

**Seleção de Marcadores SSR para a Caracterização de Cultivares de Milheto
(*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) ***

Laís Andrade Pereira¹, Adriano Alves da Silva¹, Édila Vilela de Resende Von Pinho¹ e Bruna Line Carvalho¹.

¹Universidade Federal de Lavras – UFLA, DAG/Sementes, Caixa Postal 37, CEP 37200-000, Lavras-MG.
Email: andrade.lais@gmail.com

RESUMO- A demanda por sementes de milheto vem aumentando a cada ano e, com isso, os investimentos no desenvolvimento de novas cultivares se tornam cada vez maiores. Com a aprovação da Lei de Proteção de Cultivares, em 1997, o problema com a pirataria de sementes se intensificou, comprometendo a qualidade das sementes, com reflexos diretos na produtividade. Uma das formas de assegurar a pureza genética e a proteção da propriedade intelectual é a caracterização das cultivares. Com o estreitamento da base genética, o uso de marcadores moleculares de DNA se torna cada vez mais necessário. Nesse sentido, os marcadores SSR se destacam, uma vez que apresentam estabilidade, repetibilidade, codominância e baixo custo. O objetivo neste trabalho foi a caracterização de doze cultivares de milheto por meio de marcadores SSR. As cultivares analisadas foram as seguintes: ADR 300, ADR 500, ADR 7010, ADR 7020, ADR 8010, ANsb MC, ANM 17, ANM 30, IPABULK 1BF, BN1, BN2 e BRS 1501. Foram testados 123 pares de primers, dos quais 32 foram selecionados. Os marcadores microssatélites se mostraram eficientes para a caracterização das cultivares de milheto e, portanto, uma ferramenta importante para a certificação da pureza genética em lotes de sementes.

Palavras-chave: Microssatélites; Pirataria; Identificação de cultivares; Sementes.

Introdução

O milheto (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) é o sexto cereal mais consumido mundialmente, apresenta alta resistência à seca e aos solos de baixa fertilidade, boa produção de massa e grãos e crescimento rápido (Bonamigo, 1999). Por essas características, no Brasil ele é cultivado principalmente no cerrado, no sistema de semeadura direta (Durães et al., 2003).

Essa demanda de sementes de milheto faz com que as empresas de melhoramento realizem grandes investimentos no desenvolvimento de novas cultivares.

Para assegurar o direito do obtentor sobre a cultivar desenvolvida foi aprovada no país, em 1997, a Lei de Proteção de Cultivares (L. 9456). No entanto, com a aprovação dessa lei, tem sido um grande desafio o controle da pirataria de sementes. O aumento da pirataria tem comprometido a qualidade das sementes disponibilizadas ao agricultor, com reflexos diretos na produtividade. Dessa forma, a certificação da pureza genética de cultivares torna-se

* Os autores agradecem a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG, pelo apoio financeiro para execução do trabalho.

uma ferramenta indispensável para assegurar um produto com características genéticas desenvolvidas pelo melhorista, além de garantir a proteção da propriedade intelectual (Gratapaglia e Ferreira, 1996).

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, 2007).

A avaliação da pureza genética de sementes com base em marcadores moleculares de DNA é mais segura, uma vez que os mesmos não sofrem influência ambiental e os dados obtidos são reprodutíveis e estáveis. 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). Além de serem altamente reprodutíveis, codominantes e apresentarem baixo custo.

No presente trabalho objetivou-se a identificação de cultivares de milho, *Pennisetum glaucum* L., por meio de marcadores microssatélites.

Material e Métodos

O 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 protegidas no Serviço Nacional de Proteção de Cultivares, no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e sementes de cultivares caracterizadas como de domínio público conforme descrito na Tabela 1.

A caracterização das cultivares foi realizada por meio da técnica de SSR. 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 350•l 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 1,56•l de proteinase K a 20ng/•l. Os microtubos foram incubados a 65°C por 1 hora, sendo homogeneizados a cada 15 minutos. Posteriormente foram adicionados 350•l 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, o qual foi transferido para um novo microtubo, contendo 300•l 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 140•l 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 140•l 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 pelete. Em cada microtubo, foi adicionado 50•l de água ultrapura autoclavada, contendo 0,2•l de RNase (10mg/•l) 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 diversas, variando de 200ng/•l a 500ng/•l, e ótima qualidade, com as relações E260/280 aproximadamente 1,8 e E260/230 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/•L.

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 10 •l, contendo 1•L 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, 6• M de cada primer, 0,5U de DNA Taq polimerase da Invitrogen e aproximadamente 30ng de DNA. Foram testados 123 pares de primers, descritos em artigos sobre a espécie. 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 dissociação de cada primer por 20 segundos e 72°C por 20 segundos, seguidos por alongamento final a 72°C por 5 minutos.

Os produtos de amplificação foram separados em gel de acrilamida 10% pela técnica de eletroforese a 120 V por 4 horas. Para a revelação dos géis utilizou-se o método de coloração com nitrato de prata. Após a eletroforese, as placas foram separadas e o gel foi imerso em 1 litro de solução fixadora (etanol 10% ácido acético 0,5%) e mantido sob lenta agitação por 15 minutos. Em seguida, o gel foi submerso em 1 litro de solução de nitrato de prata (AgNO₃) (0,2%) sob agitação lenta por 15 minutos. O gel, então, foi lavado com água corrente e

mantido sob agitação lenta em solução de revelação (NaOH 3%, formaldeído 0,5%) até a completa visualização das bandas.

Resultados e Discussão

Dentre os 123 primers testados, 32 apresentaram-se polimórficos, conforme a Tabela 2 para a caracterização das cultivares analisadas, a exemplo do primer PSMP 2048, Figura 1.

Por meio da utilização dos primers que se apresentaram polimórficos foi possível diferenciar as cultivares de milho. Dessa forma, esses primers podem ser adotados para a certificação da pureza genética de lotes de sementes comercializados, importantes para o controle da pirataria de sementes no país.

Conclusão

Os marcadores microssatélites se mostraram eficientes para a caracterização das cultivares de milho e, portanto, uma ferramenta importante para a certificação da pureza genética em lotes de sementes.

Literatura Citada

BONAMIGO, L. A. A cultura do milho no Brasil, implantação e desenvolvimento no cerrado. In: WORKSHOP INTERNACIONAL DE MILHETO, 2., 1999, Planaltina. Anais... Planaltina: Embrapa Cerrados, 1999. p. 31-65.

DURÃES, F. O. M.; MAGALHÃES, P. C.; SANTOS, F. G. Fisiologia da planta de milho. Sete Lagoas: EMBRAPACNPMS, 2003. p. 1-13. (Circular técnica, 28).

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

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

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

Tabela 1. Relação das amostras de sementes de milho para a identificação de cultivares. UFLA, Lavras, MG, 2012.

Número	Cultivares	Situação atual
01	ADR 300	Protegida
02	ADR 500	Protegida
03	ADR 7010	Protegida
04	ADR 7020	Protegida
05	ADR 8010	Protegida
06	ANsb MC	Protegida
07	ANM 17	Protegida
08	ANM 30	Protegida

09	IPABULK 1BF	Domínio publico
10	BN1	Domínio publico
11	BN2	Domínio publico
12	BRS 1501	Domínio publico

Tabela 2. Características dos pares de primers polimórficos utilizados para a identificação de cultivares de Milheto.

Primer	Fornecida com os Primers		Temp. usada na PCR	Número de bandas polimórficas	
	TM (°C) F	TM (°C) R	T PCR (°C)	Tamanho (pb)	
3006	54,6	55,4	55	180	13
3026	56,4	55	56	130	6
CTM-2	50,2	56,1	55	255	5
CTM-10	53,7	53,1	55	235	10
CTM-21	64,8	59,6	59	260	8
CTM-25	60,3	62,1	60	225	9
CTM-57	60,3	59,2	59	172	14
cump003	55,5	57,8	57	118	8
cump006	55,4	58,3	57	100	7
cump009	56,8	55,4	56	225	7
cump010	49,8	50,9	55	173	5
cump015	54,1	57	56	158	5
PSMP2001	50,8	52,1	55	304	9
PSMP2008	51,8	55,9	55	238	16
PSMP2027	52,5	53	55	273	13
PSMP2045	53,9	53,2	55	203	10
PSMP2048	52,4	55,7	55	252	11
PSMP2056	51,7	54,4	55	213	8
PSMP2060	53	51,5	55	220	9
PSMP2063	53,8	49,8	55	166	10
PSMP2064	52,9	51,2	55	190	6
PSMP2076	50,3	52,7	55	161	7
PSMP2078	52,7	52,5	55	172	6
PSMP2081	52,9	52,8	55	167	12
PSMP2085	52,9	52,7	55	176	6
PSMP2206	57,4	56	57	203	4
PSMP2220	55,4	55,1	55	128	4
PSMP2224	52,8	56	55	155	3
PSMP2229	58,7	58,6	59	241	7
PSMP2237	64,4	62,2	63	233	6
PSMP2261	56,4	61,4	59	193	6
PSMP2271	57,1	60,7	59	184	4

Legenda: TM – Temperatura de Melting; F – Primer forward; R – Primer reverse.

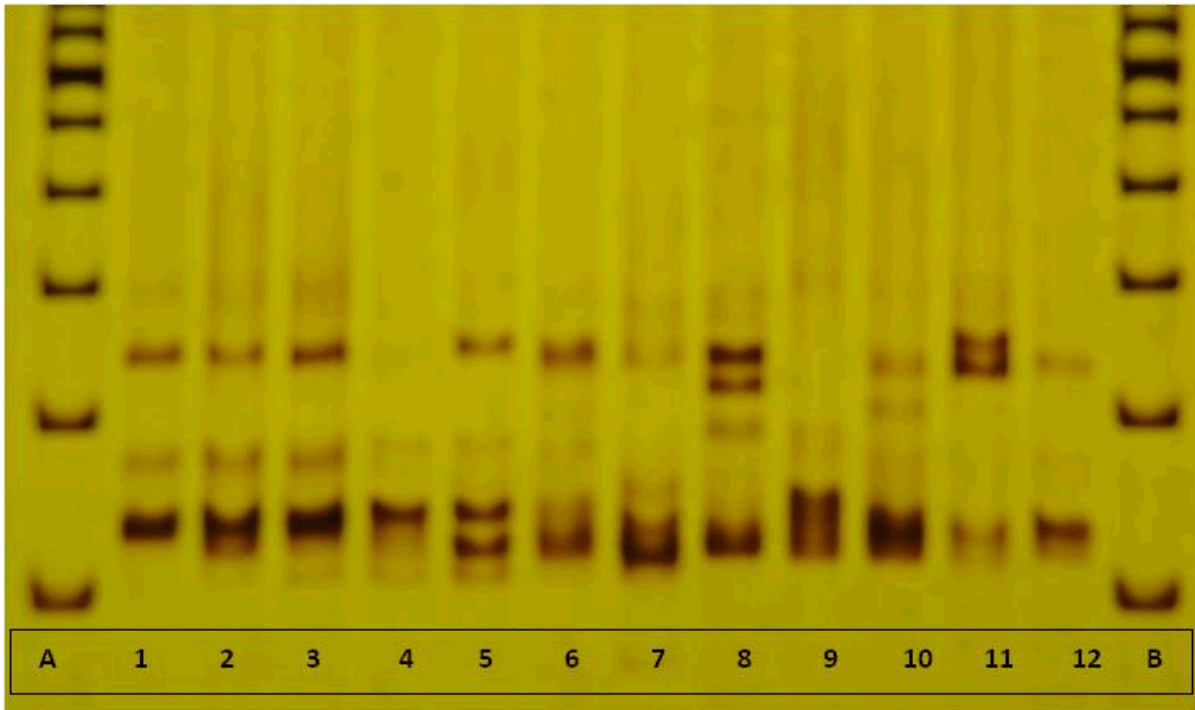


Figura 1. Padrão de bandas observados a partir do primer PSMP2048 para as cultivares da Tabela 1 (1 a 12). Sendo A e B marcadores de peso molecular.

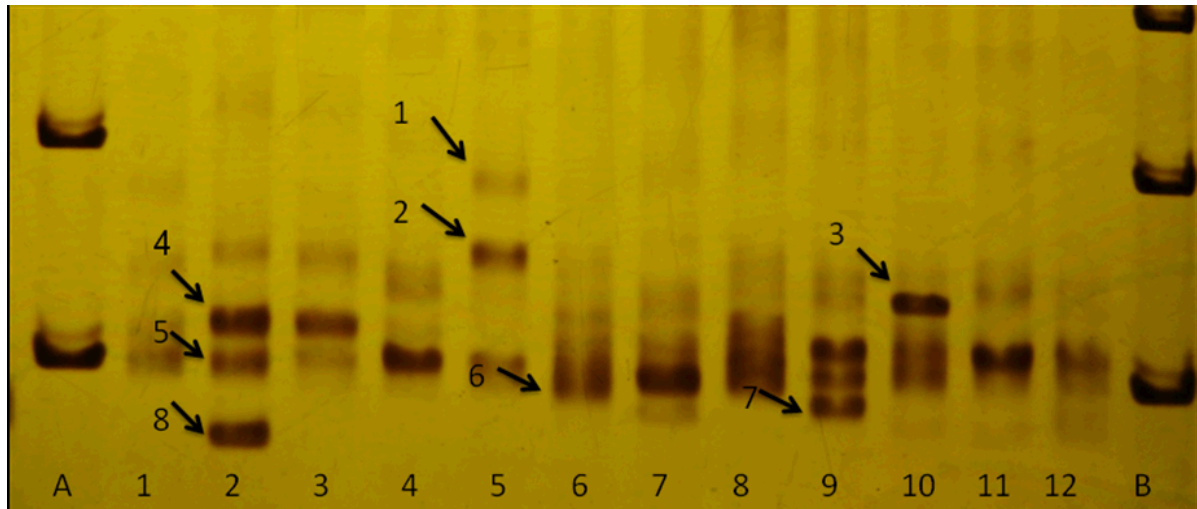


Figura 2. Zimograma com a indicação do polimorfismo observado entre as cultivares apresentadas na Tabela 1 (1 a 12), quando utilizado o primer PSMP2056 . Sendo A e B marcadores de peso molecular.