

## Obtenção de Genótipos de Milho Tropicais Indutores de Haploidia

Marcelo Rabel<sup>1</sup>, Claudia T. Guimarães<sup>1</sup>, Sidney N. Parentoni<sup>1</sup>, Ubiraci G. P. Lana<sup>1</sup>, Paulo C. Magalhães<sup>1</sup> e Edilson Paiva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG.  
marcelorabel@gmail.com, claudia@cnpms.embrapa.br, sidney@cnpms.embrapa.br,  
ubiraci@cnpms.embrapa.br, edilson@cnpms.embrapa.br

Palavras-chave: *Zea mays* L., linhagem indutora de haploidia, haplóides androgênicos, gametófito indeterminado (*ig*), marcadores moleculares SSR.

Uma alternativa para obtenção de linhagens endogâmicas na cultura do milho é o uso de haplóides duplicados (duplo-haplóides). Essa tecnologia permite a obtenção de linhagens de três a quatro vezes mais rápido em relação aos métodos tradicionais. Além do ganho de tempo, outra vantagem significativa é a utilização de menor área experimental nos campos de melhoramento. Kermicle (1969) relatou a ocorrência de uma mutação espontânea denominada gametófito indeterminado (*ig*) na linhagem Wisconsin-23 (W23). Os haplóides gerados por influência deste alelo *ig* são de origem paterna, ou seja, são androgênicos. No processo de fecundação ocorre uma degeneração do núcleo do óvulo e o núcleo espermático inicia o processo de divisão celular no citoplasma da célula ovo, formando um embrião haplóide. A linhagem W23 também carrega o marcador fenotípico dominante, sistema R-navajo (*RI-nj*), descrito por Nanda & Chase (1966). Este gene promove a pigmentação com antocianina no endosperma e no embrião das sementes diplóides, enquanto as haplóides apresentam pigmentação somente no endosperma, ficando com o embrião branco. Entretanto, esse marcador é fortemente influenciado pelo ambiente, fazendo com que o uso de marcadores moleculares microssatélites (SSR) seja uma valiosa ferramenta para a exata identificação de haplóides (Belicuas et al., 2007). Estes autores relataram que a linhagem W23 induz haplóides androgênicos nas condições tropicais de cultivo, sendo contudo susceptível ao ataque de doenças, sensível ao calor e ao fotoperíodo. A solução para estes problemas seria a transferência do gene indutor *ig* e do gene marcador *RI-nj* para um genótipo adaptado às condições tropicais de cultivo. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de transferir o gene indutor de haploidia *ig* e o gene marcador *RI-nj* da linhagem temperada W23 para genótipos de milho adaptados as condições tropicais.

A pesquisa foi conduzida nos laboratórios do Núcleo de Biologia Aplicada (NBA) e na área de campos experimentais da Embrapa Milho e Sorgo. Foram utilizadas seis famílias extraídas do cruzamento da linhagem W23 com o híbrido simples BRS 1010 desenvolvido pelo programa de melhoramento de milho da Embrapa Milho e Sorgo. Essas famílias foram obtidas de uma espiga na qual foram identificados indivíduos haplóides, confirmados por Belicuas et al. (2007). As plantas F<sub>1</sub> provenientes das sementes dessa espiga foram intercruzadas. Desse intercruzamento foram selecionadas espigas com base na boa expressão de antocianina do marcador fenotípico R-navajo no endosperma e no embrião das sementes. As sementes dessas espigas foram plantadas no campo e autofecundadas visando à obtenção das famílias na geração F<sub>3</sub>.

Foram plantadas 300 sementes de cada família, com espaçamento de 25 cm entre plantas e 90 cm entre linhas, visando estimular a prolificidade das mesmas. As plantas prolíficas foram autofecundadas e cruzadas simultaneamente. O cruzamento foi realizado na primeira espiga com a linhagem elite L512388 e a autofecundação na segunda espiga. Ao atingir a maturidade fisiológica, as espigas foram colhidas, secas e debulhadas. Em seguida, as sementes dos cruzamentos foram selecionadas conforme o marcador fenotípico indicador de haploidia R-navajo, ou seja, marcação roxa apenas no endosperma, indicando a ocorrência de possíveis sementes haplóides. Nas plantas em cujas espigas cruzadas foram identificados indivíduos haplóides, a espiga autofecundada correspondente foi considerada como possível fonte tropical indutora de haploidia.

As sementes das espigas cruzadas selecionadas como haplóides pelo marcador fenotípico foram plantadas no campo, com espaçamento de 20 cm entre plantas e 80 cm entre linhas. As plantas menos vigorosas e com porte reduzido foram submetidas a análise molecular com marcadores SSR para confirmação da haploidia. A extração do DNA genômico foi realizada utilizando-se o protocolo descrito por Saghai-Marooof et al. (1984), com modificações.

Foram testados 20 marcadores SSR entre os genitores das famílias e a linhagem utilizada para o cruzamento, com o objetivo de identificar polimorfismos entre os genitores. As reações de amplificação foram realizadas no termociclador modelo 9600 (Applied Biosystems®), num volume final de 10 µL, contendo 30 ng de DNA, solução tampão (10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 50 mM KCl, 0,01% gelatina; 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>; 125 mM de cada um dos dNTPs; 0,6 mM de cada um dos iniciadores e 1 U da enzima Taq DNA Polimerase. Os fragmentos amplificados foram separados em gel de poliacrilamida 10% e corados com nitrato de prata. Os géis foram avaliados considerando o grau de polimorfismo dos alelos amplificados, a qualidade da amplificação e, no caso de heterozigotos, a não coincidência de bandas entre os parentais.

As seis famílias avaliadas mostraram-se superiores à linhagem temperada W23 quanto ao seu potencial agrônomo, apresentando maior resistência ao ataque de pragas e doenças, além de espigas, com grãos maiores e em maior número. Foram selecionadas 64 espigas que apresentavam sementes bem desenvolvidas e boa expressão do marcador fenotípico R-navajo.

A porcentagem de possíveis haplóides variou de 1,59 a 52,69% (Tabela 1). A partir das seis famílias foram obtidas 1905 sementes que foram classificadas como possíveis haplóides e plantadas no campo.

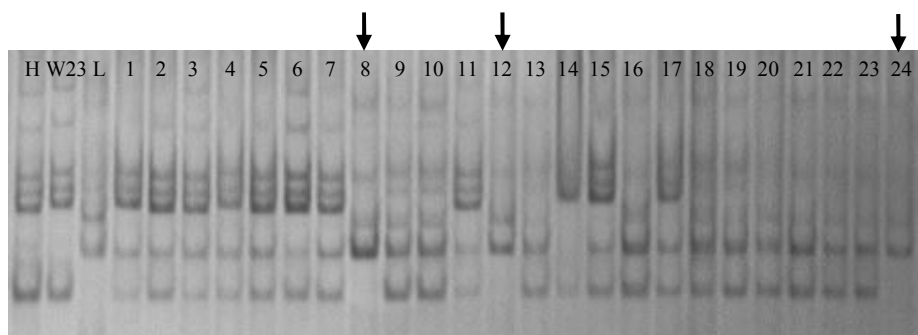
Do total de 1630 plantas obtidas no campo, originadas de sementes identificadas como possíveis haplóides, foram selecionadas 74 plantas com tamanho reduzido para serem submetidas à análise molecular, utilizando o marcador molecular SSR bnlgl82, polimórfico entre os genitores. Entre as 74 plantas de porte reduzido analisadas com o marcador bnlgl82 foram identificadas quatro plantas haplóides, das quais três estão apresentadas na Figura 1. Somente as plantas nas canaletas 8, 12 e 24 apresentam o perfil molecular da linhagem L512388, sendo portanto, identificadas como haplóides androgenéticos. As demais canaletas apresentam perfil molecular padrão dos cruzamentos entre os genitores.

**Tabela 1.** Porcentagem de sementes selecionadas como possíveis haplóides pelo marcador fenotípico R-navajo, indicador de haploidia (endosperma roxo e embrião branco), em 64 espigas obtidas do cruzamento de seis famílias nas gerações F<sub>2</sub> e F<sub>3</sub> com a linhagem L512388.

Genótipo família/espiga	Total de grãos	Possíveis haplóides	% de possíveis haplóides	Genótipo família/espiga	Total de grãos	Possíveis haplóides	% de possíveis haplóides
FAM 01/01	81	8	9,88	FAM 05/09	94	10	10,64
FAM 01/02	220	4	1,82	FAM 05/10	135	4	2,96
FAM 01/03	48	24	50,00	FAM 05/11	86	11	12,79
FAM 01/04	120	3	2,50	FAM 07/01	259	40	15,44
FAM 04/01	149	49	32,89	FAM 07/ 02	131	14	10,69
FAM 04/02	50	13	26,00	FAM 07/03	291	18	6,19
FAM 04/03	157	50	31,85	FAM 07/04	277	101	36,46
FAM 04/04	70	31	44,29	FAM 07/05	244	7	2,87
FAM 04/05	178	53	29,78	FAM 07/06	264	20	7,58
FAM 04/06	67	18	26,87	FAM 07/07	192	35	18,23
FAM 04/07	152	35	23,03	FAM 07/08	230	30	13,04
FAM 04/08	260	127	48,85	FAM 08/01	83	20	24,10
FAM 04/09	162	32	19,75	FAM 08/02	244	19	7,79
FAM 04/10	93	49	52,69	FAM 09/01	288	101	35,07
FAM 04/11	100	4	4,00	FAM 09/02	306	76	24,84
FAM 04/12	201	19	9,45	FAM 09/03	268	8	2,99
FAM 04/13	153	29	18,95	FAM 09/04	368	32	8,70
FAM 04/14	62	29	46,77	FAM 09/05	100	12	12,00
FAM 04/15	89	31	34,83	FAM 09/06	79	18	22,78
FAM 04/16	136	25	18,38	FAM 09/07	154	30	19,48
FAM 04/17	111	11	9,91	FAM 09/08	314	5	1,59
FAM 04/18	141	17	12,06	FAM 09/09	299	93	31,10
FAM 04/19	224	9	4,02	FAM 09/10	104	18	17,31
FAM 04/20	244	38	15,57	FAM 09/11	142	64	45,07
FAM 05/01	46	15	32,61	FAM 09/12	286	9	3,15
FAM 05/02	182	37	20,33	FAM 09/13	196	10	5,10
FAM 05/03	141	26	18,44	FAM 09/14	177	33	18,64
FAM 05/04	211	37	17,54	FAM 09/15	235	5	2,13
FAM 05/05	176	14	7,95	FAM 09/16	155	6	3,87
FAM 05/06	264	37	14,02	FAM 09/17	231	44	19,05
FAM 05/07	138	41	29,71	FAM 09/18	332	12	3,61
FAM 05/08	172	66	38,37	FAM 09/19	163	19	11,66

As plantas haplóides foram identificadas somente em espigas da família 9, sendo duas provenientes da espiga 1 e as outras duas originadas das espigas 15 e 17. A frequência de indução nessas espigas, considerando o total de sementes, foi de 0,6% para a espiga 1 e 0,4% para as espigas 15 e 17.

A seleção das sementes identificadas como possíveis haplóides pelo marcador fenotípico *R-navajo* não foi precisa. Das 1630 plantas obtidas, quatro foram confirmadas como haplóides androgenéticos por meio do marcador molecular bnlgl82.



**Figura 1.** Perfil molecular de indivíduos descendentes do cruzamento das famílias nas gerações F<sub>2</sub> e F<sub>3</sub> (H x W23) ♀ com a linhagem L512388 (L) ♂. Canaletas 8, 12 e 24 apresentam os indivíduos identificados como haplóides androgenéticos com base no marcador molecular SSR bnlg182.

O gene indutor *ig* e marcador *RI-nj* foram transferidos para três genótipos tropicais, induzindo uma taxa entre 0,4 e 0,6% de haplóides androgenéticos no cruzamento com a linhagem tropical L512388.

### Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio financeiro do Embrapa Milho e Sorgo, Fapemig e CNPq.

### Referências bibliográficas

BELICUAS, P.R.; GUIMARÃES, C.T.; PAIVA, L.V.; DUARTE, J.M.; MALUF, W.R.; PAIVA, E. Androgenetic haploids and SSR markers as tools for the development of tropical maize hybrids. **Euphytica**, v.156, p.95-102, 2007.

KERMICLE, J.L. Androgenesis conditioned by a mutation in maize. **Science**, Washington, v.166, p.1422-1424, 1969.

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

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. **Proceeding of National Academic Science of the United States of America Biological Science**, New York, v.81, n.24, p.8014-8018, 1984.