

## USO DE MARCADORES SSR PARA ACELERAR A RECUPERAÇÃO DE GENÓTIPOS RECORRENTES EM PROGRAMAS DE RETROCRUZAMENTO

GUIMARÃES, C.T., PARENTONI, S.N., SCHUELTER, A.R., MESQUITA, A.G.G., CARNEIRO, N.P. e PAIVA, E.

Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151 Sete Lagoas - MG, 35701-970  
claudia@cnpms.embrapa.br

Palavras-chave: SSR, retrocruzamento, altura da espiga, marcadores moleculares

### INTRODUÇÃO

O método de retrocruzamento consiste em transferir-se uma característica de interesse presente no progenitor doador para uma linhagem elite que não possui a característica e recuperar o genótipo elite, denominado de progenitor recorrente. Esta técnica tem sido utilizada tanto para transferir características monogênicas (Ferh, 1987) quanto para características quantitativas de alta herdabilidade (Shaver, 1976). Uma das limitações desta técnica é o tempo gasto para completar o processo (6 a 8 ciclos), o que muitas vezes faz com que o progenitor recorrente que era uma linhagem elite ao se iniciar o processo, se torne obsoleto ao final do mesmo. Como a distribuição de indivíduos com proporção do genótipo proveniente do progenitor recorrente é aproximadamente normal, a utilização de indivíduos que possuam maior proporção do genoma recorrente dentro de cada ciclo de retrocruzamento pode reduzir substancialmente o tempo gasto no processo. Para este fim, os marcadores moleculares apresentam-se como uma alternativa importante para aumentar a eficiência do processo de retrocruzamento uma vez que possibilita a identificação precisa e precoce de indivíduos que tenham maior recuperação do genoma do progenitor recorrente (Openshaw *et al.*, 1994). O uso de marcadores para acelerar conversão de progenitores recorrentes além de ser vital para manter a competitividade dos programas de melhoramento, tende a assumir uma importância primordial com o advento dos transgênicos, uma vez que nem todas as variedades ou linhagens comerciais não são eficientes para o processo de transformação.

Alguns pontos importantes a serem determinados num programa de retrocruzamento assistido por marcadores são o ganho em tempo no processo, o número de marcadores e o número de genótipos a serem amostrados por ciclo. Dados na literatura apontam que o número de marcadores a serem utilizados no processo varia entre três para cada 100 cM (Hospital *et al.*, 1992) e quatro marcadores para cada 200 cM (Openshaw *et al.*, 1994). Já o número de gerações necessárias para se completar o processo varia de dois retrocruzamentos (Weck *et al.* 1991) a três retrocruzamentos (Hospital *et al.* 1992). No entanto, Weck *et al.* 1991, não avaliaram o RC<sub>2</sub> a nível de campo para certificar-se de que o genótipo do progenitor recorrente foi recuperado. Quanto maior o número de indivíduos utilizados por geração, maior é a chance de obterem indivíduos com melhor recuperação, no entanto, este número tem variado de 125 (Weck *et al.*, 1991) a 500 indivíduos (Openshaw *et al.*, 1994). O último autor concluiu que, com duas gerações de retrocruzamentos utilizando 500 indivíduos e 80 marcadores recuperou-se 98% do pai recorrente. Entretanto, para a terceira geração, não houve diferença entre o uso de 100 ou 500 indivíduos.

A identificação da origem parental de cada região cromossômica por meio de uma análise de marcadores moleculares foi inicialmente proposta por Young e Tanksley (1989) com o conceito de genotipagem gráfica. Desta forma, são identificados os indivíduos que possuem os alelos de interesse ligados a um menor número de alelos indesejáveis do progenitor doador (*linkage drag*), sendo calculada a proporção de recuperação do genótipo recorrente em cada indivíduo da progênie do retrocruzamento. Atualmente, encontram-se disponíveis vários programas, dentre eles o *Graphical Genotypes* - GGT (Van Berloo, 1999), que utilizam dados de marcadores moleculares para desenharem a contribuição genética de cada progenitor envolvido no cruzamento, facilitando a análise e a interpretação dos resultados, bem como a seleção dos indivíduos de interesse.

Devido a escassez de dados conclusivos na literatura, para que um programa de retrocruzamento assistido por marcadores se torne viável, é de fundamental importância a determinação do número mínimo de marcadores, do número de indivíduos a serem amostrados por geração, do número mínimo de retrocruzamentos para obter uma recuperação satisfatória do pai recorrente e, acima de tudo, do quanto a genotipagem molecular corresponde à performance agrônômica do progenitor recorrente. Visando responder, pelo menos parte dessas questões o presente trabalho foi proposto para otimizar o estabelecimento de programas de seleção assistida por marcadores em programas de retrocruzamentos em genótipos tropicais.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas como progenitores duas linhagens elite de milho derivadas da variedade CMS14C. Como progenitor doador foi escolhida a linhagem L13 por possuir uma baixa inserção de espiga, característica quantitativa e de alta herdabilidade a ser transferida e uma baixa capacidade combinatória. A linhagem L11 foi selecionada como progenitor recorrente por apresentar uma excelente capacidade combinatória para produção de grãos e por possui uma alta inserção da espiga. Desta forma, as linhagens possuíam características complementares e contrastantes, favorecendo a seleção das plantas de interesse nas gerações segregantes.

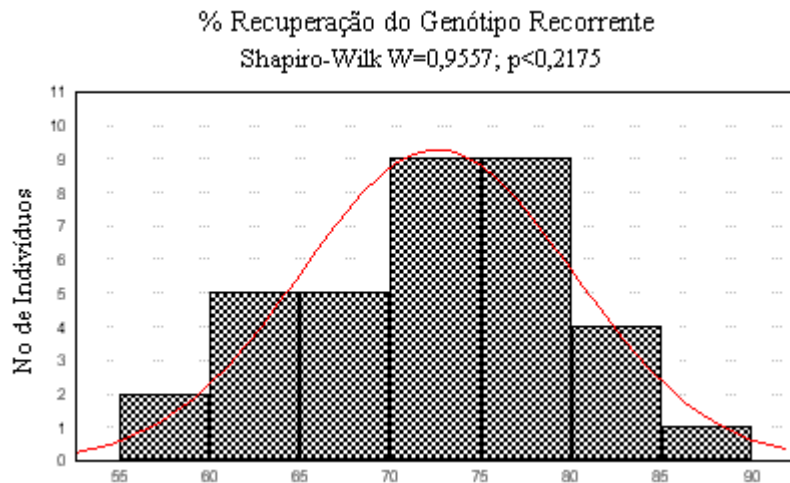
O primeiro ciclo de retrocruzamento [(L11 x L13) x L11] foi obtido, onde foram avaliados 523 indivíduos RC<sub>1</sub> para altura de inserção da espiga, altura da planta, número de nós até a espiga e número total de nós, sendo pré-selecionadas 92 plantas com base nessas características. Após a análise estatística, dentre os 92 indivíduos RC<sub>1</sub> foram selecionados 35 que apresentaram altura de inserção da espiga com um desvio padrão menor que a média das população, além dos critérios de comprimento do nó até a espiga menor que 0,15 cm e da relação entre a altura da espiga/altura da planta menor que 0,50.

Os 35 indivíduos RC<sub>1</sub> selecionados foram genotipados utilizando marcadores SSR. O DNA genômico foi extraído segundo a Saghai-Marooif *et al.* (1984), sendo quantificado em géis de agarose (0,8%) pela comparação com padrões de concentração conhecida. Os *primers* SSR específicos foram adquiridos da Research Genetics, Inc., cujas seqüências estão publicamente disponíveis no *Maize Genome Database* (<http://www.agron.missouri.edu/ssr.htm>). As reações de PCR consistiram 25 ng de DNA, 0,6 µM de cada *primer*, 100 µM de cada dNTP, 10mM Tris-HCl (pH 8.6), 50mM KCl, 2mM MgCl<sub>2</sub> e 1U da enzima Taq polimerase em um volume total

de 10 µl. As amplificações foram realizadas no termociclador Perkin Elmer 9600 com uma etapa de 95°C/2min, seguida de um ciclo de 94°C/20sec, 68°C/20sec, 72°C/20sec com a redução da temperatura de anelamento de 1°C a cada ciclo por 9 ciclos até atingir 60°C, seguindo por mais 25 ciclos com a temperatura de anelamento de 60°C e uma etapa final de 72°C/5 min. Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 4% e visualizados sob luz ultra-violeta em presença de brometo de etídio. Inicialmente foram testados mais de 250 *primers* SSR, sendo selecionados em torno de 30 *primers* distribuídos ao longo de todo o genoma do milho com uma média de três marcadores por cromossomo. Os dados de SSR foram codificados como A (homozigoto semelhante ao pai recorrente) e H (heterozigoto), sendo analisada a segregação dos marcadores pelo teste de qui-quadrado a 5%. Os dados de posição dos marcadores no genoma e dos alelos para cada indivíduo foram utilizados para a genotipagem gráfica dos indivíduos RC<sub>1</sub>, com auxílio do programa Graphical Genotypes - GGT (Van Berloo, 1999).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises estatísticas realizadas com os 523 indivíduos RC<sub>1</sub> para altura da espiga indicaram uma distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk, com média 1,22 m e desvio padrão 0,15 m. Para os 92 indivíduos RC<sub>1</sub> selecionados, a média da altura da espiga foi de 1,08 m com desvio padrão 0,09 m e distribuição normal. Entre os 92 indivíduos RC<sub>1</sub> foi realizada uma segunda seleção utilizando os critérios de um desvio padrão abaixo da média da altura da espiga, comprimento do nó até a espiga e relação entre a altura da espiga/altura da planta, o que resultou na identificação de 35 indivíduos cuja média de altura das espigas foi reduzido ainda mais para 1,00 m, totalizando uma redução significativa de 0,22 m na média da altura das espigas. Os 35 indivíduos RC<sub>1</sub> selecionados para baixa inserção da espiga foram genotipados por meio dos marcadores SSR distribuídos ao longo de todo o genoma de milho. Todos os marcadores SSR apresentaram uma segregação esperada de 1:1 na população RC<sub>1</sub>, isto é, 50% de indivíduos homozigotos semelhantes ao pai recorrente e 50% de indivíduos heterozigotos. Os dados moleculares foram utilizados para construir os genótipos gráficos dos indivíduos RC<sub>1</sub>, sendo obtida uma média de recuperação do genótipo recorrente de 72,5% com distribuição normal, como apresentado na Figura 1, em concordância com a média que seria esperada no RC<sub>1</sub> de 75%. No entanto foram obtidos indivíduos com até 86% de recuperação do genótipo recorrente, o que equivale a uma recuperação média esperada após dois ciclos de retrocruzamento. Os indivíduos RC<sub>1</sub> que apresentaram um desvio padrão acima da média de recuperação do genótipo recorrente foram selecionados para o segundo ciclo de retrocruzamento, que por sua vez seguirão as mesmas etapas de seleção e genotipagem gráfica já descritos anteriormente. Os ganhos, em termos práticos da conversão das linhagens, serão quantificados ao final de três ciclos de retrocruzamento por meio de cruzamentos-testes para avaliar a capacidade combinatória das linhagens derivadas de L11 e com baixa inserção da espiga.



**Figura 1** - Gráfico da porcentagem de recuperação do genótipo recorrente entre os 35 indivíduos RC<sub>1</sub> genotipados por meio dos SSRs, indicando a distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk e a concordância com a média esperada que seria de 75% em uma população RC<sub>1</sub>. A curva em vermelho indica a distribuição normal esperada.

## LITERATURA CITADA

FEHR, W.F. **Principles of cultivar development: Theory and Technique**. New York: Macmillan, 1987.

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

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

SAGHAI-MAROOF, M.A., SOLIMAN, K.M., JORGENSON, R., ALLAR, R.W. Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, n.81, p.8014-8018, 1994.

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

VAN BERLOO, R. GGT: software for the display of graphical genotypes. **Journal of Heredity**, Washington, v.90, p.328-329, 1999.

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

