

MARCADORES SSR PARA A CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE CULTIVARES DE MILHETO (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.)

ADRIANO ALVES DA SILVA¹, ÉDILA VILELA RESENDE VON PINHO²; BRUNA LINE CARVALHO³, VIVIAN ELIAS NASCIMENTO⁴

RESUMO

Com o aumento no número de cultivares de milho protegidas, tornou-se necessária a avaliação de marcadores moleculares eficientes e estáveis para assegurar o direito do obtentor sobre a cultivar desenvolvida e para a certificação da pureza genética de lotes de sementes comercializadas. Nessa pesquisa, objetivou-se a seleção de primers microssatélites e a caracterização e identificação em cultivares de milho protegidas e de domínio público por meio da técnica SSR. O trabalho foi desenvolvido no Laboratório Central de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras. Foram utilizadas seis cultivares como testemunhas, sendo 3 protegidas (ADR300, ADR500 e ADR7010) e 3 de domínio público (BN2, BRS1501 e IPA bulk 1BF). Foram testados 30 pares de primers de microssatélites para a caracterização das cultivares de milho. Baseando-se nos padrões de DNA das seis cultivares, foi realizada a certificação da pureza genética em 11 lotes de sementes comercializadas como BN2, de domínio público. Dos 30 primers analisados, 22 primers apresentaram-se polimórficos. Foi possível a caracterização das cultivares testemunhas por meio de quatro loci de microssatélites. Foi observado que a maioria dos lotes de sementes de milho comercializadas no Brasil como sendo de domínio público, pertence a outras cultivares, caracterizando a pirataria de sementes.

Palavras-chaves: Milheto, Microssatélites, Identificação de Cultivares, Pirataria, Sementes.

INTRODUÇÃO

No Brasil, a partir da regulamentação da Lei de Proteção de Cultivares em 1997, foi possível a proteção de cultivares vegetais, desenvolvidas em programas de melhoramento genético. Entretanto, tanto as empresas obtentoras das cultivares como as produtoras de sementes não têm usufruído dos royalties em função da pirataria de sementes.

A pirataria de sementes no Brasil tem tomado uma grande dimensão. O volume de sementes informais que circula no mercado, é pelo menos três vezes maior que a das sementes legais. Algumas empresas produtoras de sementes estão implantando programas de rastreamento de sementes para combater a pirataria (BERNHARDT, 2005). Para isso é preciso avaliar os descritores para a caracterização e a identificação de cultivares.

Descritores morfológicos e bioquímicos são utilizados para caracterizar as cultivares e garantir sua proteção, mas o estreitamento da base genética de cultivares torna difícil a diferenciação por esses marcadores (VON PINHO e MENDONÇA NETO, 2007). Para a proteção de cultivares são requeridos marcadores que atendam a critérios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade como os marcadores SSR. Marcadores microssatélites possuem propriedades que os tornam extremamente úteis na caracterização de cultivares. Normalmente poucos locos garantem a completa diferenciação dos genótipos de interesse (SCHUSTER et al, 2006).

Os SSR são muito freqüentes e são distribuídos aleatoriamente, permitindo a mais completa cobertura de um genoma eucarioto. Observa-se que os microssatélites estão bem conservados entre espécies relacionadas, o que permite, em alguns casos, a transferência de marcadores entre espécies do mesmo gênero. Essas características fazem dos microssatélites os mais ideais para o mapeamento genético e físico, para a identificação e discriminação de genótipos e em estudos de genética de populações (AKAGI et al., 1997).

¹ Doutorando em Fitotecnia, DAG/ UFLA, adrianoas@msn.com

² Professora Associada, DAG/UFLA, edila@dag.ufla.br

³ Graduanda em Agronomia, DAG/UFLA, brunalcarvalho@hotmail.com

⁴ Doutoranda em Fitotecnia, DAG/UFLA, vivian_nascimento@hotmail.com

Levando em conta a expressão codominante e o multialelismo, os SSR são os marcadores que possuem o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo. Por essa razão, essencialmente toda e qualquer informação segregante pode ser utilizada como informação para estudos de ligamento e mapeamento genético (BONOW, 2004).

No presente trabalho objetivou-se a identificação de marcadores microsatélites e a caracterização molecular de *Pennisetum glaucum* L., para a caracterização e identificação de cultivares de milho protegidas e de domínio público.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório Central de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Foram utilizadas sementes das seguintes cultivares de milho: ADR 300, ADR 500 e ADR 7010, as quais são protegidas no Serviço Nacional de Proteção de Cultivares, no MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento) e sementes de cultivares caracterizadas como de domínio público: IPA Bulk 1BF, BRS 1501 e BN2. Além das seis cultivares citadas, foram avaliados 11 lotes de sementes, coletadas no mercado nacional, as quais estavam identificados como pertencentes à cultivar BN2, de domínio público, totalizando 17 amostras analisadas conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Relação das amostras de sementes de milho para a identificação de cultivares

| Número | Variedade | Número | Variedade |
|---------------|------------------|---------------|------------------|
| 1 | Lote 1 | 10 | Lote 10 |
| 2 | Lote 2 | 11 | Lote 11 |
| 3 | Lote 3 | 16 | ADR 300 |
| 4 | Lote 4 | 17 | ADR 500 |
| 5 | Lote 5 | 23 | BN2 |
| 6 | Lote 6 | 25 | IPAbulk 1BF |
| 7 | Lote 7 | 27 | BRS 1501 |
| 8 | Lote 8 | 31 | ADR7010 |
| 9 | Lote 9 | | |

Inicialmente foi realizada a caracterização das cultivares por meio da técnica de SSR com a utilização de 30 primers. Para a extração do DNA dessas cultivares foram realizados pré-testes para a determinação da melhor metodologia de extração.

O DNA foi extraído utilizando-se sementes inteiras. As sementes foram maceradas em nitrogênio líquido com a adição do antioxidante polivinil pirrolidona (PVP). Após a maceração, uma pequena quantidade de material de cada amostra, aproximadamente 50mg, foi transferida para um microtubo com a adição de 350µl de tampão CTAB 2% (CTAB 2%; 110mM Tris HCl pH 7,5; 55mM EDTA, pH 8,0; 1,54M NaCl e 2% de β-mercaptoetanol) e 1,56µl de proteinase K a 20ng/µl. Os microtubos foram incubados a 65°C por 1 hora, sendo homogeneizados a cada 15 minutos. Posteriormente foram adicionados 350µl de solução clorofórmio: álcool isoamílico na proporção 24:1. As amostras foram homogeneizadas por 25 minutos e centrifugadas a 14000 rpm por 10 minutos. Retirou-se o sobrenadante e o qual foi transferido para um novo microtubo, contendo 300µl de álcool isopropílico refrigerado. Os microtubos foram incubados a -4°C por 30 minutos e centrifugados a 14000 rpm por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante. Ao precipitado foi adicionado 140µl de álcool etílico 70% a -20°C, homogeneizado e centrifugado a 14000 rpm por 10 minutos para a limpeza. Descartou-se o sobrenadante. Para limpeza final foi utilizado 140µl de álcool etílico 95%. O sobrenadante foi descartado com auxílio de uma pipeta. Os microtubos foram colocados abertos em capela de exaustão em temperatura ambiente por 30 minutos para a secagem do pellet. Em cada microtubo, foi adicionado 50µl de água ultrapura autoclavada, contendo 0,2µl de RNase (10mg/µl) para ressuspensão do DNA. As amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos em banho maria e acondicionadas a -4°C.

Para a quantificação e análise da qualidade do DNA extraído foram utilizados o espectrofotômetro Nanovue e gel de agarose a 0,7%. As amostras apresentaram concentrações

XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA
27 de setembro a 01 de outubro de 2010

diversas, variando de 200ng/μl a 500ng/μl, e ótima qualidade, com as relações $E_{260/280}$ aproximadamente 1,8 e $E_{260/230}$ aproximadamente 2,0. No gel de agarose o DNA apresentou-se semelhante ao padrão lambda, sem degradação aparente. Após a quantificação, o DNA foi diluído para a concentração de trabalho de 10ng/μL.

Para as análises moleculares foram feitas reações em cadeia de polimerase (PCR), utilizando marcadores moleculares de microssatélites. O volume final da reação foi igual a 10μl, contendo 1μL de tampão de PCR 10X da Invitrogen (50mM de KCl, 10mM de Tris-HCl pH 8,4, 0,1% de Triton X-100), 2mM de MgCl₂, 25mM de dNTP, 6μM de cada primer, 0,5U de DNA Taq polimerase da Invitrogen e aproximadamente 30ng de DNA. Foram testados 30 pares de primers, descritos em artigos sobre a espécie, os quais estão descritos na Tabela 2. O programa de reação consistiu em desnaturação inicial 94°C por 4 min, 30 ciclos de 94°C por 20 segundos, 49 a 55°C variando de acordo com a temperatura de melting de cada primer por 20 segundos e 72°C por 20 segundos, seguidos por alongamento final a 72°C por 5 minutos.

Tabela 2. Descrição dos primers de microssatélites de milho

| Marker | Primer sequences | Repeat type and length (bp) | T _m (°C) | Expected size (bp) |
|----------|--------------------------|---------------------------------------|---------------------|--------------------|
| CTM-9 | GCCTCCTCTTGATACCATATT | (CT) ₂₀ | 51,6 | 219 |
| | TAGCCTTGGCTGCTATATTC | | 51,8 | |
| CTM-10 | GAGGCAAAAGTGGAAAGACAG | (CT) ₂₂ | 53,7 | 235 |
| | TTGATTCCCAGTTCTATCGA | | 53,1 | |
| CTM-55 | CGTCTTCTACCACGTCCT | (CT) ₂₅ | 53,6 | 140 |
| | CATAATCCCCTCAACAATCC | | 51,1 | |
| CTM-56 | GCGTTGTTTCGGTGACCAC | (CT) ₁₅ | 57,2 | 165 |
| | GCGTATCTTTAAATTGCCTTTGTT | | 52,7 | |
| 3002 | AAAGTTACCGGGAGGGTAAAAA | (AAAC) ₃ | 54,2 | 205 |
| | TCGCCTAAAACTGGAGGAA | | 53,9 | |
| 3005 | CGCGGTGTTCTCACACAC | (AC) ₁₄ | 56,7 | 140 |
| | TGTGAATCCCGCGGGTATAG | | 54,5 | |
| 3006 | AAATCGGTTCGTGGTGAAGTT | (AC) ₁₆ | 54,6 | 180 |
| | GAGAATGTGGGAGACACACG | | 55,4 | |
| 3011 | CACGCCCTTTTACCTTGAC | (AC) ₂₁ | 54,2 | 150 |
| | CGCGACACGTCCTACACTAA | | 56,7 | |
| 3014 | TGCTTACAGCCTCTCCATA | (ACC) ₈ | 55,8 | 280 |
| | CCACCATGCAACAGCAATAA | | 53,8 | |
| 3016 | TTGTGGCTGAAGAAGAGATCC | (CA) ₁₇ | 54,6 | 450 |
| | AATGTGGGGAGAGACACAGC | | 57,0 | |
| 3017 | CACCAAACAGCATCAAGCAG | (CAG) ₇ | 54,8 | 200 |
| | AGGTAGCCGAGGAAGGTGAG | | 58,4 | |
| 3021 | GCCGACAGGAAGATTACGAT | (CGTG) ₅ | 54,5 | 175 |
| | AGCAAAACGCAGAACAACAG | | 54,3 | |
| 3028 | ACGATTCTTCGTCGTTCCAG | (GATC) ₄ | 54,8 | 170 |
| | ATACGATACGCGCAGGCTAC | | 56,9 | |
| PSMP2001 | CATGAAGCCAATTAGGTCTC | (CT) ₈ (CA) ₄₈ | 50,8 | 304 |
| | ACCATCTAGCTTGTCTTATCC | | 52,1 | |
| PSMP2006 | GACTTATAGTCACTGGGAAAGCTC | (GT) ₅₁ | 54,8 | 253 |
| | GTCTTAATAACTTTGTGCGTATT | | 50,0 | |
| PSMP2008 | GATCATGTTGTCATGAATCACC | (GT) ₃₇ | 51,8 | 238 |
| | ACACTACACCTACATACGCTCC | | 55,9 | |
| PSMP2013 | GTAACCCACTAACCTTACC | (CT) ₁₉ (GT) ₁₆ | 52,2 | 153 |
| | GTCGCACAGAAAAGAATAG | | 49,2 | |
| PSMP2018 | CGCAAGACATTTTAGTATCACC | (GT) ₃₀ | 51,7 | 203 |
| | ACAGTCATCCTCAGTCGTC | | 56,2 | |

XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA
27 de setembro a 01 de outubro de 2010

| | | | | |
|----------|----------------------|--------------------|------|-----|
| PSMP2019 | TGTGCCACAGCTTGTCCTC | (CA) ₃₈ | 58,0 | 248 |
| | CAAGCAGCCAGTTCCTCATC | | 56,1 | |

Continua...

...Continuação

| | | | | |
|----------|--------------------------|---------------------------------------|------|-----|
| PSMP2027 | AGCAATCCGATAACAAGGAC | (GT) ₃₁ | 52,5 | 273 |
| | AGCTTTGGAAAAGGTGATCC | | 53,0 | |
| PSMP2030 | ACCAGAGCTTGGAATCAGCAC | (CA) ₁₁ (GA) ₁₀ | 57,7 | 107 |
| | CATAATGCTTCAAATCTGCCACAC | | 55,0 | |
| PSMP2040 | CATTACACGTTTCTTCAAACGC | (CA) _{nd} ^a | 53,0 | 163 |
| | TCTTCGGCCTAATAGCTCTAAC | | 53,7 | |
| PSMP2045 | TCATCTTCCCCTATCCGAAAC | (CA) ₁₁ (GA) ₅ | 53,9 | 203 |
| | ACTTGCCAATGCTATCTTCAC | | 53,2 | |
| PSMP2050 | ATCAAACGGCATCAGACAAC | (AC) ₁₃ | 53,5 | 102 |
| | GGATCTCTTAGTGTGGTGGAGAGC | | 58,6 | |
| PSMP2064 | ACCGAATTAAGTCATGGATCG | (CA) ₅₆ | 52,9 | 190 |
| | TTGATTCTTCTGACACAAATGAG | | 51,2 | |
| PSMP2084 | AATCTAGTGATCTAGTGTGCTTCC | (AC) ₄₂ | 54,0 | 245 |
| | GGTAGTTTGTGTTGAGGCAAATGC | | 55,5 | |
| PSMP2088 | AAGAAGCCACCAGCACAAAA | (CA) ₂₄ | 55,5 | 149 |
| | TGCATGAAAGTAGAGGATGGTAAA | | 54,0 | |
| PSMP2201 | CCCGACGTTATGCGTTAAGTT | (TC) ₈ (AC) ₄₇ | 55,4 | 205 |
| | TCCATCCATCCATTAATCCACA | | 53,7 | |
| PSMP2224 | GGCGAAATTGGAATTCAGATTG | (TG) ₁₀ | 52,8 | 148 |
| | CGTAATCGTAGCGTCTCGTCTAA | | 56,0 | |
| PSMP2270 | AACCAGAGAAGTACATGGCCCCG | (GA) ₂₆ imp | 59,1 | 153 |
| | CGACGAACAAATTAAGGCTCTC | | 53,9 | |

^a A quantidade repetida é desconhecida pois a reação sequencial foi incapaz de continuar através das repetições.

As amostras foram aplicadas em géis de poliacrilamida a 10% e submetidas à eletroforese em uma tensão de 120V por 4 horas. Os géis foram posteriormente corados com nitrato de prata para análise dos fragmentos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os 30 primers testados, 22 primers apresentaram-se polimórficos, sendo estes: CTM-9, CTM-10, CTM-55, CTM-56, PSMP2001, PSMP2006, PSMP2013, PSMP2018, PSMP2019, PSMP2027, PSMP2030, PSMP2040, PSMP2050, PSMP2064, PSMP2084, PSMP2088, 3002, 3005, 3016, 3017, 3028. Apenas o primer PSMP2088, foi polimórfico entre todas as amostras testemunhas, Figura 1.

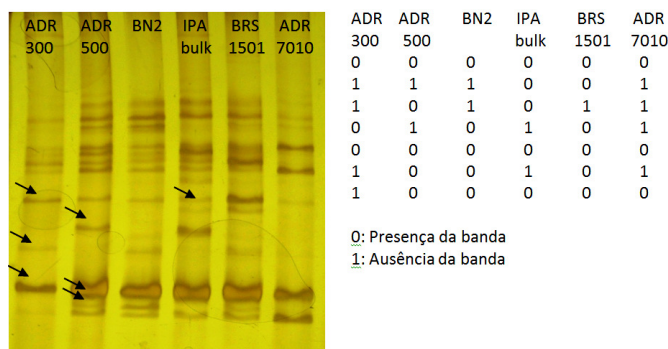


Figura 1. Padrão de bandas observado a partir da amplificação do primer PSMP2088

Por meio da utilização dos primers CTM-9, CTM-10, CTM-55 e CTM-56 foi possível diferenciar as cultivares de milho (Figura 2 e 3). Desse forma, esses primers foram adotados para a identificação das cultivares de milho de lotes comercializados e identificados como de domínio público.

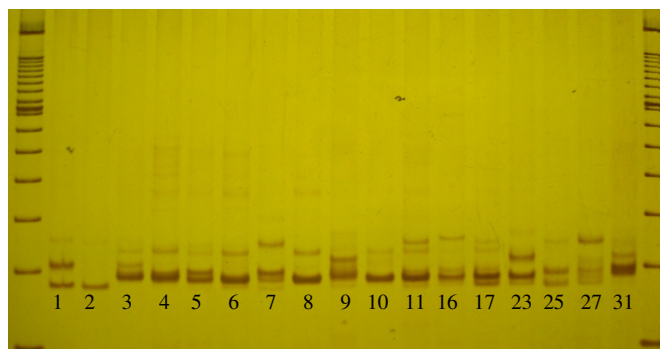


Figura 2. Padrão de bandas observado a partir da amplificação do primer CTM-9

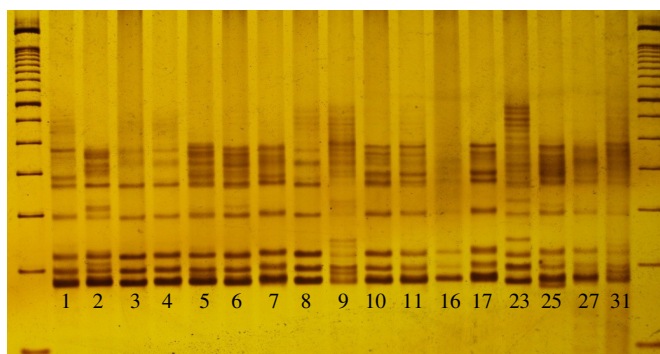


Figura 3. Padrão de bandas observado a partir da amplificação do primer CTM-10

Pelos resultados obtidos, pode-se afirmar que a maioria das amostras identificadas e comercializadas como pertencentes à cultivar BN2 não pertencem a referida cultivar ou são provenientes de misturas de cultivares.

Tabela 3. Identificação das cultivares de milho com base na amplificação dos primers CTM-9, CTM-10, CTM-55 e CTM56

| Nº da amostra | Cultivares relacionadas |
|---------------|-------------------------|
| 1 | ADR300, BN2 |
| 2 | BN2, ADR7010 |
| 3 | ADR500, BN2 |
| 4 | ADR500, BN2 |
| 5 | ADR500, BN2, ADR7010 |
| 6 | ADR500, BN2 |
| 7 | ADR500, BN2 |
| 8 | ADR500, BN2 |
| 9 | BN2, ADR7010 |
| 10 | ADR500, BN2 |
| 11 | ADR500, BN2 |

CONCLUSÃO

Por meio da técnicas de microsatélites foi possível caracterizar e diferenciar cultivares de milho.

Os lotes de sementes de milho comercializados como sendo de domínio público, correspondem às cultivares protegidas ou às sementes provenientes de misturas dessas cultivares.

REFERÊNCIAS

AKAGI, H.; YOKOZEKI, Y.; INAGAKI, A. Highly polymorphic microsatellites of rice consist of AT repeats, and a classification of closely related cultivars with these microsatellite loci. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 94, n. 1, p. 61-67, Jan. 1997.

BERNHARDT, S. M. High plains drifting : wind-blown seeds and the Intellectual property implications of the GMO revolution. **Northwestern Journal of Technology and Intellectual Property**, Chicago, IL, v. 4, n.1, p. 1-13, 2005.

BONOW, S. **Caracterização morfológica, isoenzimática e molecular de cultivares de arroz de sequeiro**. 2004. 90 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

VON PINHO, E. V. R.; MENDONÇA NETO, R. P. **Uso de Marcadores Moleculares Para a Identificação de Cultivares**. Seed News, vol. XI nº4, 2007.

SCHUSTER, I.; BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG: UFV, 2006. p. 207.