

Validação de um painel específico (*Fingerprinting*) para identificação de cultivares de *Urochloa*¹

Rafaella Lima Oliveira de Magalhães ^{2,3}
 Ariany Lacerda Nogueira ^{2,4}
 Stela Mayworm Jens ^{2,5}
 Hyago Passe Pereira ⁶
 Robert Domingues ⁷
 Daniele Ribeiro de Lima Reis Faza ⁸
 Marta Fonseca Martins ⁹
 Marco Antonio Machado ⁹
 Ana Luisa Sousa Azevedo ^{9,10}

Resumo: No Brasil, a atividade leiteira é praticada por mais de um milhão de produtores que dependem diretamente das pastagens para alimentação dos animais. Estão disponíveis no mercado diferentes cultivares forrageiras que visam atender às variadas condições edafoclimáticas e diferentes sistemas de produção. O gênero com maior relevância nesse segmento é o *Urochloa*, que possui mais de 20 cultivares protegidas ou registradas no Ministério da Agricultura e mais de 80% das pastagens cultivadas no Brasil. O Brasil é o maior consumidor, exportador e produtor de sementes forrageiras do mundo. Um dos grandes problemas do mercado de sementes de forrageiras é a pirataria e a contaminação de campos de produção de sementes. Visto que a identificação apenas visual é muito complicada para distinção de algumas cultivares, a utilização de marcadores moleculares específicos (fingerprint) é uma alternativa para auxiliar nesse processo. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um painel específico para identificação de cultivares de *Urochloa*. Foram avaliadas 19 cultivares/acessos com 30 marcadores microssatélites. Um total de 256 alelos foram detectados entre todas as cultivares avaliadas. Foram identificados 54 alelos exclusivos e 97 alelos raros, que estão presentes no máximo em três cultivares. A cultivar Marandú apresentou quatro alelos exclusivos e a cultivar BRS Piaã 11, podendo essas serem diferenciadas utilizando oito marcadores moleculares. BRS Ipyborã apresentou dois alelos exclusivos, Mavuno e Mulato II apresentaram apenas um alelo exclusivo, essas cultivares podem ser distintas usando-se nove marcadores moleculares. Para cada cultivar, a melhor combinação de marcadores moleculares foi desenvolvida e pode ser usada para testes de DNA em laboratórios credenciados. Com o uso do painel molecular, a origem genética de cada semente comercializada poderá ser certificada e denúncias de pirataria poderão ser investigadas de forma rápida e precisa.

Palavras-chave: microssatélites, painel molecular, SSR

Validation of a specific panel (*Fingerprinting*) to identify *Urochloa* cultivars

Abstract: In Brazil, the dairy activity is practiced by one million producers that depend

¹ O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil: (a) Parte do projeto "Validação de um painel específico (Fingerprinting) para identificação de cultivares de Brachiaria", liderado por Ana Luisa Sousa Azevedo.

² Bolsista PIBIC CNPq;

³ Graduanda em Ciências Biológicas - Universidade Federal de Juiz de Fora. e-mail: rafaella.magalhaes1234@gmail.com

⁴ Graduanda em Medicina Veterinária - Universidade Federal de Juiz de Fora. e-mail: ariany.lacerda@icb.ufjf.br ⁵ Graduanda em Ciências Biológicas - UniAcademia. e-mail: stelajens@hotmail.com

⁶ Doutorando em Ciências Biológicas (Imunologia e DIP / Genética e Biotecnologia) - Universidade Federal de Juiz de Fora. e-mail: hyago9295@gmail.com

⁷ Analista, Embrapa Pecuária Sul. e-mail: robert.domingues@embrapa.br

⁸ Analista, Embrapa Gado de Leite. e-mail: danielle.reis@embrapa.br

⁹ Pesquisador (a), Embrapa Gado de Leite. e-mail: marta.martins@embrapa.br, marco.machado@embrapa.br

¹⁰ Orientadora. e-mail: ana.azevedo@embrapa.br

pastures for animal feed. Different forage cultivars are available on the market that aim to meet the edaphoclimatic conditions and different production systems. The genus with the highest relevance in this group is *Urochloa*, which has 20 protected or registered cultivars in the Ministry of Agriculture and in more than 80% of cultivated pastures in Brazil. Brazil is the largest consumer, exporter and producer of forage seeds in the world. One of the major problems in the forage seed market is piracy and the contamination of seed production fields. Since it is very complicated to distinguish some cultivars by look, the use of specific molecular markers (fingerprint) is an alternative to assist in this process. Thus, the objective of this work was to develop a specific panel to identify cultivars of *Urochloa*. 19 cultivars/accesses were evaluated with 30 microsatellite markers. A total of 256 alleles were detected among all analyzed cultivars. 54 exclusive alleles and more than 97 rare alleles were identified, which are present in at most 3 cultivars. The Marandú cultivar presented four exclusive alleles and cultivar BRS Piatã 11, which both of these cultivars have the possibility to be differentiated using eight molecular markers. BRS Ipyborã had two exclusive alleles, Mavuno and Mulato II had only one exclusive allele; these cultivars can be distinguished using nine molecular markers. To each cultivar, the best molecular marker combination has been developed and it can be used for DNA testing in accredited laboratories. With the use of molecular panels, a genetic origin of each commercialized seed can be certified and piracy reporting can be investigated rapidly and accurately.

Keywords: microsatellite, molecular panel, SSR

Introdução

No Brasil, a atividade leiteira é praticada por mais de um milhão de produtores, em sua maioria pequenos, que têm nas pastagens a mais importante fonte de alimentação para o rebanho. Visando atender às diferentes demandas, várias cultivares forrageiras estão disponíveis no mercado e os programas de melhoramento estão constantemente buscando o desenvolvimento de novas cultivares para garantir a sustentabilidade da pecuária tropical.

O Brasil é o maior produtor e exportador de sementes de forrageiras tropicais do mundo, destaque para os gêneros *Urochloa* e *Panicum* que juntos possuem uma área de 111 milhões de hectares de pastagens plantadas, chegando a alcançar 90% das pastagens brasileiras (VALLE *et al.*, 2009; UNIPASTO, 2013; IBGE, 2017). Atualmente, o gênero *Urochloa* possui mais de 20 cultivares registradas no Registro Nacional de Cultivares ou protegidas no Serviço Nacional de Proteção de Cultivares.

O principal problema enfrentado é a comercialização ilegal de sementes “piratas”, que traz prejuízo para toda a cadeia produtiva e compromete a formação e a qualidade das pastagens, além de causar perdas financeiras significativas. 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 cerca de 30% do mercado (JOSÉ, 2013).

A diferenciação de cultivares por meio de descritores morfológicos apresenta dificuldades inerentes à grande similaridade morfológica entre as cultivares e à interferência ambiental na expressão das características. A utilização de marcadores moleculares específicos pode ajudar nesse processo de identificação, auxiliando na comprovação da origem genética da cultivar e nas atividades de fiscalização. Atualmente, existem muitas técnicas para determinar o perfil de DNA (DNA fingerprinting) para a diferenciação de cultivares, um exemplo é a utilização de marcadores microsatélites. Apesar de ainda não serem utilizados

para registro e proteção de cultivares, os microssatélites vêm sendo muito utilizados para comprovação de hibridações dentro dos programas de melhoramento, na identificação de sementes piratas e na identificação de contaminação não intencional em campos de produção de sementes (AVIANI; SANTOS, 2011). Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi obter um painel molecular para identificação genética de cultivares de *Urochloa* através do uso de marcadores microssatélites.

Material e Métodos

Foram avaliadas 16 cultivares de *Urochloa* registradas ou protegidas no Ministério da Agricultura e três acessos promissores em fase final de desenvolvimento pelo programa de melhoramento da Embrapa (Tabela 1). O DNA de todas as amostras foi extraído a partir de folhas jovens utilizando o método de Bonato *et al.* (2002) e quantificado em espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific®). As reações de amplificação foram realizadas com volume final de 10 µL, foram adicionados 20 ng de DNA, tampão de PCR 1X (Promega, Fitchburg, EUA), 1,5 mM de MgCl₂, 0,3 mM de dNTP, 0,5 uM de primer e 1 U de GoTaq Polimerase (Promega). Todos os microssatélites foram sintetizados com marcação fluorescente na extremidade 5' (6FAMTM, HEX, NEDTM e TAMRA®) e o produto da PCR foi analisado no sequenciador SeqStudio (Thermo Scientific®). Com base no poder discriminatório dos alelos, foram desenvolvidos os perfis de DNA para identificação de cada cultivar.

Tabela 1: Cultivares e acessos avaliados para o desenvolvimento do painel *fingerprint* e sua respectiva espécie.

Cultivar/Acesso	Espécie
Arapoty	<i>U. brizantha</i>
BRS Paiaguás	<i>U. brizantha</i>
BRS Piatã	<i>U. brizantha</i>
Capiporã	<i>U. brizantha</i>
Marandu	<i>U. brizantha</i>
MG4	<i>U. brizantha</i>
Xaraés	<i>U. brizantha</i>
MG13 Braúna	<i>U. brizantha</i>
B4	<i>U. brizantha</i>
BRS Ybaté	<i>U. brizantha</i>
Basilisk	<i>U. decumbens</i>
R86	<i>U. decumbens</i>
254-1	<i>U. decumbens</i>
MIXE DRWN 12	<i>U. brizantha</i> X <i>U. ruzizensis</i>
BRS Ipyporã	<i>U. brizantha</i> X <i>U. ruzizensis</i>
CIAT BR02 1752	<i>U. brizantha</i> X <i>U. ruzizensis</i> X <i>U. decumbens</i>
CIAT BR02 1794	<i>U. brizantha</i> X <i>U. ruzizensis</i> X <i>U. decumbens</i>
Mulato II	<i>U. brizantha</i> X <i>U. ruzizensis</i> X <i>U. decumbens</i>
970-10	<i>U. brizantha</i> X <i>U. ruzizensis</i> X <i>U. decumbens</i>

Resultados e Discussão

Trinta pares de primers foram utilizados para avaliação de 19 cultivares/acessos de *Urochloa*. Foram detectados 246 alelos no total (média de 11, 7 alelos por marcador), variando de 66 pb a 354 pb.

Para as cultivares de *U. brizantha*, 16 microssatélites foram informativos e são capazes de distinguir todas as cultivares. Avaliando as cultivares Marandu e BRS Piatã, 11 e 15 alelos exclusivos foram identificados, respectivamente. Já para as cultivares de *U. decumbens*, 12 microssatélites foram informativos. Na avaliação das cultivares/acessos oriundos de cruzamento entre duas ou mais espécies, 10 marcadores apresentaram alelos exclusivos em pelo menos um dos acessos ou cultivares. Foi estabelecido um padrão alélico esperado para cada uma das cultivares lançadas pela Embrapa (Tabela 2).

Tabela 2. Alelos raros ou exclusivos esperados para cada uma das cultivares/acessos da Embrapa. Identificação - O primeiro número é o marcador e o segundo número é o tamanho do alelo em pares de bases.

Cultivar	Alelos raros (R) ou exclusivos (E) esperado (SSR Alelo pb)
Arapoty	139_260 ^R / 85_255 ^R
BRS Paiaguás	139_260 ^R / 85_255 ^R
BRS Piatã	132_256 ^R / 112_243 ^R / 37_155 ^R 138_252 ^E / 139_242 ^E / 139_269 ^E / 139_288 ^E / 7_166 ^E / 96_255 ^E / 153_262 ^E / 39_152 ^E / 98_249 ^E / 98_305 ^E / 80_153 ^E
Capiporã	85_243 ^R / 153_241 ^E / 80_76 ^E
Marandu	139_270 ^R / 139_302 ^R / 153_245 ^R / 37_155 ^R 99_244 ^E / 96_254 ^E / 98_255 ^E / 98_311 ^E
B4	139_296 ^R / 139_244 ^E / 99_224 ^E
Xaraés	138_269 ^R / 34_165 ^R / 139_274 ^R / 85_243 ^R / 153_245 ^R / 80_149 ^R 132_260 ^E / 139_278 ^E / 139_282 ^E / 99_247 ^E
BRS Ybaté	139_296 ^R / 139_244 ^E / 99_225 ^E
Basilisk	138_236 ^R / 34_165 ^R / 132_258 ^R / 139_253 ^R / 7_206 ^R / 85_252 ^R / 99_251 ^R / 99_252 ^R / 3012_252 ^R / 98_289 ^R / 7_169 ^E
R86	138_236 ^R / 138_248 ^R / 34_166 ^R / 132_258 ^R / 139_253 ^R / 7_164 ^R / 7_206 ^R / 85_252 ^R / 99_252 ^R / 3012_252 ^R / 39_143 ^R / 80_151 ^E / 34_162 ^E
254-1	138_236 ^R / 138_248 ^R / 34_166 ^R / 132_258 ^R / 139_253 ^R / 139_274 ^R / 7_164 ^R / 7_206 ^R / 85_252 ^R / 99_251 ^R / 99_252 ^R / 3012_252 ^R / 39_143 ^R / 98_289 ^R / 80_151 ^R 85_260 ^E / 98_348 ^E / 80_154 ^E
BRS Ipyporã	34_171 ^R / 112_250 ^R / 37_149 ^R / 139_244 ^E / 7_159 ^E
970-10	139_270 ^R / 85_242 ^R

Conclusões

Apartir das amostras analisadas foi possível identificar padrões Fingerprinting determinantes para indicar diferenças entre todas as cultivares analisadas de *Urochloa*. O padrão alélico identificado será utilizado para confirmação de hibridações e para avaliação da comercialização de sementes piratas.

Referências

JOSÉ, M. R. Forrageiras: uma grande parceira para o agronegócio. Associação Brasileira de Sementes e Mudanças Anuário, 2012.

UNIPASTO. Associação de fomento a pesquisa de melhoramento de forrageiras tropicais. **IBGE, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, Brasil, 2017.**

VALLE, C. B., SIMIONI, C., RESENDE R. M. S., JANK, L., 2009. Melhoramento de Forrageiras Tropicais. 1. **Ed. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2009. 293 p.**

VALLE, C. B., BARRIOS, S. C. L., JANK, L., SANTOS, M. F. Melhoramento de plantas forrageiras para uma pecuária de baixa emissão de carbono. In: **Intensificação da produção animal em pastagens.** Brasília, DF: Embrapa, 2014.