

AMOSTRAGEM SEQUENCIAL E MICROSSATELITES NA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE GENÉTICA EM LOTES DE SEMENTES DE MILHO

SEQUENTIAL SAMPLING AND MICROSATELLITES FOR EVALUATION OF THE GENETIC QUALITY IN CORN SEEDS LOTS

Magnólia de Mendonça LOPES¹; Maria das Graças Guimarães Carvalho VIEIRA²;

1. Engenheira Agrônoma, Doutora em Produção e Tecnologia de Sementes pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil. magnolia_lopes@yahoo.com.br;

2. Professora Titular, Doutora, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras, MG, Brasil; 3. Pesquisadora, Doutora, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, Brasil.

RESUMO: Na produção de sementes, a pureza genética é um dos requisitos fundamentais para a comercialização. Assim, foi determinado o tamanho da amostra para a avaliação da pureza genética, avaliada a sensibilidade da técnica de microssatélites para discriminar híbridos de seus respectivos parentais e a sensibilidade em detectar misturas, quando presentes em pequenas proporções na amostra. Para a amostragem sequencial, foram tomados grupos de 40 sementes híbridas em sequência, até no máximo 400 sementes, as quais foram marcadas e misturadas ao lote de sementes, simulando contaminações de 0,25%; 0,5%; 1%; 2%; 4% e 6%. A sensibilidade da técnica de microssatélite foi avaliada misturando-se diferentes proporções de DNA dos híbridos com o de suas respectivas linhagens. Para mistura superior a 1:8 (1P1: 8P2; 8P1: 1P2), a sensibilidade do marcador variou em função do *primer* utilizado. Na amostragem sequencial, para detectar níveis de mistura acima de 1% no lote de sementes, com nível de risco tanto para o produtor quanto para o consumidor de 0,05, o tamanho de amostra necessário é inferior ao requerido pela amostra de tamanho fixo, o que possibilita a redução do custo e a viabilização da técnica para atestar a pureza genética de lotes de sementes de milho.

PALAVRAS-CHAVE: *Zea mays*. Pureza genética. Híbrido. DNA.

INTRODUÇÃO

A cultura do milho participa de maneira expressiva nos mercados nacional e mundial. Sua importância resulta num setor de sementes competitivo, em que as empresas de produção de sementes beneficiam-se do fato de a maioria dos materiais comercializados serem híbridos, caracterizando uma barreira natural à utilização das sementes em plantios subsequentes. Tal característica justifica os investimentos nos programas de melhoramento do milho por permitir às empresas o retorno dos investimentos no desenvolvimento de genótipos com ampla adaptação e estabilidade, mesmo antes de existir uma política de proteção de cultivares.

Dessa forma, a certificação da pureza genética é indispensável para assegurar aos agricultores produtos com as características genéticas desenvolvidas pelos melhoristas. No entanto, em função do estreitamento genético que vem ocorrendo para a maioria das espécies, torna-se cada vez mais difícil a diferenciação dos mesmos, utilizando simplesmente características morfológicas. Diante disso, a utilização de técnicas de biologia molecular cresce em importância, de forma a contribuir de maneira expressiva para o aumento da precisão das informações, viabilizando

a certificação das cultivares de interesse. A escolha do método molecular depende da estrutura genética de cada espécie, do seu modo de reprodução, do tamanho do genoma, entre outros fatores e, sem dúvida alguma, da relação custo-benefício. Na área agrônoma, os marcadores moleculares têm apresentado aplicação direta no monitoramento da pureza genética de sementes. Dentre as técnicas disponíveis, destaca-se a de microssatélite ou SSR (Simple Sequence Repeats), que possibilita a amplificação de segmentos repetidos ao longo da molécula do DNA de forma simples, rápida e precisa na geração dos perfis genéticos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Essa técnica poderá ser viabilizada para o monitoramento da pureza genética devido às várias vantagens que apresenta como o elevado conteúdo de informação genética por loco, multialélica, codominante, passível de automação, aumentando a resolução e precisão das informações (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). No entanto, em rotina onde se tem necessidade de analisar de forma rápida grande quantidade de lotes, a quantidade de sementes a ser utilizada na certificação desse tipo de técnica tem sido um dos principais questionamentos. Neste aspecto, deve-se considerar essencial um sistema que permita monitorar e rastrear contaminações genéticas que possam ocorrer no

campo, permitindo o fornecimento de sementes com elevados padrões de pureza genética aos produtores de sementes certificadas.

Um ponto crucial para o sucesso na certificação da pureza genética e que deve ser focado é o tamanho da amostra para garantir resultados rápidos, que proporcionem segurança tanto ao produtor quanto ao consumidor de sementes em níveis conhecidos e preestabelecidos, sem perder de vista a viabilidade operacional. Nesse sentido, pesquisas recentes efetuadas pelo Comitê de Estatística da ISTA (INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION, 1999) têm apontado como uma possível alternativa para análises que requerem rapidez, precisão e redução de custos, a amostragem sequencial. A amostragem sequencial caracteriza-se por utilizar amostras de tamanho variável. Uma vez formulada a hipótese de que o lote está dentro do padrão exigido pelo sistema de certificação e fiscalização, pode-se aceitá-la, rejeitá-la ou continuar amostrando, baseando-se nos resultados acumulados de cada amostragem. As principais vantagens deste método são reduzir o tempo e os custos, e assegurar que os riscos sejam os mesmos tanto para o produtor quanto para o consumidor, sem necessitar de um número fixo de amostras (PIETERS, 1978).

O presente trabalho objetivou determinar o tamanho da amostra para a avaliação da pureza genética, de forma a proteger o consumidor e o produtor de sementes, em níveis de segurança conhecido e predeterminado, avaliar a sensibilidade da técnica de microssatélites para discriminar híbridos de seus respectivos parentais e avaliar a sensibilidade da técnica de microssatélite em detectar misturas, quando presentes em pequenas proporções na amostra.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no laboratório de Análise de Sementes da Embrapa Milho e Sorgo em Sete Lagoas, MG. A amostragem sequencial foi

simulada em lotes de sementes de 1kg com conhecidos percentuais de contaminantes. Para a obtenção destes lotes, sementes de milho híbrido foram marcadas utilizando um pincel e misturadas às sementes sem marcação e, em seguida procedeu-se à homogeneização em um divisor centrífugo Gamet. Os níveis de contaminação de 0,25, 0,5, 1, 2, 4 e 6% foram considerados para as análises estatísticas do processo de amostragem.

Na elaboração do plano de amostragem sequencial, a pureza genética de sementes de milho foi considerada como variável. Foram formuladas as hipóteses H_0 : o lote de sementes híbridas está dentro dos padrões aceitáveis para a característica de pureza genética e H_1 : o lote de sementes híbridas não está dentro dos padrões aceitáveis para a característica de pureza genética. Os riscos envolvidos nas tomadas de decisão para rejeição ou aceitação do lote de sementes foram α e β . O primeiro refere-se ao risco do produtor em rejeitar um lote de sementes que atende às exigências mínimas de pureza genética. Por outro lado, β refere-se ao risco do consumidor em comprar um lote que não atende às exigências mínimas de pureza genética. Os valores de α e β foram fixados em 0,05. Foram considerados os limites para os valores de pureza genética, representadas por p_0 e p_1 , em que p_0 é o limite inferior e refere-se à percentagem de pureza genética mínima tolerada para as sementes de milho híbrido simples, duplo ou triplo e p_1 , limite superior, se refere à percentagem de pureza genética ideal para as sementes híbridas de milho. Os valores calculados para p_0 e p_1 variam com os níveis de contaminação nos lotes de sementes (Tabela 1).

Baseou-se no tamanho máximo de amostra de 400 sementes, segundo recomendações das Regras de Análises de Sementes - RAS (Brasil, 2009). A amostragem foi realizada em seqüência crescente de grupos de 40 sementes, os quais foram fixados e analisados até totalizar as 400 sementes.

Tabela 1. Valores de p_0 e p_1 para diferentes níveis de contaminação genética em lotes de sementes híbridas de milho.

Níveis de contaminação (%)	p_0 ⁽¹⁾	p_1 ⁽²⁾
0,25	0,9975	0,999
0,5	0,995	0,999
1	0,99	0,999
2	0,98	0,999
4	0,96	0,999
6	0,94	0,999

⁽¹⁾ p_0 : percentagem de pureza genética mínima tolerada; ⁽²⁾ p_1 : percentagem de pureza genética ideal.

Nas Tabelas 2 e 3, estão os valores calculados para os limites inferiores (*li*) e superiores (*ls*), adotando-se os números anteriormente mencionados. Esses limites e o tamanho médio de amostra (*TMA*) foram calculados segundo as fórmulas:

$$l_i = b + an \quad e \quad l_s = c + an$$

$$a = \frac{Ln \frac{1-P_0}{1-P_1}}{Ln \frac{P_1 - (1-P_0)}{P_0(1-P_1)}} \quad b = \frac{Ln \frac{\beta}{1-\alpha}}{Ln \frac{P_1(1-P_0)}{P_0(1-P_1)}} \quad c = \frac{Ln \frac{1-\beta}{\alpha}}{Ln \frac{P_1(1-P_0)}{P_0(1-P_1)}}$$

Em que:

n: tamanho de amostra

li : quando $n \leq$ ao limite inferior, decisão de rejeitar o lote

ls: quando $n \geq$ ao limite superior, decisão de aceitar o lote

a, b e c: coeficientes das duas retas, aceitação, continuação ou rejeição

p₀: limite aceitável

p₁: limite ideal

α = β = 0,05, ou seja, 5% de probabilidade de erro.

O tamanho médio de amostra (*TMA*) é calculado em função de *p*, podendo ser feita a partir da expressão:

$$TMA(p) = \frac{P(p).(b-c) + c}{\left(\frac{1-\beta}{\alpha}\right)^{n-a} - 1}$$

$$P(p) = \frac{\left(\frac{1-\beta}{\alpha}\right)^w - \left(\frac{\beta}{1-\alpha}\right)^w}{\left(\frac{1-\beta}{\alpha}\right)^w - \left(\frac{\beta}{1-\alpha}\right)^w}$$

Em que *p* é a probabilidade de aceitação de *H₀*: $p=p_0$

Os valores de *p* e *W* estão associados pela expressão:

$$p = \frac{1 - \left(\frac{1-p_1}{1-p_0}\right)^w}{\left(\frac{p_1}{p_0}\right)^w - \left(\frac{1-p_1}{1-p_0}\right)^w}$$

Tabela 2. Valores calculados dos limites de decisão do plano de amostragem sequencial para *p₀*; *p₁*; $\alpha=\beta=0,05$ para pureza genética em lotes de sementes de milho.

Nº de Sementes	<i>p₀</i> ⁽¹⁾ : 0,9975; <i>p₁</i> ⁽²⁾ : 0,999 pg ⁽³⁾ : 0,25%		<i>p₀</i> : 0,995; <i>p₁</i> : 0,999 pg: 0,5%		<i>p₀</i> : 0,99; <i>p₁</i> : 0,999 pg: 1%	
	<i>li</i> ⁽⁴⁾	<i>ls</i> ⁽⁵⁾	<i>li</i>	<i>ls</i>	<i>li</i>	<i>ls</i>
40	37	40	38	40	35	40
80	77	80	78	80	75	80
120	117	120	118	120	115	120
160	157	160	158	160	155	160
200	197	200	198	200	194	200
240	236	240	238	240	234	240
280	276	280	277	280	274	280
320	316	320	317	320	313	320
360	356	360	357	360	353	360
400	396	400	397	400	393	400

⁽¹⁾ *p₀*: percentagem de pureza genética mínima tolerada; ⁽²⁾ *p₁*: percentagem de pureza genética ideal; ⁽³⁾ pg: pureza genética; ⁽⁴⁾ *li*: limite inferior; ⁽⁵⁾ *ls*: limite superior.

Tabela 3. Valores calculados dos limites de decisão do plano de amostragem sequencial para *p₀*; *p₁*; $\alpha=\beta=0,05$ para pureza genética em lotes de sementes de milho.

Nº de Sementes	<i>p₀</i> ⁽¹⁾ : 0,98; <i>p₁</i> ⁽²⁾ : 0,999 pg ⁽³⁾ : 2%		<i>p₀</i> : 0,96; <i>p₁</i> : 0,999 pg: 4%		<i>p₀</i> : 0,94; <i>p₁</i> : 0,999 pg: 6%	
	<i>li</i>	<i>ls</i>	<i>li</i>	<i>ls</i>	<i>li</i>	<i>ls</i>
40	37	40	38	40	38	40
80	77	80	77	80	77	80
120	117	120	116	120	116	120
160	156	160	156	160	155	160
200	196	200	195	200	194	200
240	235	240	235	240	233	240
280	275	280	274	280	273	280
320	314	320	313	320	312	320
360	354	360	353	360	351	360
400	394	400	392	400	390	400

⁽¹⁾ *p₀*: percentagem de pureza genética mínima tolerada; ⁽²⁾ *p₁*: percentagem de pureza genética ideal; ⁽³⁾ pg: pureza genética; ⁽⁴⁾ *li*: limite inferior; ⁽⁵⁾ *ls*: limite superior.

As análises moleculares foram realizadas no Núcleo de Biologia Aplicada (NBA) da Embrapa Milho e Sorgo em Sete Lagoas, MG.

O DNA de cada material foi extraído da parte aérea de 10 plântulas oriundas de sementes germinadas em rolo de papel por cinco dias, à temperatura constante de 25 °C. O material vegetal foi macerado em presença de nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino, ao qual foram adicionados 800 µL do tampão de extração CTAB (2% de CTAB; 1M Tris-HCl pH 8,0; 0,5mM de EDTA pH 8,0; 5M NaCl, 2% de β-Mercaptoetanol). A mistura foi mantida a 65°C por 1 hora, sendo homogeneizada a cada 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 800µL da mistura clorofórmio-álcool octanol (24:1). As amostras foram homogeneizadas por 10 minutos e centrifugadas a 16.000xg por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e repetiu-se a etapa de lavagem com clorofórmio-octanol e de centrifugação. O DNA foi precipitado da fase sobrenadante com a adição de 800µL de isopropanol. Após a lavagem em etanol 70%, o DNA foi ressuscitado em 200µL de TE pH 8,0 (Tris-HCL 10 mM; EDTA 1 mM). A quantificação do DNA foi realizada em gel de agarose 0,8%, por meio da comparação com um DNA de concentração conhecida. O DNA estoque foi mantido a -20°C e o DNA diluído, na concentração de trabalho de 10 ng/µL, foi armazenado a 4°C. Em uma primeira etapa, foi realizada a seleção de conjuntos de par de *primers* para avaliação da qualidade genética. Foram utilizados 17 genótipos de milho, sendo cinco híbridos simples (HS1, HS2, HS3, HS4, HS5), um híbrido triplo (HS2 x L1) e onze linhagens (L9 x L8, L5xL6, L3 x L4, L7 x L2, L10 x L11), provenientes do programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas – MG.

Foram testados 100 pares de *primers* com o objetivo de selecionar aqueles mais informativos, com melhor padrão de amplificação. Foram avaliados *primers* capazes de gerar perfis que permitissem a distinção do híbrido de seus parentais. Uma vez selecionado o conjunto de *primers*, foram efetuados misturas de DNA provenientes dos parentais, visando avaliar a sensibilidade da técnica SSR em detectar misturas varietais em lotes de sementes, em diferentes proporções. Assim, foi realizada contaminação com misturas do DNA diluído de cada um dos parentais dos híbridos HS1, HS2, HS3, HS4 e HT nas proporções 1:1, 1:5, 1:8, 5:1 e 8:1.

As reações de amplificação dos locos microssatélites foram conduzidas seguindo

metodologia proposta por Senior et al. (1996), com modificações. Para reação de PCR com volume final de 10 µL, realizada em termociclador ABI 9600, foi realizada com 30 ng de DNA, 1,0 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 2,0mM MgCl₂, 125 µM de cada um dos dNTPs, 0,6 µM de cada um dos *primers* e 1 U da enzima *Taq* polimerase. Os ciclos da reação de PCR consistiram de uma desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguida por nove ciclos de 94°C por 20 segundos, 68°C por 20 segundos, com redução de 1°C a cada ciclo e 72°C por 20 segundos, seguidos de 25 ciclos a 94°C por 20 segundos, 60°C por 20 segundos e 72°C por 20 segundos. A extensão final foi realizada a 72°C por 10 minutos. Os fragmentos amplificados foram separados em géis de agarose 4%, sob eletroforese a 100 v por 2,5 horas. O gel foi corado com brometo de etídio (1 mg/mL) e a imagem visualizada sob luz ultravioleta.

Em uma segunda etapa foi verificada a sensibilidade da técnica de SSR em detectar diferentes concentrações de DNA, numa mesma reação de PCR. Para tanto, foram utilizados o híbrido HS3 e linhagem L1. A seleção de pares de *primers* nessa etapa foi baseada em informações já disponíveis no laboratório do NBA. O conteúdo de informação por loco dos marcadores SSR e a qualidade de amplificação dos fragmentos em gel de agarose foram considerados nesta primeira seleção. Nesta etapa foram avaliados 24 pares de *primers*.

As misturas do híbrido HS3 e a linhagem L1, e vice-versa, obedeceram às seguintes proporções: 1:0; 1:1; 1:5; 1:10; 1:15; 1:20; 1:30 e 1:40. Para a obtenção das proporções citadas procedeu-se à: *i*) mistura de volumes de DNA cuja concentração foi determinada em gel de agarose 0,8% e *ii*) mistura de discos foliares com diâmetro de 0,8cm, sendo o DNA extraído desta mistura de discos, seguindo o protocolo do CTAB (SAGHAI-MAROOF et al., 1984). Os resultados foram avaliados levando-se em conta a resolução das bandas no gel, nas diferentes proporções de mistura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observa-se, pelos resultados contidos na Tabela 5, que, num total de 400 sementes, o que corresponde ao tamanho de amostra fixa exigido pela RAS (Brasil, 2009), não foi possível tomar nenhuma decisão de aceitação e/ou rejeição de lotes de sementes de milho em relação à pureza genética, quando estes lotes tinham 0,25% e 0,5% de mistura. No entanto, para lotes com mistura varietal acima de 1%, foi necessário um número menor de sementes a serem analisadas que o exigido pelo tamanho de amostra fixa n = 400, para se tomar uma decisão.

Tabela 5. Número de sementes analisadas no plano de amostragem sequencial para a decisão de aceitar ou rejeitar o lote, em função da percentagem de mistura varietal.

Lotes	Contaminantes (%)	Número de sementes necessárias para tomada de decisão de rejeição do lote
1	0,25	> 400
2	0,5	> 400
3	1	280
4	2	120
5	4	40
6	6	40

Os lotes que apresentavam mistura varietal igual ou superior a 0,5% precisariam de um tamanho de amostra de 1,6 a 8 vezes superior ao tamanho de amostra fixa $n = 400$ (Tabela 6), para se tomar uma decisão sobre o destino destes lotes. Por ocasião da avaliação das 400 sementes exigidas pelo plano truncado, nenhuma decisão foi tomada ao final do teste, pois o resultado caía sempre na região de indecisão, entre os dois limites de controle. Como se optou pelo truncamento do teste, quando o tamanho da amostra atingiu 400 sementes, a amostragem foi finalizada e nenhuma decisão foi tomada. O resultado da média teórica (Tabela 6) indicou que, para uma mistura varietal de 0,25%, é

necessário analisar, em média, 3.347 sementes para que se possa tomar uma decisão de aceite ou rejeite do lote de sementes, com um risco de 5% de erro para o produtor e consumidor. Ao analisar apenas 400 sementes somente haverá preocupação com os riscos do produtor, não considerando que o comprador das sementes também corre riscos, os quais devem ser controlados. Da mesma forma que o produtor perde quando um lote de sementes é classificado como fora do padrão num teste, o comprador também será prejudicado se um lote de má qualidade for classificado dentro do padrão para o mesmo teste.

Tabela 6. Tamanho médio de amostra (TMA(p)) para lotes de sementes de milho com diferentes porcentagens de mistura varietal, em função dos valores atribuídos a W.

Contaminação (%)	W ⁽¹⁾	P ⁽²⁾	P(p) ⁽³⁾	TMA (p) ⁽⁴⁾
0,25	1	0,9975	0,9500	3.347
0,5	1	0,9950	0,9500	654
1	1	0,9900	0,9500	188
2	1	0,9800	0,9500	65
4	1	0,9600	0,9500	24
6	1	0,9400	0,9500	14

⁽¹⁾ W: expediente matemático; ⁽²⁾ P: percentagem de pureza mínima tolerada; ⁽³⁾ P(p): probabilidade de aceitar H_0 ; ⁽⁴⁾ TMA(p): tamanho médio de amostra

Já para lotes com 0,5% de mistura varietal, segundo os resultados da média teórica (Tabela 6), é necessário analisar, em média, 654 sementes para atestar a pureza genética desse lote, com o risco de 5% tanto para o produtor de sementes quanto para o consumidor. Vale ressaltar, que apesar da exigência de se analisar um número de sementes superior ao exigido pela amostragem de tamanho fixo ($n = 400$ sementes), a amostragem sequencial garante, em um mesmo nível de segurança proteção tanto para o consumidor quanto para o produtor. Ainda pela Tabela 6, para aceitar ou rejeitar lotes com mistura de 1% com nível de probabilidade de erro de 5% para o produtor e consumidor é necessário analisar, em média, 188 sementes. Neste experimento, foi necessário avaliar 280 sementes para se tomar a

decisão de rejeite, com o mesmo risco de probabilidade (Tabela 5). Isso ocorreu devido à flutuação do tamanho de amostra usada no plano aleatório e pelo agrupamento das sementes de 40 em 40. Como o grupo de sementes a ser ensaiado é fixado a critério do analista, se tivesse estabelecido grupos com menor quantidade de sementes, provavelmente a decisão de rejeitar o lote seria tomada com um número de semente total, mais próximo ao da média teórica.

Isto também ocorreu para os lotes de milho com mistura varietal de 2%, 4% e 6%, ou seja, na prática houve necessidade de analisar um número superior ao estabelecido pela média teórica, para se rejeitar os lotes com as misturas acima referidas, com probabilidade de risco de 5% de erro para o

consumidor e produtor (Tabela 6). Resultados semelhantes ocorreram no trabalho de Santana (1994), ao adotar agrupamento de sementes de 20 em 20, lotes que pela média teórica precisariam analisar em média 217 sementes, a referida autora, na prática, conseguiu rejeitar o lote com 95% de segurança, apenas quando analisou 400 sementes.

Ressalta-se, no entanto, a eficiência da amostragem sequencial em reduzir o tamanho da amostra para a determinação da pureza varietal em lotes com mais de 1% de mistura, sem aumentar o nível de risco de erro para o produtor e consumidor. Estes resultados reforçam outros trabalhos envolvendo o uso da amostragem sequencial em sementes, como os obtidos por Santana (1994) e Ellis & Whitehead (1987). Estes autores constataram a vantagem do uso da amostragem sequencial em relação à amostragem de tamanho fixo, quanto à redução do número de sementes utilizadas e redução do tempo gasto para se tomar uma decisão sobre a qualidade de um determinado lote sob avaliação.

Essa diminuição significativa do número de sementes a serem analisadas é de suma importância quando se utiliza técnicas rápidas e precisas, como as moleculares, tipo microssatélites. Quando métodos eletroforéticos são considerados para avaliar pureza varietal, é inviável a utilização do plano de amostragem fixa, pois estes métodos requerem a utilização de produtos químicos que elevam o custo da análise (BÁNYAI, 1978). Segundo Von Pinho (1995), a utilização de sementes com qualidade genética comprometida em função da falta de metodologias e de padrões para a identificação de contaminações proveniente da autofecundação do parental fêmea, pode reduzir a qualidade fisiológica de sementes e a produção de grãos. Para Salgado (2001), uma análise de pureza genética em sementes de milho pode ser feita utilizando tanto sementes inteiras como folhas para a extração de DNA, o que torna o teste mais rápido e de fácil execução.

No entanto, para viabilizar o uso de análise molecular em laboratório, é fundamental adotar uma amostragem que propicie a mesma porcentagem de risco, tanto para o consumidor quanto para o produtor, possibilitando a utilização de menor número de sementes visando rapidez e menor custo. Nesse sentido, a amostragem sequencial é uma alternativa, tendo ainda como vantagem o aspecto que a tomada de decisão a respeito do destino do lote não é unilateral, ou seja, os riscos são os mesmos para o produtor e o consumidor. Considerando também que quando se trabalha com as probabilidades α e β predeterminadas de se

cometer o erro tipo I e tipo II, respectivamente, nas decisões tomadas, não há nenhum outro plano de amostragem que reduza o tamanho da amostra quanto à amostragem sequencial (Santana, 1994).

Em relação à seleção de conjunto de *primers*, visando discriminar os híbridos de seus respectivos parentais, entre os 100 pares de *primers* testados, apenas cinco para cada híbrido geraram perfis de amplificação que permitiram essa discriminação. Os pares de *primers* utilizados para distinção dos híbridos dos seus parentais estão descritos a seguir: HS1 (bnlg125, bnlg166, bnlg1325, mmc1312, bnlg2291), HS2 (bnlg2291, bnlg1006, umc1037, bnlg589, mmc041), HS3 (mmc312, umc1008, phi 072, umc1055, umc1037), HS4 (bnlg125, bnlg166, bnlg1520, umc1016, bnlg669), HT (bnlg2291, bnlg1006, umc1008, umc1016, bnlg238).

Para os demais pares de *primers* não foi observada segregação, ou seja, ausência da banda na linhagem parental e presença no híbrido ou vice-versa, não havendo diferenciação do híbrido com relação aos seus respectivos genitores. Segundo Smith et al., (1997), dentre as prováveis causas dessa segregação estão a heterozigosidade residual nas linhagens parentais, contaminação genética da progênie, mutações que podem eliminar o sítio de anelamento do par de *primer* ou erros durante a replicação pela *taq* polimerase. Na Figura 1, encontram-se exemplos de padrão de amplificação gerados por alguns dos pares de *primers* selecionados. Salgado (2001) também conseguiu distinguir o híbrido de milho de seus respectivos progenitores por meio de marcadores SSR. Pode-se observar ainda que a técnica de microssatélite apresentou-se eficiente em detectar pequenas proporções de DNA em mistura na amostra. Observa-se, pelos padrões eletroforéticos, que não existe diferença no tamanho das bandas referentes as misturas 1:1, 1:5 e 1:8 das linhagens. Dessa forma, fica evidenciada a sensibilidade da técnica em detectar mistura em qualquer uma dessas proporções (Figura 1), o que viabiliza a utilização da técnica para este fim. O uso dos microssatélites também se mostrou sensível para determinar a pureza varietal em linhagens de milho (Ramos et al. 2006). Isto vem ao encontro do sistema de certificação e fiscalização de sementes, pois os microssatélites são marcadores precisos e muito informativos em função de suas características de multialelismo e co-dominância. Estas características permitem que os microssatélites sejam úteis na detecção da heterozigosidade de um loco específico, sendo importante para o monitoramento da pureza genética (PADILHA 2002, SALGADO 2001,

PRASAD et al., 2000). SCHUSTER et al. (2004) detectaram a mistura varietal em lotes de sementes de soja por meio de microssatélites, utilizando tantas amostras constituídas por DNA extraído a partir de sementes individuais como amostras

compostas. Trata-se de uma técnica que é caracterizada pela simplicidade e que, após a etapa de extração do DNA, é necessária apenas a realização da PCR e eletroforese dos fragmentos (Figura 1).

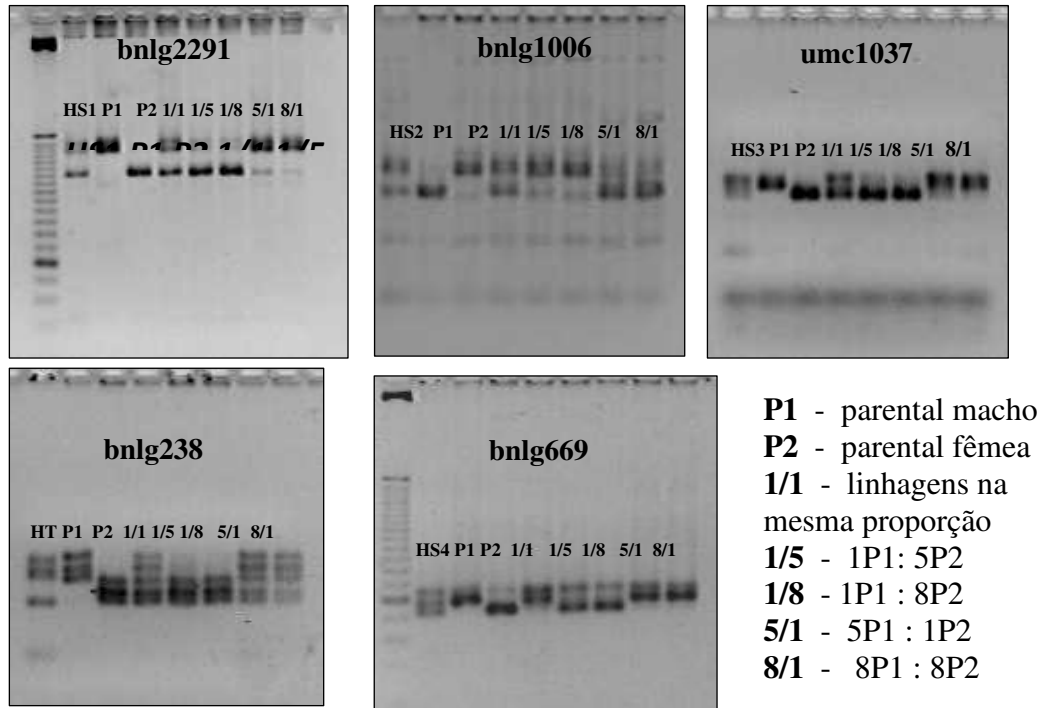


Figura 1. Perfil de amplificação pelos SSRs bnlg2291; bnlg1006; umc1037; bnlg669 e bnlg238 que permitem discriminar os híbridos (HS1, HS2, HS3, HS4 e HT) de seus respectivos parentais e a detecção das diferentes proporções de misturas entre os parentais P1 e P2.

Na etapa de avaliação da sensibilidade dos pares de *primers*, entre os 24 testados, três foram selecionados em função da sua capacidade de diferenciar o híbrido de seus respectivos parentais (Figura 2). Os demais não amplificaram alelos para um ou mais indivíduos e 6 deles não apresentaram polimorfismo entre o híbrido e a linhagem. Quando foi utilizada a mistura do híbrido HS3 e da linhagem L1, em diferentes proporções, a sensibilidade do marcador em detectar essas misturas variou em função do par de *primer* utilizado. Para o *primer* umc1019, pôde-se verificar que a resolução da banda no gel, representando a menor proporção do material na mistura, da linhagem no HS3 e vice-versa, foi precisa para as proporções 1:1; 1:5 (5H); 1:10 (10H) e 1:20 (20H). Nas proporções 1:30 (30H) e 1:40 (40H), a resolução da banda no gel diminuiu e houve comprometimento na interpretação dos resultados observados (Figura 2). Já para os *primers* umc1016 e mmc162, apenas a proporção 1:1 de mistura da linhagem L1 e do híbrido HS3 apresentou banda nítida no gel, possibilitando detectar a referida mistura (Figura 2).

Este fato provavelmente ocorreu em função da afinidade do par de *primer* pela região alvo. Ainda há de se considerar que quando amostras de DNA de indivíduos da mesma espécie são misturadas em diferentes proporções, a maioria das bandas polimórficas geradas são resultado da amplificação em função das proporções de DNA em que o fragmento se encontrava em cada amostra no seu respectivo genoma. Estas bandas, teoricamente, devem ser amplificadas proporcionalmente, porque elas estão presentes igualmente, podendo ocorrer uma ligação do *primer* com a região alvo do DNA genômico (WILLIAMS et al., 1993).

Uma forma possível de aumentar a sensibilidade da técnica para detectar misturas quando um dos materiais encontra-se em menor proporção seria a NESTED-PCR, sugerida por Fungaro (2000). Segundo a autora, esta técnica, que consiste numa reação de PCR em duas etapas, pode aumentar a sensibilidade em até 1000 vezes. Ainda foi observado (Figura 2) que os padrões de bandas foram mais informativos e nítidos ao utilizar-se mistura de discos de folhas. Isso sugere que a

técnica pode ser utilizada para detectar mistura de *bulk* de sementes para extração de DNA, o que facilita e diminui o custo das análises para

determinação da pureza genética em lotes de sementes de milho.

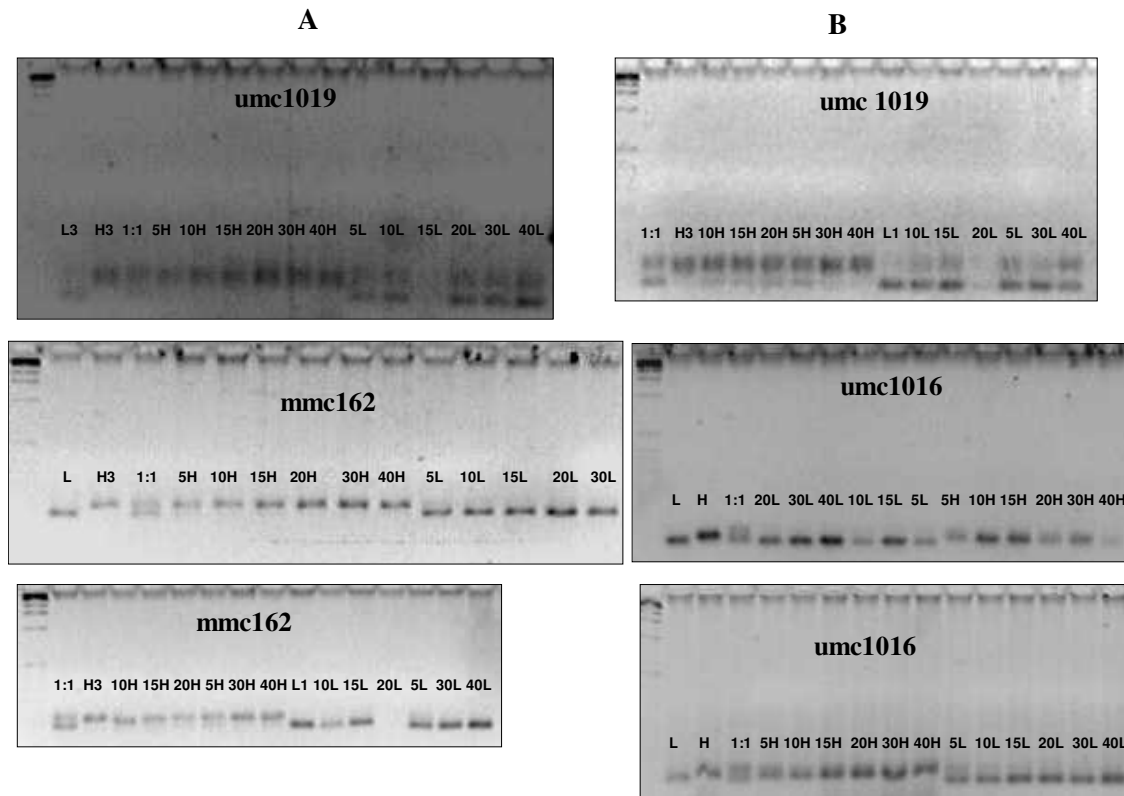


Figura 2. Perfil de amplificação pelos SSRs umc1019, mmc162 e umc 1016 da mistura de DNA (A) ou de discos foliares (B) do híbrido HS3 e da linhagem L1 em diferentes proporções. L – Linhagem, HS3 – Híbrido simples - 1:1 (1L : 1HS3), 5H(5HS3 : 1L), 10H (10HS3 :1L), 15H (15HS3 : 1L), 20H (20HS3 : 1L), 30H (30HS3 : 1L), 40H (40HS3 : 1L), 5L (5L : 1HS3), 10L (10L : 1HS3), 15L (15L : 1HS3), 20L (20L : 1HS3), 30L (30L : 1HS3), 40L (40L : 1HS3)

Outro aspecto importante a ser considerado é o custo da análise, que gira em torno de R\$ 2,80 por reação. Isso se levando em conta que foi necessária a utilização de apenas um par de *primer* de microssatélite para diferenciar os materiais considerados de seus respectivos parentais. Por outro lado, se for necessário determinar o percentual de mistura para atender a uma possível exigência do sistema de certificação e fiscalização de sementes em relação à pureza genética de um determinado lote, o custo aumentaria em função do percentual de contaminação permitido e do tamanho da amostra (número de sementes) necessário para detectar um referido percentual. Dessa forma, se for considerada uma percentagem de 0,25% ou 0,5% de contaminação, segundo os resultados desta pesquisa, para atestar-se a pureza genética do lote via marcador molecular, seria necessário analisar 3.347 ou 654 sementes, respectivamente, o que resultaria num custo de R\$ 9.370,00 ou R\$ 1.830,00 respectivamente.

De acordo com Von Pinho (1995), lotes com 1% de contaminação têm a qualidade fisiológica reduzida, bem como a produção de grãos. Dessa forma, simulando-se um percentual de mistura permitido de 1%, para se analisar um lote de sementes por meio da técnica de microssatélite, adotando o sistema de amostra de tamanho fixo (400 sementes) que é exigido pelas Regras de Análises de Sementes - RAS (Brasil, 2009), o custo por amostra (lote) é de R\$ 1.120,00. Segundo resultados da presente pesquisa, o tamanho de amostra necessário quando se utiliza amostragem sequencial para se detectar o mesmo 1% de mistura, é de 280 sementes, o que propiciaria uma redução de 30% no custo por amostra, ou seja, ficaria em R\$ 340,00, utilizando-se a mesma técnica com a mesma percentagem de segurança (5% de risco para o consumidor e o produtor). Para se determinar níveis mais elevados de contaminação, como 2%, 4% e 6% , o uso da amostragem sequencial reduziria ainda mais o custo da análise em relação ao uso da

amostragem de tamanho fixo. Isto porque seria necessário analisar 120, 40 e 40 sementes por lote, respectivamente, o que ocasionaria uma redução de 70% e 90%, respectivamente, no custo por amostra.

CONCLUSÕES

A amostragem sequencial possibilita atestar a pureza genética de lotes de sementes, com riscos iguais para o produtor e o consumidor.

A amostragem sequencial possibilita a redução do tamanho de amostra em relação ao tamanho de amostra fixa, para lotes de sementes acima de 1% de mistura varietal.

Amostragem sequencial viabiliza o uso da técnica de microssatélite para atestar a qualidade genética de lotes de sementes de milho.

A adoção da amostragem sequencial reduz os custos na determinação da qualidade genética por meio da técnica de microssatélite.

A técnica de microssatélite é eficiente para discriminar híbridos dos seus respectivos parentais, bem como em detectar misturas de proporções de DNA até um nível de 1:8. A detecção de mistura de até 1: 40 variou em função do marcador microssatélite ou par de *primers*.

ABSTRACT: In the seed production system, genetic purity is one of the fundamental requirements for its commercialization. The present work had the goal of determined the sample size for genetic purity evaluation, in order to protect the seed consumer and the producer and to evaluate the sensitivity of microsatellite technique for discriminating hybrids from their respective relatives and for detecting mixtures when they are present in small amounts in the samples. For the sequential sampling, hybrid seeds were marked and mixed in with the seed lots, simulating the following levels of contamination: 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, and 6.0%. After this, groups of 40 seeds were taken in sequence, up to a maximum of 400 seeds, with the objective of determining the quantity of seeds necessary to detect the percentage of mixture mentioned above. The sensitivity of microsatellite technique was evaluated by mixing different proportions of DNA from the hybrids with their respective seed lines. For the level of mixture was higher than 1:8 (1P1:8P2; 8P1:1P2), the sensitivity of the marker in detecting different proportions of the mixture varied according to the primer used. In terms of the sequential sampling, it was verified that in order to detect mixture levels higher than 1% within the seed lot- with a risk level for both the producer and the consumer of 0.05- the size of the necessary sample was smaller than the size needed for the fixed sample size. This also made it possible to reduce costs, making it possible to use microsatellites to certify the genetic purity of corn seeds lots.

KEYWORDS: *Zea mays*. Genetic purity. Hybrids. DNA.

REFERÊNCIAS

BÁNYAI, J. Sequenzanalyse in der saatgutprüfung. **Seed Science & Technology**, New Delhi, v. 6, n. 2, p. 505-515, 1978.

BRASIL. 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS. 399p.

ELLIS, R. H.; WHITEHEAD, J. Open, truncated and triangular sequential seed testing procedures. **Seed Science & Technology**, New Delhi, v. 15, n. 1, p. 1-17, 1987.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ed. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1998. 220p.

FUNGARO, M. H. P. PCR na micologia diagnóstico e análise de variabilidade. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 2, n. 3, p.125-132, 2000.

INTERNACIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. **Rules for seed testing**. Switzerland, 1999. 44p.

PADILHA, L. **Marcadores moleculares semi-automatizados na caracterização e determinação da diversidade genética entre linhagens de milho tropical**. 2002. 85p. Tese (Doutorado em Fitotecnia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras.

- PIETERS, E. P. Bibliography of sequential sampling plans for insects. **Bull. Entomol. Soc. Am.**, Lanham, v. 30, p. 35-7, 1978.
- PRASAD, M.; VARSHNEV, R. K.; ROY, J. K.; BALVAN, H. S.; GUPTA, P. K. The use of microsatellites for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 100, n. 3/4, p. 584-592, Feb. 2000.
- RAMOS, N. P., BRUNELLI, K. R., CAMARGO, L. E. A., FILHO, J. M. Sensibilidade dos microssatélites para determinar a pureza varietal em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 1, p. 99-105, 2006.
- SAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN, K. M.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **Proceeding of National Academic Science of the United States of America Biological Science**, New York, v. 81, n. 24, p. 8014-8018, 1984.
- SALGADO, K. C. C. **Certificação da pureza genética em sementes híbridas de milho por meio de marcadores morfológicos e moleculares**. 2001. 67p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- SANTANA, D. G. **Adaptação do teste do pH do exsudado e viabilidade do uso da amostragem sequencial na rápida definição sobre o destino de lotes de sementes de milho**. 1994. 79p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- SCHUSTER, I.; QUEIROZ, V. T.; TEIXEIRA, A. I.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Determinação da pureza varietal de sementes de soja com auxílio de marcadores moleculares microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 3, p. 247-253, 2004.
- SENIOR, M. L. ; MURPHY, J. P.; GOODMAN, M. M.; STUBER, C. W. Utility of SSRs for determining genetic similarities and relationships in maize using an agarose gel system. **Crop Science**, Madison, v. 38, n. 4 p. 1088-1098, July/Aug. 1996.
- SMITH, J. S. C.; CHIN, E. C. L.; SHU, H.; SMITH, O. S.; WALL, S. J. SENIOR, M. L.; MITCHELL, S. E.; KRESOVICH, S.; ZIEGLE, J. An evaluation of the utility of microsatellite loci as molecular markers in maize (*Zea mays L.*): comparisons with data from RFLPS and pedigree. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 95, p. 163-173, 1997.
- VON PINHO, E.V.R. **Conseqüências da autofecundação indesejável na produção de sementes híbridas de milho**. 1995. 130p. Tese (Doutorado em Fitotecnia)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- WILLIAMS, J. G. K.; RAFALKI, J. A. & TINGEY, S. V. Genetic analysis using RAPD markers. **Methods Enzymol.** 218: v.6, n. 4, p. 704-740, 1993.