

ANÁLISE DE PUREZA GENÉTICA DE LINHAGENS DE MILHO COM MARCADORES MICROSSATÉLITES EM SISTEMAS MULTIPLEX

MAIZE INBRED LINE PURITY ASSESSMENT WITH MULTIPLEXED MICROSATELLITE MARKERS



GENOMAX
TECNOLOGIA GENÔMICA

Soares, C.N.¹, Lins, TCL.¹, Guimarães, C.S.¹, Ribeiro, M.A.N.¹, Diener, P.S.A.¹, Ferreira, M.E.^{1,2} e Grattapaglia, D.^{1,2}

¹ GENOMAX™ Tecnologia Genômica, SHIN Centro de Atividades 02 Lote 19, Lago Norte, 70505-000 -Brasília, DF; ² UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA, Pós graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Brasília DF.

RESUMO

Baterias de microsatélites altamente polimórficos, localizados em cromossomos distintos e otimizados em sistemas multiplex de PCR tem sido utilizados de forma crescente no nosso laboratório para a resolução de questões de pureza genética de linhagens puras de milho em suporte a programas avançados de produção de sementes híbridas da cultura. Este trabalho descreve especificamente dois estudos nos quais o poder de resolução dos microsatélites permitiu avaliar com precisão o nível de homogeneidade bem como mistura de linhas, heterozigose devido a contaminação em amostras de sementes de linhagens de milho. Num primeiro estudo, amostras de 20 plântulas por linhagem foram analisadas em preparação a um programa de conversão de linhagens via retrocruzamento assistido por marcadores. O objetivo era verificar o grau de pureza de diferentes lotes de sementes genéticas e de sementes básicas derivadas destas visando recomendar o melhor lote a ser utilizado no programa. Existiam suspeitas, com base na avaliação fenotípica a campo, de ter havido seja mistura de linhagens bem como contaminação entre linhagens durante o processo de multiplicação de sementes nos últimos anos. Três linhagens tropicais, GMX1 a GMX10, correspondiam as linhagens tropicais enquanto GMX11 a GMX12 as linhagens temperadas. As amostras GMX1 a GMX3 constituíram amostras de sementes genéticas enquanto GMX4 sementes básicas da mesma linhagem; GMX5 a GMX7, sementes genéticas enquanto GMX8 sementes básicas da mesma linhagem e GMX9, sementes genéticas enquanto GMX10 sementes básicas da mesma linhagem. Uma amostra em bulk constituída de 10 mg de tecido foliar de cada uma das 10 plântulas foi extraída e analisada. Adicionalmente amostras de 4 a 8 plântulas individuais por linhagem foram genotipadas para discriminar entre as possibilidades de mistura de linhas versus heterozigose. Nove marcadores microsatélites independentes foram utilizados sendo que dois marcadores mapeando nas regiões distais do cromossomo 1 e os demais sete em cromossomos distintos. Marcadores phi015, phi056, phi093, phi064, phi083, phi032 e phi072 são de repetições de tetranucleotídeos enquanto phi085 e phi053 são de penta e trinucleotídeos respectivamente. Estes marcadores são recomendados para proteção varietal em função do seu elevado poder de discriminação e robustez na interpretação de genótipos (Matsuoka et al. 2002 TAG 104:436). Marcadores foram amplificados em duas reações de PCR e analisados simultaneamente em um sequenciador ABI377XL. Escadas alélicas virtuais foram construídas usando o software Genotyper permitindo assim a declaração precisa de alelos em estudos independentes. As amostras GMX1, GMX2, GMX3, GMX5, GMX7 apresentaram homogeneidade em todos os locos testados indicando um elevado grau de pureza, esperado para sementes genéticas. A amostra GMX6, entretanto, apresentou mais de um alelo em dois locos sugerindo mistura de linhas ou heterozigose. As amostras de sementes básicas GMX4, GMX8 e GMX10 apresentaram vários locos com mais de um alelo. As amostras GMX4 e GMX8 apresentaram pelo menos uma plântula individual em heterozigose em seis dos nove locos testados. Amostras GMX9 e GMX10 apresentaram indivíduos heterozigotos e alelos adicionais nos bulks, não detectados nas plântulas individuais indicando claramente a ocorrência simultânea de mistura de linhas e heterozigose possivelmente devido a contaminação. As linhagens temperadas GMX11 e GMX12 foram homozigotas a todos os locos com exceção do loco phi085 para GMX12, sugestivo de duplicação de loco. Em conclusão, pureza genética foi em geral encontrada nas amostras de sementes genéticas mas não nas amostras de sementes básicas onde heterozigose possivelmente devido a contaminação bem como mistura de linhas foram claramente detectadas. Entretanto, o comparilhamento de alelos entre as amostras de sementes genéticas e básicas da mesma linhagem, indicam que uma derivou da outra com exceção da comparação GMX9 e GMX10. Esta análise permitiu ao melhorista selecionar o lote de sementes mais puro e adequado para garantir o sucesso do programa de retrocruzamento assistido por marcadores. Num segundo estudo foram analisadas cinco amostras de sementes da mesma linhagem pura de milho para verificar a existência de possíveis misturas. Uma bateria ampliada com 22 microsatélites, cobrindo os 20 braços cromossômicos do milho foi utilizada. Todas as cinco amostras se apresentaram totalmente homozigotas e indistinguíveis utilizando assim a suspeita de ter havido mistura de linhas ou contaminação durante o processo de manutenção das linhas e multiplicação de lotes de sementes.



ABSTRACT

Multiplexed sets of highly polymorphic microsatellite markers have been used in our laboratory to solve questions of maize inbred line identity and genetic purity in support to advanced hybrid maize breeding programs. This work presents two studies where the resolution power of microsatellite markers allowed a precise assessment of the homogeneity level as well as the detection of line mixture or line contamination in seed lots. In a first study, samples of 20 seedlings per line were analyzed for genetic purity prior to a backcross assisted line conversion program. The objective was to verify the degree of purity of genetic and basic seed lots of the same lines and recommend the best seed lot to be used in a marker assisted backcross program. There were evidences from phenotypic field assessment that line mixture or contamination between lines had occurred during the seed multiplication and maintenance process in the last years. Three tropical lines samples GMX1 to GMX10 and two temperate lines, GMX11 and GMX12 were analyzed. Samples GMX1 through GMX3 were genetic seed samples and GMX4 a basic seed sample from the same line; GMX5 through GMX7 were genetic seed samples and GMX8 a basic seed sample from the same line; GMX9 was a genetic seed sample and GMX10 basic seed from the same line. A bulked leaf sample consisting of 10 mg each of 10 seedlings was extracted and the DNA analyzed. Additionally between 4 and 8 individual seedlings per line were typed to discriminate between the hypotheses of line mixture versus heterozygosity. Nine unlinked microsatellites were used, two markers mapping to the distal ends of chromosome 1 and the other seven to separate chromosomes. Markers phi015, phi056, phi093, phi064, phi083, phi032 and phi072 are tetranucleotide repeats while phi085 and phi053 are penta and trinucleotide repeats respectively. These markers were recommended for varietal protection due to their high discrimination power and typing robustness (Matsuoka et al. 2002 TAG 104:436). Loci were amplified in two PCR reactions and simultaneously analyzed in a ABI377XL sequencer. Virtual allelic ladders were constructed using the ABI Genotyper software macros to allow precise allelic declaration in independent studies. Samples GMX1, GMX2, GMX3, GMX5, GMX7 were found to be fully homozygous at the sampled loci indicating a high degree of line purity, expected for genetic seed lots. Sample GMX6 showed two loci with more than one allele indicating the occurrence of line mixture or heterozygosity. Basic seed samples GMX4, GMX8 and GMX10 showed several loci in a heterozygous state. Samples GMX4 and GMX8, basic seed samples, were highly heterozygous with at least one heterozygous seedling in six out of nine loci. Samples GMX9 and GMX10 both displayed heterozygous individual plants and additional alleles in the bulks not present in individual plants clearly indicating the simultaneous occurrence of line mixture and heterozygosity. Temperate line samples GMX11 and GMX12 were found to be homozygous at all loci with the exception of locus phi085 for GMX12, suggestive of a duplicated locus occurrence. In conclusion, line purity was generally found in the genetic seed samples but not in the basic seed samples where mixture and heterozygosity were seen. However allele sharing observed between the basic seed sample and the genetic seed sample in the comparison clearly indicated that one derived from the other, with the exception of comparison GMX9-GMX10 where different alleles were found. This marker assisted purity appraisal allowed the breeder to precisely select the current genetic seed lots to guarantee the success of the backcross program. In a second study, five seed samples from the same inbred line were analyzed to verify potential mixtures. An extended battery of 22 microsatellite markers was used covering all 20 maize chromosome arms. All five samples were found to be fully homozygous and indistinguishable therefore eliminating the suspicion of mixture or contamination during line maintenance and seed multiplication.

INTRODUÇÃO

- Baterias de microsatélites altamente polimórficos, localizados em cromossomos distintos e otimizados em sistemas multiplex de PCR tem sido utilizados de forma crescente no nosso laboratório para a resolução de questões de pureza genética de linhagens puras de milho em suporte a programas avançados de produção de sementes híbridas da cultura.
- Este trabalho descreve especificamente dois estudos nos quais o poder de resolução dos microsatélites permitiu avaliar com precisão o nível de homogeneidade bem como mistura de linhas, heterozigose devido a contaminação em amostras de sementes de linhagens de milho.
- Num primeiro estudo, amostras de 10 plântulas por linhagem foram analisadas em preparação a um programa de conversão de linhagens via retrocruzamento assistido por marcadores. O objetivo era verificar o grau de pureza de diferentes lotes de sementes genéticas e de sementes básicas visando recomendar o melhor lote a ser utilizado no programa. Existiam suspeitas, com base na avaliação fenotípica a campo, de ter havido seja mistura de linhagens bem como contaminação entre linhagens durante o processo de multiplicação de sementes nos últimos anos.
- Num segundo estudo foram analisadas cinco amostras de sementes da mesma linhagem pura de milho para verificar a existência de possíveis misturas. Uma bateria ampliada com 22 microsatélites, cobrindo os 20 braços cromossômicos do milho foi utilizada.

OBJETIVOS

- ESTUDO 1: DETERMINAÇÃO DE PUREZA DE SEMENTES BÁSICAS E GENÉTICAS DE LINHAGENS TROPICAIS PARA CONVERSÃO OBJETIVOS**
- Determinar o genótipo multiloco de amostras foliares de linhagens de milho amostradas em "bulk" de plantas para um conjunto de marcadores co-dominantes microsatélites em diferentes cromossomos;
 - Determinar o genótipo multiloco de amostras foliares de linhagens de milho amostradas em plantas individuais para um conjunto de marcadores co-dominantes microsatélites em diferentes cromossomos;
 - Verificar a pureza genética das amostras e comparar os perfis genéticos multiloco entre amostras específicas de sementes genéticas e sementes básicas;
- ESTUDO 2: DETERMINAÇÃO DE PUREZA DE AMOSTRAS DE LINHAGEM**
- Determinar o genótipo multiloco de amostras foliares em "bulk" de plantas de milho para um conjunto de 22 marcadores co-dominantes microsatélites cobrindo os 10 cromossomos de milho;
 - Avaliar a pureza genética das amostras pela proporção de locos em homozigose.

MATERIAL E MÉTODOS

Processamento das amostras. Em ambos os estudos foram recebidas amostras de plântulas de *Zea mays* provenientes de duas empresas produtoras de sementes de milho híbridas que atuam no Brasil, com uma determinada nomenclatura especificada pela empresa. As amostras GMX1 a GMX10, provêm de dez lotes de três linhagens tropicais enquanto GMX11 a GMX12 a duas linhagens temperadas. As amostras GMX1 a GMX3 constituíram lotes de sementes genéticas enquanto GMX4 sementes básicas da mesma linhagem; GMX5 a GMX7, sementes genéticas enquanto GMX8 sementes básicas da mesma linhagem e GMX9, sementes genéticas enquanto GMX10 sementes básicas da mesma linhagem. As amostras foliares foram acondicionadas em sacos plásticos e enviadas resfriadas. A mesma identificação definida pela empresa foi mantida durante todo o processo de análise.

Extração e quantificação de DNA. amostras foliares em "bulk" ou de plântulas individuais foram preparadas para a extração de DNA tomando quantidades iguais de tecido de cada uma das folhas que compõem o "bulk". Para um total de 10 amostras por bulk foram tomadas 20 mg de tecido por folha, totalizando 200 mg de material foliar. A extração de DNA genômico total foi realizada utilizando um protocolo padrão com base em CTAB, previamente utilizado e descrito para plantas (Grattapaglia e Sederoff 1994 Genetics 137:1121-1137; Ferreira e Grattapaglia, 1995 - Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 220pp. SPI Embrapa). Uma purificação adicional em coluna de troca iônica foi utilizada para amostras que apresentaram um elevado conteúdo de polifenóis. Os 200 mg de folha fresca foram pulverizados em máquina BIO101. Duas extrações independentes foram realizadas por eqüipes distintas em dias separados correspondendo a prova e contra-prova para verificação de genótipos minimizando, portanto, a possibilidade de erro humano.

Locos microsatélites. Para a análise de pureza genética foram utilizados marcadores moleculares baseados em regiões hipervariáveis do DNA conhecidas como regiões microsatélites ou "short tandem repeats - STR". Estas regiões são distribuídas por todo o genoma e podem ser genotipadas através da análise de produtos da reação de polimerase em cadeia (PCR) em géis de eletroforese de poliacrilamida com detecção semi-automatizada via laser de espectro de fluorescências em sequenciador automático de DNA. Estas regiões são altamente polimórficas, ricas em formas alélicas, possibilitando uma análise genética extremamente acurada, como a requerida em testes de paternidade, identidade genética e fingerprinting de DNA. A análise de locos STRs permite a identificação das formas alélicas que um determinado indivíduo possui em sítios definidos dos cromossomos, comparando-as com formas alélicas conhecidas para a espécie, permitindo, portanto, estimativas precisas e estatisticamente formais de vínculo genético e/ou identidade. A técnica de análise de microsatélites tem sido utilizada com sucesso para a geração de estimativas robustas de individualidade genética para milho (Chin et al. 1996; Matsuoka et al. 2002; Sharopova et al. 2002; Tarantino e Tingey 1996). Por serem marcadores co-dominantes com o mais alto poder informativo para discriminação individual, os marcadores microsatélites, são os mais recomendados para a análise solicitada assim como em identificação criminalística e estudo de paternidade em humanos. Para controle experimental em todas as análises foi utilizado um controle negativo (água). Foram analisados nove e 22 locos microsatélites respectivamente no primeiro e segundo estudos, localizados nos 10 cromossomos diferentes do milho, um para cada braço cromossômico (dois por braço para o cromossomo 6), satisfazendo a premissa de independência da análise multiloco uma vez que os dois marcadores localizados em cada cromossomo estão localizados nas extremidades opostas do mesmo (Tabela 3). Estes locos foram selecionados a partir de centenas de locos disponíveis no Maize Database (MaizeDB) pelo seu elevado polimorfismo e poder de discriminação genética, avaliados em painéis de dezenas de linhagens endogâmicas e recomendados para a análise de pureza de linhagens de milho (Matsuoka et al. 2002). Os locos foram genotipados através da análise de produtos da reação de polimerase em cadeia (PCR) em géis de eletroforese de poliacrilamida de alta resolução. A detecção dos alelos foi realizada de forma automatizada pela emissão de fluorescência em sequenciador automático de DNA ABI377XL. Os dados foram exportados para planilhas eletrônicas e compilados no laudo técnico. Foi realizada prova e contra-prova da análise dos microsatélites de todas as amostras testadas.

PCR de microsatélites. Os iniciadores dos locos microsatélites foram marcados com fluorescência azul (FAM), verde (HEX), ou amarela (NED) para detecção no filtro virtual D. As reações de PCR em multiplex de 03 a 06 locos (Figura 1) foram realizadas com 10 a 30 ng de DNA genômico, em um volume de 20 µl. **Determinação de genótipos.** Os produtos amplificados foram carregados em gel de poliacrilamida e separados via eletroforese em um sequenciador ABI Prism 377XL e analisados com os softwares Genescan Analysis v. 2.1 e Genotyper 2.0 (Figura 1).

Interpretação genética e análise de pureza. Os genótipos foram descritos com os alelos identificados em pares de bases, respeitando a natureza do microsatélite seja ele penta, tetra, tri ou dinucleotídico. Para controle experimental, sempre foi utilizada uma amostra padrão em todos os géis de eletroforese visando a comparação de estimativas de tamanhos de alelos em pares de bases entre experimentos distintos. Análogo polimorfismo foi detectado entre as linhagens tropicais e as temperadas (Figura 1). A análise de pureza foi realizada verificando-se a existência de amostras com perfis multiloco com um alelo único ou mais do que um alelo para as amostras analisadas em bulk. A observação de homozigose (ou seja, apenas um alelo detectado) em todos os locos analisados constituiu evidência em favor da pureza genética da linhagem. Alelos adicionais detectados em um ou mais locos analisados constituem evidência de contaminação devido a fundação cruzada ou a heterozigotidade (Figura 3). A análise de plantas individuais permite a declaração inequívoca de heterozigotidade complementando a análise em bulk permitindo a discriminação entre as hipóteses de mistura de linhas e heterozigose por contaminação de pólen (Figura 4).

Tabela 3. Descrição dos 22 locos microsatélites utilizados. São destacados os códigos dos locos, com informação de posição cromossômica, faixa de tamanho dos alelos conhecidos, o tipo de repetição do microsatélite e o tema (motif) repetido. Informações adicionais sobre sequências de primers de cada um dos locos pode ser obtida no *Maize Genetics and Genomics Database* em <http://www.maizegdb.org>.

LOCO MICROSSATELITE	CROMOSSOMO	BIN	FAIXA ALELICA (pb)	TIPO DE REPETIÇÃO	MOTIF REPETIDO
phi056	1	1.01	241-258	tri	CCG
phi064	1	1.11	75-110	tetra	ATCC
phi083	2	2.04	126-139	tetra	AGCT
phi127	2	2.08	110-129	tetra	AGAC
phi053	3	3.05	169-212	tetra	ATAC
bnlg1257	3	3.09	160-210*	di	AG
phi072	4	4.0	143-163	tetra	AAAC
phi093	4	4.08	284-294	tetra	AGCT
umc1097	5	5.0	100-120*	di	CA
phi085	5	5.06	233-266	pentila	AAACGC
phi39203	6	6.03	301-314	tri	AGC
nmc0523	6	6.04	100-130*	di	CT
bnlg1154	6	6.05	140-180*	di	AG
bnlg1759	6	6.07	230-250*	di	AG
bnlg1367	7	7.0	120-160*	di	AG
umc2190	7	7.06	160-180*	tri	CCT
phi420701	8	8.0	291-300	tri	CCG
phi015	8	8.08	83-104	tetra	AAAC
bnlg1272	9	9.0	250-280*	di	AG
phi032	9	9.04	233-242	tetra	AAAG
phi96342	10	10.02	223-256	tetra	ATCC
phi062	10	10.04	158-178	tri	ACG

* Faixa de tamanho de alelos aproximada verificada em um conjunto de linhagens temperadas. Alelos fora destas faixas podem ser encontrados em materiais tropicais.

RESULTADOS E CONCLUSÕES - ESTUDO 1

DETERMINAÇÃO DE PUREZA DE SEMENTES BÁSICAS E GENÉTICAS DE LINHAGENS TROPICAIS PARA CONVERSÃO

Foram determinados genótipos multiloco para as doze amostras analisadas (GMX1 a GMX12) o que permitiu a análise de pureza genética das mesmas especificamente nas regiões genômicas amostradas pelos locos utilizados (Tabela 2). As amostras GMX1, GMX2, GMX3, GMX5, GMX7 apresentaram genótipos homozigotos em todos os locos analisados indicando um elevado grau de pureza genética (Figura 3). A amostra GMX6 apresentou dois locos com mais de um alelo (locos phi015 e phi072) na análise em bulk o que indica a presença de mistura de linhas e/ou heterozigose. As amostras GMX4, GMX8 e GMX10 apresentaram diversos locos em heterozigose evidenciados pela presença de dois alelos na análise de quatro plantas individuais por linhagem e confirmadas na análise adicional na forma de bulk de todas as plantas enviadas para análise. A amostra GMX4 apresentou pelo menos uma planta individual heterozigota em sete dos nove locos amostrados, indicando portanto um elevado nível de heterozigotidade (segregação) (Figura 4). A amostra GMX8 apresentou pelo menos uma planta individual heterozigota em seis dos nove locos amostrados, indicando portanto um elevado nível de heterozigotidade (segregação). Apenas nos locos phi032, phi056 e phi072 todas as plantas bem como o bulk se apresentaram em homozigose. A amostra GMX9 foram detectados mais de dois alelos na análise em bulk. Esta observação indica a ocorrência seja de heterozigotidade bem como de mistura de linhas. Na análise das amostras de plantas individuais esta observação foi corroborada. Foram analisadas todas as oito plantas amostradas e uma delas (indicada na tabela como planta GMX9.6) foram observados novos alelos não encontrados nas demais plantas individuais da amostra nos locos phi032, phi056, phi072, phi085. Esta observação corroborou definitivamente a ocorrência de mistura de linhas na amostra GMX9. A amostra GMX10 apresentou pelo menos uma planta individual heterozigota em cinco dos nove locos amostrados, indicando portanto um moderado nível de heterozigotidade (segregação). Apenas nos locos phi015, phi056, phi083 e phi093 todas as plantas bem como o bulk se apresentaram em homozigose. A amostra GMX12 apresentou genótipos homozigotos em todos os locos analisados indicando um elevado grau de pureza genética (Figura 2).

A amostra GMX12 apresentou genótipos homozigotos em todos os locos analisados com exceção do loco phi085, indicando um alto grau de pureza genética (Figura 2).

Na comparação entre as amostras de semente genética (GMX1, GMX2 e GMX3) com a sua correspondente semente básica (GMX4), observa-se portanto pureza genética nos acessos de semente genética e segregação na semente básica. Vale ressaltar, entretanto, que a amostra de semente básica compartilha em todos os nove locos um dos alelos com o alelo encontrado nas amostras de semente genética, indicando claramente a derivação genética esperada (Figura 3).

Na comparação entre as amostras de semente genética (GMX5, GMX6 e GMX7) com a sua correspondente semente básica (GMX8), observa-se portanto pureza genética nos acessos de semente genética e segregação na semente básica. Vale ressaltar que a amostra GMX9 e GMX10 observa-se a presença de alelos diferentes entre as duas amostras. Por exemplo no loco phi015 a amostra GMX9 apresentou os alelos 84, 90 e 96 com predominância do alelo 96,82, enquanto que a amostra GMX10 apresentou o alelo 90. Da mesma forma no loco phi032 a amostra GMX9 apresentou o alelo 240 enquanto que a amostra GMX10 apresentou os alelos 234 e 242. Idem no loco phi085 no qual a amostra GMX9 apresentou os alelos 244, 253 e 262 com predominância do alelo 262, enquanto que a amostra GMX10 apresentou os alelos 238 e 244. Este resultado indica que existe diferença genética entre o acesso de semente genética e de semente básica em desacordo com o esperado.

Na comparação entre as amostras GMX1-GMX3 com as amostras GMX11 e GMX12 oito dos nove locos analisados e sete dos nove locos analisados apresentaram polimorfismo respectivamente.

Da mesma forma na comparação entre as amostras GMX5-GMX7 com as amostras GMX11 e GMX12 oito dos nove locos analisados e sete dos nove locos analisados apresentaram polimorfismo respectivamente.

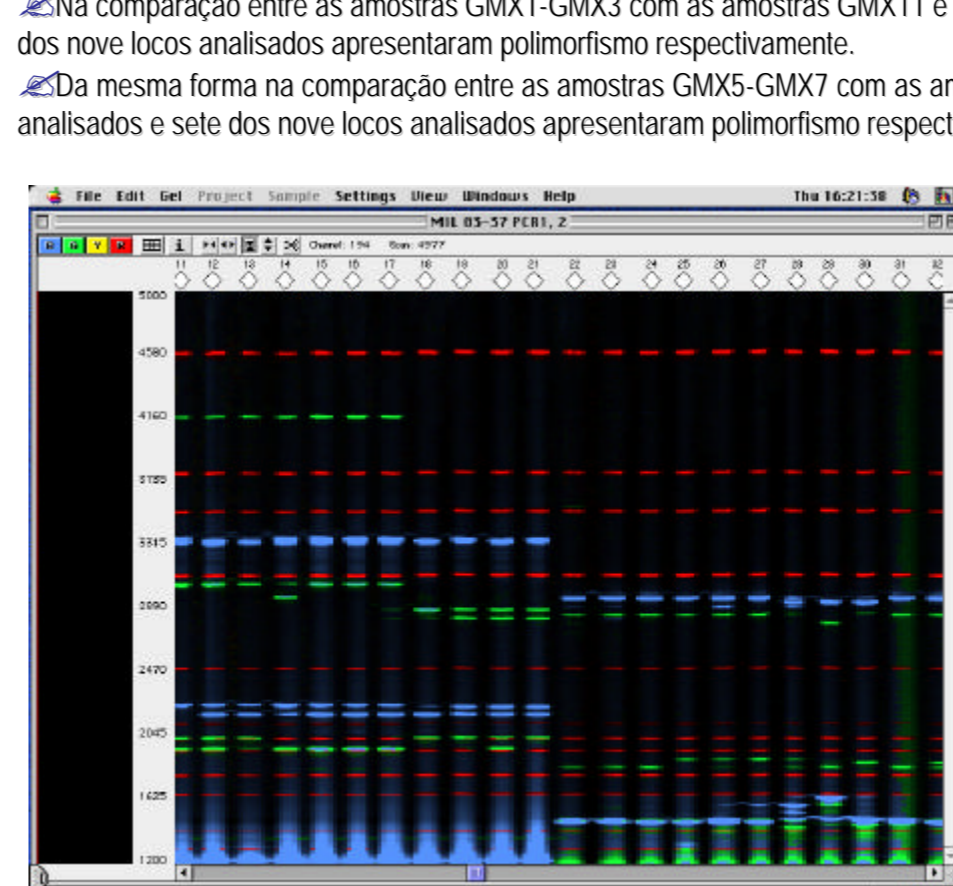


Figura 1 Painel à esquerda: imagem do gel de eletroforese com a análise simultânea de nove locos resolvidos em sequenciador 377XL em dois multiplexes. Painéis inferiores: eletroferograma de dois multiplexes mostrando a visualização conjunta dos locos no software Genescan.

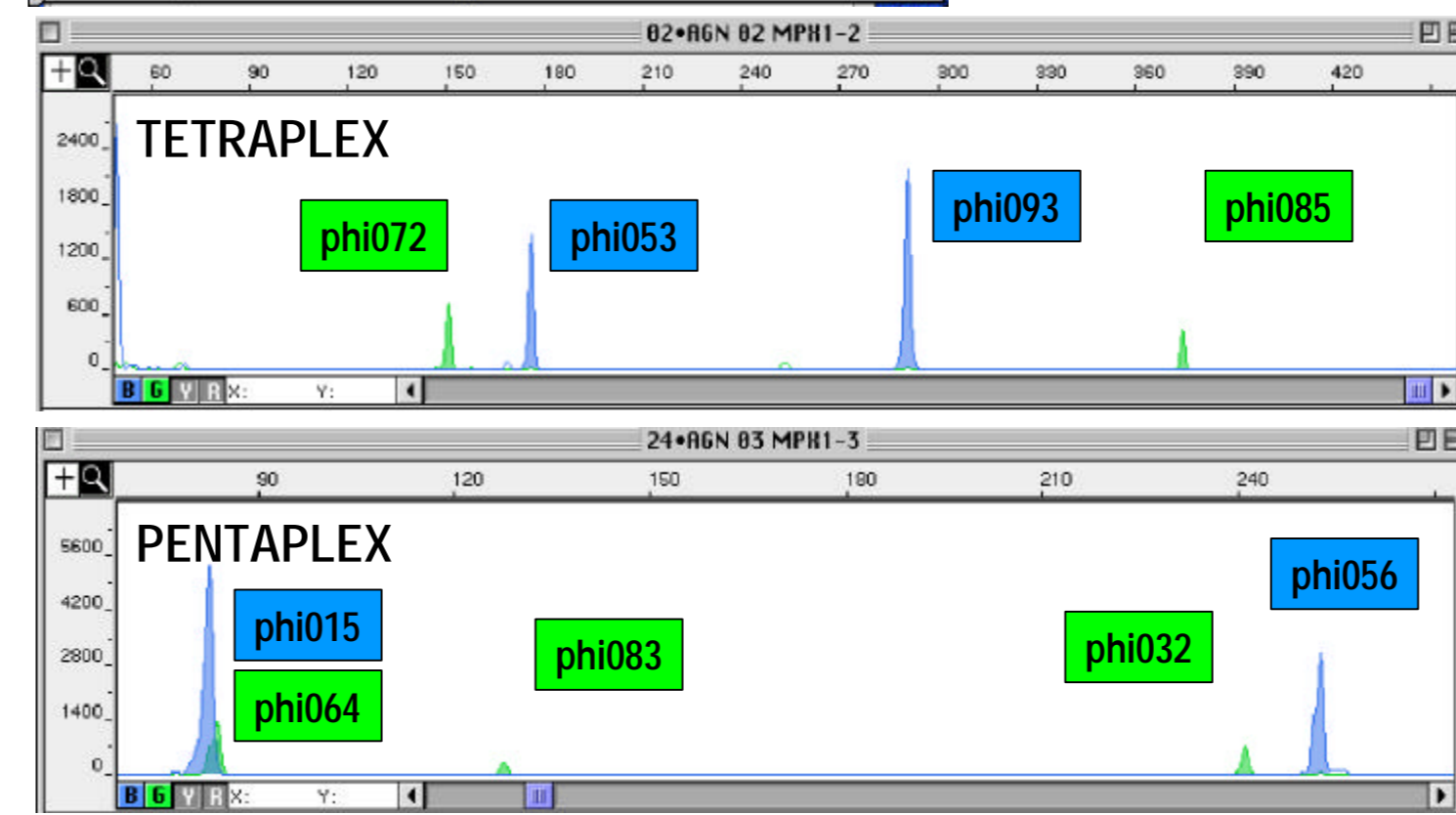


Tabela 2. ESTUDO 1: Perfis genéticos multiloco das amostras de folhas de *Zea mays* para os 09 locos microsatélites. Os genótipos constituídos de mais de um alelo estão indicados em vermelho e itálico (veja texto para descrição de cada amostra).

Loco Bin	Genótipos em pares de bases*				phi053
	phi015	phi072	phi093	phi085	
1-E	AAAB1	AAAB1	AAAB1	AAAB1	AAAB1
1-E	AAAB2	AAAB2	AAAB2	AAAB2	AAAB2
2-E	AAAB1	AAAB1	AAAB1	AAAB1	AAAB1
2-E	AAAB2	AAAB2	AAAB2	AAAB2	AAAB2
3-E	AAAB1	AAAB1	AAAB1	AAAB1	AAAB1
3-E	AAAB2	AAAB2	AAAB2	AAAB2	AAAB2
4-E	AAAB1	AAAB1	AAAB1	AAAB1	AAAB1
4-E	AAAB2	AAAB2	AAAB2	AAAB2	AAAB2
5-E	AAAB1	AAAB1	AAAB1	AAAB1	AAAB1
5-E	AAAB2	AAAB2	AAAB2	AAAB2	AAAB2
6-E	AAAB1	AAAB1	AAAB1	AAAB1	AAAB1
6-E	AAAB2	AAAB2	AAAB2	AAAB2	AAAB2
7-E	AAAB1	AAAB1	AAAB1	AAAB1	AAAB1
7-E	AAAB2	AAAB2	AAAB2	AAAB2	AAAB2
8-E	AAAB1	AAAB1	AAAB1	AAAB1	AAAB1
8-E	AAAB2	AAAB2	AAAB2	AAAB2	AAAB2
9-E	AAAB1	AAAB1	AAAB1	AAAB1	AAAB1
9-E	AAAB2	AAAB2	AAAB2	AAAB2	AAAB2

POLIMORFISMO ENTRE LOTES DE LINHAGENS TROPICAIS (GMX01 E GMX05) E LOTES DE LINHAGENS TEMPERADAS (GMX11 E GMX12)

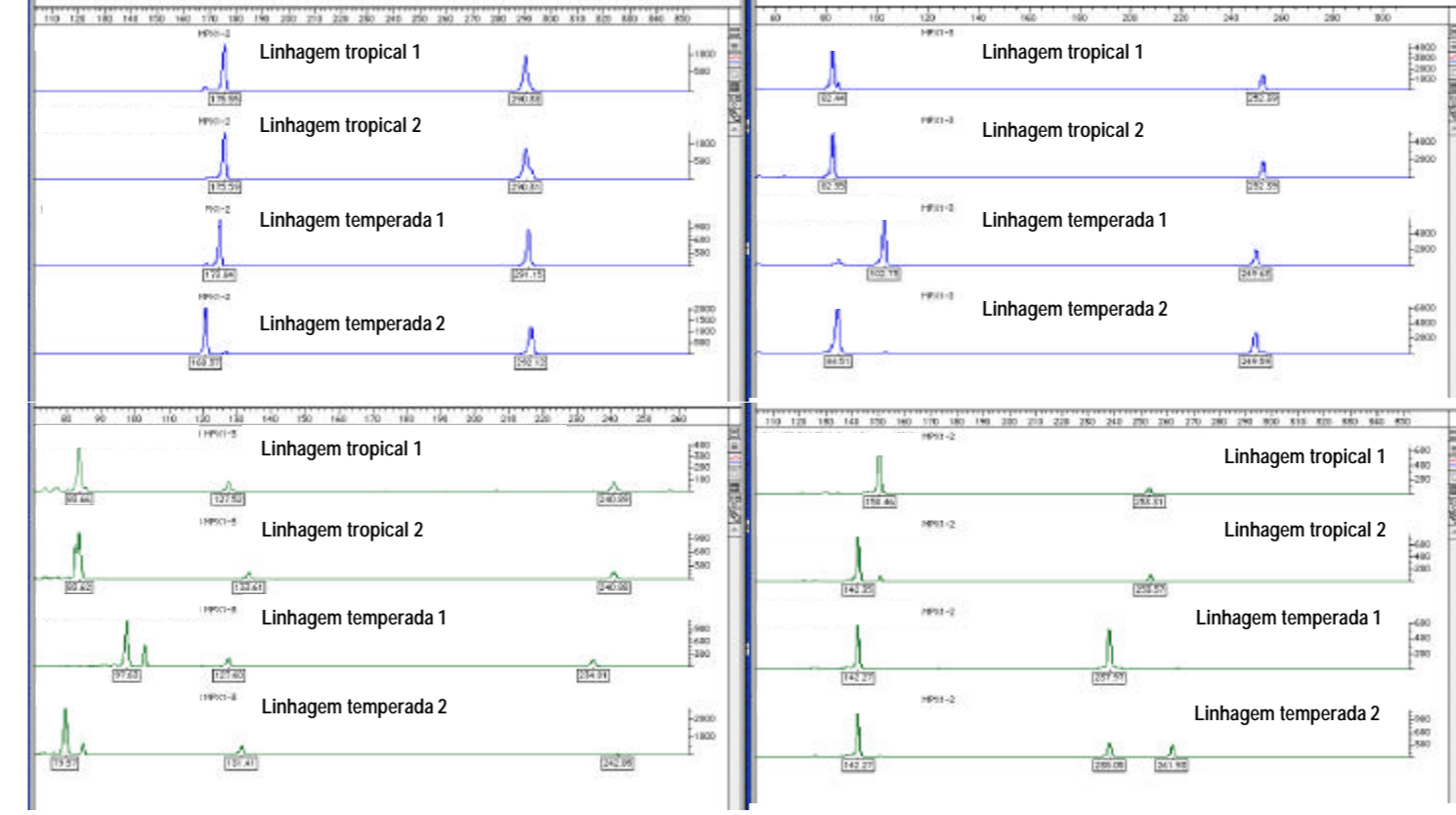


Figura 2. Detecção de polimorfismo alélico utilizando a bateria básica de nove marcadores microsatélites entre duas linhagens tropicais (perfis superiores) e duas linhagens temperadas (perfis inferiores). Observou-se também heterozigotidade residual na segunda linhagem temperada ao loco phi085.

ANÁLISE COMPARATIVA DE AMOSTRAS EM BULK DE LOTES DE SEMENTES GENÉTICAS (GMX01 a GMX03) COM UM LOTE DE SEMENTES BÁSICAS (GMX04) DA MESMA LINHAGEM

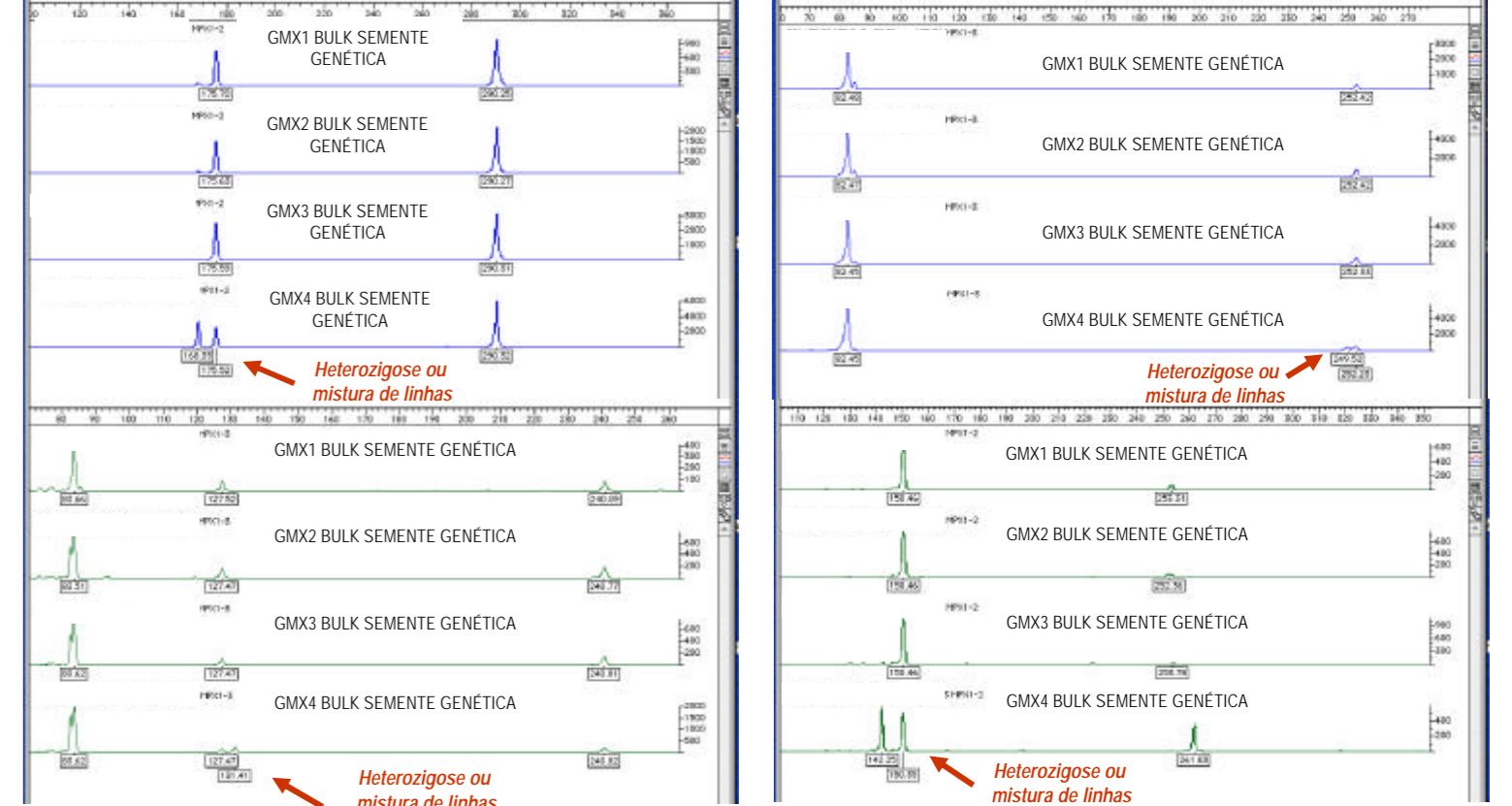


Figura 3. Análise comparativa das amostras em bulk de lotes de sementes genéticas (GMX01 a GMX03) com um lote de sementes básicas (GMX04), destacando a visualização de dois alelos no lote de sementes básicas o que poderia ser seja contaminação de pólen entre linhagens ou mistura de linhas

ANÁLISE COMPARATIVA DE AMOSTRA EM BULK COM PLANTAS INDIVIDUAIS DO MESMO LOTE DE SEMENTES BÁSICAS GMX04

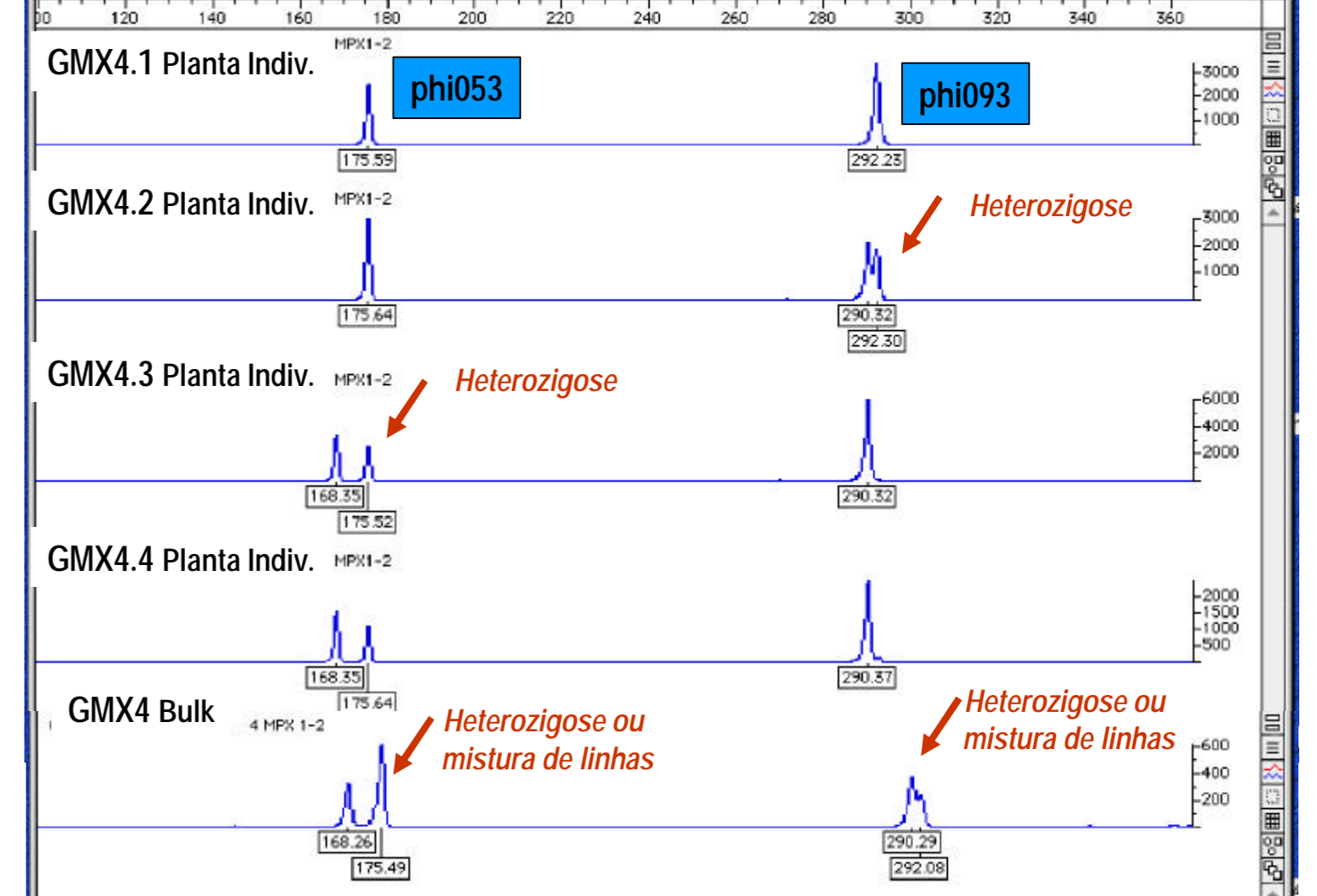


Figura 4. Resolução da base genética dos múltiplos alelos detectados na amostra em bulk: análise comparativa da amostra em bulk do lote de sementes básicas com 4 plantas individuais do mesmo lote, destacando a visualização de dois locos nos bulks foram detectados dois alelos na mesma planta ou que reflete heterozigose devido a contaminação de pólen

RESULTADOS E CONCLUSÕES - ESTUDO 2

DETERMINAÇÃO DE PUREZA DE AMOSTRAS DE SEMENTES GENÉTICAS DE LINHAGEM

Foram determinados genótipos multiloco para as cinco amostras analisadas em 22 locos microsatélites cobrindo os 20 braços cromossômicos do milho, em sistema de extração e re-extração (prova e contra-prova independentes) o que permitiu realizar as análises de pureza solicitadas. Não foram observadas diferenças genéticas (polimorfismos) entre as cinco amostras analisadas indicando se trataram de amostras da mesma linhagem ou de linhagens altamente isogênicas (Tabela 3). No cromossomo 6 foi detectada inicialmente uma evidência preliminar de mais de um alelo no loco BNLG 1600 (não relatado). Mais 4 locos microsatélites próximos foram analisados revelando que a evidência detectada era mais provavelmente derivada de uma duplicação do loco microsatélite e não uma mistura de linhas ou heterozigose. Todas as cinco amostras apresentaram homozigose em todos os 22 locos analisados (100%) indicando, portanto, uma elevada pureza genética (Tabela 3). Estes materiais são, portanto, plenamente adequados para a condução eficiente de programas de produção de sementes híbridas e/ou programas de retrocruzamento nos quais sejam requeridas linhagens puras totalmente homozigotas.

Tabela 3. ESTUDO 2: Perfis genéticos multiloco das cinco amostras de plântulas analisadas em bulk derivadas de cinco lotes de sementes genéticas de *Zea mays* para 22 locos microsatélites. O tamanho dos alelos foi declarado com base em duas análises independentes com precisão de duas casas decimais. O desenho padrão sobre estas estimativas pode chegar até 1,2 pares de bases entre experimentos independentes para mais ou para menos em função da impossibilidade de declaração exata do tamanho da molécula de DNA contendo um microsatélite mesmo em eletroforese de alta resolução em sequenciador automático

Loco Bin	Genótipos em pares de bases*				
	phi056	phi072	phi083	phi127	phi053
1-E	AAAB1	AAAB1	AAAB1	AAAB1	AAAB1
1-E	AAAB2	AAAB2	AAAB2	AAAB2	AAAB2
2-E	AAAB1	AAAB1	AAAB1	AAAB1	AAAB1
2-E	AAAB2	AAAB2	AAAB2	AAAB2	AAAB2
3-E	AAAB1	AAAB1	AAAB1	AAAB1	AAAB1
3-E	AAAB2	AAAB2	AAAB2	AAAB2	AAAB2
4-E	AAAB1	AAAB1	AAAB1	AAAB1	AAAB1
4-E	AAAB2	AAAB2	AAAB2	AAAB2	AAAB2
5-E	AAAB1	AAAB1	AAAB1	AAAB1	AAAB1
5-E	AAAB2	AAAB2	AAAB2	AAAB2	AAAB2

Loco Bin	Genótipos em pares de bases*				
	umc1257	phi093	umc1097	phi085	
1-E	AAAB1	AAAB1	AAAB1	AAAB1	AAAB1
1-E	AAAB2	AAAB2	AAAB2	AAAB2	AAAB2
2-E	AAAB1	AAAB1	AAAB1	AAAB1	AAAB1
2-E	AAAB2	AAAB2	AAAB2	AAAB2	AAAB2
3-E	AAAB1	AAAB1	AAAB1	AAAB1	AAAB1
3-E	AAAB2	AAAB2	AAAB2	AAAB2	