



Obtenção, Identificação e Caracterização Molecular de Haplóides Androgenéticos em Milho

PEDRO R. BELICUAS¹, LUCIANO V. PAIVA¹, CLAUDIA T. GUIMARÃES², JAIR M. DUARTE³, e EDILSON PAIVA²

1- Universidade Federal de Lavras - UFLA Cx. Postal 37 - CEP 37200-000 - Lavras MG

2- Embrapa Milho e Sorgo, C. P. 151, CEP 35701-970, Sete Lagoas, MG. E-mail: edilson@cnpms.embrapa.br

3- Syngenta Seeds

INTRODUÇÃO

O processo tradicional de produção de híbridos envolve a geração de linhagens endogâmicas que são obtidas por autofecundações sucessivas. Uma das alternativas disponíveis para este processo na cultura do milho é a técnica de obtenção de linhagens homocigóticas instantâneas pelo uso de haplóides duplicados (di-haplóides). Kermicle (1969) relatou a ocorrência de uma mutação espontânea que ele chamou de gametófito indeterminado (*ig*) na linhagem Wisconsin-23 (W23). Os haplóides gerados por influência deste alelo *ig* são de origem paterna, ou seja, são androgenéticos.

OBJETIVOS

Avaliar o processo de obtenção de linhagens homocigóticas a partir de linhagens indutoras de haploidia nas condições tropicais de cultivo e comparar os métodos de confirmação de haplóides verificando a eficiência e aplicabilidade dos mesmos.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos haplóides

Foram realizados cruzamentos entre a linhagem temperada indutora de haploidia Wisconsin-23 (W23) e o híbrido simples BRS1010, sendo este o parental masculino. As sementes obtidas nesses cruzamentos foram colhidas, secadas e separadas conforme o marcador morfológico indicador de haploidia (sistema *R-navajo*) conforme figura 1.

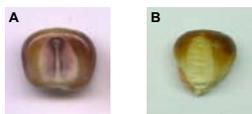


FIGURA 1 Padrão de coloração do marcador morfológico controlado pelo sistema *R-navajo*. (A) endosperma e embrião roxo, indicando cruzamento. (B) endosperma roxo e embrião sem coloração, indicando haploidia.

Contagem cromossômica

Foram confeccionadas lâminas de mitose a partir de meristemas radiculares das plântulas possíveis haplóides.

Marcadores SSR

Foram testados 122 marcadores SSR entre a linhagem W23 e o híbrido BRS1010. Para o estudo de distância genética foram utilizados 13 primers SSR marcados com fluorescência e polimórficos entre as linhagens que deram origem ao híbrido BRS1010.

Citometria de fluxo

Para as análises no citômetro de fluxo, foram utilizadas folhas jovens dos genitores (híbrido BRS1010 e a linhagem W23) e dos indivíduos F1 provenientes do cruzamento entre eles. A metodologia de extração e coloração da suspensão nuclear foi realizada conforme as recomendações do fabricante no uso do tampão DNA Staining Solution Partec®.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos cruzamentos entre a W23 e o BRS1010 foram selecionadas 50 espigas. Os indivíduos possíveis haplóides foram analisados com os marcadores mmc0022 (bin 3,05) e o mmc0081 (bin 5,05) previamente selecionados. Quatro indivíduos foram identificados como haplóides entre os 462 analisados, sendo eles 216, 494, 660 e 664 (Figura 2).



FIGURA 2 Teste de haploidia realizado com os marcadores mmc0022 (bin 3,05) e mmc0081 (bin 5,05) em gel de agarose 4%. W23: linhagem indutora; HIB: BRS1010; 801 e 804A: Diplóides; 216, 494, 660 e 664: Haplóides.

Para a validação dos resultados obtidos com os marcadores SSR, foram utilizadas as técnicas de contagem cromossômica e citometria de fluxo. As quatro plantas identificadas como haplóides pelos marcadores SSR foram confirmadas por esses dois métodos conforme figuras 3 e 4.

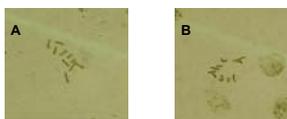


FIGURA 3 Fotomicrografia das lâminas de mitose mostrando os 10 cromossomos das plantas haplóides de milho 216 (A) e 494 (B) Aumento total 1000 X.

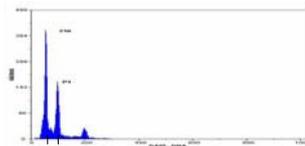


FIGURA 4 Histograma obtidos por citometria de fluxo de plantas genitoras diplóide P1 e planta haplóide 216. Observar que o pico G1 das plantas diplóide P1, no canal 100, e o pico G1 da amostra 216 no canal 50,6.

As quatro plantas haplóides apresentaram fenótipo característico pelo tamanho reduzido, entretanto algumas plantas diplóides também apresentaram porte reduzido

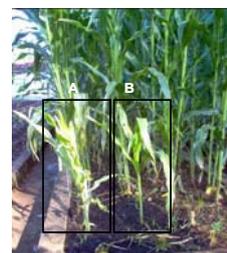


FIGURA 5 Foto comparativa da planta haplóide (A) e das plantas diplóides (B) e ao fundo, ambas germinadas na mesma época. EMBRAPA - Sete Lagoas - MG, Abril/2004.

Um estudo de distância genética foi realizado verificando que durante o processo de geração dos indivíduos haplóides a distribuição dos alelos das plantas ocorreu ao acaso (Figura 6).

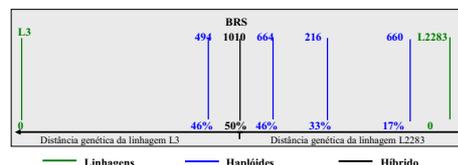


FIGURA 6 Figura representativa da distância genética entre os haplóides e as linhagens que deram origem ao híbrido BRS1010.

CONCLUSÕES

A linhagem W23 é efetiva na geração de haplóides androgenéticos, induzindo a uma taxa de 1,19% no genótipo tropical do híbrido BRS1010.

Todas as plantas identificadas como haplóides apresentavam porte reduzido, sendo que algumas plantas diplóides heterocigotas também.

O sistema de identificação de haplóides por meio de marcadores morfológicos (*R-navajo*) não foi eficiente. Para esta identificação os marcadores SSR se mostraram eficientes e de maior aplicabilidade em relação aos outros dois.

A distribuição dos alelos no momento da geração dos indivíduos haplóides ocorreu de forma aleatória.

LITERATURA CITADA

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