

Validação de marcadores moleculares para identificação de cultivares forrageiras¹

Rosiana Angélica Campos², Daniele Ribeiro de Lima Reis Faza³, Ana Luisa Sousa Azevedo^{4,5}

¹O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil.

²Graduando em Farmácia – Suprema/Juiz de Fora. e-mail: rosiana.angelica@gmail.com

³Analista - Embrapa Gado de Leite/Juiz de Fora: daniele.reis@embrapa.br

⁴Pesquisadora - Embrapa Gado de Leite/Juiz de Fora: ana.azevedo@embrapa.br

⁵Orientadora

Resumo: Atualmente, existem muitas técnicas para desenvolvimentos de perfis de DNA para a diferenciação de cultivares, tais como os microssatélites. Apesar de ainda não serem utilizados para registro e proteção, as técnicas moleculares vêm sendo utilizadas como ferramentas auxiliares nas análises dos processos, no sentido de comprovação da origem genética da cultivar (teste de paternidade), na identificação de cultivares em casos de uso indevido e em atividades de fiscalização. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi desenvolver perfis de DNA (DNA fingerprinting) para diferenciação das cultivares forrageiras protegidas pela Embrapa. Foram avaliadas as quatro cultivares de capim elefante lançadas pela Embrapa (Pioneiro, BRS Capiapu, BRS Kurumi e BRS Canará) comparadas com acessos do Banco Ativo de Germoplasma de capim-elefante da Embrapa Gado de Leite. Foram testados 21 conjuntos de *primers* de microssatélite e aqueles que apresentaram maior poder de identificação de uma ou mais cultivares foi avaliado em um conjunto maior de amostras. Foi possível identificar um padrão específico para cada uma das cultivares avaliadas e os resultados obtidos serão utilizados para comprovação de identidade e avaliação de comercialização ilegal das cultivares.

Palavras-chave: capim-elefante, cenchrus, microssatélite, ssr

Validation of molecular markers for cultivar identification

Abstract: Currently, there are many techniques for developing DNA profiles for cultivar differentiation, such as microsatellites. Although not yet used for registration and protection, molecular techniques have been used as auxiliary tools in the analysis of processes, in the sense of proving the genetic origin of the cultivar (paternity test), in the identification of cultivars in cases of misuse and in inspection activities. Thus, the objective of this work was to develop DNA profiles (DNA fingerprinting) for differentiation of forage cultivars protected by Embrapa. The four elephant grass cultivars launched by Embrapa (Pioneiro, BRS Capiapu, BRS Kurumi and BRS Canará) were evaluated and compared with accessions from the Elephant grass Germoplasma Bank of Embrapa Gado de Leite. Twenty-one primers were tested and those that showed greater identification power of one or more cultivars were evaluated in a larger set of samples. It was possible to identify a specific pattern for each of the cultivars evaluated and the results obtained will be used for proof of identity and assessment of illegal commercialization of the cultivars.

Keywords: elephant grass, cenchrus, microsatellite, ssr

Introdução

No Brasil, a atividade leiteira é praticada por mais de um milhão de produtores, em sua maioria pequenos, que têm nas pastagens e nas capineiras as mais importantes fontes de alimentação para o rebanho. Fatores como a integração do Brasil aos mercados internacionais, expansão da agricultura, preservação ambiental e inclusão social, dentre outros, têm provocado mudanças nos sistemas de produção animal no sentido da intensificação (VALENTIM, 2004). Tecnologias que promovem a intensificação têm sido desenvolvidas, como a integração lavoura-pecuária, pastejo rotativo e plantio direto, as quais exigem forrageiras adaptadas. Nesse contexto, existe forte demanda por forrageiras de elevado potencial produtivo e qualidade nutricional visando manter elevada a produtividade animal durante o ano todo (PEREIRA et al., 2010). Por esse motivo uma das principais demandas dos produtores refere-se a cultivares forrageiras melhoradas para corte e pastejo que possam atender as necessidades nutricionais dos rebanhos durante todo o ano (VALENTIM, 2004; PEREIRA et al., 2010).

A obtenção de novas cultivares pode ter grande contribuição para solucionar dois problemas principais dos sistemas de produção animal. O primeiro seria a demanda por cultivares adaptadas para sistemas intensificados de produção animal e o segundo por cultivares que possam suprir a deficiência de alimento nas épocas de menor disponibilidade.

O mercado brasileiro de sementes de forrageiras tropicais movimenta aproximadamente R\$ 1 bilhão por ano, o que representa cerca de 20% do mercado formal de sementes no Brasil (JOSÉ, 2013). A demanda por sementes certificadas de espécies forrageiras tropicais chega a 50 mil toneladas, onde 75% destinam-se ao mercado interno e 25% para exportação (CHIARI, 2015). Esses números demonstram a importância da atividade para o agronegócio brasileiro e dá uma ideia do prejuízo que o mercado ilegal (“pirataria”) de sementes de forrageiras tropicais traz para toda a cadeia produtiva. A produção e comercialização de sementes “piratas” de forrageiras tropicais, segundo levantamentos da Associação para o Fomento à Pesquisa de Melhoramento de Forrageiras (Unipasto), alcançam 30% do mercado desse tipo de sementes (JOSÉ, 2013).

O mercado ilegal traz prejuízo para toda a cadeia produtiva. O pecuarista perde, pois as sementes “piratas” têm qualidade duvidosa (baixa qualidade e pureza), o que compromete a formação e a qualidade de suas pastagens. Os produtores de sementes perdem devido à competição desleal pelo preço. Os obtentores das cultivares perdem porque deixam de receber os royalties, o que compromete o retorno dos investimentos às pesquisas de novas cultivares. Por fim, o governo perde porque deixa de arrecadar impostos, o que se traduz em prejuízo a toda sociedade brasileira.

A identificação de cultivares tem sido tradicionalmente realizada por meio de descritores morfológicos, aceitos para registro e proteção de cultivares pela UPOV (União Internacional para a Proteção de Novas Variedades de Plantas), da qual o Brasil é signatário (IPGRI, 1997). Entretanto, esses descritores têm muitas desvantagens, como o baixo número e o fato de sofrerem a influência do ambiente na sua expressão, além de interações epistáticas, efeitos pleiotrópicos, etc. Ademais, a perícia desses descritores é, geralmente, difícil e restrita a especialistas.

Atualmente, existem muitas técnicas para desenvolvimentos de perfis de DNA (DNA fingerprinting) para a diferenciação de cultivares, tais como os microssatélites. Apesar de ainda não serem utilizados para registro e proteção, as técnicas moleculares vêm sendo utilizadas como ferramentas auxiliares nas análises dos processos, no sentido de comprovação da origem genética da cultivar (teste de paternidade), na identificação de cultivares em casos de uso indevido e em atividades de fiscalização (AVIANI & SANTOS, 2011). Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi desenvolver perfis de DNA (DNA fingerprinting) para diferenciação das cultivares forrageiras protegidas pela EMBRAPA.

Material e Métodos

Foram coletadas folhas jovens de todas as cultivares lançadas pela Embrapa nos últimos 10 anos. O DNA foi extraído utilizando o método de Bonato et al. (2002), que obtém DNA de alta qualidade. O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific®) e sua integridade verificada em gel de agarose corado com GelRed (Biotium).

Para a amplificação com os marcadores microsatélites foram sintetizados *primers* simples para avaliação em gel de poli(acrilamida) e *primers* marcados com diferentes fluoróforos (6FAM™, VIC®, NED™ e PET®) para eletroforese capilar. A reação em cadeia de polimerase foi realizada em um volume final de 20 µL como descrito: 1X GoTaq reaction buffer (Promega, Wisconsin, Estados Unidos), 0,5 µM de cada *primer*, 3 mM MgCl₂, 0,4mM dNTP, 1 unidade de GoTaq Flexi DNA Polimerase (Promega, Wisconsin, Estados Unidos) e 45 ng de DNA genômico. As reações em cadeia da polimerase foram realizadas em termociclador Veriti (Life Technologies, Califórnia, Estados Unidos) com o seguinte perfil: desnaturação inicial a 95°C (15 minutos), seguido de 5 ciclos a 94°C (30 segundos), temperatura de ligação específica de cada *primer* (90 segundos) e 57°C (1 minuto), com decréscimo de 1°C na temperatura de ligação por ciclo; 25 ciclos a 94°C (30 segundos), temperatura de ligação específica de cada *primer* (90 segundos) e 52°C (1 minuto); e um ciclo final de extensão de 60 minutos a 60°C. Em seguida, os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de poli(acrilamida) a 8% por 5 horas a uma voltagem de 500 V.

Com base no poder discriminatório dos alelos, foram desenvolvidos os perfis de DNA, baseados em SSR, para cada cultivar.

Resultados e Discussão

A partir dos resultados dos testes de amplificação dos *primers* desenhados, os 21 mais promissores foram avaliados para a identificação de polimorfismos entre 20 cultivares/aceessos do Banco Ativo de Germoplasma de capim-elefante (BAGCE) da Embrapa.

O *primer* RNA-CE 05 mostrou um padrão de bandas que diferenciaram as cultivares BRS Kurumi e Mott (um dos parentais do Kurumi) dos demais acessos analisados. Como pode ser observado na Figura 1, ambas as amostras apresentaram bandas exclusivas próximas a 290 pb.

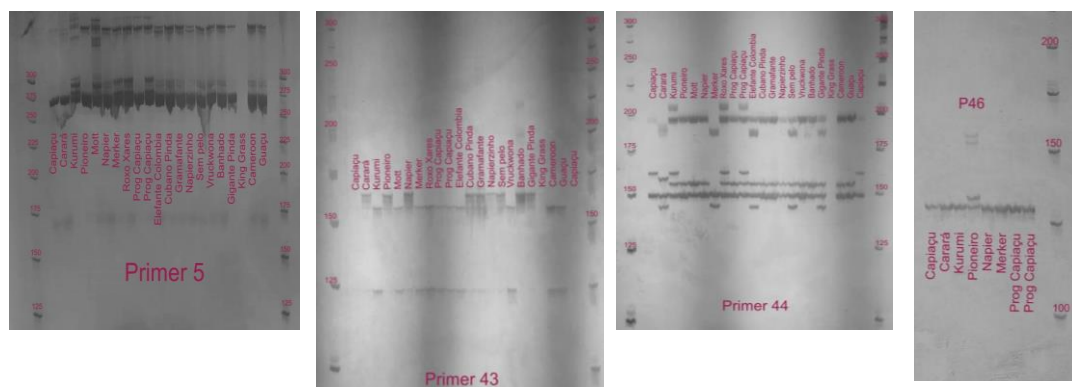


Figura 1. Gel de acrilamida com os *primers* 5, 43, 44 e 46 avaliados em amostras de DNA de cultivares e acessos pertencentes ao BAGCE.

O *primer* RNA-CE 44 permitiu a identificação de um padrão de bandas único para BRS Canará, como visto na Figura 1. Para esta cultivar, foi identificado um perfil de bandas com tamanhos de 145, 150 e 158 pb.

A identificação de um padrão único da cultivar Pioneiro pode ser observada no *primer* RNA-CE 46. A partir da avaliação de amplificação de BRS Capiáçu, BRS Canará, BRS Kurumi, Pioneiro, Napier, Merker e Prog Capiáçu foi possível visualizar que a cultivar Pioneiro apresentou bandas nas regiões de 130 e 133pb (Figura 1).

Três *primers* foram informativos para a identificação da cultivar BRS Capiáçu. Assim como pode ser visto na Figura 1, RNA-CE 5 apresentou uma única banda na região de 270 pb. Já RNA-CE 43 se diferencia por não ser amplificado na cultivar aqui em destaque. O *primer* RNA-CE 44 pode ser considerado um forte identificador de Capiáçu por apresentar um padrão de banda único, com bandas encontradas somente nas regiões 150 e 162 pb (Figura 1).

Conclusões

Com os marcadores microssatélites avaliados é possível identificar as seguintes cultivares de capim-elefante: BRS Capiáçu, BRS Kurumi, BRS Canará e Pioneiro.

Referências

- AVIANI, D. M.; SANTOS, F. S. Uso de marcadores moleculares em proteção de cultivares. In: BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Proteção de Cultivares no Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo, Brasília: Mapa/ACS, 2011. p.155-158.
- BONATO, A. L. V.; VERZIGNASSI, J. R.; RESENDE, R. M. S.; FERNANDES, C. D.; LEGUIZAMON, G. O. de C. **Extração de DNA genômico de *Stylosanthes* spp.** Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2002. 4 p. (Embrapa Gado de Corte. Comunicado Técnico, 78)
- JOSÉ, M. R., Forrageiras: uma grande parceira para o agronegócio. Associação Brasileira de Sementes e Mudanças Anuário, 2012.
- PEREIRA, A. V.; AUAD, A. M., LÉDO, F. J. S.; BARBOSA, S. Pennisetum purpureum. In: FONSECA, D. M., MARTUSCELLO, J. A. Eds. **Plantas Forrageiras**. Viçosa: UFV, 2010. p. 198-220.
- VALENTIM, J. F. Pecuária na Amazônia: mudanças macroeconômicas, políticas, tecnológicas e conexões entre o seminário de Porto Velho e o workshop de Belém. In: WORKSHOP INTERNACIONAL PARA DESENVOLVIMENTO DA PECUÁRIA NA AMAZÔNIA: BASES PARA A PRODUÇÃO E SUSTENTABILIDADE DAS PASTAGENS, 2004, Belém, PA. Anais... Belém: Embrapa/Iniciativa Amazônica/ Procitrópicos/IICA, 2004. 1 CD.