



JAIR M. DUARTE¹, CLESO A.P. PACHECO², CLAUDIA T. GUIMARÃES² e
EDILSON PAIVA²

¹ Syngenta Seeds Ltda, C P 585, Uberlândia, MG. 38400-974

² Embrapa Milho e Sorgo, C P 151, Sete Lagoas, MG. 35701-970

cleso@cnpmis.embrapa.br

Palavras-chave: *Zea mays*, QPM, *opaco-2*, híbridos, conversão de linhagens, retrocruzamento.

INTRODUÇÃO

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* (*o₂*) 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* levou ao desenvolvimento de genótipos *opaco-2* modificados, designados *Quality Protein Maize* ou simplesmente QPM (Villegas et al., 1992). Grãos QPM apresentam a dureza e a vitreosidade dos genótipos normais, enquanto mantêm o elevado conteúdo de lisina dos mutantes *opaco-2*.

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. O método dos retrocruzamentos modificados, proposto por Guimarães et al. (2000) diminui o tempo necessário à recuperação do genótipo do genitor recorrente e fornece a oportunidade para seleção de características QPM em todas as gerações. Assim, esse método tem potencial para facilitar o desenvolvimento e lançamento de cultivares e híbridos QPM, podendo também ser usado em outros programas para incorporar múltiplas características da semente governadas por um alelo recessivo e modificadores (Guimarães et al. 2000).

O objetivo deste trabalho foi 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.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados dois híbridos experimentais QPM obtidos pela 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 quatro híbridos da Embrapa Milho e Sorgo, sendo dois normais e dois QPM. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos completos casualizados, com seis repetições. Cada parcela foi constituída de duas linhas de 4 metros, com espaçamento de 0,90 m entre linhas. Os tratos culturais foram aqueles normalmente empregados em sistema de plantio convencional.

As seguintes características agronômicas foram avaliadas: florescimento feminino (FL), altura da planta (AP), altura da espiga (AE), acamamento + quebramento (AQ), espigas doentes (ED), diâmetro do colmo (DC), comprimento da espiga (CE), número de fileiras de grãos (NF), diâmetro da espiga (DE), diâmetro do sabugo (DS), população de plantas (POP) e produtividade de grãos (PROD).

Para avaliação das características de qualidade dos grãos, cinco plantas representativas de cada parcela foram autofecundadas, em duas repetições, e as análises realizadas em uma amostra dos grãos destas espigas. As características avaliadas foram: densidade dos grãos (DEN) em g/cm^3 : segundo o método descrito por Wessel-Beaver et al. (1984), peso de 100 sementes (PCS) em g, teor de proteína do grão (TPG), teor de triptofano na proteína (TRIP): determinado segundo Villegas et al. (1984), teor de lisina na proteína (LISP): determinado segundo o método descrito por Hernandez e Bates (1969) pela equação de regressão: $y = 0,3601 + 4,074x$, onde x = teor de triptofano na proteína, produção de proteína (PRP): obtida a partir do teor de proteína do grão e da produtividade de grãos da parcela em kg/ha, produção de triptofano (PRT), produção de lisina (PRL), teor de óleo do grão (TOG): determinado segundo o método descrito por Silva (1981). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância utilizando-se o programa Genes (Cruz 1987) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Adicionalmente, a divergência genética entre os híbridos foi analisada por meio de marcadores SSRs, cujas reações foram realizadas conforme descrito por Ninamango-Cárdenas et al. (2003). Foram utilizados 31 *primers* específicos bem distribuídos no genoma do milho, a estimativa da similaridade genética foi efetuada pelo coeficiente de Dice, e a representação simplificada destas similaridades realizada em um dendrograma obtido pelo método UPGMA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve significância para a fonte de variação tratamentos, a 5% pelo teste F, para todas as características agronômicas avaliadas, exceto para a população de plantas. 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 variou 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).

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, o que demonstra um satisfatório potencial produtivo destes híbridos. O híbrido simples BRS1001 foi significativamente ($P < 0,05$) superior a todos os outros híbridos avaliados, com uma produtividade média de 8.534 kg/ha (Tabela 1). A comparação entre os híbridos QPM convertidos e suas versões normais demonstra que ambos tiveram a produtividade de grãos semelhante (Tabela 1). Tais resultados demonstram que os genótipos QPM podem ser igualmente competitivos, desde que comparados com suas versões normais, com relação à produtividade de grãos. Ao contrário, Paschoalick (1998) relatou que os genótipos QPM foram em média 10% menos produtivos que os genótipos normais. As versões QPM dos híbridos apresentaram um desempenho inferior com relação à porcentagem de acamamento + quebraamento e à porcentagem de espigas doentes, além de apresentar sabugos mais grossos em relação às versões normais. Vale ressaltar que as versões QPM avaliadas neste ensaio foram obtidas a partir da geração MRC₃F₁, cuja estimativa teórica de porcentagem de recuperação do genótipo da linhagem recorrente é de 84,38%. Dessa forma, as diferenças observadas nas características agrônomicas encontram-se dentro do esperado. Além disso, as diferenças obtidas refletem as dificuldades freqüentemente encontradas no melhoramento do milho QPM, como uma maior porcentagem de acamamento + quebraamento, sabugos mais grossos e grãos mais curtos (Guimarães et al. 1994; Pacheco et al. 1999; Paschoalick 1998), sugerindo algum efeito pleiotrópico ou de ligação do alelo *o*₂ com estas características negativas.

Tabela 1: Resultados encontrados no banco de dados (GenBank) referentes à biblioteca de ápice de raiz do milho Saracua, submetido a hipoxia

Clone	Descrição no banco de dados (GenBank)	e-value	Identidade	Score
A02	<i>Inositol ricinus glutathione S-transferase</i>	3e-05	100%	56
B04	<i>Z. mays</i> gliceraldeído-3-P desidrogenase	0,0	99%	1013
C02	<i>Dianthus caryophyllus</i> provável proteína MtH3	2e-06	100%	60
D06	<i>Oryza sativa</i> cultivar japonesa DNA	e-144	97%	517

Em um programa de melhoramento de milho QPM, além das características agrônomicas tradicionalmente avaliadas, atenção especial também deve ser dispensada às características de qualidade do grão. Houve diferenças significativas, pelo teste F a 5% de probabilidade, para todas as características relacionadas à qualidade do grão, exceto para teor de óleo no grão. Os híbridos QPM convertidos apresentaram uma densidade dos grãos inferior às suas versões normais. No entanto, os outros híbridos QPM apresentaram densidade de grãos semelhante aos híbridos normais, a exceção do híbrido BRS1001, que apresentou uma densidade superior a todos os outros híbridos do ensaio (Tabela 2). A diferença na densidade entre as versões QPM e normais dos híbridos é um forte indicativo de que o processo de conversão utilizado não conseguiu manter o grau de modificação do endosperma nas versões convertidas. Considerando que uma das vantagens proporcionadas pela metodologia de conversão proposta por Guimarães et al. (2000) seria permitir a seleção para modificação do endosperma em todas as gerações MRC, indicando que este objetivo não foi atingido até o grau de conversão avaliado.

Os teores de triptofano e de lisina na proteína foram superiores para todos os híbridos QPM em relação aos híbridos normais, com uma média de 68% e 62%, respectivamente (Tabela 2). Estes resultados refletem a superioridade dos híbridos QPM para tais características e indicam que o processo de conversão das linhagens manteve os teores elevados de lisina e triptofano das linhagens QPM doadoras, embora nenhuma técnica para análise destes teores tenha sido empregada durante a seleção. A produção de triptofano e lisina por área manteve a tendência de superioridade dos híbridos QPM convertidos em relação às suas versões normais. Apesar do híbrido normal BRS1001 ter apresentado uma produção de lisina por área superior aos híbridos QPM, reforçando 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

TABELA 2: Resultados encontrados no banco de dados (GenBank) referente: biblioteca de raiz do milho Saracura, submetida a hipoxia

Clone	Descrição no banco de dados (GenBank)	e-value	Identidade	Score
A03	<i>Homo sapiens</i> mioglobina	1e-35	97%	137
A11	<i>Zea mays</i> PCC096382 RNAm	2e-39	98%	168
B05	<i>H. sapiens</i> proteína-ligante FK506	3e-81	91%	309
C12	<i>H. sapiens</i> bangina	2e-57	99%	228
D11	<i>H. sapiens</i> paracaspase	0,0	99%	384
D12	<i>Z. mays</i> PCC078539 RNAm	e-173	95%	617
E04	<i>H. sapiens</i> lisina	e-120	99%	438
E10	<i>H. sapiens</i> bangina	1e-62	98%	246
E12	<i>Z. mays</i> PCC078539 RNAm	0,0	97%	728
F01	<i>H. sapiens</i> bangina	3e-69	100%	268
G11	<i>H. sapiens</i> paracaspase	0,0	98%	348
H02	<i>Z. mays parvoglobins</i> sequência DNA	1e-21	100%	109
H12	<i>H. sapiens</i> mioglobina	2e-39	98%	168

A análise de similaridade genética entre os híbridos foi realizada utilizando 73 alelos obtidos a partir de 31 pares de *primers* SSRs. A representação simplificada da matriz de similaridade foi realizada por meio de um dendrograma (Figura 1) que refletiu o grau de parentesco e as diferenças encontradas entre as versões normais e QPM dos híbridos avaliados. As maiores similaridades genéticas obtidas corresponderam às versões normal e QPM dos híbridos BR3123 e HS200, com valores de 0,91 e 0,90 respectivamente. Estes resultados corroboram com as diferenças nas características agrônômicas e nutricionais encontradas entre os híbridos convertidos. O elevado grau de similaridade entre os híbridos HS200 e BR3123 retratou grau de parentesco entre eles. A elevada divergência do BRS1001 sugere que esse híbrido seja representante de um germoplasma diferente dos demais híbridos, o que justifica, pelo menos em parte, o seu desempenho superior quanto à produtividade de grãos e outras características.

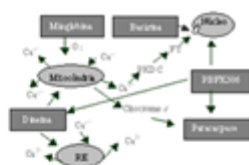


FIGURA 1. Representação da provável relação entre as proteínas codificadas pelos fragmentos dos genes obtidos na biblioteca subtrativa por supressão das raízes de plântulas de milho submetidas a hiponia sob influência do cálcio.

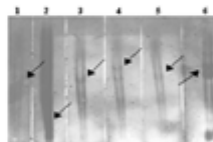


FIGURA 2. Resultado da hibridação dos clones com o DNA genômico do milho Saracura. 1: mioglobina, 2: proteína-ligante FK506, 3: dineína, 4: basigina, 5: paracaspar, 6: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. As setas indicam as bandas hibridadas pela sonda.

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 híbridos menos produtivos do ensaio. Isto demonstra que os próprios híbridos convencionais perderam competitividade quando comparados aos híbridos mais recentes, utilizados como testemunhas do experimento. Assim, o tempo gasto na obtenção das linhagens convertidas é um fator decisivo para o sucesso do programa de melhoramento, devendo o mesmo ser rápido e dinâmico para acompanhar a competitividade dos novos híbridos de milho que são disponibilizados no mercado. A combinação de conversão e reciclagem de linhagens complementa o programa de melhoramento de milho QPM e apresenta grande potencial na geração de híbridos superiores.

LITERATURA CITADA

- Cruz CD (1997) Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística. Editora UFV, Viçosa, 442 p.
- Guimarães PEO, Pacheco CAP, Lopes MA (2000) Processo de introdução de características genéticas expressadas em sementes e controladas por um gene recessivo e seus modificadores. Patente: Privilégio e Inovação. n. PI 00046, "Processo de introdução de característica". 14 de setembro de 2000 (Depósito).
- Guimarães PEO, Lopes MA, Gama EEG, Santos MX, Parentoni SN, Paes MC, Vieira Junior PA, Silva AE, Paiva E, Correia LA, Pacheco CAP (1994) Quality protein maize improvement at the National Maize and Sorghum Research Center. In: Proceedings of the International Symposium on Quality Protein Maize. EMBRAPA/CNPMS, Sete Lagoas, p 185-204.
- Hernandez HH, Batez LS (1969) A modified method for rapid tryptophan analysis of maize. CYMMIT, Mexico, 7 p. (Research Bulletin, 13).
- Ninamango-Cárdenas FE, Guimarães CT, Martins PR, Parentoni SN, Carneiro NP, Lopes MA, Moro JR, Paiva E (2003) Mapping QTLs for aluminum tolerance in maize. Euphytica, 130 (2): 223-232.
- Mertz ET, Bates LS, Nelson OE (1964) Mutant gene that changes the protein composition and increases the lysine content of maize endosperm. Science 145: 279-280.
- Nelson OE (1969) Genetic modification of protein quality in plants. Advances in Agronomy 21: 171-194.

Pacheco CAP, Guimarães PEO, Parentoni SN, Lopes MA, Santos MX, Gama EEG, Vasconcelos MJV, Correia LA, Meirelles WF (1999) O desenvolvimento de milho de alta qualidade nutricional no Brasil. In: Memórias 28ª Reunión Latinoamericana Del Maiz. CIMMYT, México, p 13-26.

Paschoalick HNS (1998) 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. MS Thesis, Universidade do Estado de São Paulo, Jaboticabal, 107p.

Scapim CA, Carvalho CG, Cruz CD (1995) Uma proposta de classificação dos coeficientes de variação para a cultura do milho. Pesquisa Agropecuária Brasileira 30: 683-686.

Silva DJda (1981) Análise de alimentos - métodos químicos e biológicos. Editora UFV, Viçosa, 166p.

Villegas E, Ortega E, Bauer R (1984) Chemical methods used at CIMMYT for determination of protein quality in cereal grains. CIMMYT, México, 641p.

Villegas E, Vasal SK, Bjarnason M (1992) Quality Protein Maize - What is it and how was it developed. In: Mertz ET (ed.) Quality protein maize. The American Society of Cereal Chemists, St. Paul, p 27-48.

Wessel-Beaver L, Beck RH, Lambert RJ (1984) Rapid method for measuring kernel density. Agronomy Journal 76: 307-309.

