



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

ISSN 1678-9601

Dezembro, 2007

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 28

Análise de Pureza Genética de Sementes de Feijoeiro Comum Utilizando Marcadores Microssatélites em Sistema de Genotipagem Multiplex

Giselle Lara de Carvalho Chediak
Rosana Pereira Vianello Brondani
Maria Jose Del Peloso
Leonardo Cunha Melo
Claudio Brondani

Santo Antônio de Goiás, GO
2007

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Arroz e Feijão

Rodovia GO 462 - Km 12 - Zona Rural - Caixa Postal 179
75375-000 Santo Antônio de Goiás, GO

Fone: (62) 3533 2123

Fax: (62) 3533 2100

www.cnpaf.embrapa.br

sac@cnpaf.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Carlos Agustín Rava*

Secretário-Executivo: *Luiz Roberto Rocha da Silva*

Membro: *Leonardo Cunha Melo*

Maria José Del Peloso

Supervisor editorial: *André Ribeiro Coutinho*

Revisão gramatical: *André Ribeiro Coutinho*

Normalização bibliográfica: *Ana Lúcia D. de Faria*

Capa: *Sebastião José de Araújo*

Editoração eletrônica: *Fabiano Severino*

1ª edição

1ª impressão (2007): 500 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Arroz e Feijão

Análise de pureza genética de sementes de feijoeiro comum utilizando Marcadores microssatélites em sistema de genotipagem multiplex / Giselle Lara de Carvalho Chediak ...[et al.]. - Santo Antônio de Goiás : Embrapa Arroz e Feijão, 2007.
20 p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Arroz e Feijão, ISSN 1678-9601 ; 28)

1. Feijão - Marcador molecular. 2. Feijão - Semente - qualidade.
I. Chediak, Giselle Lara de C. II. Embrapa Arroz e Feijão. III. Série.

CDD 635.652233 (21. ed.)

© Embrapa 2007

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução	9
Material e Métodos	11
Material Vegetal	11
Preparo do DNA	11
Análise molecular utilizando marcadores microsatélites	11
Genotipagem semi-automatizada dos marcadores microsatélites	12
Resultados e Discussão	13
Conclusões	18
Referências	18

Análise de Pureza Genética de Sementes de Feijoeiro Comum Utilizando Marcadores Microssatélites em Sistema de Genotipagem Multiplex

Giselle Lara de Carvalho Chediak¹; Rosana Pereira Vianello Brondan²; Maria José Del Peloso³; Leonardo Cunha Melo⁴; Claudio Brondan⁵

Resumo

A determinação de pureza genética de sementes de feijoeiro comum, realizada com base nos descritores morfológicos, é um dos requisitos necessários para a sua certificação como forma de assegurar a qualidade comercial do produto. Os marcadores moleculares podem ser utilizados como uma ferramenta de auxílio na determinação da pureza varietal por detectarem variação no DNA com um elevado grau de precisão e confiabilidade. Esse estudo teve como objetivo principal avaliar o grau de pureza genética de amostras de sementes genéticas e básicas derivadas da multiplicação da cultivar BRS Campeiro utilizando sistemas de genotipagem multiplex e detecção semi-automatizada de marcadores microssatélites. Ao todo, 19 microssatélites foram avaliados quanto às condições de amplificação, dos quais 16 foram utilizados no estabelecimento de quatro sistemas de genotipagem. Um conjunto de 81 amostras de sementes genéticas, 82 de sementes básicas e 73 sementes consideradas atípicas quando

¹ Graduando em Biologia, Universidade Católica de Goiás, Avenida Universitária 1.440, Setor Universitário. 74605-010 Goiânia-GO.

² Bióloga, Doutora em Biologia Molecular Vegetal, Embrapa Arroz e Feijão Rod. GO 462, Km 12, 75375-000 Santo Antônio de Goiás-GO, rosanavb@cnpaf.embrapa.br

³ Engenheira Agrônoma, Doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, Embrapa Arroz e Feijão. mjpeloso@cnpaf.embrapa.br

⁴ Engenheiro Agrônomo, Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas, Embrapa Arroz e Feijão. leonardo@cnpaf.embrapa.br

⁵ Engenheiro Agrônomo, Doutor em Biologia Molecular, Embrapa Arroz e Feijão, Rod. GO 462, Km 12 75375-000 Santo Antônio de Goiás-GO. brondani@cnpaf.embrapa.br

comparadas com a cultivar padrão foram avaliadas. De um modo geral, o grau de pureza genética encontrado nas amostras de sementes, com o mesmo padrão visual da amostra-controle, foi considerado satisfatório, sendo que todas as plantas derivadas da semente genética foram geneticamente idênticas. Para as sementes identificadas como atípicas, 20% apresentaram variação para mais de um loco gênico e 8% apresentaram um loco em heterozigose, e portanto, foram consideradas geneticamente distintas da variedade padrão. Os resultados apontam falhas no processo de multiplicação, onde existe um forte indicativo de ocorrência de segregação ou cruzamento natural na obtenção da semente genética, bem como a ocorrência de mistura de linhas. A análise molecular mostrou-se adequada para a análise de pureza genética em feijão comum e pode ser implementada como uma ferramenta auxiliar aos testes de certificação de lotes de sementes comerciais feitos a partir de métodos tradicionais. Deste modo, estes testes podem indicar quais lotes de sementes genéticas serão utilizados para a obtenção de sementes comerciais do feijoeiro.

Termos para indexação: *Phaseolus vulgaris*, pureza varietal, marcadores moleculares, qualidade de sementes, identidade genética.

Analysis of genetic purity of common bean seeds using multiplex system based on microsatellite markers

Abstract

The determination of genetic purity of seeds of common beans seeds, based on morphological descriptors, is a necessary requirement the quality certification. The molecular markers can be used as an auxiliary tool to detect the variation of the genetic purity due to the power to infer the DNA variation. The main objective of this study was to evaluate the degree of genetic purity of genetic and basic seeds derived from the multiplication of BRS Campeiro cultivar using genotyping multiplex systems and semi-automated detection. In total, 19 microsatellites were evaluated for the amplification conditions, of which 16 were used to establish four genotyping systems. A set of 81 samples of genetic seeds, 82 of basic seeds and 73 considered atypical seeds when compared with the standard of BRS Campeiro, were evaluated. In general, the degree of genetic purity found in the seed samples with the same visual standard of the original cultivar was considered satisfactory, since the whole set of plants derived from the genetic seed was genetically identical. For the seeds identified as atypical, 20% showed variation for more than one locus and 8% presented one locus in heterozygosity, and therefore, they were considered genetically distinct from the original cultivar. The results indicate failure in the process of seed multiplication, which is an indicator that is occurring segregation or natural cross to obtain the genetic seed, as well as the occurrence of lines mixture. The molecular analysis showed to be adequate for the analysis of genetic purity in common beans and can be implemented as a auxiliary tool in the

certification tests of commercial seed lots based on traditional methods. This means that the molecular analysis can indicate which genetic seed lots will be used to obtain the common bean commercial seeds.

Index terms: Phaseolus vulgaris, varietal purity, molecular markers, seed quality, genetic identity.

Introdução

A cada ano os programas de melhoramento genético, sejam eles público ou privado, beneficiam a sociedade com a oferta de novas cultivares mais produtivas, tolerantes a um amplo espectro de estresses bióticos e abióticos, adaptadas a diversas condições edafoclimáticas e com características nutricionais e agrônomicas diferenciadas. O desenvolvimento de novas cultivares é tido como um processo longo, podendo durar mais de uma década, e com alto custo agregado, em função das inúmeras etapas envolvidas no decorrer das sucessivas avaliações e seleções. Diante disso, é fundamental que existam mecanismos de controle que assegurem a proteção dos direitos aos seus obtentores, o que é regulamentado pela Lei de Proteção de Cultivares (Lei N° 9.456, de 25 de abril de 1997), além de mecanismos que garantam a identidade e qualidade do material desenvolvido, atualmente regido pela Lei de Sementes (Lei N° 10.711, de 05 de agosto de 2003).

Com base na Lei de Proteção de Cultivares, as cultivares indicadas passaram a ter o Certificado de Proteção, o que impede a comercialização por terceiros não autorizados ou multiplicação comercial em todo o território brasileiro pelo prazo de 15 anos, contados a partir da data de concessão do Certificado Provisório (FONSECA, 2006). De posse do certificado de proteção, a etapa seguinte diz respeito à obtenção de um grande volume de sementes para fins de comercialização. Inicialmente, é desenvolvida a semente genética, obtida pelo obtentor da cultivar. Posteriormente, essa semente passa por multiplicações sucessivas, dando origem à semente básica certificada. Para a obtenção de sementes com alta qualidade, um controle rigoroso em todas as etapas do processo deve ser mantido. Conforme descrito por Della Vecchia et al. (1998), isto requer ciência, tecnologia, conhecimento, experiência, bom gerenciamento e, certamente o mais importante, um absoluto e incondicional comprometimento com a qualidade. Como forma de assegurar aos produtores que as sementes utilizadas possuem alta qualidade, a certificação das sementes em cada geração é utilizada como agente controlador.

A utilização de sementes certificadas é a garantia de que os esforços realizados na obtenção de uma cultivar melhorada sejam traduzidos em benefícios para a produção agrícola e, em última instância, para o mercado consumidor. Assim, empresas produtoras de sementes e órgãos oficiais têm o compromisso de certificarem as sementes quanto à sua qualidade para posterior comercialização. Segundo Vieira e Rava (2000), uma semente de qualidade deve possuir pureza

genética (constituição genética da semente, que irá expressar-se no comportamento da planta), pureza física (ausência de contaminação por impurezas), qualidade fisiológica (capacidade da semente em gerar uma nova planta, perfeita e vigorosa, sob condições favoráveis) e sanidade (ausência de patógenos).

No Brasil, a produção de sementes de feijão comum na safra 2005/2006 atingiu 16 mil toneladas, com um acréscimo de 41% em relação a safra no período de 2003/2004, com área plantada em grãos estimada em 2,3 milhões de hectares (Feijão, 2007). O percentual de uso de sementes certificadas, na safra 2005/2006 foi de aproximadamente 11%. A produção de sementes certificadas ocorre em maior escala nas regiões Centro-Oeste (GO e MS), Sudeste (SP, MG), Sul (PR, SC, RS) e Nordeste (BA). Entretanto, mesmo que houvesse uma forte fiscalização com relação ao uso de sementes certificadas de feijão comum, a produção atual (16 mil toneladas) não chegaria a atender 7% da demanda potencial, estimada em 139 mil toneladas (Feijão, 2007).

Devido ao volume de sementes que são produzidas para fins de comercialização, a certificação dos lotes de sementes é feita baseada em amostragens, de modo que a determinação de qualquer impureza presente no lote é determinado com base na avaliação da amostra. Para feijão comum, o peso mínimo para análise de pureza é de 700 gramas, ou o equivalente a uma média de 2800 sementes. A partir da mostra coletada, as sementes são separadas em sementes puras, outras sementes (visualmente diferentes da amostra padrão) e materiais inertes. São consideradas sementes puras lotes com menos de 5% do peso das misturas identificadas (BRASIL, 1992). Além da homogeneidade fenotípica presente nos lotes de sementes comerciais, determinada com base nos descritores morfológicos, espera-se que as mesmas também sejam geneticamente homogêneas. Muitas vezes, pelo simples fato de uma semente apresentar um padrão de cor diferenciado dos demais, todo o lote é comprometido e recomendado para descarte, tendo em vista a impossibilidade de avaliar a pureza genética com base em outros parâmetros. Entretanto, conforme descrito em Schuster et al. (2004), fatores ambientais podem contribuir para a produção de sementes com características diferentes da amostra padrão não relacionado a variações genéticas.

O uso de técnicas moleculares para caracterizar e identificar cultivares comerciais é um processo que vem sendo fortalecido em função do alto grau de precisão e informação que pode ser obtido pela análise do DNA. Além disso, os marcadores

apresentam a vantagem de serem estáveis e não sujeitos às variações ambientais, o que os torna adequados para diversos tipos de análise genética como, por exemplo, a determinação da identidade genética por meio da obtenção do perfil molecular. Os marcadores microssatélites são indicados para esse tipo de análise pelas características de co-dominância, multialelismo, ampla distribuição no genoma e simplicidade da técnica que se baseia na reação da polimerase em cadeia (PCR). Esse estudo teve como objetivo avaliar quanto a pureza genética um conjunto de sementes de feijão comum resultantes do processo de multiplicação da cultivar BRS Campeiro, incluindo as sementes genéticas, sementes básicas e sementes com tipo diferenciado de grãos, quando comparados com a cultivar padrão, utilizando um sistema de genotipagem semi-automatizado baseado em marcadores microssatélites.

Material e Métodos

Material Vegetal

Foram analisadas quanto a pureza genética 81 grãos derivados de um lote de sementes genéticas e 82 grãos derivados de um lote de sementes básicas, selecionados aleatoriamente, da cultivar BRS Campeiro indicada pela Embrapa Arroz e Feijão no ano de 2005. Adicionalmente, foi analisado um grupo de 73 grãos derivados de um de lote de 120 kg de sementes básica que apresentaram um padrão diferenciado da cultivar padrão, denominados de mistura.

Preparo do DNA

As sementes identificadas foram germinadas em vasos, em casa de vegetação, contendo quatro plantas por vaso. Amostras do tecido foliar foram coletadas após 20 dias para extração do DNA genômico total. A extração do DNA foi realizada segundo protocolo descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998). A concentração do DNA foi estimada por eletroforese submarina em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio (0,2 mg/ml) e comparação com o DNA-padrão fago lambda, seguido por diluição do DNA a 3 ng/ μ L.

Análise molecular utilizando marcadores microssatélites

Inicialmente, 19 locos microssatélites previamente desenvolvidos por Blair et al. (2003) para feijão comum foram avaliados individualmente para o

estabelecimento das condições de amplificação e determinação precisa do tamanho dos alelos em pares de base. Em uma segunda etapa, os marcadores microssatélites foram reunidos em quatro grupos, denominados de painéis, atendendo aos seguintes critérios: 1) o tamanho do produto amplificado, 2) as condições de amplificação na PCR e 3) a qualidade do produto amplificado. Os marcadores que amplificaram produtos de PCR sem sobreposição de fragmentos com, no mínimo, 50 pares de base (pb) de diferença entre o maior fragmento do loco "A" e o menor fragmento do loco "B", foram marcados com a mesma fluoresceína. Os marcadores com sobreposição de fragmentos foram marcados com fluoresceínas diferentes, possibilitando a eletroforese simultânea dos locos.

As reações individuais de amplificação de locos microssatélites foram conduzidas em um volume final de 15 μL , contendo 0,85 μL de água estéril, 1,5 μL de tampão de reação 10X, 1,3 μL de dNTP (2,5 mM de cada nucleotídeo), 1,3 μL de DMSO (50%), 4,3 μL do par de primer *Forward* e *Reverse* (0,9 μM cada), 0,6 μL de Taq Polimerase (5 U/ μL) e 5 μL de DNA genômico (3 ng/ μL). Para as reações de PCR onde foram amplificados mais de um loco simultaneamente, foram utilizados 4 μL de tampão de reação 10X, 1,2 μL de dNTP (2,5 mM de cada nucleotídeo), 1,2 μL de DMSO (50%), 1,2 μL do par de cada primer "Forward" e "Reverse" (0,9 μM), 0,6 μL de Taq Polimerase (5 U/ μL), 3 μL de DNA genômico (3 ng/ μL) e água miliQ estéril para completar o volume final para 20 μL .

Os ciclos da PCR realizados em Termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) incluíram uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 4 minutos, seguida por 40 ciclos incluindo uma etapa de desnaturação (95°C por 1 minuto), anelamento (temperaturas variando de acordo com o primer por 1 minuto) e uma etapa de extensão (72°C por 1 minuto), e a etapa final de extensão a 72°C por 30 minutos.

Genotipagem semi-automatizada dos marcadores microssatélites

Os fragmentos amplificados foram separados via eletroforese automatizada utilizando o analisador automático de DNA, modelo ABI 3100 (Applied Biosystems). O tamanho dos fragmentos foi determinado através da eletroforese conjunta de um marcador de massa molecular (BRONDANI; GRATTAPAGLIA,

2001) com cada amostra genotipada. Os dados foram coletados automaticamente através do programa Data Collection® (Applied Biosystems) e analisados manualmente com o auxílio do programa GeneMapper 3.5® (Applied Biosystems).

Resultados e Discussão

Com relação ao padrão de amplificação, dos 19 microssatélites avaliados, nove (BM98, BMy06, BMd33, BMy02, BMd40, BM138, BM212, GATS11 e BM185) amplificaram produtos de boa qualidade, com padrão de bandas específicas e de fácil interpretação, sete marcadores (BM157, BM152, BMd36, BM170, BM161, BM142 e BM184) com um padrão de amplificação inespecífica, onde foi observado a amplificação simultânea de múltiplas bandas migrando acima ou abaixo da banda principal (mais intensa), e três marcadores (BMd41, BM53 e BMd03) com produtos de PCR de difícil interpretação. Após o ajuste das condições de amplificação individual, 16 marcadores foram selecionados e agrupados em quatro sistemas de genotipagem multiplex (Tabela 1).

Tabela 1. Relação dos 16 marcadores microssatélites utilizados na análise de identidade genética de sementes genéticas e básicas da cultivar BRS Campeiro.

Nomenclatura do primer	PIC	T.a. °C	Fluoresceína	Tamanho do fragmento amplificado	Referência	Painel
BMy6 (PV-gaat001)	0.19	56	6-FAM	156-168	Yu et al. (2000)	01
BM212	0.14	56	6-FAM	194-212	Gaitán-Solis et al. (2002)	
BM152	0.55	56	HEX	85-135	Gaitán-Solis et al. (2002)	
BM098	Mono	56	6-FAM	242-256	Gaitán-Solis et al. (2002)	
BM157	0.43	56	6-FAM	92-123	Gaitán-Solis et al. (2002)	02
BMd36	0.53	56	HEX	157-188	Blair et al. (2003)	
BMy2 (PV-ag001)	0.13	56	6-FAM	144-157	Yu et al. (2000)	
BMd33	0.37	56	HEX	89-106	Blair et al. (2003)	03
BM170	0.62	48	HEX	156-256	Gaitán-Solis et al. (2002)	
GATS11	0.60	56	HEX	224-235	Gaitán-Solis et al. (2002)	
BMd40	0.48	56	6-FAM	177-229	Blair et al. (2003)	
BM161	0.17	56	HEX	186-202	Gaitán-Solis et al. (2002)	04
BM142	Mono	56	6-FAM	150-154	Gaitán-Solis et al. (2002)	
BM138	0.14	54	6-FAM	191-203	Gaitán-Solis et al. (2002)	
BM185	0.66	56	6-FAM	92-114	Gaitán-Solis et al. (2002)	
BM184	0.56	48	HEX	149-163	Gaitán-Solis et al. (2002)	

Das 81 plantas derivadas das sementes genéticas morfológicamente idênticas a cultivar BRS Campeiro, 11 (13,58%) apresentaram variação molecular para um loco marcador quando comparadas com a amostra padrão. Uma planta apresentou variação para o loco BM170 e as demais 10 plantas variaram para o loco BMd36, conforme descrito na Tabela 2. Os alelos com padrão diferente do esperado foram re-avaliados para fins de comprovação do seu tamanho, sendo que os resultados foram confirmados. Dentre as variações alélicas observadas, houve o predomínio de apenas um alelo para todas as amostras testadas. A ocorrência dessa variação pode ser resultante do processo pelo qual a cultivar BRS Campeiro (grão preto) foi desenvolvida, baseado na indução de mutação com raios gama visando alterar a cor do tegumento da cultivar Corrente (grão mulatinho), e conduzida, pelo método genealógico associado à seleção massal (CARNEIRO et al., 2005). A indução da mutação certamente alterou, além do gene alvo para cor do tegumento, outras regiões no DNA não sujeitas ao processo de seleção durante a condução da população. Dessa forma, alelos diferentes em um mesmo loco gênico podem ter sido fixados no decorrer do processo de seleção massal, resultando na variação intraloco descrita acima. Com relação à amostragem das 82 plantas individuais derivadas de um lote de sementes básica, cinco apresentaram um padrão diferencial de alelos quando comparados com o perfil molecular da cultivar original, conforme descrito na Tabela 3. Das cinco plantas, uma apresentou um alelo diferente para dois locos gênicos e as demais diferiram para apenas um loco.

Tabela 2. Descrição das variações alélicas identificadas em relação a amostra padrão BRS Campeiro para a amostragem de sementes genéticas avaliadas com 16 locos microssatélites.

<i>Amostra</i>	<i>Marcador microssatélite</i>	<i>Alelo identificado na amostra padrão</i>	<i>Alelo diferente do esperado</i>
30	BM170	176	180
59	BMd36	174	176
60	BMd36	174	176
53	BMd36	174	176
62	BMd36	174	176
56	BMd36	174	176
64	BMd36	174	176
57	BMd36	174	176
74	BMd36	174	176
75	BMd36	174	176
68	BMd36	174	176

Tabela 3. Descrição das variações alélicas identificadas em relação à amostra padrão BRS Campeiro para a amostragem de sementes básicas avaliadas com 16 locos microssatélites.

<i>Amostra</i>	<i>Marcador microssatélite</i>	<i>Alelo identificado na amostra padrão</i>	<i>Alelo diferente do esperado</i>
10	BM170	176	174
51	BM170 e BMd40	176 e 195	174 e 198
30	BMd36	176	174
64	BM152	101	106
82	BM152	101	104

Das 41 amostra identificadas como mistura dentro do lote de sementes básicas, onde o padrão diferencial apresentado pela semente foi identificado e descrito, apenas seis amostras individuais apresentaram alelos diferentes da amostra padrão Campeiro (Tabela 4), sendo que quatro amostras diferiram para um loco e duas (Carioca 7 e Carioca Zebra 5) para dois locos.

Tabela 4. Descrição das variações alélicas para a amostragem de 41 plantas oriundas de sementes básicas, identificadas como atípicas em relação à amostra padrão BRS Campeiro e classificadas quanto ao padrão diferencial dos grãos, avaliadas com 16 locos microssatélites.

<i>Amostra</i>	<i>Marcador microssatélite</i>	<i>Alelo identificado na amostra padrão</i>	<i>Alelo diferente do esperado</i>
Roxo/1	BM170	176	174
Roxo/3	BM152	101	104
Carioca/7	BMd36 e BMd40	176 e 195	172 e 198
Carioca Zebra/3	BM157	92	94
Carioca Zebra/5	BM170 e BM138	176 e 197	174 e 196
Carioca Graúdo/6	BM157	92	94

Dentre as 73 amostras identificadas como sementes atípicas dentro do lote de sementes básicas, foram identificadas 25 amostras (34%), com alelos diferentes da cultivar padrão. Dessas, 18 (72%) diferiram para apenas um loco, cinco (20%) apresentaram variação em dois locos e duas (8%) apresentaram um loco em heterozigose (Tabela 5). Dentro dos grupos de sementes atípicas que apresentaram variação genética, as sementes descritas como Campeiro/Roxo, Campeiro/Carioca, Campeiro/Graúdo, Campeiro/Carioca Zebra confirmaram a presença de alelos que diferiram da amostra padrão. Conforme o esperado, pelo padrão fenotípico diferencial das sementes, os resultados apontam falhas no processo de multiplicação. Particularmente, para o grupo de sementes Campeiro/

Carioca Zebra (feijão com tipo carioca, mas com rajas pretas) onde existe um forte indicativo de ocorrência de cruzamento natural no processo de obtenção de semente genética, foram observadas variações genéticas para mais de um loco gênico. Para as sementes com padrão descrito como Campeiro/Preto Imaturo, não foram observados alelos diferentes do esperado, tendo em vista que o padrão fenotípico é de sementes imaturas da cultivar BRS Campeiro, indicando se tratar de uma variação em função do estágio de colheita das sementes.

Tabela 5. Descrição das variações alélicas para a amostragem de 32 sementes básicas, identificadas como mistura em relação à amostra padrão BRS Campeiro, avaliadas com 16 locos microssatélites.

<i>Amostra</i>	<i>Marcador microssatélite</i>	<i>Alelo identificado na amostra padrão</i>	<i>Alelo diferente do esperado</i>
A08	Bmy06	157	160
D08	BM170	176	174
A07	BM98	251	254
B07	BM98 e BMd40	251 e 195	254 e 198
C07	BM98	251	254
A06	BM98 e BM170	251 e 176	254 e 174
B06	BM98	251	254
C06	BM98	251	254
A05	BM98	251	254
B05	BM98	251	254
B04	BM98 e BMd40	251 e 195	254 e 198
A03	BM98	251	254
C03	Bmy06	157	160
D03	BM170	176	174
A02	BMy06	157	158/168
B02	BMy06	157	158/166
A01	BM98	251	254
B01	BM98	251	254
D01	BM170	176	174

Conforme o esperado, a análise molecular mostrou que o número de sementes geneticamente diferente da cultivar padrão foi bem maior para os grupos de sementes classificadas como misturas. A grande maioria das variações alélicas observadas retrataram locos em homozigose, sendo que foram identificados apenas dois genótipos com um loco em heterozigose. A presença de locos em heterozigose pode ser um indicativo da ocorrência de cruzamento durante o processo de produção das sementes genéticas. Uma vez que as sementes não

foram analisadas a partir de lotes de sementes, e sim como grupo de sementes manualmente separadas a partir de amostragens de vários lotes, não é possível concluir a respeito da aprovação ou não dos lotes comerciais de sementes de feijão comum. Entretanto, os resultados da análise molecular apontam claramente para variações genéticas entre as sementes avaliadas.

O predomínio dos locos em homozigose é esperado em feijão comum por se tratar de uma espécie autógama. Contudo, certo grau de heterogeneidade é esperado, uma vez que não é possível obter plantas totalmente idênticas após 3 ou 4 gerações de auto-fecundação, que é o número de gerações obtidos normalmente para o desenvolvimento de sementes genéticas. Espera-se sempre encontrar a heterozigose residual, mesmo após dezenas de gerações de auto-fecundação, mas em nível sempre ao redor de 1%. A ocorrência de sementes com padrão genético diferente da amostra pode resultar na ocorrência de segregação, e que pode levar à reprovação de lotes de sementes que seriam utilizadas para comercialização. Neste caso a variação pode ser resultante de fluxo gênico, onde a fonte doadora de pólen poderia ser plantas de feijoeiro cultivadas em áreas adjacentes ao campo de produção de sementes, ou mistura de sementes em alguma etapa durante o processo de obtenção de sementes. As causas mais prováveis de mistura são por contaminação mecânica, que podem ocorrer tanto em função da utilização de colhedora com sementes residuais de outros genótipos, quanto devido à germinação de plantas voluntárias de feijão no campo experimental. Entretanto, nessa situação, seriam esperadas variações alélicas em mais de um loco gênico, o que não foi observado, indicando a necessidade de incluir um maior número de marcadores na análise para fins de confirmação destas hipóteses.

O número mínimo de diferenças genéticas para declarar a distinguibilidade entre dois genótipos com elevada confiabilidade ainda é contraditório na literatura. Para soja, Schuster et al. (2004) adota o limite de apenas uma diferença (diferença em um loco) para considerar uma mistura varietal. Adotando uma estratégia mais conservadora, Grattapaglia et al. (2003) exige no mínimo duas diferenças genéticas para declarar dois materiais como distintos com elevada contabilidade. No estudo atual, tendo em vista que os marcadores microsatélites utilizados ainda estão em fase de determinação de seu conteúdo informativo e caracterização quanto ao seu padrão de amplificação, optou-se por considerar, no mínimo, duas diferenças genéticas para declarar duas plantas geneticamente distintas. Deste modo, para os genótipos identificados como

sementes genéticas, não foram identificados materiais distintos entre si. Para os grupos de genótipos classificados como mistura, apenas seis genótipos diferiram geneticamente para mais de um loco, apresentando indícios da ocorrência de mistura varietal.

Schuster et al. (2004), utilizando marcadores microssatélites, ao avaliarem onze lotes de sementes de soja considerados como impuros na análise visual e, portanto, eliminados do processo de certificação, verificaram que apenas quatro apresentavam número de sementes de outras cultivares acima do limite tolerado. No estudo atual, com base nos dados moleculares, pode-se concluir que os lotes de sementes, das quais as sementes atípicas e com padrão genético diferencial foram identificadas, são lotes que apresentam um comprometimento quanto à sua pureza varietal, sugerindo a necessidade de um controle mais rígido no monitoramento do processo de multiplicação. Por outro lado, das sementes consideradas atípicas, que poderiam resultar na reprovação de um lote, apenas cinco apresentaram variação genética quando comparadas com a amostra padrão. Desta forma, a análise do DNA tem se mostrado um método eficiente e robusto para identificar variações genéticas, podendo ser implementada como rotina para complementar os testes de certificação de lotes de sementes feitos a partir de métodos tradicionais.

Conclusões

- O grau de pureza genética encontrado nas amostras de sementes genética foi considerado satisfatório;
- As variações genéticas encontradas para dois locos gênicos na amostra de semente básica configuram a ocorrência de mistura;
- Os locos em heterozigose identificados na amostragem de sementes atípicas, oriundos de fecundação cruzada ou mistura de sementes, podem levar à ocorrência de segregação nos lotes de sementes durante o processo de produção da semente básica;

A análise molecular mostrou-se adequada e eficiente para detectar as variações genéticas, sendo recomendada a sua implementação em atividades de rotina, em complementação aos testes de certificação de lotes de sementes comerciais feitos a partir de métodos tradicionais.

Referências

- BLAIR, M. W.; PEDRAZA, F.; BUENDIA, H. F.; GAITÁN-SOLÍS, E.; BEEBE, S. E.; GEPTS, P.; TOHME, J. Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 107, n. 8, p. 1362-1374, Nov. 2003.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF, 1992. 365 p.
- BRONDANI, R. P. V.; GRATTAPAGLIA, D. Cost-effective method to synthesize a fluorescent internal DNA standard for automated fragment sizing. **BioTechniques**, Natick, v. 31, n. 4, p. 793-800, Oct. 2001.
- CARNEIRO, J. E. de S.; FARIA, L. C. de; PEREIRA, P. A. A.; DEL PELOSO, M. J.; RAVA, C. A.; COSTA, J. G. C. da; CARNEIRO, G. E. de S.; SOARES, D. M.; CABRERA DÍAZ, J. L.; MELO, L. C.; MESQUITA, A. N. de; FARIA, J. C. de; SILVA, H. T. da; SARTORATO, A.; BASSINELLO, P. Z.; ZIMMERMANN, F. J. P. BRS Campeiro: nova cultivar de feijoeiro comum, de grão preto, para o sul do Brasil. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO - CONAFE, 8, 2005, Goiânia. **Anais...** Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2005. v. 1, p. 342-344. (Embrapa Arroz e Feijão. Documentos, 182).
- DELLA VECCHIA, P. T.; SILVA, C. A. R. da; TERCENIANO-SOBRINHO, P. Use of molecular marker techniques in seed testing by brazilian seed companies. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 55, p. 79-82, ago. 1998. Número especial.
- FEIJÃO - Estatísticas. Disponível em: < <http://www.abrasem.com.br/estatisticas/index.asp> > . Acesso em: 12 nov. 2007.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.
- FONSECA, T. **Considerações sobre proteção na área vegetal**. Disponível em: < <http://agenciact.mct.gov.br/index.php/content/view/19068.html> > . Acesso em: 26 out. 2006.

GAITÁN-SOLÍS, E.; DUQUE, M. C.; EDWARDS, K. J.; TOHME, J. Microsatellite repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris*): isolation, characterization, and cross-species amplification in *Phaseolus* ssp. 2002. **Crop Science**, Madison, v. 42, n. 6, p. 2128-2136, Nov./Dec. 2002.

GRATTAPAGLIA, D.; SOARES, C.; FERREIRA, M. E. Desenvolvimento e análise genética de um banco de dados de perfis genéticos de marcadores microsatélites das variedades de soja protegidas no Brasil. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 49., 2003, Águas de Lindóia. **Anais...** [S.l.]: Sociedade Brasileira de Genética, 2003. 1 CD-ROM.

SCHUSTER, I.; QUEIROZ, V. T. de; TEIXEIRA, A. I.; BARROS, E. G. de; MOREIRA, M. A. Determinação da pureza varietal de sementes de soja com o auxílio de marcadores moleculares microsatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 39, n. 3, p. 247-253, mar. 2004.

VIEIRA, E. H. N.; RAVA, C. A. Características botânicas e fisiológicas da semente. In: VIEIRA, E. H. N.; RAVA, C. A. (Ed.). **Sementes de feijão: produção e tecnologia**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2000. p. 25-38.

YU, K.; PARK, S. J.; POYSA, V.; GEPTS, P. Integration of simple sequence repeat (ssr) markers into a molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **The Journal of Heredity**, Washington, v. 91, n. 6, p. 429-434, Nov./Dec. 2000.