

Validação de um painel específico (*Fingerprinting*) para identificação da cultivar BRS Integra

Rafaella Lima Oliveira de Magalhães^(1,2), Ariany Lacerda Nogueira^(1,3), Robert Domingues⁽⁴⁾, Daniele Ribeiro de Lima Reis Faza⁽⁵⁾, Marta Fonseca Martins^(6,7), Marco Antonio Machado^(6,7), Ana Luisa Sousa Azevedo^(6,8)

⁽¹⁾Bolsista Pibic CNPq, ⁽²⁾Graduanda em Ciência Biológicas - UFJF, Juiz de Fora, MG. Email: rafaella.magalhaes1234@gmail.com, ⁽³⁾Graduanda em Medicina Veterinária - UFJF, Juiz de Foa, MG. Email: ariany.lacerda@icb.ufjf.br, ⁽⁴⁾Analista, Embrapa Pecuária Sul. E-mail: robert.domingues@embrapa.br, ⁽⁵⁾Analista, Embrapa Gado de Leite. E-mail: danielle.reis@embrapa.br, ^(6,7)Pesquisador (a), Embrapa Gado de Leite. Email: marco.machado@embrapa.br, ⁽⁸⁾Orientadora: ana.azevedo@embrapa.br

Resumo- As gramíneas representam a principal fonte de alimentação dos bovinos e o desenvolvimento de novas cultivares forrageiras impacta diretamente a pecuária nacional. Recentemente a Embrapa lançou uma nova cultivar de *Brachiaria* para utilização em sistemas integrados, a BRS Integra, que apresenta acentuada produção de palhada e massa seca de folhagem. Essa é a primeira cultivar sexual de *Brachiaria* lançada pela Embrapa e faz-se necessário um acompanhamento da estabilidade genética ao longo dos ciclos de produção de sementes. Essa avaliação deve ser rápida e precisa, para garantir que as sementes produzidas não foram contaminadas. A identificação baseada apenas na morfologia é trabalhosa e onerosa e uma alternativa é a utilização de marcadores moleculares específicos (*fingerprinting*). Com isso, o objetivo do presente trabalho foi obter um painel molecular para identificação genética da cultivar BRS Integra por meio do uso de marcadores microssatélites. Foram avaliadas sete populações de *U. ruziziensis* com cultivares Kennedy e BRS Integra. Um total de 230 alelos, variando de 100 a 500 pares de bases, foram detectados. Nas populações da cultivar Kennedy foram identificados 196 alelos, dos quais 78 eram únicos e nas populações da BRS Integra foram identificados 146 alelos, sendo 28 exclusivos dessa cultivar. Foi possível identificar alelos com frequências distintas entre as cultivares Kennedy e BRS Integra. Essas informações serão utilizadas para acompanhar a estabilidade genética das sementes comerciais produzidas anualmente, além de auxiliar na identificação de sementes piratas comercializadas ilegalmente.

Termos para indexação: *brachiaria*, microssatélites, SSR, *Urochloa*.

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

Abstract- Forage represents the main source of food for cattle and the development of new forage cultivars has a direct impact on national livestock. Recently, Embrapa launched a new *Brachiaria* cultivar to be used in integrated systems, BRS Integra, which presents a high production of straw and dry mass of foliage. This is the first sexual *Brachiaria* cultivar launched by Embrapa and it is necessary to monitor the genetics stability throughout the seed production cycles. This assessment must be quick and accurate, to ensure that the

seeds produced were not contaminated. Identification based only on morphology is laborious and costly and an alternative is the use of specific molecular markers (fingerprinting). Therefore, the objective of the present work was to obtain a molecular panel for the genetic identification of the cultivar BRS Integra through the use of a microsatellite marker. Seven populations of *U. ruziziensis* with Kennedy cultivars and BRS Integra were evaluated. A total of 230 alleles, ranging from 100 to 500 base pairs, were detected. In the Kennedy populations cultivar, 196 alleles were identified, of which 78 were unique, and in the BRS Integra population, 146 alleles were identified, 28 of which were exclusive to this cultivar. It was possible to identify alleles with different frequencies between Kennedy and BRS Integra cultivars. This information will be used to monitor the genetic stability of commercial seeds produced externally, in addition to assisting in the identification of pirated seeds sold illegally.

Index terms: brachiaria, microsatellite, SSR, *Urochloa*.

Introdução

Segundo levantamentos da Associação para o Fomento à Pesquisa de Melhoramento de Forrageiras (UNIPASTO), a produção e comercialização de sementes “piratas” de forrageiras tropicais alcançam 30% do mercado desse tipo de sementes (JOSÉ, 2013). O mercado ilegal traz prejuízo pra 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 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.

A diferenciação de cultivares por meio de descritores morfológicos também 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 e um exemplo é a utilização de marcadores microssatélites. 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).

Recentemente a Embrapa lançou a cultivar BRS Integra, primeira cultivar de *Urochloa ruziziensis* (*syn. Brachiaria ruziziensis*) desenvolvida para as condições de clima e solo

brasileiros. Essa cultivar visa disponibilizar aos agricultores uma opção para a produção de palhada nos sistemas integrados de cultivo envolvendo lavoura, pecuária e floresta (ILPF). A BRS Integra é uma cultivar sexuada, ou seja, demanda um controle maior nos campos de produção de sementes para evitar o cruzamento com outros materiais.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo a identificação de um conjunto de marcadores moleculares específicos para a detecção de possíveis contaminações em lotes de sementes de BRS Integra, também contribuindo para apontar fraudes (pirataria de sementes). Os resultados que a seguir são expostos vão ao encontro dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) contidos na Agenda 2030, proposta pela Organização das Nações Unidas, da qual o Brasil é signatário, contribuindo para o alcance dos seguintes objetivos específicos: ODS 2 - Erradicação da fome: acabar com a fome, alcançar a segurança alimentar e melhoria da nutrição e promover a agricultura sustentável; ODS 8 - Empregos dignos e crescimento econômico: promover o crescimento econômico sustentado, inclusivo e sustentável, emprego pleno e produtivo, e trabalho decente para todos.

Material e métodos

Foram avaliadas sete populações de *U. ruzizensis* das cultivares Kennedy e BRS Integra (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 µM de primer e 1 U de GoTaq Polimerase (Promega). Todos os microssatélites foram sintetizados com marcação fluorescente na extremidade 5' (6FAM™, HEX, NED™ 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 cada uma das cultivares de *B. ruzizensis*.

Tabela 1. Populações avaliadas para desenvolvimento do painel para identificação da cultivar BRS Integra.

População	Cultivar	Número de indivíduos
VCU - Embrapa	BRS Integra	50 plantas
Semente comercial - UNIPASTO	BRS Integra	48 plantas
Semente genética - Várzea	BRS Integra	31 plantas
Globo Rural	Kennedy	48 plantas
Wolf	Kennedy	48 plantas
Ponto Alto	Kennedy	48 plantas
VCU-Embrapa Kennedy	Kennedy	50 plantas

Resultados e discussão

Doze pares de primers foram utilizados para avaliação das sete populações de *U. ruziziensis*. Foram detectados 230 alelos no total (média de 19,2 alelos por marcador), variando de 100 a 500 pares de bases. Nas populações da cultivar Kennedy foram identificados 196 alelos, dos quais 78 eram únicos e nas populações da BRS Integra foram identificados 146 alelos, sendo 28 exclusivos dessa cultivar (Figura 1).

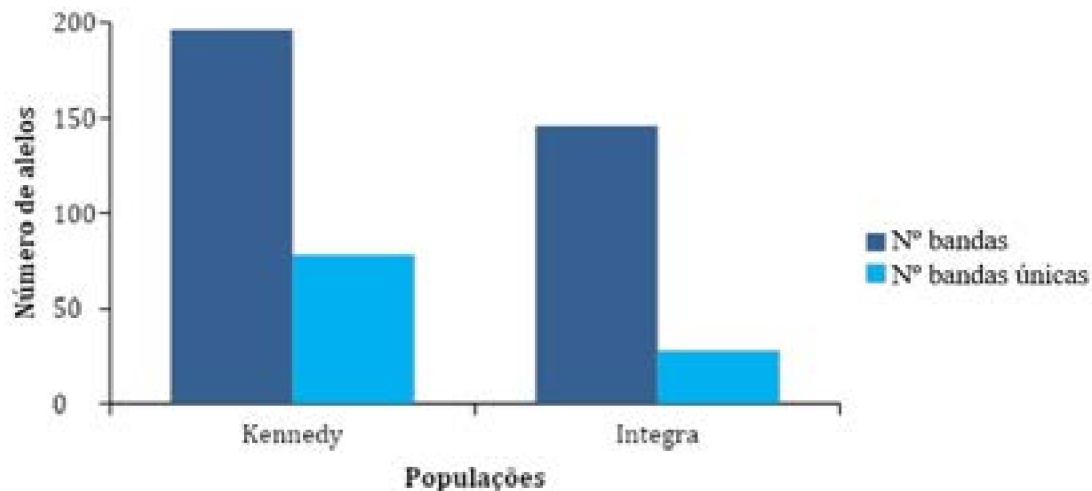


Figura 1. Número de alelos identificados dentro de cada uma das cultivares analisadas – Kennedy e BRS Integra.

Foi realizada uma análise prévia de variância molecular para verificar se os marcadores moleculares selecionados conseguiam identificar variabilidade entre as populações. A maior parte da variabilidade (93%) foi identificada dentro das populações e apenas 7% da variância existente é decorrente da variabilidade entre as sete populações amostradas.

Analisando as sete populações separadamente, foi possível identificar alelos únicos dentro de cada uma delas e foi estabelecida a frequência alélica para posterior determinação dos marcadores mais informativos para diferenciação das duas cultivares.

A partir da avaliação da frequência alélica dentro de cada uma das populações avaliadas, foram selecionados 10 marcadores informativos. Foram selecionados marcadores com frequência alélica distinta entre as duas cultivares. Vinte e quatro alelos se mostraram promissores para auxiliar na distinção entre as duas cultivares (Tabela 2).

Tabela 2. Marcadores usados e respectivas frequências alélicas nas populações das cultivares Kennedy e BRS Integra.

Alelo	Frequência alélica Kennedy	Frequência alélica BRS Integra
108_253	0,16	0,03
108_257	0,55	0,06
108_263	0,11	0,00
108_271	0,00	0,67
112_239	0,57	0,10
138_244	0,07	0,00
138_254	0,41	0,03
138_248	0,36	0,17
034_176	0,12	0,01
037_141	0,05	0,00
037_148	0,50	0,11
037_150	0,53	0,20
037_171	0,05	0,00
132_235	0,06	0,01
132_261	0,13	0,02
132_265	0,09	0,02
132_273	0,11	0,02
139_247	0,23	0,07
139_249	0,10	0,77
007_154	0,16	0,02
007_156	0,72	0,30
080_149	0,18	0,03
080_150	0,28	0,02
098_251	0,56	0,07

Conclusões

Foi possível identificar alelos com frequências distintas entre as cultivares Kennedy e BRS Integra. Essas informações serão utilizadas para acompanhar a estabilidade genética das sementes comerciais produzidas anualmente, além de auxiliar na identificação de fraudes, sementes piratas comercializadas ilegalmente.

Referências

AVIANI, D. M.; SANTOS, F. S. Uso de marcadores moleculares em proteção de cultivares. In: In: PROTEÇÃO de Cultivares no Brasil. Brasília, DF, 2011. p.155-158.

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

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

VALLE, C. B. do; SIMIONI C.; RESENDE, R. M. S.; JANK, L. **Melhoramento de forrageiras tropicais**. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2009. 293 p.

VALLE, C. B. do; BARRIOS, S. C. L.; JANK, L.; SANTOS, M. F. Melhoramento de plantas forrageiras para uma pecuária de baixa emissão de carbono. In: SIMPÓSIO DE PECUÁRIA INTEGRADA, 1., 2014, Sinop, MT. **Intensificação da produção animal em pastagens**: Anais... Brasília, DF: Embrapa, 2014.