

Determinação da pureza varietal de sementes da cultivar de soja BRS Raimunda utilizando marcadores moleculares

MOREIRA, C.T.¹; BROGIN, R.L.²; SOUZA, P. I. M. de¹; FARIAS NETO, A.L. de¹; ABUD, S.¹; TEIXEIRA, R.N.³;

¹Embrapa Cerrados, Cx. P. 08223. 73310-970, Planaltina, DF;

²Embrapa Soja; ³Embrapa Transferência de Tecnologia
claudete@cpac.embrapa.br



Introdução

É comum observar variações na cor do hilo, em razão das influências ambientais, em cultivares de soja. Temperaturas altas, associadas ou não à ocorrência de veranicos, durante a fase de desenvolvimento da semente, normalmente contribuem para modificar a coloração típica do hilo.

Na safra 2001/2002, durante a produção de semente genética da cv. BRS Raimunda, foram observadas variações na cor do hilo dessa cultivar pela primeira vez. Alguns hilos apresentaram a coloração típica preta, outros apresentaram descoloração parcial do preto, passando a cinza e, também, descoloração total, passando a marrom-claro (MOREIRA et al., 2002).

O objetivo deste trabalho foi verificar a pureza genética de um lote de semente genética de soja da cultivar, com variação na cor do hilo de algumas sementes.

Material e métodos

Para esse teste foram utilizadas sementes consideradas atípicas na avaliação visual da pureza genética de sementes da cultivar BRS Raimunda, apresentando variação na cor do hilo, produzidas na Fazenda Sucupira, em Brasília, DF. As sementes atípicas foram agrupadas em três subamostras: (1) hilo com aspecto preto/cinza ("intermediário"); (2) hilo claro com aspecto cinza; (3) hilo claro com aspecto marrom. Também foram tomadas sementes-padrão da cultivar em avaliação, com coloração normal do hilo na cor preta. Os testes de laboratório foram realizados na Embrapa Soja, em Londrina, PR.

Extração de DNA e composição dos bulks de DNA

A extração do DNA das sementes foi realizada de acordo com o protocolo descrito por McDonald et al. (1994), com algumas modificações, conforme descrito por Schuster et al. (2004).

Seis sementes de cada uma das subamostras foram submetidas à extração de DNA, individualmente. Depois da extração, a mesma quantidade da solução, contendo o DNA de cada uma das sementes de cada subamostra, foi "aliquotada" e adicionada em um mesmo microtubo para formar o bulk de DNA de cada subamostra.

Extração do DNA

De cada semente, foram cortadas fatias de 20 e 30 mg do cotilédono. Esses fragmentos foram colocados em tubos de microcentrifuga com capacidade para 1,5 mL e foram adicionados 300 µL de tampão de extração (Tris-HCl 200 mM, pH 7,5, NaCl 288 mM, EDTA 25 mM e SDS 0,5%).

Os fragmentos foram macerados com pistilo, acrescentando-se mais 700 µL do tampão de extração, sendo a mistura homogeneizada por um minuto em agitador do tipo vortex. Os tubos foram centrifugados por 4 minutos a 10.144 g, sendo o sobrenadante transferido para um novo tubo e centrifugado novamente por 4 minutos à mesma velocidade. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e foram adicionados 10 µL de proteinase K (10 mg/mL) e 10 µL de CaCl₂ 1 mM para remoção das proteínas, em banho-maria a 37 °C por 30 minutos.

Após resfriamento à temperatura ambiente, foram adicionados 900 µL de isopropanol a cada tubo para precipitar o DNA, e os tubos foram centrifugados por 7 minutos a 10.144 g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi secado por 15 minutos à temperatura ambiente. Para a eliminação de RNA, o precipitado foi ressuspenso em 300 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 e EDTA 1 mM), contendo 40 µL/mL de RNase a 10 mg/mL. Os tubos foram novamente colocados em banho-maria a 37 °C por 30 minutos e, em seguida, a precipitação com isopropanol foi repetida. O sobrenadante foi descartado, o precipitado foi secado e o DNA foi ressuspenso em 300 µL de TE. Os testes de qualidade e a quantificação do DNA foram feitos em gel de agarose 0,8%, contendo 0,2 µg/mL de brometo de etídio. Foram aplicados 7 µL de cada amostra de DNA, com 3 µL de corante tipo IV (azul de bromofenol 0,25% e sacarose 40%). O DNA foi quantificado no gel por comparação com padrões de DNA de concentrações conhecidas. Após a quantificação, o DNA foi diluído em TE para uma concentração de 10 ng/µL.

Amplificação do DNA

As reações de amplificação de microssatélites foram realizadas conforme descrito no trabalho realizado por Schuster et al. (2004). Os primers utilizados para a realização do teste, a maioria proposta no trabalho citado acima, estão bem distribuídos no mapa genético da soja (Cregan et al., 1999) e encontram-se descritos na Tabela 1.

As reações de amplificação de microssatélites foram feitas em um volume total de 25 µL, contendo Tris-HCl 12,5 mM (pH 8,3), KCl 62,5 mM, MgCl₂ 2,5 mM, 125 µM de cada um dos deoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,2 µM de cada primer (senso e anti-senso), uma unidade da enzima Taq DNA polimerase e 30 ng de DNA. As amplificações foram realizadas em termociclador Perkin Elmer 9600, programado para uma etapa inicial de 7 minutos a 72 °C, seguida de 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 min a 50 °C e 2 minutos a 72 °C. Por fim, uma etapa de 7 minutos a 72 °C.

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose/synergel 3%, contendo brometo de etídio (0,2 µg/mL) e tampão TBE 1X (Tris-Borato 90 mM, EDTA 2 mM). Nas extremidades dos géis foi adicionado o marcador de peso molecular de 50 pares de bases. Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta.

Tabela 1. Relação dos primers utilizados para a determinação da pureza genética de sementes da cultivar de soja BRS Raimunda.

Primer	Grupo de Ligação	Primer	Grupo de Ligação
Satt042	A1	Sat_001	D2
Sat_128	B1	Satt045	E
Satt079	C2	Satt030	F
Satt100	C2	Satt146	F
Satt307	C2	Sat_064	G
Satt460	C2	Sat_094	G
Satt184	D1a+Q	Satt038	G
Satt163	G	Sat_099	L
Satt181	H	Satt156	L
Sat_105	I	Satt175	M
Satt162	I	GMABAB	N
Satt183	J	Sat_038	O
Satt244	J	Sat_127	Não mapeado
Satt167	K	Satt586	Não mapeado

Resultados

Foram testados 28 primers de microssatélites nos quatro bulks de DNA das sementes. Nenhum dos primers testados identificou polimorfismo entre o DNA das subamostras com coloração atípica do hilo e a amostra-padrão da cultivar BRS Raimunda. Nas Figuras de 1 a 5, podem ser observadas as fotos dos géis contendo os perfis de bandas dos 28 primers testados. Um mesmo tamanho de fragmento, amplificado por cada um dos primers foi observado entre as subamostras.

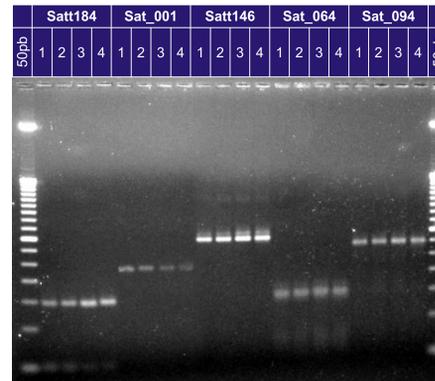


Figura 1. Géis contendo perfis de bandas dos primers Satt184, Sat_001, Satt146, Sat_064, Sat_094. (1- hilo com aspecto preto/cinza (intermediário); 2- hilo claro com aspecto cinza; 3- hilo claro com aspecto marrom; 4- hilo na cor preta, padrão normal das sementes).

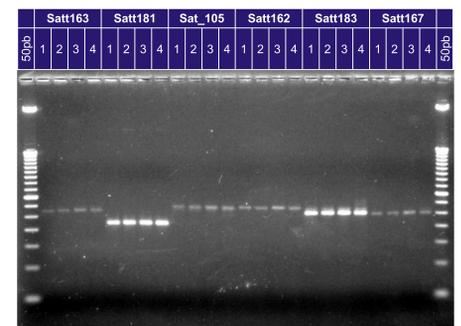


Figura 2. Géis contendo perfis de bandas dos primers Satt163, Satt181, Sat_105, Satt162, Satt183, Satt167. (1- hilo com aspecto preto/cinza intermediário; 2- hilo claro com aspecto cinza; 3- hilo claro com aspecto marrom; 4- hilo na cor preta, padrão normal das sementes).

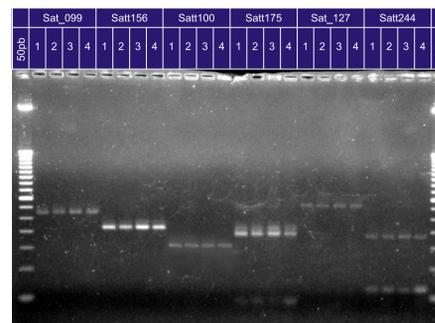


Figura 3. Géis contendo perfis de bandas dos primers Sat_099, Satt156, Satt100, Satt175, Sat_127 e Sat244. (1- hilo com aspecto preto/cinza (intermediário); 2- hilo claro com aspecto cinza; 3- hilo claro com aspecto marrom; 4- hilo na cor preta, padrão normal das sementes).

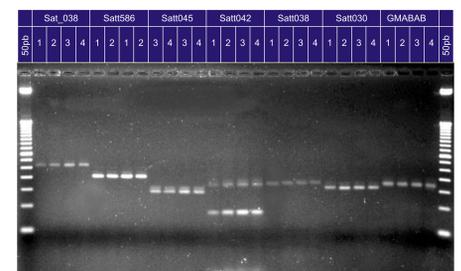


Figura 4. Géis contendo perfis de bandas dos primers Sat_038, Satt586, Satt045, Satt042, Satt038, Satt030 e GMABAB. (1- hilo com aspecto preto/cinza (intermediário); 2- hilo claro com aspecto cinza; 3- hilo claro com aspecto marrom; 4- hilo na cor preta, padrão normal das sementes).

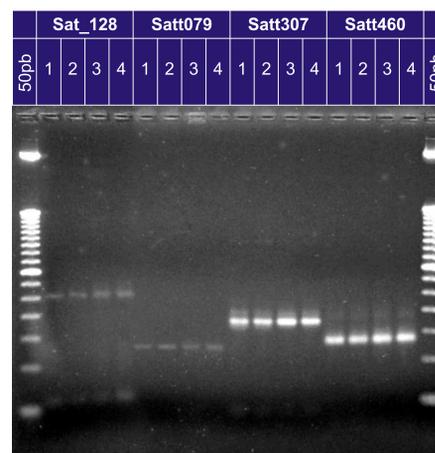


Figura 5. Géis contendo perfis de bandas dos primers Sat_128, Satt079, Satt307, Satt460. (1- hilo com aspecto preto/cinza (intermediário); 2- hilo claro com aspecto cinza; 3- hilo claro com aspecto marrom; 4- hilo na cor preta, padrão normal das sementes).



Sementes de soja da cultivar BRS Raimunda com coloração padrão e com variação na cor do hilo.

Conclusão

Não há diferença genética entre a amostra-padrão da cultivar BRS Raimunda e as subamostras com coloração atípica de hilo.

Referências bibliográficas

McDonald, MB; Elliot, LJ; Sweeney, PM. DNA extraction from dry seeds for RAPD analyses in varietal identification studies. *Seed Science & Technology*, v.22, p.171-176, 1994.

MOREIRA, C.T.; SOUZA, P.I.M.; TEIXEIRA, R.N.; FARIAS NETO, A.L.; ABUD, S. Variação na coloração da cor do hilo da cultivar de soja BRS Raimunda. In: Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil (24.:2002: São Pedro, SP) Resumos da XXIV Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil. Londrina: Embrapa Soja, 2002.p.225.

Schuster, I; Queiroz, VT; Teixeira, AI; Barros, EG; Moreira, MA. Determinação da pureza varietal de sementes de soja com o auxílio de marcadores moleculares microssatélites. *Pesq. Agropec. Bras.*, v.39, n.3, p.247-253, 2004.