



**CERTIFICAÇÃO DA PUREZA  
GENÉTICA EM SEMENTES  
HÍBRIDAS DE MILHO POR MEIO DE  
MARCADORES MORFOLÓGICOS E  
MOLECULARES**

**KALINKA CARLA DE CARVALHO SALGADO**

**2001**

**KALINKA CARLA DE CARVALHO SALGADO**

**CERTIFICAÇÃO DA PUREZA GENÉTICA EM SEMENTES HÍBRIDAS  
DE MILHO POR MEIO DE MARCADORES MORFOLÓGICOS E  
MOLECULARES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção do título de "Mestre".

Orientadora

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira.

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2001

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Salgado, Kalinka Carla de Carvalho

Certificação da pureza genética em sementes híbridas de milho por meio de marcadores morfológicos e moleculares / Kalinka Carla de Carvalho Salgado. – Lavras : UFLA, 2001.

67 p. : il.

Orientador: Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Milho. 2. Semente. 3. Marcador morfológico. 4. Isoenzima. 5. Microsatélite.  
6. Pureza genética. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.153

**KALINKA CARLA DE CARVALHO SALGADO**


**CERTIFICAÇÃO DA PUREZA GENÉTICA EM SEMENTES HÍBRIDAS  
DE MILHO POR MEIO DE MARCADORES MORFOLÓGICOS E  
MOLECULARES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal  
de Lavras, como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em Agronomia,  
área de concentração em Fitotecnia, para  
obtenção do título de “Mestre”.

**APROVADA em 22 de fevereiro de 2001.**

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Édila Vilela R. Von Pinho UFLA**

**Pesq. Dr.<sup>a</sup> Cláudia Teixeira Guimarães EMBRAPA Milho e Sorgo**

  
**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira**  
**UFLA**  
**(Orientadora)**

**LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL**

Aos meus pais, Lázaro e Joana D'arc,  
e minhas irmãs, Kaline e Kênia,  
exemplos de carinho, dignidade e amor.

À toda minha família, pelo constante apoio,  
Ao Robson, pelo carinho, atenção e compreensão.

### **OFEREÇO**

Ao meu primo Fabrício (*in memoriam*),  
pelo sorriso que iluminou nossas vidas.

### **DEDICO**

Cada pessoa em sua existência pode ter duas atitudes: construir ou plantar.  
Os construtores podem demorar anos em suas tarefas,  
Mas um dia terminam aquilo que estavam fazendo.  
Então param e ficam limitados por suas próprias paredes.  
A vida perde o sentido quando a construção acaba.  
Mas existe os que plantam.  
Estes, às vezes sofrem com tempestades, com as estações, e raramente descansam.  
Mas ao contrário de um edifício, o jardim jamais pára de crescer.  
E ao mesmo tempo que exige a atenção do jardineiro,  
também permite que, para ele a vida seja uma grande aventura.  
Os jardineiros sempre se reconhecerão entre si  
porque sabem que na história de cada planta  
está o crescimento de toda a Terra.

(Paulo Coelho)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, nosso Mestre maior, que sempre guiou meus passos

À Universidade Federal de Lavras - UFLA e Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA Milho e Sorgo, pela oportunidade de realização do curso e desenvolvimento científico.

À Prof<sup>a</sup> Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira, pela amizade, orientação e apoio.

Aos professores Édila Vilela de Resende Von Pinho e Renzo Garcia Von Pinho, pelo incentivo, colaboração e amizade.

À pesquisadora Cláudia Teixeira Guimarães - "Kcal", pelo incentivo, profissionalismo e amizade.

Aos "meninos da república": Prof. Renato Mendes Guimarães e Pesquisadores João Almir de Oliveira e Antônio Rodrigues Vieira, pelas preciosas contribuições.

Aos professores Maria Laene Moreira de Carvalho e Delacyr da Silva Brandão Júnior, pela amizade e atenção sempre concedida.

Aos pesquisadores do NBA, pelo apoio e sugestões.

Ao professor Gabriel José de Carvalho e à funcionária Maria de Lourdes Carvalho, pelo apoio e incentivo.

Ao colega de curso de pós-graduação, Anderson Imolesi, exemplo de profissionalismo, amizade e dedicação.

Aos demais colegas de curso de pós-graduação, pela amizade e apoio, em particular à Lílian, Renatinha, Ebert, Guilherme, Elisa, Slivia, Ana, Dinara, Tida, Wagner, Palelo e Maria de Lourdes.

Aos funcionários do setor de sementes, Andrea e Elsa, e do NBA Ubiraci e Miguel, pela amizade e colaboração.

Aos alunos de iniciação científica, especialmente Lourenço e Rogério, pelos serviços prestados e pela amizade no decorrer do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pelo suporte financeiro.

À família "Padilha" pela acolhida e apoio em Sete Lagoas.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	i
LISTA DE FIGURAS .....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT .....	iv
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	3
2.1 Pureza genética.....	3
2.2 Marcadores morfológicos .....	5
2.3 Marcadores isoenzimáticos .....	9
2.4 Marcadores microssatélites .....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	22
3.1 Material Genético .....	22
3.2 Avaliação das características morfológicas.....	23
3.2.1 Avaliação no estágio de plântulas.....	23
3.2.2 Avaliação de plantas no campo .....	24
3.2.3 Avaliação das espigas .....	25
3.2.4 Análise dos dados .....	25
3.3 Análise eletroforética de isoenzimas .....	26
3.4 Análise de microssatélites .....	27
3.4.1 Extração de DNA de folhas.....	27
3.4.2 Extração de DNA de sementes .....	28
3.4.3 Marcadores Microssatélites .....	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	30
4.1 Marcadores morfológicos .....	30
4.2 Marcadores baseados na amplificação de microssatélites.....	44
4.3 Marcadores isoenzimáticos .....	51
4.4 Relação entre marcadores morfológicos e isoenzimáticos.....	57

<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>58</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>59</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Descrição das linhagens e dos híbridos utilizados na pesquisa. UFLA, Lavras-MG, 2001.....	22
2	Resultados percentuais de acerto e de erro na certificação da pureza genética de plantas híbridas em três épocas de avaliação. UFLA, Lavras-MG, 2001.....	32
3	Resultados percentuais de acerto e de erro da determinação da pureza genética de plantas provenientes do parental fêmea autofecundado em relação às plantas híbridas, em três épocas de avaliação. UFLA, Lavras-MG, 2001.....	32
4	Resultados médios da altura de plantas e de inserção das espigas e ângulo de inserção de folha, de linhagens e híbridos de milho. UFLA, Lavras-MG, 2001.....	39
5	Resultados do teste de Qui-quadrado ( $\lambda^2$ ) aplicados aos resultados obtidos por 3 avaliadores quando da separação dos híbridos de seus parentais macho e fêmea autofecundados, em várias épocas de avaliação. UFLA, Lavras-MG, 2001.....	43
6	Resultados do teste de Qui-quadrado ( $\lambda^2$ ) aplicados aos resultados obtidos por 3 avaliadores quando da separação do parental fêmea autofecundado dos híbridos, em várias épocas de avaliação. UFLA, Lavras-MG, 2001.....	44
7	Localização no mapa genômico e seqüência dos primers Foward/Reverse dos locos de microssatélites estudados. EMBRAPA, Sete Lagoas - MG, 2001.....	49

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Coleoptilo (A), plântula (B), espiga (C), antera (D) e primeira folha (E), do híbrido 7/4 e de seus progenitores masculino (7) e feminino (4). UFLA, Lavras-MG, 2001.....	34
2	Coleoptilo (A), plântula (B), espiga (C), antera (D) e primeira folha (E), do híbrido 8/3 e de seus progenitores masculino (8) e feminino (3). UFLA, Lavras-MG, 2001.....	36
3	Padrão de amplificação dos locos de microssatélites Bnlg2291 e Bnlg238 de híbridos e seus respectivos progenitores. EMBRAPA, Sete Lagoas – MG, 2001.....	45
4	Padrões de amplificação de locos de microssatélites de folhas e sementes individuais do híbrido UFLA 8/3 e de seu parentais macho autofecundado (UFLA 8) e fêmea autofecundado (UFLA 3). EMBRAPA, Sete Lagoas – MG, 2001.....	47
5	Perfis de bandas dos sistemas enzimáticos 6-fosfoglucomato desidrogenase (PGDH), fosfatase ácida (ACP), álcool desidrogenase (ADH), catalase (CAT), glutamato oxaloacetato transaminase (GOT), isocitrato desidrogenase (IDH), malato desidrogenase (MDH), fosfoglucomutase (PGM) e esterase (EST), extraídos de sementes, coleótilos e folhas de dois híbridos e de seus parentais macho e fêmea autofecundados. UFLA, LAVRAS-MG, 2001.....	53

## RESUMO

**SALGADO, Kalinka Carla de Carvalho. Certificação da pureza genética em sementes híbridas de milho por meio de marcadores morfológicos e moleculares. Lavras: UFLA, 2001. 67p. (Dissertação – Mestrado em Fitotecnia)\*.**

Um dos principais atributos que conferem à semente uma alta qualidade é a pureza genética, cuja principal causa de contaminação é a ocorrência de autofecundação do parental feminino. No entanto, ainda não existem metodologias seguras e rápidas para detectar tais impurezas. Desta forma, objetivando certificar a pureza genética em sementes híbridas de milho por meio de marcadores morfológicos e moleculares, o presente trabalho foi desenvolvido no laboratório de Sementes da UFLA, Lavras-MG e no Núcleo de Biologia Aplicada da EMBRAPA, Sete Lagoas-MG. Sementes de quatro linhagens e dois híbridos, provenientes do programa de melhoramento da Universidade Federal de Lavras, UFLA, foram utilizadas nesta pesquisa. A avaliação da pureza genética foi feita por marcadores morfológicos, nos estádios de plântula e planta; por padrões eletroforéticos das isoenzimas álcool desidrogenase (ADH), esterase (EST), fosfatase ácida (ACP), glutamato-oxalacetato transaminase (GOT), malato desidrogenase (MDH), isocitrato desidrogenase (IDH), 6-fosfoglucomato desidrogenase (PGDH), fosfoglucomutase (PGM), catalase (CAT) e  $\beta$ -glucosidade ( $\beta$ GLU) e por marcadores microssatélites, utilizando primers específicos para o milho. Foi observado pelos resultados, que as características morfológicas permitiram diferenciar os híbridos de seus progenitores. Dentre os sistemas enzimáticos testados, a catalase, a isocitrato desidrogenase e a esterase, permitiram separar os híbridos de seus respectivos progenitores, sendo que a esterase apresentou segregação mendeliana para o híbrido UFLA 8/3, o que torna a certificação da pureza genética mais segura. Os microssatélites além de terem se apresentado eficientes na diferenciação dos híbridos das linhagens parentais, trata-se de uma técnica de análise rápida, precisa e independente do ambiente. O teste de pureza genética não foi influenciado quando se utilizou o DNA extraído de sementes inteiras, ao invés do embrião, o que torna o teste mais rápido e de fácil execução, além de se obter uma maior quantidade de DNA por amostra.

---

\* Comitê Orientador: Dr<sup>a</sup>. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira (Orientadora), Dr<sup>a</sup>. Édila Vilela de Resende Von Pinho – UFLA, Dr<sup>a</sup>. Cláudia Teixeira Guimarães - EMBRAPA e Dr. Renzo Garcia Von Pinho – UFLA.

## ABSTRACT

SALGADO, Kalinka Carla de Carvalho. **Certification of genetic purity in hybrid seeds of corn by means of morphologic and molecular markers.** Lavras: UFLA, 2001. 67p. (Dissertation – Master in crop Science)\*

One of the main features that confer high quality to the seed is genetic purity, in which one of the major cause of contamination is the occurrence of self-fecundation of the female parent. Yet, there is no accurate and fast methodology for detecting such contamination. Thus, aiming the certification of genetic purity in corn hybrid seeds by means of morphologic and molecular markers, the present study was developed in the UFLA Seed Laboratory, Lavras – MG and in the Applied Biology Nucleus of EMBRAPA- in Sete Lagoas – MG. It was used seeds from four lines and two single cross hybrids coming from the breeding program of the Universidade Federal de Lavras, UFLA. Evaluation of genetic purity was done at seedling and plant stages by means of morphological markers; electrophoretic patterns of the isoenzymes alcohol dehydrogenase (ADH), esterase (EST), acid phosphatase (ACP), glutamate-oxaloacetate transaminase (GOT), malate dehydrogenase (MDH), isocitrate dehydrogenase (IDH), 6-phosphoglucamate dehydrogenase (PGDH), phosphoglucomutase (PGM), catalase (CAT) and B-glucosidase (BGLU), and microsatellite markers using specific primers for corn. The morphologic characteristics enabled to distinguish the single-cross hybrids from their parents, as well as the catalase, isocitrate dehydrogenase and esterase enzyme systems tested. Furthermore, esterase showed a Mendelian segregation for the hybrid UFLA 8/3, which makes the certification of genetic purity more accurate. The microsatellite markers were highly efficient for distinguishing the hybrids from their female and male parents lines. The analysis of genetic purity was not influenced by using DNA extracted from whole seeds compared with the embryos, making the test easier and faster, besides yielding a greater amount of DNA per sample.

---

\* Supervising Committee: Dr<sup>a</sup>. Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira (Major Professor), Dr<sup>a</sup>. Édila Vilela de Resende Von Pinho – UFLA, Dr<sup>a</sup>. Cláudia Teixeira Guimarães – EMBRAPA-CNPMS e Dr. Renzo Garcia Von Pinho – UFLA.

## 1 INTRODUÇÃO

↙ O desenvolvimento de uma variedade mais produtiva ou qualitativamente superior demanda muito esforço, tempo e investimento. A certificação da pureza genética torna-se uma ferramenta indispensável para assegurar aos agricultores um produto com as características genéticas desenvolvidas pelo melhorista, além de garantir a proteção da propriedade intelectual, especialmente em face da Lei de proteção de Cultivares. A aprovação no Brasil da Lei de Proteção de Cultivares nº 9456, de 25 de Abril de 1997 permite a proteção de variedades vegetais desenvolvidas nos programas de melhoramento genético, tanto pelas instituições públicas como privadas. A proteção legal do desenvolvimento de uma nova variedade é imprescindível, caso contrário, o produto desta pesquisa poderia ser imediatamente usufruído por terceiros, sem que a instituição tivesse qualquer controle sobre isto (Gratapaglia e Ferreira, 1996). Segundo a Lei, para que uma cultivar seja registrada, ela deve atender aos critérios de distinção, homogeneidade e estabilidade. Para atender a esses critérios, a nova cultivar é submetida à análise de descritores que permitirão identificá-la de modo inequívoco e aferir a sua pureza genética.

Com a finalidade de manter a pureza genética de cultivares híbridas de milho, são adotadas medidas nos sistemas de produção de sementes, das quais o isolamento dos campos de produção, a retirada do pendão do parental fêmea, a limpeza das máquinas e equipamentos são as mais conhecidas.

No campo de produção de sementes híbridas de milho, a principal causa de contaminação genética é a ocorrência de autofecundação devido à incompleta remoção do pendão do parental fêmea, o que eleva os níveis de endogamia, reduzindo a qualidade fisiológica das sementes e consequentemente, a produção de grãos.

Apesar de serem utilizadas para a certificação da pureza genética em milho, características morfológicas de sementes e de plantas, técnicas de eletroforese de isoenzimas e marcadores de DNA, se faz ainda necessário analisar os reais benefícios e o potencial dessas técnicas na identificação da contaminação de sementes provenientes dos parentais fêmea e macho autofecundados em lotes de sementes híbridas.

Desse modo, esta pesquisa foi desenvolvida com os objetivos de avaliar a eficiência de marcadores morfológicos e moleculares na certificação da pureza genética em sementes de milho dos híbridos UFLA 8/3 e UFLA 7/4 e verificar a relação entre marcadores morfológicos e isoenzimáticos utilizados na diferenciação dos híbridos e de seus progenitores.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Pureza genética

Com a globalização da economia mundial, a agricultura moderna tem exercido papel fundamental no contexto mundial, tanto como fonte de alimentação animal e humana quanto para o equilíbrio da balança comercial dos países produtores.

Um reflexo da modernização é a utilização de tecnologias avançadas, o que contribui com o aumento da produtividade agrícola. Uma das tecnologias com influência direta sobre a produtividade agrícola é a utilização de sementes com alta qualidade (Lima, 1996). A expressão “qualidade de semente”, segundo Delouche e Potts (1974), pode ser conceituada como a soma de vários atributos da semente, como pureza genética, pureza física, poder germinativo, vigor, uniformidade e sanidade. Para tais características são estabelecidos padrões que beneficiam todos os segmentos da agricultura e asseguram a sua qualidade por meio de uma série de funções e de atividades, denominados controle de qualidade (Andreoli, 1991).

Empresas produtoras de sementes de milho têm investido no controle da qualidade, monitorando todas as fases da produção com o objetivo de assegurar ao agricultor, os benefícios e atributos alcançados pelo melhoramento genético. O controle da polinização garante os efeitos da heterose, que são obtidos por meio de cruzamentos entre linhagens com boa capacidade combinatória, gerando híbridos com uma performance agrônômica satisfatória (Sprague e Heberhart, 1977). A eliminação do pólen produzido pelo parental fêmea utilizando a macho esterilidade, tratamento químico ou despendoamento manual (Smith e Wych, 1986) evita a

ocorrência de autofecundação da linhagem fêmea, que constitui a principal causa de contaminação genética (Hutchcroft, 1959).

Em um sistema de produção de sementes são adotadas normas para padrões de campo e de laboratório. Tais padrões estipulam valores máximos de mistura varietal para assegurar a pureza, a identidade e a uniformidade genética de sementes nas gerações subsequentes (Andreoli, 1992). Porém para a produção de sementes de milho no Brasil, não existem padrões de tolerância estabelecidos para porcentagem de contaminação proveniente do parental fêmea autofecundado. Segundo Von Pinho (1995), isso ocorre devido à inexistência de dados conclusivos mostrando o efeito da autofecundação do parental fêmea na qualidade fisiológica de sementes híbridas e na produção de grãos. Daí a falta de metodologias e de padrões para a identificação destas contaminações.

As conseqüências da autofecundação indesejável na produção de sementes híbridas de milho foram estudadas por Von Pinho (1995). Para este estudo, foram feitas avaliações na qualidade fisiológica de lotes de sementes de um híbrido simples, um híbrido triplo e dois híbridos duplos, contaminados nas taxas de 0, 5, 10, 20 e 100% com sementes provenientes dos parentais fêmea autofecundados. Os resultados indicaram que além da redução da qualidade fisiológica das sementes, para cada 1% de contaminação de sementes provenientes de autofecundação misturadas nas sementes híbridas houve uma redução média de 0,5% na produção de grãos dos quatro híbridos estudados. Entretanto, esse rendimento poderia sofrer uma maior redução se fosse adotado um padrão de tolerância de 6% de sementes provenientes do parental fêmea autofecundado, como é adotado em algumas empresas americanas. Ainda segundo a autora, além da redução mais significativa da produção de grãos do híbrido simples em relação aos demais híbridos, um aspecto prejudicial seria a exposição das linhagem em

lavouras comerciais, decorrente da autofecundação em campos de produção de sementes, colocando em risco o trabalho realizado durante vários anos pelos melhoristas.

Para Koranyi (1989), o controle da pureza genética na cultura de milho torna-se de grande importância em todas as fases de produção comercial de sementes híbridas e na certificação da pureza genética. Assim, diferentes técnicas têm sido utilizadas com o objetivo de determinar testes que forneçam resultados reproduzíveis dentro e entre laboratórios, que sejam rápidos, de fácil execução e de baixo custo (Payne, 1986; Smith e Register III, 1998).

## **2.2 Marcadores morfológicos**

Em alguns trabalhos têm sido ressaltada a utilização de características morfológicas na certificação da pureza genética. Em milho, tem sido de grande utilidade a expressão de xenia. Exemplo disso é a mistura de sementes de endosperma duro e amarelo com as de endosperma branco e mole. Assim, contaminações resultantes de pólen estranho podem ser identificadas nas sementes sem a necessidade de avaliação das características das plântulas e das plantas. Quando ocorre xenia, alguns procedimentos poderão ser tomados para remoção das sementes contaminantes, como a seleção visual anteriormente à secagem das espigas (Wick, 1988).

A avaliação da pureza genética por meio de características morfológicas de sementes é feita pela observação de determinadas características físicas das sementes, comparando as amostras de sementes a serem testadas com uma amostra padrão da variedade em questão. Tal análise possui várias vantagens, como a utilização de poucos equipamentos, rapidez e baixo custo para a condução dos testes (Payne, 1986). Segundo o

autor, a reprodutibilidade dos resultados entre laboratórios tem sido bem alta com este tipo de análise. Porém, a maioria das novas cultivares possui sementes com as características físicas bem semelhantes, o que faz com que a utilização dessas características seja limitada para a discriminação e controle da pureza genética.

Segundo as regras para análise de pureza da Association of Official Seed Analysts (AOSA, 1983), diante da impossibilidade de identificação da cultivar por meio de características das sementes, devem ser consideradas características das plântulas ou das plantas em crescimento. Uma das características que tem sido utilizada é a presença ou não de antocianina. Antocianinas são pigmentos flavonóides de cor púrpura presentes no coleoptilo, raiz primária, ligula, folha, colmo, estilo-estigma, gluma, antera, pericarpo, sabugo, escutelo e embrião, entre outros tecidos. Porém, um dos problemas da sua utilização como marcador morfológico na identificação de cultivares é a variação que ocorre na pigmentação em várias partes das plântulas e plantas. A genética da pigmentação de antocianina em milho é bastante complicada devido à presença de um grande número de genes e suas complexas interações. A falta de uniformidade ou total eliminação desses pigmentos durante o processo de melhoramento, faz com que a segregação e a variabilidade da expressão desses pigmentos em várias partes da planta dificultem a certificação da pureza genética (Singh e Sarkar, 1982).

Tais pigmentos, são sintetizados por vários genes, entre eles estão quatro genes regulatórios (R, B, C1 e P1). Para a formação de antocianina, é necessário que haja uma combinação alélica desses genes para que os genes estruturais sejam transcritos, ocorrendo a formação de enzimas biossintéticas que irão atuar na rota metabólica da antocianina (Cocciolone e Cone, 1993; Taylor e Briggs, 1990). Em milho, 17 locos estão envolvidos na elaboração quantitativa e distribucional de antocianina em vários tecidos da planta e

sementes. Alguns deles estão envolvidos na pigmentação de antocianina exclusivamente em plantas, em que nove locos estão diretamente envolvidos na produção, intensidade e distribuição destes pigmentos. Outros locos também atuam exclusivamente nos tecidos das sementes, sendo poucos os essenciais à formação de antocianina em todos os tecidos.

Taylor e Briggs (1990) estudaram o efeito dos locos regulatórios R, B e Pl na acumulação de antocianina em plântulas de milho, por meio da indução de luz. Os autores concluíram que somente o gene R regula exclusivamente a biossíntese de antocianina. Apenas as plântulas com alelo dominante deste loco acumularam pigmento. Embora tanto os alelos B ou Pl sozinhos ou interagidos não produzam pigmentos de antocianina, quando os alelos do gene R se encontram na forma dominante, a presença de dominância nos alelos B e Pl produzem mais pigmentos do que nos alelos recessivos b e pl.

Já Singh e Sarkar (1982) afirmam que em plantas, alguns alelos, como Pl podem induzir a síntese e a distribuição de antocianina sob baixa luminosidade, enquanto outro alelo pl tem sua atividade completamente limitada à exposição de luz. Segundo os autores, o gene B é o fator mais importante na regulação da presença ou ausência de antocianina, já a formação de pigmentação púrpura nos tecidos vegetais requer a ação complementar deste e de mais seis genes, sendo que um deles pode ser substituído pela luz. Quando o gene B possui seus alelos em homozigose recessiva, partes da planta não apresentam pigmentação púrpura ou marrom, embora certos pigmentos de alguns tecidos sejam condicionados a efeitos de alelos R, que duplicam a ação dos alelos de B.

Von Pinho et al. (1997), utilizando quatro híbridos comerciais de milho e sementes dos parentais fêmeas autofecundados, realizaram um levantamento de características morfológicas que pudessem ser utilizadas

como marcadores para a identificação de sementes provenientes do parental fêmea autofecundado. As avaliações foram feitas no estágio de plântula, em plantas com cinco a sete folhas, no florescimento, na colheita e pós-colheita. Os autores concluíram que é viável a utilização de marcadores morfológicos para a avaliação da pureza genética em alguns híbridos, sendo possível separar, por meio de características morfológicas, as plantas provenientes de auto fecundação das plantas híbridas, em três das quatro cultivares estudadas. Segundo os autores, a fase de desenvolvimento das plantas de milho, mais adequada para a avaliação da pureza genética, varia com o híbrido.

Payne (1986) cita como a principal vantagem do uso de marcadores morfológicos a possibilidade de avaliar diversas características, desde o estágio de plântula até a maturidade. Dentre essas características, pode-se citar altura de planta, cor do mesocótilo e das raízes, altura de planta, ocorrência de perfilhos, data da emissão do estilo-estigma, grau de macho esterilidade, características da palha da espiga, características dos grãos e da espiga na maturidade, que podem ser utilizadas para a certificação da pureza genética (Pauksens, 1975, Pauksens e Dhesi, 1978).

Por outro lado, a utilização de marcadores morfológicos apresenta como principais desvantagens o tempo, espaço e mão-de-obra requeridos para as avaliações; a não detecção de genes específicos que conferem resistência a pragas, doenças ou estresse ambiental (Smith e Register III, 1998) e a baixa precisão dos resultados devido à influência dos fatores ambientais (Cooke, 1984). Revila e Tracy (1995), avaliaram 34 características morfológicas em duas datas diferentes de plantio. Os resultados indicaram que 15 das 34 características avaliadas sofreram um alto efeito da data de plantio. Entretanto, segundo Goodman e Paterniani (1969) as avaliações fenotípicas devem ser feitas em diferentes condições

ambientais para selecionar descritores morfológicos que apresentem pequena interação ambiental.

### 2.3 Marcadores isoenzimáticos

↳ Outra técnica que tem sido proposta para a determinação da pureza genética em milho é a eletroforese de isoenzimas e proteínas. Em plantas, existem proteínas com um alto polimorfismo, como é o caso das proteínas de sementes. Segundo Smith e Wych (1986), o uso de perfis eletroforéticos de proteínas é mais vantajoso que o de marcadores morfológicos devido à maior precisão e à menor influência de fatores ambientais na obtenção dos resultados. O uso de técnicas eletroforéticas de proteínas tem sido sugerido na identificação de cultivares e certificação da pureza genética, por se tratar de um teste rápido e demandar pouco espaço físico.

⊙ ↳ O fato de proteínas serem produtos gênicos, torna a técnica de eletroforese de proteínas apropriada para a certificação da pureza genética (Cooke, 1995). A premissa básica adotada ao se utilizar essa técnica é que diferenças na mobilidade de proteínas sob um campo elétrico são resultantes de diferenças nas seqüências de nucleotídeos do DNA que codificam tais proteínas. Assim, assume-se que diferenças nos padrões eletroforéticos das proteínas possuem uma base genética e são herdáveis (Murphy et. al., 1990). Essa técnica tem sido usada na caracterização de linhagens de milho (Goodman e Stuber, 1980; Cardy e Kannenberg, 1982; Koranyi, 1989; Orman et al., 1991) e de híbridos (Cardy e Kannenberg, 1982; Smith, 1984; Smith, 1989).

Profissionais de companhias produtoras de sementes têm adotado tais técnicas para realizar pesquisas e auxiliar nos testes de qualidade de seus produtos desde o campo até a embalagem final (Martinez, 1990). De acordo com Payne (1986), 50% dos laboratórios filiados à AOSA utilizam

características morfológicas de sementes e de plantas de milho para a identificação varietal, sendo que os demais utilizam técnicas de isoenzimas.

x → O termo isoenzima define um grupo de múltiplas formas moleculares da mesma enzima, que ocorre em uma espécie como resultado da presença de mais de um gene codificando cada uma das enzimas (Moss, 1982). Isoenzimas desempenham a mesma atividade catalítica, mas podem ter diferentes propriedades cinéticas e ser separadas por processos bioquímicos. Isto significa que as isoenzimas de um mesmo grupo diferem entre si na seqüência de aminoácidos que possuem, o que poderá influenciar, por conseguinte, a natureza da estrutura protéica secundária, terciária e quaternária da enzima. O número de isoenzimas de uma determinada enzima está relacionado ao número de compartimentos subcelulares nos quais a mesma reação catalítica é realizada (Ferreira e Grattapaglia, 1995).

Para a identificação de cultivares e certificação da pureza genética em milho utilizando a técnica de eletroforese de isoenzimas, a AOSA (1991) recomenda vários sistemas isoenzimáticos, entre eles o da álcool desidrogenase, malato desidrogenase, esterase, fosfatase ácida e glutamato-oxalacetato transaminase. Já Orman et al. (1991) demonstraram que as isoenzimas dos sistemas fosfatase ácida, álcool desidrogenase, isocitrato desidrogenase, malato desidrogenase, 6-fosfogluconato desidrogenase, fosfoglucomutase e fosfohexoisomerase, juntamente com características morfológicas, podem ser utilizadas com sucesso na identificação de cultivares de milho.

Orman et al. (1991), comparando a exatidão e reprodutibilidade entre marcadores morfológicos e análise de isoenzimas na detecção de diferentes contaminações em linhagens de milho, observaram que as análises de isoenzimas são mais precisas, contudo a sua utilização em conjunto com as

características morfológicas torna a determinação da pureza genética em milho mais segura.

Neste sentido, Negut e Sarca (1994) realizaram um trabalho em que a porcentagem de contaminação de sementes por autofecundação e cruzamentos indesejáveis, presentes em lotes de sementes híbridas, foi estimada utilizando características morfológicas em associação com eletroforese de isoenzimas. As avaliações das características morfológicas foram realizadas nos estádios de plântula, antes e na maturidade. Segundo os autores, foram encontradas pequenas diferenças entre as análises eletroforéticas e morfológicas quando o nível de contaminação se encontrava entre 2 a 3%, sendo que o estágio de maturidade foi a melhor época para a avaliação das características morfológicas.<sup>5</sup> Os autores ressaltam, que a eletroforese de isoenzimas possui algumas vantagens sobre o uso de características morfológicas, como a rapidez, a capacidade de determinação da porcentagem de contaminação antes da colheita e a não interação do método com fatores ambientais.

Smith (1984) analisou 11 sistemas enzimáticos com o objetivo de determinar o potencial do uso de eletroforese de isoenzimas na identificação e no controle de produção de sementes híbridas de 111 cultivares americanas de milho. Segundo o autor, a variabilidade isoenzimática permitiu uma rápida análise de pureza desses híbridos em condições de laboratório, podendo assim, ser usada na caracterização de linhagens e híbridos.

O sistema enzimático de fosfatase ácida (ACP – 3.1.3.2), é codificado pelos locos Acp1, Acp2 e Acp4, porém o último possui uma baixa resolução nos géis e só ocorre em algumas populações de milho. As variações associadas ao loco Acp1 têm sido largamente estudadas, sendo sua atividade expressa no citoplasma de toda a planta, incluindo raízes, folhas, coleótilos, escutelo e pólen (Efron, 1970).

┌ A álcool desidrogenase (ADH – EC 1.1.1.1.) é uma enzima largamente distribuída entre animais, plantas e microrganismos e catalisa a reação  $R-CH_2OH + NAD \leftrightarrow R-CHO + NADH_2$  (Scandalios, 1974). Em milho, ADH apresenta dois locos fortemente ligados (Adh1 e Adh2) que se expressam durante os primeiros estágios do desenvolvimento da semente e do pólen, cuja atividade enzimática decresce durante a germinação da semente. Estes locos são muito estudados sob o aspecto de regulação da expressão gênica, porque têm uma função definida sob condições anaeróbicas (Torggler et al., 1995).

Catalase (CAT – EC 1.11.1.6) é o sistema enzimático mais estudado em plantas superiores. Embora sua rota biológica permaneça desconhecida, sua ação parece ser importante no consumo de oxigênio pelos organismos (Scandalios, 1974). As isoenzimas são codificadas por três locos, sendo que o loco Cat1 é expresso no desenvolvimento de grãos, inicialmente no endosperma e escutelo, enquanto Cat2 é expressa inicialmente no escutelo e no desenvolvimento de plântulas, durante a germinação. Já o loco Cat3 é expresso no hipocótilo, no início do desenvolvimento das plântulas em germinação (Goodman e Stuber, 1987).

As esterases (EST – EC 3.1.1.1) constituem um sistema enzimático complexo e heterogêneo, que hidrolisa ésteres de acordo com a reação  $R-COOR + HOH \leftrightarrow R-COOH + R-OH$ . Em milho, este sistema é codificado por 10 locos, sendo que as isoenzimas associadas aos locos E8 e E9 têm sido encontradas em todos os tecidos estudados da planta. Já a isoenzima do loco E10 têm sido encontradas somente em endosperma imaturo, e as do loco E4 somente em raízes de plântulas. A maior atividade desse sistema enzimático é expresso no escutelo, com E5, E6, E8 e E9 particularmente ativos (Goodman e Stuber, 1987).

A  $\beta$ -glucosidase ( $\beta$ -GLU – EC 3.2.1.21) é uma enzima importante no metabolismo de carboidratos em plantas e é conhecida por catalisar importantes reações na relação patógeno-hospedeiro em milho. Possui apenas um loco, o qual codifica enzimas que possuem atividade no citoplasma. Sua atividade tem sido encontrada inicialmente em tecidos de plântulas como raízes, mesocótilos e coleótilos.

Glutamato-oxaloacetato transaminase (GOT – EC 2.6.1.1), também conhecida como aspartato aminotransferase, catalisa a reação específica de transferência de um aminogruppo de um aminoácido ao ácido  $\alpha$  cetoglutarato para formar o ácido glutâmico e produzir cetoácido (Conn e Stump, 1980). Esta enzima tem um papel importante no metabolismo de aminoácidos. Uma outra função, também atribuída a esta enzima, é na descarboxilação via enzima do ácido málico e na transformação de aspartato em ácido oxalacético e malato durante a fixação do gás carbônico pelas plantas. Existem três locos distintos para GOT em milho (Got1, Got2 e Got3), sendo que os produtos da Got1 são expressos no glioxissomas, da Got 2 em plastideos e da Got 3 em mitocôndrias. As isoenzimas associadas ao loco Got3 migram mais que as do loco Got 2, e as do loco Got1 migram mais lentamente que as isoenzimas associadas aos outros dois locos (Goodman e Stuber, 1987).

A isocitrato desidrogenase (IDH – EC 1.1.1.42) é uma das enzimas envolvidas na oxidação do ácido cítrico. Em milho, as isoenzimas são codificadas por dois locos (Idh1 e Idh2) e são encontradas no citossol, estando presentes em todas as partes da planta, como raízes, folhas, coleótilo, escutelo e pólen (Goodman e Stuber, 1987).

A enzima malato desidrogenase (MDH – EC 1.1.1.37) está presente em uma variedade de plantas catalisando a reação  $\text{MALATO} + \text{NAD}^+ \leftrightarrow \text{OXALACETATO} + \text{ADH}^+ + \text{H}^+$ . Apresenta importantes funções fisiológicas

dentro da célula, como enzima do ciclo de Krebs e atua também como papel central na maioria das rotas bioquímicas da célula. É ainda integrante da malato, que transfere equivalentes reduzidos sobre as membranas da mitocôndria, podendo participar da fixação de gás carbônico em plantas superiores (Scandalios, 1974). As isoenzimas são codificadas por cinco locos e se encontram compartimentalizadas em pequenas organelas, mitocôndrias e no citossol. As isoenzimas presentes nas mitocôndrias e citossol se encontram ativas na raiz, endosperma, escutelo, hipocótilo, coleoptilo, folhas adultas e escutelo; e as isoenzimas associadas às pequenas organelas se encontram ativas no endosperma e escutelo do milho (Goodman e Stuber, 1987).

Fosfoglucomutase (PGM – EC 2.7.5.1) é uma das enzimas glicolíticas, codificadas por dois locos (Pgm1 e Pgm2), ativos no cloroplasto e no citoplasma. Os estudos em vários tecidos de milho, incluindo raízes, coleoptilos, folhas, escutelo e pólen, mostram que as isoenzimas PGM estão presentes em toda a planta (Goodman e Stuber, 1987).

A 6-fosfoglucomato desidrogenase (6-PGD – EC 1.1.1.44) é uma enzima da rota pentose fosfato, e suas isoenzimas em milho são codificadas por dois locos, Pgd1 e Pgd2. Entretanto, nenhuma atividade tem sido detectada nos plastídeos ou mitocôndria, sugerindo que o produto de ambos os locos são ativos no citossol. A atividade destas isoenzimas é encontrada por toda a planta de milho (Goodman e Stuber, 1987).

A utilização da variabilidade enzimática na identificação de cultivares de milho foi reportada por pesquisadores, a exemplo de Cardy e Kannerberg (1982), que utilizaram 12 sistemas enzimáticos envolvendo 22 locos em 110 linhagens e 155 híbridos comerciais de milho. Bilgen et. al. (1995), utilizando os sistemas enzimáticos álcool desidrogenase (ADH), malato desidrogenase (MDH), fosfoglucomutase (PGM) e glicose 6-fosfato

isomerase (GPI) para o monitoramento da pureza genética de linhagens e seus híbridos simples de milho, detectaram diferenças entre as linhagens e seus híbridos pelo sistema enzimático MDH. Os padrões isoenzimáticos da ADH, da PGM e da GPI, tanto para as linhagens quanto para os híbridos apresentaram-se monomórficos.

Hendrich-Sobrinho (1982) utilizou as isoenzimas álcool desidrogenase, catalase, peroxidase, esterase e fosfatase ácida como marcadores genéticos na identificação de nove linhagens de milho; o autor observou que apenas quatro locos em esterase diferenciaram as nove linhagens. Em milho, o uso de 23 locos isoenzimáticos permitiu o fingerprint de 85% das linhagens americanas públicas. Entretanto, o uso combinado de locos, aumentou o percentual de identificação de cultivares para 94% das 62 linhagens usadas no sistema de produção e de melhoramento desde o ano de 1960, caracterizados por 34 locos de isoenzimas (Smith e Smith, 1987).

Goodman e Stuber (1980) trabalharam com 13 isoenzimas com a finalidade de determinar o potencial das isoenzimas na caracterização de cultivares de milho exótico, elite e selvagem dos Estados Unidos. Os autores relataram a presença de 226 alelos para esses materiais, concluindo que os fingerprints isoenzimáticos obtidos foram capazes de identificar 86% dos 342 materiais analisados. Tal trabalho demonstrou variabilidade suficiente para a utilização de isoenzimas na identificação de cultivares de milho.

Por outro lado, Peirce e Brewbaker (1973) ressaltam que a estabilidade das isoenzimas dos diversos tecidos vegetais submetidos a condições ambientais distintas é variável e que condições variáveis de temperatura, fotoperíodo, nutrição mineral, injúria mecânica e associações com microrganismos podem influenciar a expressão isoenzimática, comprometendo os resultados.

Silva (1997) pesquisou a interferência de microrganismos associados às sementes e coleótilos nos padrões eletroforéticos dos sistemas enzimáticos álcool desidrogenase, malato desidrogenase, esterase, fosfatase ácida, peroxidase e glutamato oxaloacetato transaminase, os quais são utilizados na identificação de cultivares e certificação da pureza genética. Os estudos revelaram que os perfis eletroforéticos de coleótilos, obtidos de sementes infectadas com microrganismos, apresentam-se praticamente inalterados. Já os padrões isoenzimáticos obtidos a partir de sementes apresentam-se, de uma maneira geral, alterados em função da presença de microrganismos. Variações nos padrões eletroforéticos de isoenzimas também podem estar associadas ao processo de deterioração das sementes de milho. A perda da viabilidade de sementes, com a evolução do processo de deterioração, ocorre devido às alterações bioquímicas e metabólicas, alterando, assim, a atividade enzimática das sementes (Brandão Júnior, 1996).

→ A influência de diferentes doses de nitrogênio, aplicados durante o desenvolvimento da cultura do milho, nos marcadores morfo-agronômicos e isoenzimáticos de sementes de milho, foi estudada por Imolesi (1999). O autor observou a influência do nitrogênio sobre o número de folíolos expostos das plântulas, data de florescimento das plantas, altura das plantas, inserção da primeira espiga e alteração no padrão eletroforético da isoenzima catalase. Já os padrões eletroforéticos das isoenzimas esterase e malato desidrogenase não sofreram alterações com a adubação nitrogenada, podendo ser utilizadas na certificação da pureza genética.

## **2.4 Marcadores microssatélites**

Outras modalidades de marcadores que também têm sido apontados como ferramenta para o monitoramento rápido e eficiente da pureza genética

de sementes são os baseados na análise de DNA (Grattapaglia e Ferreira, 1996; Lanza et al., 2000). Dentre as vantagens desse tipo de marcadores, destacam-se a não influência do ambiente e do estágio fisiológico da planta, a não apresentação do efeito pleiotrópico, e o fornecimento de um número ilimitado de polimorfismo distribuído aleatoriamente ao longo de todo o genoma (Vasconcelos, 1995; Lanza et al., 2000). Como cada indivíduo possui uma composição única de seqüências de DNA em seu genoma, os marcadores moleculares podem gerar um padrão único ou uma impressão digital genética (“genetic fingerprint”) que pode ser utilizada na identificação e discriminação dos indivíduos (Grattapaglia e Ferreira, 1996).

Dentre os marcadores de DNA, os microssatélites ou SSR (“Simple Sequence Repeats”) têm se apresentado como um dos mais promissores na identificação de contaminação genética, devido ao fato de serem codominantes e multialélicos. Os resultados dos microssatélites são de fácil análise e interpretação, possuindo vários locos com potencial para gerar um perfil alélico único, ou seja, um “fingerprinting” genético, que pode ser utilizado na análise de pureza genética. Além disso, a disponibilidade de informações das seqüências dos pares de “primers” supera as dificuldades na transferência de sondas entre laboratórios (Chin et al. 1996). Os microssatélites possuem várias características desejáveis, como herança codominante; alta abundância nos genomas eucariotos; multi-alelismo; baixo custo e potencial para amplificação de sistemas multiplex, o que os torna uma técnica de fácil execução e amplamente automatizável.

A aplicação dos SSRs em plantas é relativamente recente (Bell e Ecker, 1994; Morgante et al., 1994). No entanto, já foram descritos para inúmeras espécies, incluindo soja (Rongwen et al. 1995; Diwan e Cregan, 1997), arroz (Olufowote et al., 1997), batata (Schneider e Douches, 1997), cevada (Russell et al., 1997), alface (Wiel, Arens e Vosman, 1998),

Arabidopsis (Bell e Ecker, 1994), videira (Browers et al., 1996), eucalipto (Kirst, 1999) e milho (Taramino e Tingey, 1996; Senior e Heun, 1993; Phelps et al., 1996), dentre outras.

Locos de microssatélites consistem de pequenas seqüências de 1 a 6 nucleotídeos repetidos várias vezes em tandem (Gupta et al., 1996), representando pelo menos 70% do genoma dos cereais (Henry e Weining, 1997). Os microssatélites são amplificados individualmente pela técnica de PCR, utilizando um par de "primers" específicos complementares às seqüências conservadas que flanqueiam o microssatélite. Na reação de PCR, cada fragmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo de um mesmo loco, sendo que o polimorfismo é obtido pela variação no número de seqüências repetidas (Ferreira e Grattapaglia, 1995).

Em espécies vegetais, ocorre uma grande variação quanto à freqüência e distribuição dos microssatélites no genoma. Segundo Wang et al. (1994), a freqüência de ocorrência média dos elementos repetitivos é aproximadamente de um loco para cada 64,6 mil pares de base (pb) em monocotiledôneas e um loco para cada 21,2 mil pb em dicotiledôneas, sendo que, para o milho, em média ocorre um loco de microssatélite para cada 50 mil pb (Chin et al., 1996). Em geral, os elementos repetidos mais freqüentemente em plantas são (AT)<sub>n</sub>, seguidos por (A)<sub>n</sub> e (AG)<sub>n</sub>, além dos motivos (ATA)<sub>n</sub>, (AAC)<sub>n</sub>, (AGC)<sub>n</sub>, (AAG)<sub>n</sub>, (AATT)<sub>n</sub>, (AAAT)<sub>n</sub> e (ACTC)<sub>n</sub> (Wang et al., 1994). Os mesmos autores ainda ressaltaram que os microssatélites compostos por mono, di e tetranucleotídeos estavam localizados em regiões não codificadoras do genoma, enquanto 57% dos microssatélites compostos por trinucleotídeos contendo C-G apresentavam-se posicionados em regiões codificadoras. Em contraste, as repetições trinucleotídeos (AAT)<sub>n</sub> e (TTA)<sub>n</sub> se encontravam apenas em regiões não codificadoras.

Chin et al. (1996), estudando a presença e a distribuição dos microssatélites em milho com base nas informações das seqüências depositadas no GenBank e no EMBL, identificaram 200 locos de microssatélites potenciais dentre as 576 seqüências examinadas, avaliando nove linhagens de milho de diversos pedigrees. Dentre os locos microssatélites, 69 apresentaram polimorfismos moderados gerando 2 a 4 alelos, sendo que os motivos  $(AG/TC)_n$ ,  $(CCT/GGA)_n$  e  $(CCG/GGC)_n$ , foram os mais abundantes.

Olufowote et al. (1997) diferenciaram 71 cultivares de arroz por meio de dados fenotípicos, de RFLP e de microssatélites. De uma maneira geral, os microssatélites apresentaram um grande número de alelos e foram capazes de discriminar indivíduos proximalmente relacionados, sendo mais eficientes para a caracterização das cultivares. Também Smith et al. (1997), comparando dados de RFLP, de microssatélites e de pedigree na caracterização de linhagens de milho, concluíram que os microssatélites apresentaram um maior poder de discriminação e excederam a capacidade do RFLP na avaliação da diversidade genética e no suporte da Proteção da Propriedade Intelectual.

Em uma pesquisa feita com 35 cultivares de soja, distribuídas em quatro grupos de maturidade, Diwan e Cregan (1997) utilizaram 20 locos microssatélites com motivos di e trinucleotídeos, os quais distinguiram facilmente as cultivares dentro dos grupos avaliados. Adicionalmente, tais locos foram capazes de distinguir outras sete cultivares de soja, consideradas idênticas em uma avaliação utilizando 17 sondas de RFLP. Segundo os autores, a alta diversidade genética dos marcadores microssatélites possibilitam a identificação rápida de genótipos muito próximos de soja, podendo ser utilizados no sistema de proteção intelectual do material.

Em macieira, os motivos (GA)<sub>15</sub> e (GT)<sub>15</sub> são abundantes, ocorrendo aproximadamente a cada 120 e 190Kb, respectivamente. Os “primers” para estes locos de microssatélites foram capazes de amplificar segmentos de DNA de 21 cultivares diferentes. A maioria das marcas foi altamente polimórfica e mostrou herança mendeliana simples, embora cerca de 25% das marcas gerassem padrões de bandas complexos, consistentes com a amplificação de mais de um loco, e três microssatélites foram suficientes para diferenciar todas as 21 cultivares (Guilford et al., 1997).

Powell et al. (1996) selecionaram 12 linhagens (duas de *Glycine soja* e dez de *G. max*), que representavam 92% do total da variabilidade detectada e avaliaram este grupo em função de 11 microssatélites. Os resultados foram comparados com 25 acessos de *Glycine soja*, oriundos de seis diferentes regiões, e com 12 acessos de *Glycine max*. O grupo selecionado representou apenas 40% da variabilidade nos 11 locos de microssatélites. Os agrupamentos feitos a partir de índices de similaridade permitiram a separação de *Glycine soja* e *Glycine max*.

Rongwen et al. (1995) avaliaram 96 cultivares de soja com sete locos de microssatélites, e destas somente duas cultivares apresentaram perfis de bandas idênticos, devido ao fato de possuírem pedigree similares. Os autores acreditam que, com a seleção de outros locos de microssatélites com alto polimorfismo, será possível a distinção de cultivares, mesmo com pedigree similares.

Onze locos de microssatélites foram usados para examinar 24 genótipos de cevada, sendo que três combinações separadas, com quatro microssatélites cada, distinguiram todos os genótipos de cevada (Russel et al. 1997). A estabilidade dos microssatélites ao longo de diferentes gerações foi demonstrada por meio da análise de pedigree para a cultivar de cevada

Golden Promise, resolvendo conflitos de publicações com relação ao parentesco dessa cultivar.

Embora a maioria dos trabalhos indique que os dinucleotídeos constituem a classe mais freqüente e polimórfica de microssatélites entre as espécies de plantas estudadas, estes elementos repetitivos freqüentemente produzem bandas múltiplas (bandas “stutter”), o que torna bastante difícil a determinação precisa do tamanho dos alelos. Os tri e tetranucleotídeos apresentam uma freqüência menor destes artefatos (Chin et al., 1996). Segundo Litt e Luty (1989), as bandas mais fortes de cada linha do perfil eletroforético correspondem ao alelo, sendo que as bandas situadas acima destas, provavelmente resultam do movimento lento das fitas que contêm os dinucleotídeos, e as bandas menores podem ser conseqüências de falhas da Taq polimerase sobre a fita molde durante a reação de PCR.

Uma grande desvantagem dos microssatélites é o desenvolvimento dos pares de “primers” específicos, que requer a construção de bibliotecas genômicas enriquecidas com os microssatélites, clonagem e seqüenciamento destes e o desenho dos “primers” complementares às regiões conservadas que flanqueiam os microssatélites (Ferreira e Grattapaglia, 1995). Entretanto, uma vez desenvolvidos, a geração dos marcadores torna-se fácil e rápida, envolvendo a amplificação por PCR e um sistema de eletroforese para resolução dos fragmentos gerados. Lanza et al. (2000) ressaltam que com o aumento da disponibilidade de “primers” de microssatélites para várias espécies, será possível obter um padrão único para cada cultivar, possibilitando com isso sua utilização em processos de identificação de cultivares. Atualmente, encontram-se disponíveis em torno de 1400 primers SSR para milho, cuja seqüência e posição no genoma estão publicamente disponíveis no “Maize Genome DataBank”.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram conduzidos nos Laboratórios de Análise de Sementes e de Biotecnologia e na área experimental do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e no Núcleo de Biologia Aplicada da EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.

#### 3.1 Material Genético

Foram utilizadas sementes de dois híbridos simples e das quatro linhagens parentais, provenientes do programa de melhoramento de milho do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras-UFLA, como descritos na Tabela 1.

TABELA 1. Descrição das linhagens e dos híbridos utilizados na pesquisa. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Linhagens	Ciclo	Grão	Porte
UFLA 3	Normal	Semi-duro	Alto
UFLA 4	Super-precoce	Semi-duro	Médio
UFLA 7	Precoce	Duro	Baixo
UFLA 8	Precoce	Duro	Médio
Híbridos			
UFLA 7/4*	Super-precoce	Semi-duro	Alto
UFLA 8/3*	Precoce	Semi-duro	Alto

\* O numerador refere-se a linhagem utilizada como parental masculino e o denominador a linhagem utilizada como parental feminino.

## **3.2 Avaliação das características morfológicas**

### **3.2.1 Avaliação no estágio de plântulas**

Para a caracterização das plântulas, as sementes híbridas e as das linhagens foram semeadas em caixas plásticas contendo areia e solo na mesma proporção, totalizando 50 sementes por caixa, em quatro repetições. Em seguida, estas foram colocadas para germinar em uma câmara de crescimento, na presença de luz. A avaliação foi realizada quando os dois folíolos se encontravam totalmente desenvolvidos.

Neste estágio foram avaliadas as características cores da bainha da primeira folha, da nervura central e do coleoptilo, que são relacionadas com presença e intensidade de antocianina. Também foi avaliada a forma dos folíolos.

Para a avaliação dos três indivíduos, foram formadas 3 parcelas de 50 plântulas cada. Cada parcela continha 10 plântulas provenientes da linhagem parental fêmea autofecundado, 10 da linhagem parental macho autofecundado e 30 do híbrido. As plântulas foram arrancadas quando os dois folíolos se encontrarem totalmente desenvolvidos. Os três avaliadores, previamente informados das características que deveriam ser observadas, avaliaram cada plântula, julgando quais eram provenientes de sementes híbridas e quais eram provenientes dos parentais fêmea e macho autofecundados.

### **3.2.2 Avaliação de plantas no campo**

Para a caracterização das plantas híbridas e das linhagens, foi instalado um experimento em blocos ao acaso, com quatro repetições. Cada parcela foi constituída por 4 linhas de 5 m de comprimento, para cada tratamento, sendo que as duas linhas externas foram usadas como bordadura. A densidade de plantio foi de 5 plantas/metro, totalizando 80 plantas na parcela útil.

Após um mês do plantio, foram avaliadas a cor do limbo foliar e da bainha das duas primeiras folhas. No florescimento foram avaliados as alturas de plantas e espigas; o ângulo de inserção da folha logo acima da primeira espiga, pela utilização de um transferidor; a cor do limbo foliar; as cores dos estilo-estigmas, das anteras, das glumelas; o formato do pendão e a data de florescimento.

Em outra área experimental, foram semeadas 4 linhas com 100 plantas cada, sendo 80 plantas híbridas e 10 plantas de cada uma das linhagens parentais, com a finalidade de serem submetidas a avaliação pelos três avaliadores.

Os locais que continham sementes das linhagens parentais foram identificados em croqui. Foram instaladas linhas contendo, separadamente, plantas provenientes das linhagens parentais e das plantas híbridas, para servirem como padrão durante a visualização das características a serem usadas na separação do híbrido dos seus parentais fêmea e macho autofecundados. As avaliações foram realizadas por três avaliadores que desconheciam a porcentagem existente de plantas híbridas e plantas provenientes dos parentais fêmea e macho autofecundados. As plantas foram avaliadas individualmente e o avaliador apontava as plantas que julgava serem híbridas, fêmeas ou macho autofecundadas.

### **3.2.3 Avaliação das espigas**

Inicialmente foi feita uma caracterização do formato da espiga, tipo e cor dos grãos de 15 espigas provenientes de plantas híbridas e 15 espigas provenientes de cada uma das linhagens parentais . Posteriormente, para cada híbrido, foram montadas 3 parcelas contendo 24 espigas provenientes de plantas híbridas e 5 espigas provenientes de cada uma das linhagens parentais.

Duas espigas de cada cultivar foram utilizadas como padrão de comparação para as características a serem avaliadas. As avaliações foram realizadas por três avaliadores que desconheciam a porcentagem existente de espigas provenientes dos parentais macho e fêmea autofecundados, sendo estas avaliadas individualmente, e o avaliador apontava as espigas que julgava serem provenientes de cada cultivar.

### **3.2.4 Análise dos dados**

A análise dos dados de ângulo de inserção de folhas, altura de plantas e espiga foi realizada com o auxílio do “software” SISVAR. A comparação das médias foi feita pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Foram calculadas as porcentagens de acerto e de erro e o desvio padrão da média dos resultados obtidos nas avaliações das quatro repetições do florescimento e nas três repetições do estágio de plântulas e das espigas, obtidas pelos três avaliadores, conforme PIMENTEL GOMES (1987).

Para verificar a significância dos desvios ocorridos entre os resultados obtidos pelos avaliadores, foi utilizado o teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ).

Neste teste, os desvios foram transformados em um único valor de  $\lambda^2$ , representando a medida padronizada da magnitude dos desvios (Ramalho et al., 1990).

O valor de  $\lambda^2$  foi estimado pela seguinte expressão:

$$\lambda^2 = \sum (F_o - F_e)^2 / F_e$$

sendo :

$F_o$  : frequência observada de plantas provenientes de sementes da linhagem parental fêmea autofecundado

$F_e$  : frequência esperada de plantas provenientes de sementes da linhagem parental fêmea autofecundado.

Os dados de frequência esperada e observada foram obtidos da média de quatro repetições para cada avaliador.

### 3.3 Análise eletroforética de isoenzimas

Foram utilizadas amostras de 50 coleótilos, 50 folhas e 50 sementes de cada híbrido e das linhagens parentais fêmea e macho. Para a extração da fração protéica das folhas e coleótilos, 50 sementes foram germinadas em uma câmara de crescimento, na presença de luz, em caixas plásticas contendo areia e solo na mesma proporção, por um período de sete dias. As sementes, coleótilos e folhas foram triturados a frio em moinho refrigerado. O pó obtido foi armazenado em freezer a  $-84^\circ\text{C}$ . A extração da fração protéica foi efetuada adicionando, a 100 mg do pó, 200 $\mu\text{l}$  do tampão de extração Tris-HCl 0,2M pH 8,0 e o homogeneizado foi mantido por 24h em geladeira. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 16.000 xg a  $4^\circ\text{C}$  por 30 minutos. Foram aplicados 40 $\mu\text{l}$  da fração protéica extraída de sementes e 60 $\mu\text{l}$  da extraída dos coleótilos e folhas, em géis de poliacrilamida a 7,5%

(gel separador) e 4,5% (gel concentrador). A corrida eletroforética foi realizada a 12mA no gel concentrador e 24mA no gel separador.

Posteriormente, os géis foram revelados para os sistemas enzimáticos: álcool desidrogenase (ADH), esterase (EST), fosfatase ácida (ACP), glutamato-oxalacetato transaminase (GOT), malato desidrogenase (MDH), isocitrato desidrogenase (IDH), 6-fosfoglucomato desidrogenase (PGDH), fosfoglucomutase (PGM), catalase (CAT) e  $\beta$ -glucosidade ( $\beta$ GLU), de acordo com a metodologia descrita por Alfenas (1991).

### **3.4 Análise de microssatélites**

#### **3.4.1 Extração de DNA de folhas**

O DNA foi extraído de folhas provenientes de 50 plântulas de cada híbrido e de cada parental fêmea e macho autofecundado. Após a maceração das folhas em nitrogênio líquido, foram adicionados, a 5 gramas do tecido verde, 10ml do tampão de extração CTAB 2% (CTAB 2%; 1M Tris-HCl pH 7,5; 0,5mM de EDTA pH 8,0; 5M NaCl), com adição de 2% de  $\beta$  mercaptoetanol e incubado a 65°C por 90 minutos. Ao final deste período, foram adicionados 5ml de mistura clorofórmio-álcool octanol (24:1) para a obtenção de uma emulsão, que foi, posteriormente centrifugada, a 735 xg. O sobrenadante foi retirado, sendo adicionados 6 ml de isopropanol gelado para a precipitação dos ácidos nucleicos. O precipitado foi dissolvido em 3ml de TE pH 8,0 (Tris-HCl 0,1mM, EDTA 0,1mM). Logo em seguida, foram adicionados 30  $\mu$ l de RNase (10mg/ml) e o precipitado foi incubado a 37°C por 1 hora. O DNA foi então precipitado com álcool etílico 95%, lavado com etanol 70% e posteriormente ressuspensionado em 500  $\mu$ l de TE.

As amostras tiveram a concentração de DNA determinada em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio utilizando padrões de DNA com concentrações conhecidas, e visualizados sob luz ultra-violeta.

### **3.4.2 Extração de DNA de sementes**

O DNA foi extraído de sementes individuais dos híbridos e de seus respectivos parentais autofecundados. Após a maceração das sementes, foram adicionados, a 200 mg do pó, 200 µl do tampão de extração (100mM Tris-HCl pH8,5; 100mM NaCl; 20mM EDTA pH 8,0 e 1% de Sarcosyl), obtendo-se um homogeneizado que ficou em repouso por 10 minutos. Ao final deste período, foram adicionados 600 µl de fenol, com agitação vigorosa por 5 minutos, seguidos de uma centrifugação a 16000 xg por 10 minutos. Ao sobrenadante foram adicionados 5 µl de RNase (10mg/ml), com posterior incubação a 37° C por 1 hora. Após este período, foram adicionados 400 µl de isopropanol gelado, incubando-se a -80 °C por 30 minutos e centrifugando a 16000 xg por 10 minutos. O precipitado foi lavado com 500 µl de etanol 70% por 5 minutos e ressuscitado em 50 µl de água.

As amostras tiveram a concentração de DNA determinada em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio utilizando padrões de DNA com concentrações conhecidas, e visualizados sob luz ultra-violeta.

### **3.4.3 Marcadores Microssatélites**

Os “primers” de microssatélite foram adquiridos da Research Genetics, Inc. (Huntsville, AL, USA), cujas seqüências estão publicamente disponíveis no “Maize Genome DataBank”

(<http://www.agron.missouri.edu/ssr.htm>). As reações de PCR consistiram de 10ng de DNA; 0,6  $\mu$ M de cada primer; 100 $\mu$ M de cada dNTP; 10 mM Tris-HCl (pH 8,6); 50 mM KCl; 2mM MgCl<sub>2</sub> e 1 U da enzima Taq polimerase, em um volume total de 10 $\mu$ l. As amplificações foram realizadas no termociclador Perkin Elmer 9600, com uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos, seguida por nove ciclos de 94°C por 20 segundos, 68°C por 20 segundos e 72°C por 20 segundos, com a redução da temperatura de anelamento de 1°C a cada ciclo até atingir 60°C, seguidos por mais 25 ciclos com a temperatura de anelamento de 60°C e uma etapa final de 72°C por 5 min.

Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 4% por eletroforese a 100V por 3h. Os géis foram corados com brometo de etídio (0,5 $\mu$ g/ml), visualizados sob luz ultravioleta e as imagens captadas pelo sistema Eagle Eye de foto-documentação.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Marcadores morfológicos**

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados médios dos percentuais de acerto e erro, obtidos nas identificações dos híbridos em relação aos parentais fêmea e macho autofecundados, e na Tabela 3 estão os resultados médios dos percentuais de acerto e erro obtidos nas identificações de plantas da linhagem parental fêmea autofecundada em relação às plantas híbridas.

Na diferenciação de plantas híbridas em relação aos parentais macho e fêmea autofecundados, a maior porcentagem de acerto foi observada durante a avaliação de espigas para o híbrido UFLA 8/3. Já para o híbrido UFLA 7/4, o estágio de plântula foi mais eficiente para a diferenciação dos híbridos de seus respectivos parentais. Apesar dos avaliadores conseguirem a total identificação de plântulas híbridas, o que gerou uma porcentagem de acerto de 100%, algumas plântulas provenientes dos parentais macho e fêmea foram computadas como plantas híbridas, o que gerou um erro de 0,74% na identificação do híbrido (Tabela 2).

A avaliação do híbrido UFLA 8/3 feita em espigas, permitiu a total separação das espigas provenientes de plantas da linhagem parental fêmea autofecundada, das espigas provenientes de plantas híbridas, com uma porcentagem de acerto de 100% e uma porcentagem de erro de 0% (Tabela 3). Para o híbrido UFLA 7/4, tanto no estágio de plântula quanto no estágio de florescimento foi observada uma porcentagem de acerto de 100% e nenhuma porcentagem de erro, apresentando esses estádios precisos para a avaliação da pureza genética neste híbrido. A principal característica que permitiu a total diferenciação nestes estádios foi a ausência de pigmentos (antocianina) em toda a plântula e planta da linhagem parental fêmea,

diferentemente das plantas e plântulas da linhagem parental macho e do híbrido, que apresentavam pigmentação (antocianina). Segundo Singh e Sarkar (1982), a genética da pigmentação de antocianina em milho é bastante complicada devido à presença de um grande número de genes e suas interações. Provavelmente houve uniformidade desses pigmentos durante o processo de melhoramento dos híbridos e linhagens pertinentes a pesquisa, não ocorrendo assim, segregação e variabilidade da expressão desses pigmentos em várias partes da planta, o que dificultaria a certificação da pureza genética. Assim, apesar da estabilidade da expressão de pigmentos de antocianina ter permitido a sua utilização na diferenciação dos híbridos de seus parentais no presente trabalho, a complexidade genética envolvida na expressão desses pigmentos faz com que nem todos híbridos possam ser distinguidos com base em tal característica.

A escolha do estágio para a análise da pureza genética depende do objetivo da avaliação. Segundo Von Pinho et. al. (1997), em um programa de controle de qualidade na produção de sementes de milho, é mais interessante a identificação de contaminantes no estágio de plântulas, por permitir a análise da pureza genética após a colheita e antes da comercialização das sementes. Por outro lado, a avaliação em estádios mais avançados permite a aferição do trabalho de despendoamento nos campos de produção, podendo orientar alterações metodológicas em safras subsequentes.

**TABELA 2.** Resultados percentuais de acerto e de erro na certificação da pureza genética de plantas híbridas em três épocas de avaliação. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Híbrido		Épocas de avaliação		
		Plântula	Florescimento	Espiga
UFLA 8/3	% acerto	94,07 ± 0,38*	100 ± 0,00	100 ± 0,00
	% erro	12,82 ± 2,22	1,69 ± 0,29	0,00 ± 0,00
UFLA 7/4	% acerto	100 ± 0,00	99,13 ± 0,14	99,50 ± 0,19
	% erro	0,74 ± 0,38	1,81 ± 0,14	1,38 ± 0,58

\* Desvio padrão da média

**TABELA 3.** Resultados percentuais de acerto e de erro da determinação da pureza genética de plantas provenientes do parental fêmea autofecundado em relação às plantas híbridas, em três épocas de avaliação. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Híbrido		Épocas de avaliação		
		Plântula	Florescimento	Espiga
UFLA 8/3	% acerto	99,33 ± 1,15*	79,72 ± 0,41	100 ± 0,00
	% erro	13,33 ± 2,31	28,37 ± 0,53	0,00 ± 0,00
UFLA 7/4	% acerto	100 ± 0,00	100 ± 0,00	95,56 ± 0,38
	% erro	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	6,86 ± 0,58

\* Desvio padrão da média

A caracterização morfológica efetuada no estágio de plântula (Figura 1), permitiu a diferenciação dos híbridos dos seus respectivos progenitores. A

A caracterização morfológica efetuada no estágio de plântula (Figura 1), permitiu a diferenciação dos híbridos dos seus respectivos progenitores. A linhagem UFLA 7 possui pigmento (antocianina) na nervura central, na bainha da primeira folha e no coleoptilo; as suas folhas são de coloração verde-escuro e sua primeira folha é lanceolada. O híbrido UFLA 7/4 apresenta estrias na segunda folha, semelhantes às do parental fêmea (linhagem UFLA 4), a coloração da folha é verde intermediário, mais claro do que a do parental macho e mais escuro do que a do parental fêmea. A bainha da primeira folha e o seu coleoptilo apresentam pigmento (antocianina). A linhagem UFLA 4 apresenta folha mais alveolada, com estrias verde-escuras, não coincidentes com as nervuras, alternadas com estrias verde-claras. Uma outra característica desta linhagem é a ausência total de pigmento (antocianina) na plântula.

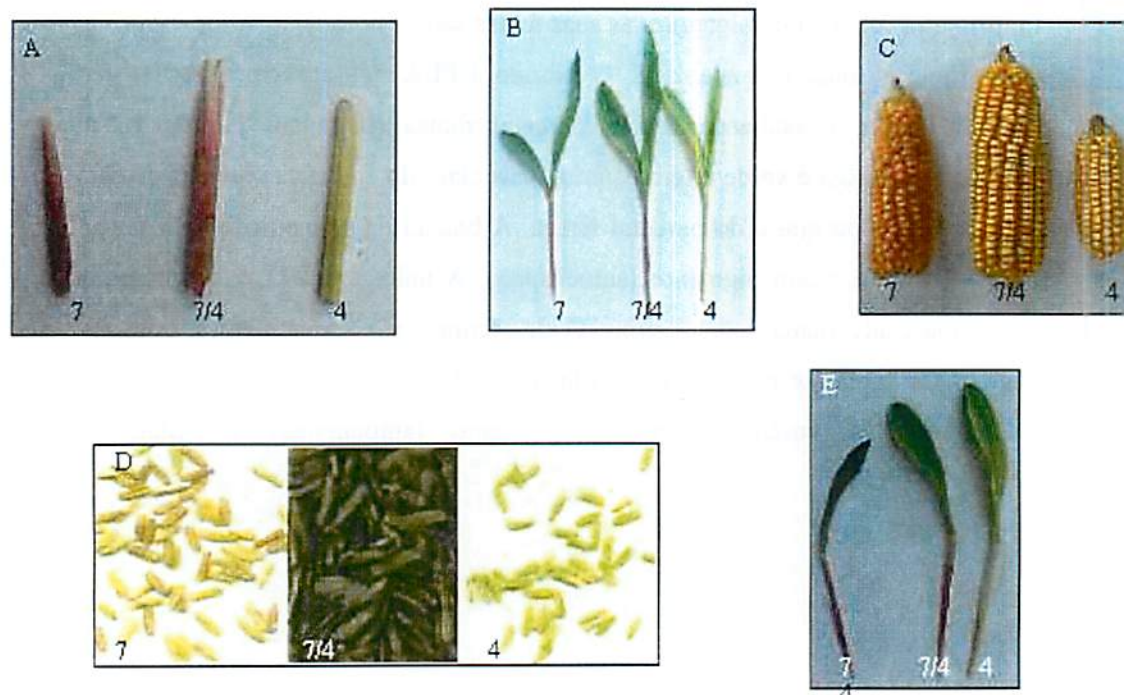


FIGURA 1. Coleoptilo (A), plântula (B), espiga (C), antera (D) e primeira folha (E), do híbrido 7/4 e de seus progenitores masculino (7) e feminino (4). UFLA, Lavras-MG, 2001.

A linhagem UFLA 8 (Figura 2) apresenta coleoptilo com pigmentação (antocianina) pouco intensa, a segunda folha lanceolada, com estrias verde-escuras e verde-claras, não coincidentes com as nervuras. A margem das folhas apresenta uma linha fina com pigmento (antocianina) semelhante ao híbrido. A bainha da primeira folha tem mais pigmento (antocianina) do que a do híbrido e da linhagem UFLA 3. O híbrido UFLA 8/3 tem a forma da folha semelhante a do parental fêmea, o coleoptilo apresenta pigmentação mais intensa do que os pais, e as estrias nas folhas idênticas às dos pais. A bainha da primeira folha possui uma intensidade de pigmentação (antocianina) intermediária em relação à dos pais. Além dessas características diferenciais observadas, o híbrido teve um desenvolvimento maior que as linhagens progenitoras. A linhagem UFLA 3 apresenta a segunda folha com a ponta mais arredondada, estrias verde-escuras e verde-claras, não coincidentes com as nervuras, mas estas estrias não são tão destacadas como as do híbrido e as do parental macho. O coleoptilo e a bainha da primeira folha apresentam pigmentação menos intensa do que na linhagem UFLA 8 e no híbrido UFLA 8/3, e a margem e a nervura central da primeira folha não apresentam pigmentação.



FIGURA 2. Coleoptilo (A), plântula (B), espiga (C), antera (D) e primeira folha (E), do híbrido 8/3 e de seus progenitores masculino (8) e feminino (3). UFLA, Lavras-MG, 2001.

Para o híbrido UFLA 7/4, houve uma porcentagem de acerto de 100%, tanto na identificação das plântulas híbridas em relação aos parentais autofecundados como na separação da linhagem parental fêmea autofecundada das plântulas híbridas. Neste estágio de plântula, as principais características utilizadas pelos avaliadores para a separação das plantas foram a ausência de pigmentação (antocianina) na linhagem fêmea autofecundada; ausência de estrias na segunda folha lanceolada da linhagem macho autofecundada e presença de estrias na segunda folha alveolada do híbrido (Figura 1).

No estágio de plântula, para o híbrido UFLA 8/3 foi observada uma porcentagem de acerto de 94,07% na identificação das plântulas híbridas em relação às linhagens parentais fêmea e macho, e de 99,33% na separação da linhagem fêmea autofecundada das plântulas híbridas. As principais características utilizadas pelos avaliadores para a separação foi a ausência de pigmentação (antocianina) na margem das folhas das plântulas do parental fêmea autofecundado, na segunda folha lanceolada nas plântulas do parental macho autofecundado e na segunda folha alveolada nas plântulas híbridas (Figura 2).

Na caracterização aos 30 dias após a semeadura, a linhagem UFLA 4 não apresentou pigmentação na bainha das duas primeiras folhas e o limbo foliar apresentou-se com um verde de intensidade mais claro, o que permitiu diferenciá-la da linhagem UFLA 7 e do híbrido UFLA 7/4. Entretanto, não foi possível diferenciar os dois últimos, uma vez que ambos apresentaram pigmentação na bainha das duas primeiras folhas e limbo foliar com uma coloração verde mais escura. Apesar do híbrido UFLA 8/3 ter apresentado folhas com um limbo mais escuro que seus progenitores, a presença de pigmentos (antocianina) na bainha das duas primeiras folhas não permitiu a diferenciação dos seus progenitores.

No florescimento, plantas provenientes da linhagem UFLA 4 não possuíam pigmento no estilo-estigma, glumas e anteras, ao passo que a linhagem UFLA 7 apresentou pigmentação no estilo-estigma e nas glumas, sendo menos intensa nas anteras. O híbrido apresentou pigmentação no estilo-estigma e nas anteras, com maior intensidade nas extremidades desta última. As glumas apresentaram-se arroxeadas e esverdeadas, o que dificulta a avaliação. O estilo-estigma da linhagem UFLA 3 apresentou uma coloração rosada na ponta, provavelmente devido à presença de pigmento (antocianina); no entanto, as glumas e anteras são verdes, devido à ausência de pigmento (antocianina). Já o híbrido UFLA 8/3 e a linhagem UFLA 8 possuem uma coloração violeta intensa em todo o estilo-estigma. As glumas e anteras apresentam uma cor violeta semelhante (Figura 2.); entretanto, o pendão do híbrido é mais ramificado e o da linhagem UFLA 8 apresenta-se mais fechado e ereto, permitindo a diferenciação do híbrido do progenitor masculino.

As plantas híbridas floresceram 3 a 6 dias antes das progenitoras. Pelo ângulo de inserção das folhas foi possível diferenciar o híbrido UFLA 7/4 dos seus progenitores, o mesmo não sendo possível com o híbrido UFLA 8/3. O híbrido UFLA 7/4 apresenta altura de espiga maior do que seus progenitores masculino e feminino, já no híbrido UFLA 8/3 essa característica não o diferiu do seu parental fêmea (Tabela 4).

**TABELA 4. Resultados médios da altura de plantas e de inserção das espigas e ângulo de inserção de folha, de linhagens e híbridos de milho. UFLA, Lavras-MG, 2001.**

<b>Materiais genético</b>	<b>Altura de planta(m)</b>	<b>Altura de inserção da espiga (m)</b>	<b>Ângulo de inserção da folha (°)</b>
UFLA 7/4	1,75 a	0,67 a	32,78 b
UFLA 7	1,16 c	0,39 b	40,20 a
UFLA 4	1,28 b	0,44 b	24,26 c
UFLA 8/3	1,98 a	0,90 a	33,98 ab
UFLA 8	1,46 b	0,52 b	36,81 a
UFLA 3	1,21 b	0,59 ab	31,81 b

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Em função da época e das condições hídricas e de temperatura adversas durante o desenvolvimento da cultura, a avaliação pelos avaliadores foi efetuada somente no florescimento das plantas híbridas, sendo que a diferença entre o tempo de florescimento das plantas híbridas e das plantas progenitoras foi de 6 a 9 dias. Tal fato impossibilitou o uso de algumas características por parte dos avaliadores, a exemplo da cor das glumas e anteras, na diferenciação dos híbridos e de suas respectivas linhagens progenitoras. Revilla e Tracy (1995) observaram a influência em 15 das 34 características avaliadas, em função das 2 épocas de plantio utilizadas. Em uma das épocas, as condições ambientais foram favoráveis, em outra, houve condições de baixa temperatura e alta infestação de ferrugem. Segundo os

autores, características como dias para o florescimento, peso de 100 grãos, comprimento e diâmetro de espigas sofreram efeito da época de plantio; no entanto, características como a orientação da folha, cor do grão e do sabugo e forma da espiga não sofreram influência. Assim, a influência das condições adversas no prolongamento do ciclo, principalmente das linhagens, inviabilizou o uso das características de cor da antera e glumas, o que, para Smith e Smith (1989), seriam excelentes características para separar os híbridos dos seus progenitores devido à sua repetibilidade em vários anos e locais. Por outro lado, a orientação da folha e as características da espiga puderam ser utilizadas pelos avaliadores na separação das plantas híbridas e de seus respectivos progenitores.

Outras características foram afetadas pelas condições adversas, dificultando o trabalho dos três avaliadores, como a não produção de espigas na maioria das linhagens e o aparecimento de espigas no pendão em algumas plantas da linhagem UFLA 4. As plantas apresentaram menor vigor com uma redução da altura de plantas, principalmente nas linhagens. Tal fato pode ser explicado pelo efeito da heterose no híbrido simples, o que leva à produção de um híbrido superior em rendimento e vigor em relação às linhagens endogâmicas (Jungenheimer, 1959). Esse maior vigor das plantas híbridas foi a mais importante característica utilizada na separação das plantas híbridas de suas respectivas linhagens progenitoras.

No estágio de florescimento, na separação do híbrido UFLA 7/4 dos parentais fêmea e macho autofecundados, foi observada uma porcentagem de acerto de 99,13% e de 100% de acerto quando da separação do parental fêmea das plantas híbridas. A total ausência de pigmentação no parental fêmea autofecundado foi a principal característica utilizada na separação, sendo ainda utilizadas a menor altura de planta, a presença de pigmentação (antocianina) da linhagem macho, e o maior vigor das plantas híbridas, que

se apresentavam maiores e com as espigas mais desenvolvidas. No híbrido UFLA 8/3, a separação de plantas híbridas de seus progenitores foi realizada com uma porcentagem de acerto de 100% e uma porcentagem de erro de 1,69%, e uma porcentagem de acerto de 79,72%, com uma porcentagem de erro de 28,37%, quando da separação do parental fêmea das plantas híbridas.

Neste estágio de florescimento, a diferenciação entre as linhagens parentais fêmea e macho e as plantas híbridas foi dificultada, pois características importantes como a cor do estilo-estigma para a identificação da linhagem fêmea, e o formato do pendão para a diferenciação da linhagem macho, não puderam ser utilizadas devido às condições adversas ocorridas durante a época de avaliação. As principais características utilizadas pelos avaliadores para a separação das plantas foram o maior porte das plantas híbridas; as folhas mais claras e eretas das plantas provenientes da linhagem fêmea e o maior porte das plantas provenientes da linhagem parental macho, que também apresentaram folhas mais retorcidas e com estrias longitudinais na maioria delas. Assim, apesar dos avaliadores conseguirem identificar todas as plantas híbridas, algumas plantas da linhagem fêmea foram consideradas como plantas híbridas, o que levou a essa menor porcentagem de acerto e maior porcentagem de erro quando da identificação do parental fêmea autofecundado.

Na avaliação feita em espigas, foi possível diferenciar o híbrido UFLA 7/4 dos parentais macho e fêmea autofecundados, com uma porcentagem de acerto de 99,5%, e identificar as plantas provenientes do parental fêmea autofecundado com uma porcentagem de acerto de 95,56%. As espigas das plantas macho autofecundadas apresentaram endosperma alaranjado e grão duro, o que possibilitou uma total diferenciação das demais espigas do híbrido e da fêmea autofecundada. Entretanto, as espigas provenientes de plantas híbridas e do parental fêmea autofecundado

possuíam grãos semi-dentados, endosperma amarelo-claro e de forma cônica, o que dificultou a separação pelos avaliadores, levando a um erro de 6,82% quando da identificação de espigas de plantas provenientes do parental fêmea. Neste estágio, as características que permitiram aos avaliadores separar o híbrido do progenitor feminino foram o maior tamanho e a coroa um pouco mais clara das espigas provenientes de plantas híbridas (Figura 1).

Para o híbrido UFLA 8/3, houve um acerto de 100% quando se utilizaram espigas para separá-lo de seus progenitores. Entre todos os estágios de avaliação considerados, este apresentou-se como o melhor para a separação entre esse híbrido e seus progenitores. As espigas provenientes de plantas do parental fêmea autofecundado apresentaram-se com forma cilíndrica, endosperma com cor amarelo-claro, sendo que a característica utilizada pelos avaliadores que melhor permitiu a separação foi o formato pontiagudo dos grãos (semelhante grãos de pipoca). Já as espigas provenientes de plantas híbridas apresentaram-se com forma cônica, semelhante às daquelas provenientes de plantas macho; entretanto, as espigas de plantas híbridas apresentaram-se bem maiores, com grãos semi-dentados, endosperma amarelo e coroa alternando entre as cores branca e amarela; na linhagem macho, o endosperma apresentou coloração amarelo-creme e grãos duro. Desta forma, a avaliação nesse estágio apresentou-se precisa para a determinação da pureza genética no híbrido UFLA 8/3 (Figura 2.).

Pelos resultados apresentados nas Tabelas 5 e 6, pode-se observar a não significância dos desvios entre os resultados obtidos pelos três avaliadores, o que indica que os erros foram devidos ao acaso (erro amostral). Desta forma, as variações que ocorreram entre os resultados obtidos pelos três avaliadores são aceitáveis. Os baixos valores de qui-quadrado, com resultados não significativos, juntamente com as altas taxas de acerto e as baixas porcentagens de erro,

indicam ser possível a separação dos híbridos de seus respectivos progenitores, por meio de características morfológicas.

TABELA 5. Resultados do teste de Qui-quadrado ( $\lambda^2$ ) aplicados aos resultados obtidos por 3 avaliadores quando da separação dos híbridos de seus parentais macho e fêmea autofecundados, em várias épocas de avaliação. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Híbrido	Avaliador	Épocas de Avaliação		
		Plântula	Florescimento	Espiga
UFLA 8/3	1	0,011	0,016	0,000
	2	0,015	0,004	0,000
	3	0,000	0,004	0,000
	$\lambda^2$	0,015NS	0,024NS	0,000NS
UFLA 7/4	1	0,004	0,001	0,000
	2	0,000	0,001	0,000
	3	0,004	0,001	0,005
	$\lambda^2$	0,008NS	0,001NS	0,005NS

\*\* - Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

\* - Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

NS - Não significativo.

TABELA 6. Resultados do teste de Qui-quadrado ( $\lambda^2$ ) aplicados aos resultados obtidos por 3 avaliadores quando da separação do parental fêmea autofecundado dos híbridos, em várias épocas de avaliação. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Híbrido	Avaliador	Épocas de Avaliação		
		Plântula	Florescimento	Espiga
UFLA 8/3	1	0,000	0,360	0,000
	2	0,000	1,440	0,000
	3	0,000	1,960	0,000
	$\lambda^2$	0,000NS	3,76NS	0,000NS
UFLA 7/4	1	0,000	0,048	0,000
	2	0,000	0,058	0,000
	3	0,000	0,050	0,022
	$\lambda^2$	0,000NS	0,156NS	0,022NS

\*\* - Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

\* - Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

NS - Não significativo.

#### 4.2 Marcadores baseados na amplificação de microssatélites

Inicialmente foram avaliados 27 “primers” de microssatélites, que já haviam sido pré-selecionados em função do padrão de bandas apresentado em outros materiais genéticos da EMBRAPA Milho e Sorgo. Dentre estes, foram identificados aqueles que apresentam amplificação de fragmentos entre os híbridos e seus respectivos progenitores utilizando DNA provenientes de amostras de folhas jovens, a exemplo dos ilustrados na Figura 3.

provenientes de amostras de folhas jovens, a exemplo dos ilustrados na Figura 3.

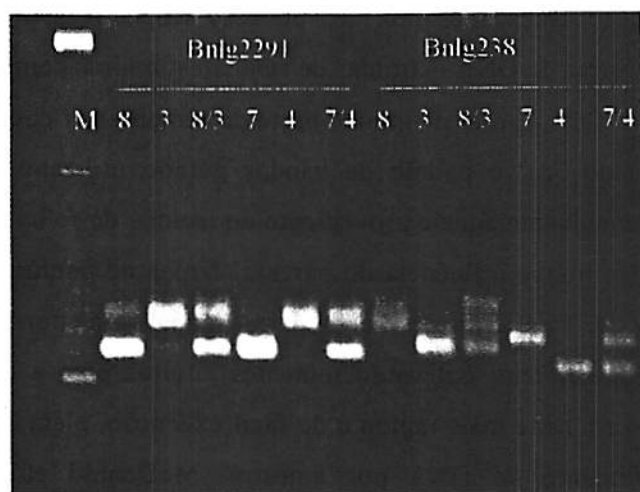


FIGURA 3. Padrão de amplificação dos microssatélites Bnlg2291 e Bnlg238 entre os híbridos e seus respectivos progenitores. EMBRAPA, Sete Lagoas-MG, 2001.

Considerando o microssatélite um marcador codominante, seria esperado um padrão de amplificação do híbrido contendo ambas as bandas provenientes dos respectivos parentais. Em análise de contaminação genética por autofecundação do parental fêmea em lotes de sementes híbridas, é imprescindível o uso de sementes individuais, o que pode ser questionado, considerando que as células do endosperma do milho são  $3n$  e que utilizando sementes inteiras, seria esperado uma maior influência do parental feminino no padrão de bandas do híbrido. Uma alternativa para contornar o problema seria utilizar apenas o embrião, cujas células são  $2n$ . No entanto, o aumento

de gastos em termos de tempo e mão-de-obra dificultariam significativamente a análise. No presente estudo foram avaliados os padrões de amplificação dos “primers” de microssatélites polimórficos que possibilitaram a separação dos híbridos de seus respectivos progenitores, comparando amostras de DNA extraídas de sementes inteiras com o daquelas obtidas de folhas ( $2n$ ). Apesar de grande parte da semente ser composta pelo endosperma (tecido  $3n$ ), o padrão de bandas gerado utilizando sementes individuais foi semelhante àquele proveniente de tecidos de folha (Figura 4), indicando que não houve influência do parental fêmea no padrão de bandas de DNA do híbrido. Tais resultados sugerem que a análise de pureza genética de sementes pode ser feita utilizando sementes inteiras para a extração de DNA, o que torna o teste mais rápido e de fácil execução, além de acarretar um maior rendimento de DNA por amostra. McDonald et al. (1994) ressaltam que com a utilização de DNA extraído da semente inteira, os resultados podem ser obtidos em um espaço de tempo mais curto, compatibilizando seu uso com a análise para a certificação de sementes.

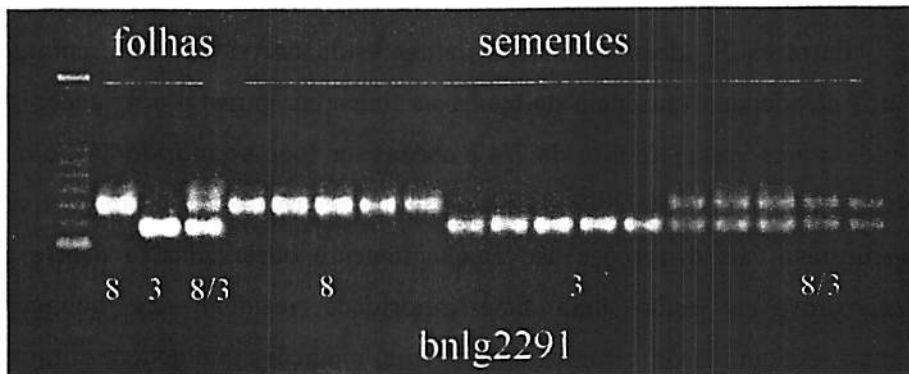


FIGURA 4. Padrões de amplificação do microssatélite bnlg2291 utilizando DNA extraído de folhas e de sementes individuais do híbrido UFLA 8/3 e das linhagens parentais macho (UFLA 8) e fêmea (UFLA 3). EMBRAPA, Sete Lagoas–MG, 2001.

Dos 27 “primers” de microssatélites avaliados inicialmente, apenas dez locos de microssatélites individuais foram eficientes para distinguir o híbrido 7/4 de seus progenitores masculino e feminino. No entanto para a diferenciação apenas entre o híbrido e o parental fêmea autofecundado, 14 locos de microssatélites apresentaram-se eficientes. Os demais locos não apresentaram uma resolução clara dos produtos da PCR ou apresentaram padrões monomórficos.

Para o híbrido 8/3, 17 locos de microssatélites foram polimórficos entre o híbrido e seus parentais macho e fêmea, sendo que apenas um loco apresentou polimorfismo somente entre o híbrido e seu progenitor feminino. Desta forma, um total de 18 locos de microssatélites foram eficientes para detectar a contaminação genética por autofecundação do parental fêmea. O

restante dos locos estudados não apresentou uma boa resolução na PCR ou não detectou diferenças entre o híbrido e seus parentais.

Entre os 27 locos de microssatélites estudados, 3 não apresentaram herança mendeliana (ausência da banda na linhagem parental e presença no híbrido ou vice-versa) no híbrido 7/4 e apenas um loco no híbrido 8/3, o que impossibilitou a diferenciação do híbrido com relação aos seus respectivos progenitores. Tais distorções são freqüentemente observadas, e dentre as causas prováveis estão uma heterozigiosidade residual nas linhagens parentais, contaminação genética da progênie, mutações que podem eliminar o sítio de anelamento do “primer” ou erros ocorridos durante a replicação pela Taq polimerase. Smith et al. (1997) relataram a presença de segregação não-mendeliana em um estudo feito para caracterizar linhagens e híbridos de milho. Em um grupo de 13 linhagens com seus respectivos progenitores, 25 dos 131 locos de microssatélites estavam associados a pelo menos uma incidência de segregação não-mendeliana, sendo que houve, em média, 2,2% de segregação não-mendeliana por linhagem. Para os 4 híbridos e seus respectivos parentais, 12 locos de microssatélites estavam associados a pelo menos uma ocorrência de segregação não-mendeliana e a média por híbrido foi de 2,3%.

Dentre os “primers” selecionados para a diferenciação dos híbridos e de seus respectivos progenitores, pode ser observado a ampla distribuição da posição de cada loco de microssatélite no mapa genômico de milho, representado pelos bins da Tabela 7, o que indica que as diferenças entre as linhagens se encontram distribuídas ao longo de todo genoma.

TABELA 7. Localização no mapa genômico e seqüência dos primers Foward/Reverse dos locos de microssatélites estudados. EMBRAPA, Sete Lagoas-MG, 2001.

LOCO SSR	LOCO (BIN) <sup>A</sup>	SEQUÊNCIA DOS PRIMERS 5' → 3'
bnlg109	1.02	F: GCCAGCTGATGTCTGATGAACAGCACA R: GATCGGGCCAGATTTCTCAAGTCGTCA
bnlg381	2.03	F: TCCCTCTTGAGTGTTTATCACAAA R: GTTCCATGGGCAGGTGTAT
nc003	2.06	F: ACCCTTGCCTTTACTGAAACACAACAGG R: GCACACCGTGTGGCTGGTTC
magla01	2.08	F: ACTGCACTGCACCTCTCTC R: ACACAACGGCTTCTAACCTT
bnlg420	3.05	F: CTTGCGCTCTCCTCCCCTT R: GGCCAGCTCACTGCTCACT
mmc0071	3.05	F: TTACGGACAAGACGCTACTAC R: ATACGTTTCGGCCAATCTCCT
bnlg197	3.07	F: GCGAGAAGAAAGCGAGCAGA R: CGCCAAGAAGAAACACATCACA
umc1031	4.05	F: TTGGGTTTCATACCTCCTAGGAACA R: ACGTGGACAACCAGTCTATCAACA
bnlg2291	4.07	F: CCTCTCGATGTTCTGAAGCC R: GTCATAACCTTGCCTCCAA
mmc0321	4.08	F: TAATCCGAGCTGCAGAG R: CACATGAGCTGAGCATCA
Bnlg589	4.11	F: GGGTCGTTTAGGGAGGCACCTTTGGT R: GCGACAGACAGACAGACAAGCGCATTGT
bnlg1208	5.03	F: GCTGTGATGGTGAGACGAGA R: GCAGGCACTACTAAAACCGC
bnlg278	5.05-5.06	F: CATGCATCAACGTA ACTCCCT R: CATGTCACGCGTTCCACTTG

...Continua...

TABELA 7, Cont.

bnlg238	6.00	F:CTTATTGCTTTTCGTCATACACACACATTTCAT R:GAGCATGAGCTTGCATATTTCTTGTGG
mmc0241	6.05	F: TATATCCGTGCATTTACGTTT R: CATCGCTTGTCTGTCGA
phi112	7.01	F: TGCCCTGCAGGTTACATTGAGT R: AGGAGTACGCTTGGATGCTCTTC
umc1015	7.02- 7.03	F: CAGACACAAGCAGCAAAGCAAG R: TCCGACTCCAAGAAGAGGAGAA
umc1016	7.02	F: GTGATACCGGGTAATCTGGTGC R: GATGATGGGTGATCATCGGTTC
umc1036	7.02	F: CTGCTGCTCAAGGAGATGGAGA R: GACACACATGCACGAGCAGACT
phi116	7.06	F: GCATACGGCCATGGATGGGA R: TCCCTGCCGGGACTCCTG
phi115	8.03	F: GCTCCGTGTTTCGCCTGAA R: ACCATCACCTGAATCCATCACA
bnlg1031	8.06	F: AATCGGTGAGGCTTCACAAC R: ATGCCTACCTACCACCATGC
mac.e01.c01	8.09	F: AGCAGGTACCACAATGGAG R:GTGTACATCAAGGTCCAGATTT
umc1033	9.02	F: CTTCTTCGTAAAGGCATTTTGTGC R: GTGCGGGATTCCCTTAGTTTGC
bnlg1884	9.05	F: TTCGGATGCATGTGTAACGT R:CGGAAGTCCCATCTGTTTGT
bnlg128	9.07	F: CACCTGGAGGGACCCATTCC R: AGGACCACAGGATCCATCATCCT
phi059	10.02	F: AAGCTAATTAAGGCCGGTCATCCC R: TCCGTGTA CTGCGGACTC

<sup>A</sup> Posição dos locos de SSRs em “bins”, onde o primeiro número do “bin” fornece o grupo de ligação e o segundo, a posição do “bin” dentro do grupo de ligação.

Fonte: <http://www.agron.missouri.edu>

### **4.3 Marcadores isoenzimáticos**

Nos sistemas enzimáticos avaliados, o perfil eletroforético das isoenzimas extraídas de sementes apresentaram, de um modo geral, um maior número de bandas, maior intensidade e tamanho de bandas, seguidos das extraídas de folhas e coleótilos, respectivamente. Somente a enzima  $\beta$ -glucosidade (GLU), não apresentou atividade em nenhum dos três tecidos estudados.

Dentre os sistemas isoenzimáticos testados para determinar a pureza genética em milho, apenas os sistemas esterase (EST), malato desidrogenase (MDH) e catalase (CAT) apresentaram atividade tanto nas sementes como nos tecidos dos coleótilos e das folhas, e pelos sistemas esterase e catalase pôde-se diferenciar os híbridos de seus parentais autofecundados.

A catalase apresentou um perfil eletroforético polimórfico dentro de cada tecido (Figura 5). Nos tecidos da sementes, este sistema permitiu a diferenciação do híbrido UFLA 7/4 de seus parentais macho e fêmea autofecundados e entre os parentais. Para o híbrido UFLA 8/3, o padrão de bandas foi semelhante ao dos seus parentais, o que impossibilitou a sua separação. Em coleótilos, essa enzima apresentou-se ativa somente nos híbridos. Nos tecidos das folhas, não foi possível separar o híbrido UFLA 7/4 de seus parentais. Já para o híbrido UFLA 8/3, a diferenciação do híbrido de seus progenitores foi possível por este sistema utilizando tecidos das folhas. Assim, quando da utilização desse sistema enzimático, somente em tecidos de coleótilos foi possível diferenciar os dois híbridos de seus parentais fêmea autofecundados. Tais resultados divergem dos encontrados por Hendrich Sobrinho (1982), o qual não conseguiu diferenciar 9 linhagens de milho por este sistema. Provavelmente esta divergência se deve ao fato de terem sido utilizados diferentes materiais genéticos. No entanto, cuidados

devem ser tomados ao utilizar esse sistema enzimático para a diferenciação de cultivares, pois Imolesi (1999) detectou influência da adubação nitrogenada no padrão eletroforético dessa enzima.

Em tecidos de coleótilos e folhas, o perfil eletroforético do sistema enzimático esterase apresentou apenas uma banda, com um perfil monomórfico entre os híbridos e seus respectivos progenitores, sendo que o padrão de bandas entre estes dois tecidos mostrou-se semelhante (Figura 5). Também não foi possível diferenciar o híbrido UFLA 7/4 de seus parentais quando se utilizou semente para a extração dessa enzima, devido ao padrão monomórfico entre eles. Já para o híbrido UFLA 8/3, a esterase apresentou uma segregação mendeliana, na qual o híbrido possui duas bandas, provenientes de cada um dos parentais. Tal padrão de bandas permitiu a distinção do híbrido de seus progenitores bem como das duas linhagens progenitoras entre si, permitindo a avaliação segura da pureza genética do híbrido UFLA 8/3. Esses resultados reforçam aqueles encontrados por Yen (1987), que detectou a presença de bandas do parental macho e fêmea em híbridos simples de arroz utilizando o mesmo sistema enzimático.

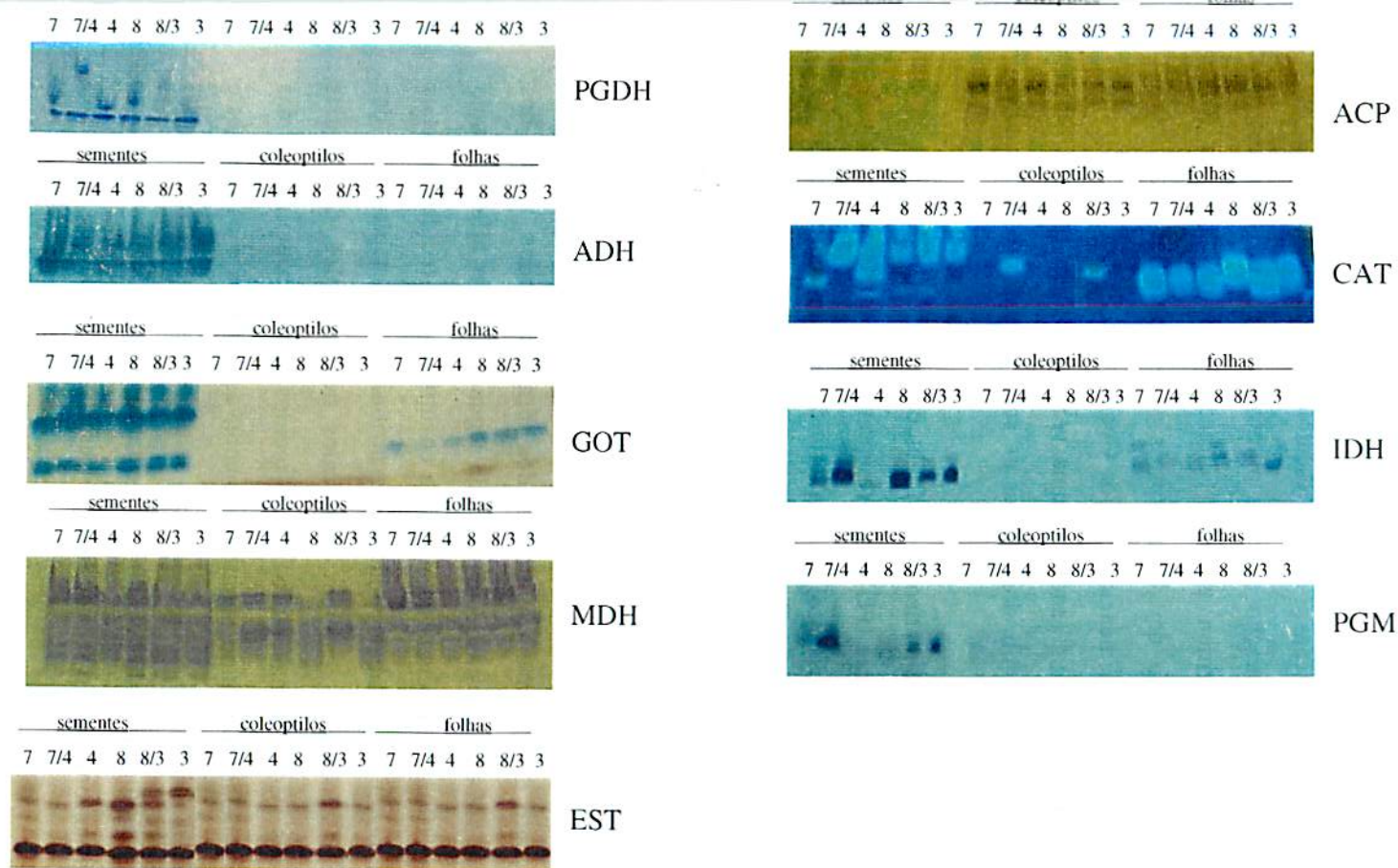


FIGURA 5. Perfís de bandas dos sistemas enzimáticos 6-fosfoglucomato desidrogenase (PGDH), fosfatase ácida (ACP), álcool desidrogenase (ADH), catalase (CAT), glutamato oxaloacetato transaminase (GOT), isocitrato desidrogenase (IDH), malato desidrogenase (MDH), fosfoglucomutase (PGM) e esterase (EST), extraídos de sementes, coleoptilos e folhas de dois híbridos e de seus parentais macho e fêmea autofecundados. UFLA, Lavras-MG, 2001

A malato desidrogenase não apresentou polimorfismo entre os híbridos e seus parentais macho e fêmea autofecundados, no entanto, os perfis eletroforéticos diferiram entre os diferentes tecidos (Figura 5). Provavelmente isso ocorreu devido à expressão de diferentes locos nos tecidos analisados, como já mencionado por Goodman e Stuber (1987), ou por diferenças entre materiais genéticos, uma vez que Bilgen et al. (1995) conseguiram diferenciar os híbridos simples de seus progenitores utilizando esse sistema.

Os sistemas enzimáticos fosfoglucomutase (PGM) e 6-fosfoglucomato desidrogenase (PGDH) apresentaram atividade somente nos tecidos das sementes, entretanto, nem a atividade nem a resolução se mostraram satisfatórias e confiáveis para uma análise de pureza genética (Figura 5). Ao contrário, Goodman e Stuber (1987) afirmaram que a atividade de tais sistemas enzimáticos é encontrada por toda a planta de milho. A ausência de atividade encontrada neste trabalho pode ter sido devido à ausência de expressão dos locos isoenzimáticos na fase de desenvolvimento da planta em que os tecidos foram coletados, apesar dos locos estarem presentes nestes tecidos. Ainda segundo Burger (1963), citado por Oliveira (1992), a ausência de atividade enzimática em tecidos vegetais ou a baixa resolução também podem ser atribuídas à complexação das proteínas por compostos fenólicos produzidos nos vacúolos das células desses tecidos. Com a maceração desses tecidos, há o rompimento das células e organelas, liberando, simultaneamente, as enzimas e os compostos fenólicos; estes últimos se complexam com as proteínas, interferindo na sua atividade e resolução. Vale ressaltar, no entanto, que no presente estudo cuidados foram tomados no sentido de evitar esse tipo de ação de compostos fenólicos.

Em um trabalho de Mauria et al. (2000), a fosfoglucomutase apresentou menor capacidade em detectar contaminações genética e varietal do que a malato desidrogenase, que foi a mais eficiente, seguida pela fosfatase ácida. Ainda segundo os autores, o sistema enzimático fosfoglucomutase apresentou o menor poder de discriminação entre linhagens, dentre os sete sistemas enzimáticos analisados.

O sistema enzimático álcool desidrogenase (ADH) apresentou atividade somente nos tecidos das sementes, tanto para os híbridos quanto para seus respectivos parentais, reforçando os resultados de Torggler et al. (1995), que afirmam que esta enzima possui dois locos, que se expressam durante os primeiros estádios de desenvolvimento da semente. Entretanto, o padrão de bandas, à semelhança da fosfatase ácida (ACP), apresentou-se monomórfico (Figura 5). A enzima fosfatase ácida foi a única que não apresentou atividade nas sementes, mas somente nos tecidos dos coleótilos e das folhas, reforçando relatos de Efron (1970), de que esta enzima encontra-se presente nestes dois tecidos. A ausência de atividade da fosfatase ácida nos tecidos da semente provavelmente ocorreu em função do não envelhecimento das sementes e da ausência de microrganismos associados a elas. Esta enzima está envolvida na hidrólise de ésteres, podendo atuar sobre fosfolipídeos de membrana, tendo como consequência a peroxidação de lipídeos. Segundo Silva (1997) e Brandão Júnior (1996), ocorre uma maior intensidade de bandas quando a semente está infectada com microrganismos ou quando ocorre o envelhecimento das sementes, devido ao aumento de peroxidação de lipídeos.

A glutamato-oxaloacetato transaminase (GOT) apresentou atividade nos tecidos das sementes e folhas, porém os padrões eletroforéticos se apresentaram monomórficos (Figura 5). Assim, a exemplo do que ocorreu com as enzimas malato desidrogenase, fosfoglucomutase, 6-fosfoglucomutase

desidrogenase, álcool desidrogenase e fosfatase ácida, a glutamato oxaloacetato transaminase não foi útil como marcador para a análise de pureza genética, pois não houve variação nos padrões entre os híbridos e seus respectivos progenitores em nenhum dos tecidos considerando no presente estudo.

A isocitrato desidrogenase (IDH) apresentou atividade somente em tecidos de sementes e folhas (Figura 5), o que discorda de Goodman e Stuber (1987), que afirmaram que esta enzima está presente em todas as partes da planta de milho. Pelo perfil eletroforético, pôde-se observar que essa enzima apresentou um número limitado de bandas, e sua atividade e resolução em tecidos de folhas não permitiram uma avaliação precisa e confiável da sua ocorrência e da sua posição. Quando se utilizou sementes, o padrão eletroforético desta isoenzima permitiu a diferenciação do híbrido UFLA 7/4 de seus progenitores masculino e feminino. O mesmo não foi possível para o híbrido UFLA 8/3, o qual se apresentou diferente de seus progenitores apenas em relação à espessura das bandas, o que ocasionou dúvidas na interpretação dos resultados.

Em virtude das diferenças encontradas nos padrões enzimáticos dos diferentes tecidos, a exemplo dos resultados da isocitrato desidrogenase, catalase e glutamato-oxaloacetato transaminase, tornou-se evidente a expressão diferencial dos genes nos diferentes tecidos analisados. Entretanto, apesar dos coleótilos apresentarem padrões de bandas menos alterados em função da presença de microrganismos (Silva, 1997), no presente trabalho somente o sistema enzimático catalase apresentou diferenças no perfil eletroforético dos híbridos e seus respectivos progenitores quando da utilização desse tecido. Já a análise utilizando sementes apresentou atividade para quase todos os sistemas e proporcionou uma maior distinção entre os híbridos e seus progenitores.

Com base nos padrões enzimáticos da catalase, isocitrato desidrogenase e esterase, foi possível separar os híbridos de seus respectivos progenitores, sendo que a esterase apresentou segregação mendeliana para o híbrido UFLA 8/3, o que torna a certificação da pureza genética mais segura. Entretanto, a ação de microrganismos, a influência do ambiente e a deterioração das sementes podem afetar os padrões eletroforéticos das enzimas (Brandão Júnior, 1996; Silva, 1997), devendo, assim, ser usadas com restrições nas análises de pureza genética.

#### **4.4 Relação entre marcadores morfológicos e isoenzimáticos**

Não foi possível observar uma relação entre a variação nos padrões isoenzimáticos em qualquer tecido utilizado e a variação morfológica, que permitiram a diferenciação dos híbridos de seus progenitores. Isto talvez se deva ao fato de que as características fenotípicas utilizadas para a caracterização e separação dos híbridos de seus parentais não estão ligadas às características relacionadas à adaptação. Segundo Torgglen et al. (1995), há evidências de que, em plantas, a heterozigose isoenzimática está associada com a variação morfológica nas características ligadas ao valor adaptativo. Assim, os heterozigotos devem ser mais adaptados, ou seja, menos suscetíveis ao estresse ambiental que os homozigotos, no que se refere diretamente às características relacionadas ao valor adaptativo. Tal afirmação está de acordo com o trabalho de Gupta e Singh (1977), que testaram locos de esterase em arroz com relação ao vigor híbrido. As diferenças observadas em peso dos grãos foram consistentes com os padrões de variação isoenzimática dos híbridos, sugerindo que, em vigor de híbridos, os locos de esterase estavam associados com os de características fenotípicas.

## 5 CONCLUSÕES

Marcadores morfológicos e moleculares são eficientes na certificação da pureza genética em sementes dos híbridos UFLA 8/3 e UFLA 7/4.

As características morfológicas permitem diferenciar os híbridos UFLA 8/3 E UFLA 7/4 de seus progenitores, sendo que a fase de desenvolvimento das plantas de milho mais adequada para a avaliação de pureza genética foi no estágio de plântulas para o híbrido 7/4 e nas avaliações feitas em espigas para o híbrido 8/3 .

Dentre os sistemas enzimáticos testados, a catalase, a isocitrato desidrogenase e a esterase permitiram separar os híbridos UFLA 8/3 E UFLA 7/4 de seus respectivos progenitores. a esterase apresentou segregação mendeliana para o híbrido UFLA 8/3, o que torna a certificação da pureza genética mais segura.

Os marcadores de DNA tipo microssatélites apresentam-se como técnica eficiente, rápida e segura na diferenciação dos híbridos UFLA 8/3 e UFLA 7/4 e suas respectivas linhagens parentais.

Não há uma relação entre a variação nos padrões isoenzimáticos e a variação morfológica, que permitiram a diferenciação dos híbridos UFLA 8/3 e UFLA 7/4 de seus progenitores.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C. Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e florestais. Viçosa: UFV, 1991, 242p.
- ANDREOLI, C. Controle da qualidade da semente – Conceito e estratégia. **Informativo ABRATES**, Brasília, v.1, n.3, p.54-56, Jun. 1991.
- ANDREOLI, C. Mistura varietal: aspectos genéticos e físicos na produção de sementes. **Informativo ABRATES**, Brasília, v.1, n.3, p.32-36, Set. 1992.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS - AOSA. **Cultivar purity testing**. Lansing, 1991. 371p.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS – AOSA. **Seed vigor testing handbook**. Lansing, 1983. 88p. (Contribution, 32).
- BELL, C.J.; ECKER, J.R. Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. **Genomics**, [s.l.], v.19, p.137-144, 1994.
- BILGEN, G.; DOMIR, I.; MARQUARD, R. Study on the identification of genetic constitution by means of isoenzyme electrophoresis in maize. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v.19, n.2, p.95-102, 1995. CD-ROM. CAB Abstracts 1996-7/98.
- BRANDÃO JUNIOR, D.E. Eletroforese de proteína e isoenzima na avaliação da qualidade de sementes de milho. Lavras: UFLA, 1996. 110p. (Dissertação – Mestrado em Fitotecnia).
- BROWERS, J.E.; DANGL, G.S.; VIGNANI, R. et al. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). **Genome**, Ottawa, v.39, p.658-633, 1996.

CARDY, B.J. & KANNENBERG, L.W. Allozymic variability among maize inbred lines and hybrids: Applications for cultivar identification. *Crop Science*, Madison v.22, p.1016-20, 1982.

CHIN, E.C.L.; SENIOR, M.L.; SHU, H. et al. Maize simple repetitive DNA sequences abundance and allelic variation. *Genome*, Ottawa, v.39, p.866-873, 1996.

COCCIOLONE, S.M. & CONE, K.C. PL-BL, na anthocyanin regulatory gene of maize that leads to variegated pigmentation. *Genetics*, Princeton, v.135, p.575-588, 1993.

↳ CONN, E.C. & STUMPF, P.K. *Introdução à bioquímica*. São Paulo: E. Bliccher, 1980. 415p.

COOKE, R.J. Gel electrophoresis for the identification of plant varieties. *Journal of Chromatography*, Amsterdam, v.689, p.281-299, 1995.

COOKE, R.J. The characterization and identification of crop cultivars by electrophoresis. *Electrophoresis*, Weinheim, v.5, p.59-72, 1984.

DELOUCHE, J.C. & POTTS, H.C. *Programa de sementes, planejamento e implantação*. Brasília: AGIPLAN, 1974. 118p.

DIWAN, N. & CREGAN, P.B. Automated sizing of fluorescent-labelled simple sequence repeats (SSR) markers to assay genetic variation in soybean. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlim, v.95, p.723-733, 1997.

↳ EFRON, Y. Tissue specific variation in the isozyme pattern of the AP<sub>1</sub> acid phosphatase in maize. *Genetics*, Princeton, v.65, p.575-583, 1970.

FERREIRA, M.E.; & GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética*. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995.

GOODMAN, M.M & STUBER, C.W. Maize. In: TANKSLEY, S.D. & ORTON, T.J. **Isozymes in Plant Genetics and Breeding. (Part B)** Amsterdam: Elsevier, 1987. p.1-33.

GOODMAN, M.M. & PATERNIANI, E. The races of maize. III. Choices of appropriate characters for racial classification. **Economic of Botany**, New York, v.31, p.265-71, 1969.

✓ GOODMAN, M.M. & STUBER, C.W. Genetic identification of lines and crosses using isoenzyme electrophoresis. In: **ANNUAL CORN AND SORGHUM RESEARCH CONFERENCE 35.**, Washington, 1980. **Proceedings**. Washington, American Seed Trade Association, p.10-30, 1980.

GRATAPAGLIA, D. & FERRERA, M.E. Proteção de cultivares por análise de DNA. **Anuário ABRASEM**, Brasília, p.44-50, 1996.

GUILFORD, P.; PRAKASH, S.; ZHU, J.M. et al. Microsatellites in *Malus X domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.94, p.249-254, 1997.

GUPTA, P.K.; BALYAN, H.S.; SHARMA, P.C. et al. Microsatellites in plants: A new class of molecular markers. **Current Science**, [s.l.], v.70, n.1, p.45-54, 1996.

GUPTA, U.K. & SINGH, S.P. Biochemical basis of hybrid vigor. The genetics of grain weight of *Oryza sativa*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.49, p.259-264, 1977.

HEIDRICH-SOBRINHO, E. Isoenzimas como marcadores genéticos na identificação de nove linhagens de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.17, n.2, p.281-286, 1982.

HENRY, R.J.; KO, H.L. & WEINING, S. Identification of cereals using DNA-based technology. **Cereal Foods World**, [s.l.], v.42, n.1, p.26-29, 1997.

- HUTCHCROFT, C.D. Contamination in seed fields of corn resulting from incomplete detasseling. *Agronomy Journal*, Madison, v.51, p.267-71, 1959.
- IMOLESI, A.S. Efeito da adubação nitrogenada na qualidade fisiológica, em características morfo-agronômicas e nos padrões eletroforéticos de proteínas e isoenzimas de sementes de milho. Lavras: UFLA, 1999. 57p. (Tese- Mestrado em fitotecnia).
- JUNGENHEIMER, R.W. Hybrid maize breeding and seed production. *FAO Agricultural Development Paper*, Rome v.62, p.157, 1958.
- KIRST, M. Desenvolvimento de sistemas de genotipagem multilocus semi-automatizados, baseados em marcadores microssatélites, e sua aplicação em espécies do gênero *Eucalyptus*. Viçosa: UFV, 1999. 150p. (Tese-Magister Scientiae).
- KORANYI, P. Characterisation of maize (*Zea mays* L.) seed samples by the electrophoretic patterns of their protein monomers. *Seed Science & Technology*, Zurich, v.10, p.153-159, 1989.
- LANZA, M.B.; GUIMARÃES, C.T.; SCHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v.21, n.204, p.97-108, 2000.
- LIMA, R.M. Efeito do tamanho das sementes sobre alguns atributos fisiológicos e agronômicos. *Anuário ABRASEM*, Brasília, p.39-43, 1996.
- LITT, M. & LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetic*, [s.l.], v.44, p.397-401, 1989.
- MARTINEZ, C. Using electrophoresis to test purity during the cleaning process may save money and time. *Seed World*, Illinois, v.128, p.8-10, Dec. 1990.

- MAURIA, S.; SINGH, N.N.; MUKHERJEE A.K. et al. Isozyme characterisation of indian maize inbreds. *Euphytica*, Wagening, v.112, p.253-259, 2000.
- MCDONALD, M.B.; ELLIOT, L.J.; SEEENEY, P.M. DNA extraciton from dry seeds for RAPD analyses in varietal identification studies. *Seed Science and Technology*, Zurich, v.22, p.171-176, 1994.
- MORGANTE, M.; RAFALSKI, A.; BIDDLE, P. et al. Genetic mapping and variability of seven soyben simple sequence repeat loci. *Genome*, Ottawa, v.37, p.763-769, 1994.
- MOSS, D.W. *Isoenzymes*. Capman & Hall, London & New York. 1982.
- MURPHY, R.W.; SITES, J.W.Jr; BUTH,D.G. et al. Proteins I: isozyme electrophoresis. In: Hillis, D. M. & Moritz, c. *Molecular Systematics*. Sunderland: Sinauer Associates, 1990. p.45-126.
- NEGUT, E.L. & SARCA, V. Relationship between electrophoresis and growouts in identification of self pollinated plants and outcrosses in maize hybrid seed. *Romanian Agricultural Research*, v.1, p.23-26, 1994. CD-ROM. CAB Abstracts 1996-7/98.
- OLIVEIRA, A.C.B. *Isozimas na idientificação de genótipos de soja (Glycine max (L.) Merrill)*. Viçosa: UFV, 1992. 87p. (Tese-Mestrado em Genética e Melhoramento).
- OLUFOWOTE, J.O.; XU, Y.; CHEN, X. et al. Comparative evaluation of within-cultivar variation of rice (*Oryza sativa* L.) using microsatellite and RFLP markers. *Genome*, Ottawa, v.40, p.370-378, 1997.
- ORMAN, B.A.; LAW RANCE, G.D.; DOWNES, P.M. et al. Assessment of maize inbred genetic purity by isoenzyme eletrophoresis. *Seed Science & Technology*, Zurich, v.19, p.527-553, 1991.
- PAUKSENS, J. & DHESI, N.S. Cultivar verification methods used in Canada. *Seed Science & Technology*, Zurich, v.6, p.585-592, 1978.

- PAUKSENS, J.** Methods for determination of cultivar trueness and purity in maize (*Zea mays* L.). **Seed Science & Technology**, Zurich, v.3, n.1, p.176-185, 1975.
- PAYNE, R.C.** Variety testing by official AOSA seed laboratories. **Journal of Seed Thecnology**, Lansing, v.10, n.1, p.24-36, 1986.
- PEIRCE, L.C. & BREWBAKER, J.L.** Applications of isozyme analysis in horticultural science. **Hortscience**, Alexandria, v.8, n.1, p.17-22, 1973.
- PHELPS, T.L.; HALL, A.E.; BUCKNER, B.** Microsatellite repeat variation within the *yl* gene of maize and teosinte. **The Journal of Heredity**, Edinburgh, v.87:5, p.396-399, 1996.
- PIMENTEL GOMES, R.** **Curso de estatística experimetal**. 12.ed. Piracicaba: ESALQ/USP, Nobel, 1987. 466p.
- POWELL, W.; MORGANTE, M.; DOYLE, J.J. et al.** Genepool variation in genus *Glycine* Subgenus *soja* revealedi by polymorphic nuclear and chloroplast microsatellites. **Genetics**, Princenton, v.144, p.793-803, 1996.
- RAMALHO, M.A.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.B.** **Genética na Agropecuária**. Lavras: FAEPE, 1990. 359p.
- REVILLA, P. & TRACY, W.F.** Morphological characterization and classification of open-pollinated sweet com cultivars. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v.120, n.1, p.112-128, 1995.
- RONGWEN, J.; AKKAYA, M.S.; BHAGWAT, A.A. et al.** The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype idientification. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v.90, p.43-48, 1995.

RUSSEL, J.; FULLER, J.; YOUNG, G. et al. Discriminating between barley genotypes using microsatellite markers. *Genome, Ottawa*, v.40, p.442-450, 1997.

✓ SCANDALIOS, J.G. Isoenzymes in development and differentiation. *Annual Review Plant Physiology, Palo Alto*, v.25, p.225-258, 1974.

SCHNEIDER, K. & DOUCHES, D.S. Assessment of PCR-based simple sequence repeats to "fingerprinting" North American potato cultivars. *American Potato Journal*, [s.l.], v.74, p.149-160, 1997.

SENIOR, M.L. & HEUN, M. Mapping maize microsatellites and polymerase chain reaction confirmation of the targeted repeats using a CT primer. *Genome, Ottawa*, v.36, p.884-889, 1993.

SILVA, E.A.A. Padrões eletroforéticos de isoenzimas e proteínas de sementes e coleótilos de milho em associação com microrganismos. Lavras: (UFLA), 1997, 87p. (Tese-Mestrado em Fitotecnia).

SINGH N.N. & SARKAR, K.R. Anthocyanin pigmentation in various parts of the maize plant in relation to line development and seed certification. *Seed Science Research, Wallingford*, v.10, n.1, p.18-26, 1982.

SMITH, J.S.C. Genetic variability within U.S. hybrid maize: multivariate analysis of isozyme data. *Crop Science, Madison*, v.24, p.1041-1046, Nov/Dec. 1984.

SMITH, J.S.C. The characterization and assessment of genetic diversity among maize hybrids that are widely grown in France: Chromatographic data and isozymic data. *Euphytica, Netherlands*, v.43, p.73-85, 1989.

SMITH, J.S.C.; REGISTER III, J.C. Genetic purity and testing technologies for seed quality: a company perspective. *Seed Science Research, Wallingford*, v.8, p.285-293, 1998.



- VIEIRA, M.G.G.** Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro (*Gossypium Hirsutum* L.). Lavras: UFLA, 1996. 114p. (Tese-Doutorado em Fitotecnia).
- VON-PINHO, E.V.R.** Consequências da autofecundação indesejável na produção de sementes híbridas de milho. Piracicaba: ESALQ, 1995. 130p. (Tese-Doutorado em Fitotecnia).
- VON-PINHO, E.V.R.; VON-PINHO, R.Z.; CICERO, S.M.** Utilização de características morfológicas para avaliação da pureza genética em sementes híbridas de milho. Pesquisa agropecuária brasileira, Brasília, v.32, n.9, p.941-949, 1997.
- WANG, G.L. & PATERSON, A.H.** Assessment of DNA pooling strategies for mapping of QTLs. Theoretical and Applied Genetics, Berlim, v.88, p.355-361, 1994.
- WELSH, J. & MCCLLAND, M.** Fingerprint genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research, Oxford, v.18, p.7213-7218, 1990.
- WIEL, C. Van de; ARENS, P. & VOSMAN, B.** Microsatellite fingerprinting in lettuce (*Lactuca sativa* L.) and wild relatives. Plant Cel Reports, Wageningen, v.17, p.837-842, 1998.
- WYCK, R.D.** Production of hybrid seed corn. In: SRAGUE, G.F. & DUDLEY, J.W. Corn and corn improvement. 3.ed. Madison: American Society of Agronomy, 1988. p.565-607.
- YEN, C.C.** Identification of the genuineness and the purity of hybrid rice (*Oryza sativa* ssp. *Indica*) and its parental lines by electrophoretic analysis of esterases. Seed Science & Technology, Zurich, v.15, p.645-649, 1987.

