a
97HT129Q	5,12 a	581,80 b	6,81 b	29,46 a	3,34 a	215,18 a
CMS00Q-03	6,28 a	587,81 b	8,53 a	36,84 a	3,88 a	264,87 a
BRS3060	3,47 b	645,15 b	4,67 c	22,14 b	2,86 a	221,72 a
BRS1001	3,39 b	947,91 a	7,10 b	31,95 a	3,60 a	319,52 a

<sup>1/</sup> DEN= densidade dos grãos (g/cm<sup>3</sup>); <sup>2/</sup> PCS= peso de 100 sementes (g); <sup>3/</sup> TPG= teor de proteína no grão (%); <sup>4/</sup> TRIG= teor de triptofano no grão (%); <sup>5/</sup> TRIP= teor de triptofano na proteína (%); <sup>6/</sup> LISG= teor de Lisina no grão (%); <sup>7/</sup> LISP = teor de lisina na proteína (%); <sup>8/</sup> PRP= produção de proteína em kg/ha; <sup>9/</sup> PRT= produção de triptofano em kg/ha; <sup>10/</sup> PRL= produção de lisina em kg/ha; <sup>11/</sup> TOG= teor de óleo no grão (%); <sup>12/</sup> PRO= produção de óleo em kg/ha.

\* Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Skott-Knott.

Em média, os híbridos QPM avaliados foram 68% e 62% superiores aos híbridos normais com relação aos teores de triptofano e lisina na proteína, respectivamente. Estes resultados refletem a superioridade dos híbridos QPM para estas características e indicam, ainda, que o processo de conversão das linhagens manteve os teores elevados de lisina e triptofano das linhagens QPM doadoras, embora nenhuma técnica laboratorial para análise destes teores tenha sido empregada durante o processo seletivo.

A produção de triptofano e lisina por área manteve a tendência de superioridade dos híbridos QPM convertidos em relação às versões normais destes mesmos híbridos. Por ser uma característica influenciada pela produtividade de grãos, entretanto, observa-se que o híbrido normal BRS1001 apresentou uma produção de lisina por área superior ao híbrido QPM HS200Q e semelhante aos híbridos BR3123Q, 97HT129Q e CMS00Q. Estes resultados reforçam os argumentos de que o valor agregado de melhor qualidade nutricional dos híbridos QPM somente terá um significado econômico para a cadeia produtiva do milho caso este seja também competitivo com relação a outras características importantes, principalmente produtividade de grãos, quando comparados aos híbridos normais disponíveis no mercado.

Ainda, na Tabela 5, observa-se que os híbridos avaliados no ensaio apresentaram comportamento semelhante com relação ao teor de proteína e óleo dos grãos e também produção de óleo por área. Paschoalick (1998) relatou uma superioridade dos genótipos QPM com relação ao teor de óleo nos grãos, a qual não foi confirmada neste ensaio.

Além das características agrônômicas e de qualidade do grão, os híbridos estudados foram ainda analisados com marcadores SSRs, como uma forma de se investigar o relacionamento genético entre os mesmos. Na construção da matriz de similaridades genéticas apresentada na Tabela 6 foram utilizados 73 alelos obtidos a partir de 31 pares de *primers* SSRs, os quais apresentaram

polimorfismo em pelo menos um dos híbridos, representando uma média de 2,4 alelos por loco. A representação simplificada destas similaridades é apresentada na Figura 1.

As maiores similaridades genéticas obtidas corresponderam às comparações entre as versões normal e QPM dos híbridos BR3123 e HS200, com valores de 0,91 e 0,90 respectivamente. Em termos moleculares, estes resultados evidenciam que, embora altamente relacionados, algumas diferenças ainda são encontradas entre as versões normais e QPM dos híbridos convertidos, conforme também demonstraram os resultados agronômicos e nutricionais. O grau de parentesco entre os híbridos HS200 e BR3123, o qual é formado pelo cruzamento do híbrido HS200 com uma terceira linhagem, também ficou evidenciado nesta avaliação molecular. Observa-se ainda que o híbrido normal BRS1001 é geneticamente o mais distante em relação aos outros híbridos avaliados no ensaio, representando um germoplasma diferente dos demais híbridos, o que justifica, de uma certa forma, o seu desempenho superior com relação à produtividade de grãos e outras características agronômicas e nutricionais.

TABELA 6. Matriz de similaridades genéticas obtidas a partir do coeficiente de similaridade de Dice, entre os híbridos normais e QPM avaliados no ensaio de avaliação de híbridos experimentais QPM.

	1	2	3	4	5	6	7	8
1	1,00							
2	0,90	1,00						
3	0,74	0,69	1,00					
4	0,68	0,69	0,91	1,00				
5	0,37	0,43	0,41	0,42	1,00			
6	0,53	0,54	0,48	0,46	0,62	1,00		
7	0,62	0,63	0,60	0,59	0,48	0,52	1,00	
8	0,44	0,36	0,39	0,34	0,49	0,59	0,40	1,00

1 = HS200; 2 = HS200Q; 3 = BR3123; 4 = BR3123Q; 5 = 97HT129Q; 6 = CMS00Q-03; 7 = BRS3060; 8 = BRS1001.

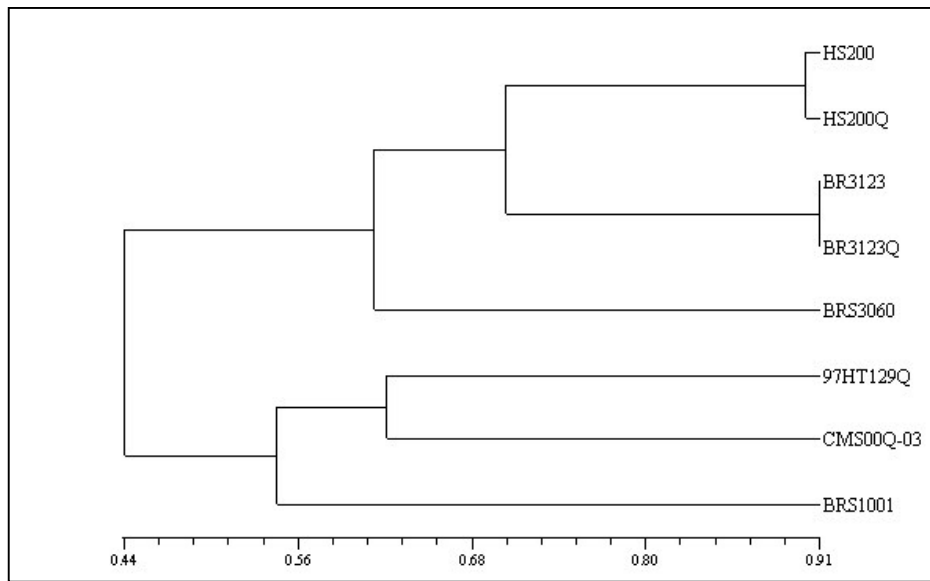


FIGURA 1. Dendrograma representativo das similaridades genéticas entre os diferentes híbridos avaliados no ensaio de avaliação de híbridos experimentais QPM.

Na definição de uma estratégia eficiente de conversão de linhagens, o tempo que será gasto para obtenção das linhagens convertidas é um fator decisivo para o sucesso do programa. Isso porque se o processo não for rápido e dinâmico, o próprio híbrido convencional que está sendo convertido perde competitividade e importância, em função da rapidez com que novos híbridos de milho superiores são disponibilizados ao mercado por programas de melhoramento públicos e privados. No ensaio, observou-se que, embora as versões normais e QPM dos híbridos HS200 e BR3123 tenham apresentado resultados semelhantes em termos de produtividade de grãos, o que representa um aspecto positivo do programa de conversão, estes foram os piores híbridos do ensaio, considerando-se esta característica. Isto demonstra claramente que os próprios híbridos convencionais perderam competitividade quando comparados a outros híbridos mais recentes, tanto normais quanto QPM, utilizados como testemunhas do experimento.

Considerando-se estes aspectos e por ser o método de retrocruzamento um processo de melhoramento conservador, é importante que o processo de conversão seja realizado de forma rápida e eficiente. Adicionalmente, a utilização das gerações de retrocruzamento com diferentes proporções de recuperação do genótipo do genitor recorrente como fontes de germoplasma para extração de novas linhagens também se constitui em uma estratégia de melhoramento promissora. Assim, é possível atender a uma demanda do programa por geração de germoplasma com boa adaptação e qualidades agronômicas de uma forma relativamente rápida, por meio do processo de reciclagem das linhagens, enquanto a conversão propriamente dita segue como uma linha adicional do sistema.

Esta combinação de conversão e reciclagem de linhagens complementa os objetivos do programa de melhoramento de milho QPM e tem um grande potencial na geração de germoplasma e híbridos superiores.

## 4 CONCLUSÕES

Os híbridos QPM obtidos pela conversão parcial de linhagens normais apresentaram uma melhor qualidade protéica, e comportamento semelhante para a maioria das características agrônômicas avaliadas, incluindo a produtividade de grãos, quando comparados aos híbridos originais. Entretanto, alguns dos problemas geralmente associados aos híbridos QPM, como uma maior porcentagem de acamamento + quebraamento, sabugos mais grossos e grãos mais curtos, mantiveram-se até esta fase do processo.

Tanto as versões normais como os híbridos QPM convertidos apresentaram os piores desempenhos em termos de produtividade de grãos, quando comparados com os híbridos utilizados como testemunhas, indicando uma perda de competitividade em relação a estes híbridos mais recentes.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists.** 11. ed. Washington, 1970. 1015 p.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Intenção de plantio da safra 2002/03. Brasília, DF. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/politica-agricola/safra/avalia.html>>. Acesso em: 27 jan. 2003.

CRUZ, C. D. **Programa Genes:** Aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 1997. 442 p.

DICE, L. Measures of the amount of ecological association between species. **Ecology**, Washington, v. 26, p. 297-302, 1945.

GUIMARÃES, P. E. O.; GAMA, E. E. G.; PACHECO, C. A. P.; SANTOS, M. X. Obtenção de linhagens QPM vítreas e estáveis. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo. **Relatório técnico anual CNPMS 1992-1993**. Sete Lagoas, 1994a. p. 220.

GUIMARÃES, P. E. O.; LOPES, M. A.; GAMA, E. E. G.; SANTOS, M. X.; PARENTONI, S. N.; PAES, M. C.; VIEIRA JÚNIOR, P. A.; SILVA, A. E.; PAIVA, E.; CORREIA, L. A.; PACHECO, C. A. P. Quality protein maize improvement at the national maize and sorghum research center CNPMS/EMBRAPA/BRAZIL. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON QUALITY PROTEIN MAIZE, 1994, Sete Lagoas. **Proceedings...** Sete Lagoas, 1994b. p. 185-204.

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

HERNANDEZ, H. H.; BATES, L. S. **A modified method for rapid tryptophan analysis of maize**. CYMMIT: México, 1969. 7 p. (Research Bulletin, 13).

PACHECO, C. A. P.; GUIMARÃES, P. E. O.; PARENTONI, S. N.; LOPES, M. A.; SANTOS, M. X. dos; GAMA, E. E. G.; VASCONCELOS, M. J. V.; CORREIA, L. A.; MEIRELLES, W. F. O desenvolvimento de milho de alta qualidade nutricional no Brasil. In: REUNIÓN LATINOAMERICANA DEL MAIZ, 28., 1999, Sete Lagoas. **Memórias....** Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS; México: CIMMYT, 1999. p. 13-26.

PASCHOALICK, H. N. S. **Efeito da época de aplicação do nitrogênio na produção, teor de óleo e na qualidade protéica de cultivares de milho (*Zea mays L.*) normal e QPM**. 1998. 107 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – UNESP, Jaboticabal.

PIXLEY, K. V.; BJARNASON, M. S. Pollen-parent effects on protein quality and endosperm modification of quality protein maize. **Crop Science**, Madison, v. 34, n. 2, p. 404-409, Mar./Apr. 1994.

PIXLEY, K. V.; BJARNASON, M. S. Stability of grain yield, endosperm modification and protein quality of hybrid and open-pollinated quality protein maize (QPM) cultivars. **Crop Science**, Madison, v. 42, n. 6, p. 1882-1890, Nov./Dec. 2002.

POMMER, C. V. Efeito da posição dos grãos na espiga sobre o teor de proteína e lisina no milho. **Bragantia**, Campinas, v. 38, p. 7-9, 1979.

SCAPIM, C. A.; CARVALHO, C. G.; CRUZ, C. D. Uma proposta de classificação dos coeficientes de variação para a cultura do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 5, p. 683-686, maio 1995.

SILVA, D. J. da. **Análise de alimentos** – métodos químicos e biológicos. Viçosa: UFV, 1981. 166 p.

SKOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, p. 507-512, 1974.

VASAL, S. K.; VILLEGAS, E.; BJARNASON, M.; GELAW, B.; GOETZ, P. Genetic modifiers and breeding strategies in developing hard endosperm opaque-2 materials. In: POLLMER, W. G.; PHILLIPS, R. (Ed.). **Improvement of quality traits of maize for grain and silage use**. The Hague: Nijhoff, 1980. p. 37-71.

VILLEGAS, E.; ORTEGA, E.; BAUER, R. **Chemical methods used at CIMMYT for determination of protein quality in cereal grains**. México: CIMMYT, 1984. 641 p.

WESSEL-BEAVER, L.; BECK, R.H.; LAMBERT, R. J. Rapid method for measuring kernel density. **Agronomy Journal**, Madison, v. 76, p. 307-309, 1984.

ZARKADAS, C. G.; HAMILTON, R. I.; YU, R. Z.; CHOI, V. K.; KHANIZADEH, S.; ROSE, N. G. W.; PATTISON, P. L. Assessment of the protein quality of 15 northern adapted cultivars of quality protein maize using amino acid analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, p. 5351-5361, 2000.