



**ADRIANO ALVES DA SILVA**

**MARCADORES ENZIMÁTICOS E  
MICROSSATÉLITES PARA A  
CARACTERIZAÇÃO DE CULTIVARES DE  
MILHETO [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.]**

**LAVRAS - MG**

**2013**

**ADRIANO ALVES DA SILVA**

**MARCADORES ENZIMÁTICOS E MICROSSATÉLITES PARA A  
CARACTERIZAÇÃO DE CULTIVARES DE MILHETO**

**[*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.]**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora

Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho

**LAVRAS - MG**

**2013**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Silva, Adriano Alves da.

Marcadores enzimáticos e microssatélites para a caracterização de cultivares de milho [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] / Adriano Alves da Silva. – Lavras : UFLA, 2013.

75 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Édila Vilela de Resende Von Pinho.

Bibliografia.

1. Identificação de cultivares. 2. Pureza genética. 3. SSR. 4. Fingerprinting. 5. Sementes. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.1717

**ADRIANO ALVES DA SILVA**

**MARCADORES ENZIMÁTICOS E MICROSSATÉLITES PARA A  
CARACTERIZAÇÃO DE CULTIVARES DE MILHETO**

**[*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.]**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 27 de fevereiro de 2013.

Dr. Antônio Rodrigues Vieira	EPAMIG
Dr. Samuel Pereira de Carvalho	UFLA
Dr. Renzo Garcia Von Pinho	UFLA
Dr. João Almir Oliveira	UFLA

Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho  
Orientadora

**LAVRAS - MG**

**2013**

A Deus, pela luz e proteção em todos os momentos;  
Aos meus pais, Manoel e Lídia;  
Aos meus irmãos, Priscila, Lucas e Paulina;  
Aos familiares e amigos.

### **OFEREÇO**

A minha esposa Renata e meu filho Mateus, meus grandes amores, pelo apoio,  
incentivo e compreensão durante todos os momentos.

### **DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Lavras - UFLA, pela oportunidade de realização do doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnologia (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos e concessão de recursos para a execução do projeto.

A Profa. Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho, pela orientação, consideração, amizade, paciência e por todos os esforços dedicados a execução deste trabalho.

Ao Sr. Luiz Bonamigo, Pesq. José Nildo Tabosa do IPA, Pesq. Déa Alécia Martins Netto da Embrapa Milho e Sorgo, Sementes Adriana e Agronorte Pesquisa e Sementes, pelo envio das amostras de sementes.

Aos Professores do Setor de Sementes Renato Mendes Guimarães e João Almir Oliveira e a professora Maria Laene Moreira de Carvalho e ao pesquisador Antônio Rodrigues Vieira, pelos ensinamentos e amizade.

Aos funcionários do DAG, em especial à secretária da pós-graduação em Fitotecnia, Marli dos Santos Túlio.

As Funcionárias do Setor de Sementes, estagiários e bolsistas de iniciação científica, pela ajuda na execução dos experimentos.

A Juliana Stracieri pelo apoio na análise dos dados.

Aos amigos e colegas de pós-graduação pelo companheirismo durante o curso.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos”.

Fernando Pessoa

## RESUMO

A demanda por sementes de milho tem aumentado a cada ano devido à expansão da área de plantio direto e, com isso, os investimentos para o desenvolvimento de novas cultivares se tornam cada vez mais necessários. Com a aprovação da Lei de Proteção de Cultivares, em 1997, na qual está previsto o direito de cobrança de royalties pelos obtentores de cultivares, o comércio ilegal de sementes tornou-se expressivo, comprometendo a qualidade das sementes, com reflexos diretos na produtividade. Uma das formas de assegurar a pureza genética e os direitos de proteção é a caracterização das cultivares por meio de métodos seguros. O objetivo neste trabalho foi caracterizar cultivares de milho por meio de marcadores de enzimas e de microssatélites e selecionar primers de microssatélites e sistemas enzimáticos para a identificação de cultivares. As cultivares analisadas foram as seguintes: ADR 300, ADR 500, ADR 7010, ADR 7020, ADR 8010, ANSB MC, ANM 17, ANM 30, IPA BULK 1BF, BN-1, BN-2 e BRS 1501. Foram testados sete sistemas enzimáticos: álcool desidrogenase (ADH), catalase (CAT), esterase (EST), glutamato oxaloacetato transaminase (GOT), malato desidrogenase (MDH), isocitrato desidrogenase (IDH), fosfatase ácida (ACP). Pelas enzimas ACP e CAT não foi observado polimorfismo suficiente para a diferenciação das cultivares. Para a análise de microssatélites foram testados 123 pares de primers, dos quais 60 foram selecionados. Foi possível identificar cultivares de milho por meio de marcadores de enzimas e microssatélites. Dos sistemas enzimáticos avaliados o da esterase apresenta-se mais polimórfico para a distinção das cultivares avaliadas. Pelos primers PSMP2008, PSMP2045 e PSMP2056 foi possível distinguir todas as cultivares de milho utilizadas nesta pesquisa. Para os marcadores microssatélites foi observado polimorfismo variando de 20 a 90%.

Palavras-chave: Identificação de cultivares. Pureza genética. SSR. Fingerprinting.

## ABSTRACT

The demand for millet seeds has increased each year due to the expansion of direct planting areas and, thus, the investments for the development of new cultivars have become increasingly necessary. With the approval of the Cultivar Protection Law in 1997, in which is foreseen the right to charge for royalties by the cultivar breeders, the illegal commerce of seeds has become expressive, compromising the quality of the seeds, directly reflecting on the productivity. One of the means to insure genetic purity and protection rights is characterizing the cultivars with safe methods. The objective of this work was to characterize millet cultivars by means of enzyme and microsatellite markers and selecting microsatellite primers and enzymatic systems for cultivar identification. The analyzed cultivars were the following: ADR 300, ADR 500, ADR 7010, ADR 7020, ADR 8010, ANBS MC, ANM 17, ANM 30, IPA BULK 1BF, BN-1, BN-2 and BRS 1501. Seven enzymatic systems were tested: alcohol dehydrogenase (ADH), catalase (CAT), esterase (EST), glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), malate dehydrogenase (MDH), isocitrate dehydrogenase (IDH) and acid phosphatase (ACP). A sufficient polymorphism for cultivar differentiation was not observed for enzymes ACP and CAT. For the microsatellite analysis we tested 123 pairs of primers of which 60 were selected. It was possible to identify millet cultivars by means of enzyme and microsatellite markers. Of the evaluated enzymatic systems, that of the esterase presented higher polymorphism for distinguishing the evaluated cultivars. It was possible to distinguish all millet cultivars used in this research with the primers PSMP2008, PSMP2045 and PSMP2056. For the microsatellite markers we observed polymorphism varying from 20 to 90%.

Keywords: Cultivar identification. Genetic purity. SSR. Fingerprinting.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Zimograma da isoenzima álcool desidrogenase (ADH) em sementes de cultivares de milho	33
Figura 2	Zimograma da isoenzima esterase (EST) em sementes de cultivares de milho	34
Figura 3	Zimograma da isoenzima glutamato oxaloacetato transaminase (GOT) em sementes de cultivares de milho	36
Figura 4	Zimogramas da isoenzima malato desidrogenase (MDH) em sementes de cultivares de milho	37
Figura 5	Zimograma da isoenzima isocitrato desidrogenase (IDH) em sementes de cultivares de milho	38
Figura 6	Dendrograma de similaridade das doze cultivares de milho, obtido pela análise de agrupamento UPGMA, estimada pelo coeficiente de Jaccard, com base na análise de isoenzimas em sementes	40
Figura 7	Zimogramas a partir da amplificação do primer Cump009 em sementes de cultivares de milho	45
Figura 8	Zimograma a partir da amplificação do primer PSMP2085 em sementes de cultivares de milho	46
Figura 9	Zimograma a partir da amplificação do primer PSMP2224 em sementes de cultivares de milho	47
Figura 10	Zimograma a partir da amplificação do primer PSMP2271 em sementes de cultivares de milho	48

Figura 11 Zimograma a partir da amplificação do primer PSMP2008 em sementes de cultivares de milho	49
Figura 12 Zimograma a partir da amplificação do primer PSMP2045 em sementes de cultivares de milho	50
Figura 13 Zimograma a partir da amplificação do primer PSMP2056 em sementes de cultivares de milho	51
Figura 14 Dendrograma de similaridade das doze cultivares de milho, obtido pela análise de agrupamento UPGMA, estimada pelo coeficiente de Jaccard, com base na análise de microssatélites	53

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Relação das cultivares de milho utilizadas para a caracterização..	24
Tabela 2	Similaridade genética entre doze cultivares de milho, estimada pelo coeficiente de Jaccard, com base na análise de isoenzimas em sementes .....	42
Tabela 3	Primers SSR, número de fragmentos totais, número de fragmentos polimórficos e porcentagem de polimorfismo.....	43
Tabela 4	Similaridade genética entre doze cultivares de milho, estimada pelo coeficiente de Jaccard, com base na análise de microssatélites em sementes.....	55

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	15
<b>2.1</b>	<b>A cultura do milheto</b> .....	15
<b>2.2</b>	<b>Desenvolvimento de cultivares e a Lei de Proteção de Cultivares</b> .....	16
<b>2.3</b>	<b>Marcadores moleculares para a identificação de cultivares</b> .....	19
<b>2.4</b>	<b>Diversidade genética</b> .....	23
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	24
<b>3.1</b>	<b>Local</b> .....	24
<b>3.2</b>	<b>Cultivares</b> .....	24
<b>3.3</b>	<b>Extração de enzimas e análises eletroforética</b> .....	26
<b>3.4</b>	<b>Extração de DNA</b> .....	27
<b>3.5</b>	<b>Quantificação e diluição do DNA</b> .....	28
<b>3.6</b>	<b>Amplificação</b> .....	28
<b>3.7</b>	<b>Primers microssatélites (SSR)</b> .....	29
<b>3.8</b>	<b>Eletroforese e visualização dos géis</b> .....	30
<b>3.9</b>	<b>Similaridade genética</b> .....	30
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	32
<b>4.1</b>	<b>Marcadores enzimáticos</b> .....	32
<b>4.2</b>	<b>Marcadores microssatélites</b> .....	43
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	56
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	57
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	58
	<b>ANEXOS</b> .....	66

## 1 INTRODUÇÃO

O milheto (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) é o sexto cereal mais consumido mundialmente e apresenta alta resistência à seca e aos solos de baixa fertilidade, boa produção de massa e grãos e crescimento rápido (BONAMIGO, 1999). Por essas características, no Brasil o milheto é cultivado principalmente no cerrado, no sistema de semeadura direta (DURÃES; MAGALHÃES; SANTOS, 2003).

Em função do aumento da área do plantio direto no país e do potencial de cobertura do solo oferecido para a prática de plantio direto, a demanda por sementes de milheto tem crescido substancialmente. Este aumento da necessidade de sementes faz com que as empresas invistam em programas de melhoramento para o desenvolvimento de novas cultivares, o que gera muito trabalho, tempo e investimento.

Para assegurar o direito do obtentor sobre a cultivar desenvolvida foi aprovada no país, em 1997, a Lei de Proteção de Cultivares (L. 9456). No entanto, para a efetiva implementação dessa lei, o controle da produção e comercialização de sementes ilegais tem sido um grande desafio, o que tem comprometido a qualidade das sementes disponibilizadas ao agricultor, com reflexos diretos na produtividade. Dessa forma, a certificação da pureza genética de cultivares, de forma segura, torna-se uma prática indispensável nos programas de controle de qualidade das empresas para assegurar as características genéticas das cultivares desenvolvidas pelo melhorista, além de fornecer subsídios para a proteção das cultivares (GRATAPAGLIA; FERREIRA, 1996).

Para a proteção das cultivares exige-se por parte dos obtentores o teste DHE, para atender os critérios de distinguibilidade da cultivar e os critérios de homogeneidade e estabilidade dos descritores.

Descritores morfológicos têm sido utilizados para caracterizar as cultivares e garantir sua proteção. Porém, esses marcadores apresentam desvantagens como a necessidade de um grande número de descritores, em sua maioria, na planta inteira ou adulta. Além do tempo gasto e da necessidade de espaço físico para a avaliação dos genótipos, alguns marcadores morfológicos podem ser influenciados pelo ambiente. Assim, marcadores moleculares de enzimas e de DNA possuem particularidades que os tornam extremamente úteis para a proteção de cultivares e para a certificação da pureza genética de lotes de sementes.

Marcadores microssatélites possuem características que os tornam marcadores seguros para a caracterização de cultivares. Normalmente poucos locos garantem a completa diferenciação dos genótipos de interesse (SCHUSTER; BORÉM; CAIXETA, 2006). Os marcadores enzimas são codominantes e dependendo do sistema enzimático utilizado pode ser considerado útil para a caracterização de cultivares.

No presente trabalho objetivou-se caracterizar cultivares de milho, por meio de marcadores de enzimas e de microssatélites e selecionar primers de microssatélites e sistemas enzimáticos para a identificação de cultivares.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 A cultura do milheto

Pertencente à família das poáceas, o gênero *Pennisetum* abriga mais de 140 espécies (BRUNKEN, 1977). O milheto tem recebido nomes distintos de espécies tais como *P. glaucum* L. e *P. typhoides*. Em 1976, foi renomeado *P. americanum* (L.) (TERREL, 1976). O nome *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. parece ser o mais apropriado segundo Andrews e Rajewskim (1995). Surgiu entre 4 mil e 5 mil anos atrás, ao Sul do Deserto do Saara, e foi levado para a Índia a partir do ano 2.000 a.C., onde foram gerados genótipos distintos dos originais africanos. O milheto é uma espécie alógama e apresenta sete pares de cromossomos ( $2n = 14$ ) (STAPF; HUBBARD, 1934).

Essa espécie é o sexto cereal mais consumido no planeta. O centro de origem é a África e, depois de domesticado há 5000 anos, foi introduzido na Índia e transportado via rotas comerciais para mais de 40 países (DURÃES; MAGALHÃES; SANTOS, 2003). A cultura do milheto apresenta, além de rusticidade, ampla adaptabilidade aos ambientes semi-áridos por apresentar eficiência na utilização da água. Apresentando características xerófila (FERRARIS, 1973; LIRA, 1982), é uma forrageira de clima tropical, anual, C4, de hábito ereto, porte alto, com desenvolvimento uniforme e apresenta bom perfilhamento. De uma maneira geral, consiste de uma cultura de duplo propósito tanto para produção de grãos e, principalmente, para produção de forragem, em face da elevada qualidade do produto, quando comparada a outras forrageiras.

O milheto é uma cultura potencialmente produtiva para grãos ou silagem de alta qualidade, apresentando-se superior ao sorgo em estabelecimento e produção sob estresse hídrico (SMITH; HOVELAND; HANNA, 1989; WITT;

EASTIN, 1995). É cultivado quase exclusivamente em áreas tropicais áridas e semiáridas, caracterizadas por estação de crescimento com altas temperaturas, baixa precipitação pluvial e solos rasos ou arenosos. Segundo Bonamigo (1999), o milheto apresenta grande resistência à seca, boa produção de biomassa, crescimento rápido, boa adaptação em diferentes níveis de fertilidade, sistema radicular profundo e abundante; passível de mecanização, não se torna infestante, apresenta ainda resistência às pragas e doenças, facilidade de produção de sementes e forragem de qualidade. Por suas características agronômicas tem-se apresentado como uma das melhores opções de culturas em áreas de plantio direto no Brasil (RAMOS JÚNIOR et al., 2013), e para produção de grãos para o Nordeste, Centro-Oeste e Sul do Brasil.

A cultura do milheto tem se expandido de forma acelerada nos cerrados brasileiros devido à sua versatilidade de usos, rusticidade e crescimento rápido (MARTINS NETTO, 1998). Expandiu-se para o cerrado, a partir de 1984, quando começou a ser utilizado no sistema de semeadura direta e estendeu-se às mais diferentes regiões do país (DURÃES; MAGALHÃES; SANTOS, 2003). Atualmente, ocupa uma área estimada em 4,0 milhões de hectares (MARTINS NETTO; BONAMIGO, 2005).

Com a expansão de áreas com a cultura do milheto, aumentou-se a demanda por cultivares que apresentam características de interesse do agricultor e de sementes com alta qualidade genética.

## **2.2 Desenvolvimento de cultivares e a Lei de Proteção de Cultivares**

Existem demandas por cultivares de milheto para a produção de grãos, forragem e biomassa e adaptados aos sistemas de plantio direto. A diversificação e o melhoramento de populações são utilizados no desenvolvimento de cultivares de alta produtividade, considerando-se características específicas

como a resistência à seca, a doenças, à pragas, tolerância à altas temperaturas, à acidez do solo, precocidade, insensibilidade ao fotoperiodismo e qualidade do produto.

Os investimentos em programas de melhoramento para o desenvolvimento de novas cultivares são altos, havendo a necessidade de proteção dessas cultivares em mercados econômicos cada vez mais competitivos.

No Brasil, com a regulamentação da Lei de Proteção de Cultivares, tornou-se possível proteger as variedades vegetais desenvolvidas em programas de melhoramento genético (GRATAPAGLIA; FERRERA, 1996). Após essa lei, empresas públicas e privadas, incentivadas pelas garantias previstas na lei, investiram fortemente no desenvolvimento de novas cultivares, incluindo o milho. Além disso, produtores de sementes atentos aos rumos da agricultura no Brasil, investiram em suas unidades de produção e laboratórios para garantir a comercialização de sementes com alta qualidade. Entretanto, tanto as empresas obtentoras das cultivares como as empresas produtoras de sementes não conseguiram o retorno desejado por causa da pirataria, que gerou um comércio ilegal de sementes.

A cultivar protegida pode ser produzida, beneficiada, armazenada, comercializada com a devida autorização do obtentor e o mesmo pode cobrar uma retribuição pecuniária sobre a utilização da cultivar. Assim, muitas empresas iniciaram programas de pesquisa no Brasil, pois, como a pesquisa demanda investimentos, a Lei de Proteção de Cultivares garante o retorno dos recursos investidos (BRASIL, 1992). Atualmente existem 21 cultivares de milho registradas no Registro Nacional de Cultivares (ADR 300, ADR 500, ADR 7010, ADR 7020, ADR 8010, ANM 17, ANM 23, ANM 25, ANM 29, ANM 30, ANM 6123, ANSB 93, ANSB HHVBC, ANSB MC, ANSB Okashama, BRS 1501, BRS 1503, ENA 1, ENA 2, IPA BULK 1BF e

NUTRIFEED). Cultivares protegidas no Serviço Nacional de Proteção de Cultivares são oito: ANM 17, ANM 23, ANM 25, ANM 29, ANM 30, ANM 6123, BRS 1502 e BRS 1503.

Para a proteção exige-se do obtentor a caracterização das cultivares por meio de descritores, que são características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas ou moleculares que sejam herdadas geneticamente e que a critério do órgão competente sejam suficientes para diferenciar uma nova cultivar ou uma cultivar essencialmente derivada das demais cultivares conhecidas. Para regulamentar a proteção de uma nova cultivar, essa deve ser submetida ao teste de DHE (distingüibilidade, homogeneidade e estabilidade), sendo a distingüibilidade, a comprovação de que a nova cultivar ou a cultivar essencialmente derivada é distinta de outras cujos descritores sejam conhecidos. A característica de homogeneidade dos descritores garante que as cultivares devem ser homogêneas quanto às suas características em cada ciclo reprodutivo. Os descritores ainda devem ser estáveis quanto à repetição das mesmas características ao longo de gerações sucessivas (BRASIL, 2003).

Muitas empresas têm protegido cultivares por meio de marcadores morfológicos. No entanto, o estreitamento genético que vem ocorrendo para um grande número de cultivares em diferentes espécies tem levado à obtenção de cultivares morfolologicamente muito similares, dificultando a diferenciação desses materiais. Até meados da década de 60, a diferenciação de genótipos nos estudos de genética e melhoramento estava associada às características morfológicas das plantas. Porém, esse método de análise tem como limitações as influências ambientais sobre o fenótipo, de tal maneira que, muitas vezes, a identificação entre cultivares baseada somente no fenótipo deixa muitas dúvidas quanto à verdadeira identidade dos genótipos. Buscando superar esse fator limitante, novos métodos de análise foram introduzidos para auxiliar a caracterização

genética de cultivares a exemplo do uso de marcadores de enzimas e de DNA (GRATAPAGLIA; FERREIRA, 1996).

### **2.3 Marcadores moleculares para a identificação de cultivares**

A caracterização e a discriminação de cultivares são realizadas com mais segurança quando, além de caracteres morfológicos, são usados marcadores moleculares que fornecem ampla informação genética para diversas aplicações. Dentre os marcadores de proteínas as enzimas são encontradas em células de todos os organismos e podem exercer seus efeitos em muitos níveis da organização biológica podendo constituir em importantes marcadores para a caracterização de cultivares. Essas proteínas não são apenas interessantes do ponto de vista estrutural e funcional, mas também provas importantes de mecanismos fundamentais, tais como regulação, transmissão e evolução dos genes (ALFENAS et al., 1991; QUIRÓS, 1991).

A expressão de enzimas pode ser avaliada por diferentes técnicas, entre elas a eletroforese em gel. Essa técnica é a mais versátil e facilmente aplicável ao estudo de variações individuais em vegetais.

As sementes constituem um excelente material para a análise por serem fáceis de armazenar, normalmente ricas em proteínas e enzimas com elevada atividade e são, geralmente, livres de metabólitos secundários, os quais podem interferir na resolução e na atividade enzimática (SMITH; WICH, 1986). Entre os sistemas isoenzimáticos frequentemente utilizados para a separação de genótipos de várias espécies as esterases têm sido consideradas importantes por serem de fácil detecção e com atividade enzimática detectável. Além das esterases, outros sistemas enzimáticos têm sido propostos para a identificação de genótipos como 6-fosfogluconato desidrogenase, isocitrato desidrogenase, leucina aminopeptidase, fosfatase ácida, peroxidase, fosfoglucoisomerase,

glutamato oxaloacetato transaminase, entre outros (FREITAS et al., 2000). Nas análises de isoenzimas como descritores para a caracterização e identificação de cultivares, as funções bioquímicas passam a ter importância secundária, diferente de estudos envolvendo qualidade fisiológica ou outros. Dessa maneira, qualquer sistema isoenzimático que preencha os requisitos de um marcador, principalmente quanto à estabilidade, é um potencial descritor (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Análises eletroforéticas, não somente de isoenzimas, mas também de outras proteínas, têm fornecido resultados promissores na identificação de variedades. Em alguns casos, podem-se distinguir variedades por meio de análises qualitativas, referentes à expressão de proteínas resistentes ao calor (LEA). Sengupta e Chattopadhyay (2000), analisando proteínas totais em sementes de cultivares de arroz, distinguiram todas as variedades baseando-se nas diferenças qualitativas dos zimogramas. Além disso, esses autores consideraram como principais vantagens à rapidez e facilidade dos procedimentos exigidos pela técnica.

O uso de enzimas como descritores pode apresentar algumas limitações como o número de locos que são avaliados, o número de alelos por loco, a variação dos padrões em função do tecido a ser avaliado, além da não repetibilidade de resultados em algumas situações (ALFENAS et al., 1991).

A estabilidade das isoenzimas nos diversos tecidos vegetais submetidos a condições ambientais distintas é variável e, temperatura, fotoperíodo, nutrição mineral, injúria mecânica podem influenciar na expressão das mesmas comprometendo os resultados (FREITAS et al., 2000). No momento da caracterização de cultivares de espécies vegetais é de fundamental importância o cuidado da realização da análise em tecidos não contaminados por fungos ou a utilização de sistemas isoenzimáticos que sejam mais estáveis em microrganismos e em sementes com diferentes níveis de deterioração. Padrões

de isoenzima esterase foram alterados em sementes com diferentes níveis de qualidade fisiológica e sanitária, mas essa alteração não prejudicou a identificação das cultivares (MENDONÇA NETO et al., 2013).

As técnicas moleculares fundamentadas na amplificação de fragmentos de DNA vêm se tornando mais eficientes na discriminação de cultivares, uma vez que não são influenciáveis pelo ambiente (TOSTAIN, 1992).

No caso da proteção de cultivares, há necessidade de utilização de métodos precisos e reprodutíveis para a identificação das cultivares protegidas. O uso de técnicas moleculares de DNA tem merecido atenção em função dos vários exemplos práticos de processos jurídicos solucionados por meio de *fingerprintings* moleculares (BERNHARDT, 2005). A implementação de tais metodologias constitui uma técnica efetiva para assegurar os direitos relacionados à proteção de cultivares.

Marcadores moleculares de microssatélites ou SSR, que são sequências simples repetidas, são indicados para a caracterização de cultivares por serem altamente polimórficos, reprodutíveis e codominantes (MILACH, 1998). As regiões que contêm sequências simples repetidas, SSR, são amplificadas individualmente por meio de PCR a partir de um par de primers específicos, de 20 a 30 bases, complementares às sequências únicas que flanqueiam o microssatélite. Os segmentos amplificados a partir desses sítios, quase invariavelmente apresentam um extenso polimorfismo resultante da presença de diferentes números de SSR. Assim, cada microssatélite, independentemente do elemento repetido, constitui um *locus* genético altamente variável, multialélico, de grande conteúdo informativo. Cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo diferente do mesmo loco (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Cada loco de microssatélite é analisado individualmente ao utilizar o par de primers construído especialmente para sua amplificação. É possível analisar

mais de um loco por vez, sempre que os alelos de cada loco tenham tamanhos suficientemente diferentes. Esses métodos de genotipagem, denominados multiplex, são utilizados simultaneamente com mais de um par de primers específicos na mesma reação de PCR. Os locus SSR parecem ser somaticamente estáveis e possuem expressão codominante, ou seja, ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto são visualizados e são altamente multialélicos, ou seja, todos os alelos daquele loco podem ser detectados e discriminados (FERREIRA; GRATAPACLIA, 1998).

Levando em conta a expressão codominante e o multialelismo, os SSR são os marcadores que possuem elevado conteúdo de informação de polimorfismo, ou PIC – Polymorphism Information Content. Por essa razão, essencialmente toda e qualquer informação segregante pode ser utilizada como informação para estudos de ligamento e mapeamento genético (BONOW, 2004).

Os pares de primers devem ser escolhidos com base em suas habilidades de detectar um loco único, boa cobertura genômica e boa reprodutibilidade na determinação de tamanhos de alelos. A média de alelos e o número de alelos únicos dependem do número de indivíduos analisadas por população (GRATTAPAGLIA; FERREIRA, 1998).

Microssatélites têm sido utilizados em estudos de diversidade genética e identificação de cultivares em batata (PROVAN et al., 1999), arroz (BONOW et al., 2009; OLUFOWOTE et al., 1997; YANG, 2007), cevada (STRUSS; PLIESKE, 1998), milheto (CHOWDARY et al., 1998; KAPILA et al., 2008; MENDONÇA NETO, 2013; PINHO; MENDONÇA NETO, 2007), milho (PADILHA; GUIMARÃES; PAIVA, 2003; SALGADO, 2006), pessegueiro (BIANCHI; SANSAVINI; FACHINELLO, 2004), algodão (BERTINI et al., 2006), trigo (SCHUSTER et al., 2009), café (VIEIRA et al., 2010) feijão (VIEIRA et al., 2001) e soja (ALCÂNTARA NETO, 2001; GARCIA et al.,

2007; OLIVEIRA, 2009; PASSIANOTTO, 2009; PRIOLLI et al., 2002; SCHUSTER et al., 2004; VIEIRA et al., 2009).

## **2.4 Diversidade genética**

A partir dos marcadores moleculares é possível avaliar a diversidade genética entre diferentes cultivares. Os métodos preditivos de diversidade genética têm sido bastante utilizados no melhoramento, sobretudo para identificar combinações híbridas de maior heterozigose e de maior efeito heterótico (CARVALHO et al., 2003).

Diversidade genética pode ser analisada em termos de genótipos individuais, linhas puras, clones, acessos e espécies silvestres (BORÉM; CAIXETA, 2009). Ainda segundo os mesmos autores, o estudo da diversidade é o processo pelo qual a variação entre populações, entre grupos ou indivíduos de um grupo é analisada por meio de um método específico ou de uma combinação de métodos.

Nos últimos anos, com o advento dos marcadores moleculares, os pesquisadores passaram a dispor de uma técnica que pode auxiliá-los na estimativa da diversidade genética existente na coleção e na determinação das relações genéticas entre materiais para definirem a direção de cruzamento ou a seleção de progênies, além de poderem acompanhar a introgressão de genes durante o processo de melhoramento em si (BORÉM; CAIXETA, 2009).

Para estudar a variabilidade genética, testes morfológicos, isoenzimáticos e técnicas moleculares podem ser usadas. Entre elas, as técnicas que envolvem DNA são as melhores e permitem a detecção de diferenças genotípicas. Entre os marcadores moleculares, os SSR são usados mais frequentemente e comprovadamente tem sido os mais eficientes (SETOTAW et al., 2010).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório Central de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras - UFLA.

#### 3.2 Cultivares

Foram utilizadas sementes de cultivares de milho protegidas no Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e sementes de cultivares caracterizadas como de domínio público, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1 Relação das cultivares de milho utilizadas para a caracterização

Número	Cultivares	Tipo de Cultivar	Situação atual	Destinação
1	ADR 300	Variedade	Protegida	Palhada
2	ADR 500	Variedade	Protegida	Forrageira
3	ADR 7010	Híbrido	Protegida	Palhada/Grãos
4	ADR 7020	Híbrido	Protegida	Palhada/Grãos
5	ADR 8010	Híbrido	Protegida	Palhada/Grãos
6	ANM 17	Variedade	Protegida	Forragem
7	ANM 30	Variedade	Protegida	Forragem
8	ANSB MC	Variedade	Protegida	Forragem

“Tabela 1, conclusão”

Número	Cultivares	Tipo de Cultivar	Situação atual	Destinação
9	BRS 1501	Variedade	Domínio público	Palhada
10	IPA BULK 1BF	Variedade	Domínio público	Forragem
11	BN-2	Variedade	Domínio público	Palhada
12	BN-1	Variedade	Domínio público	Palhada

As amostras de sementes das cultivares protegidas foram adquiridas diretamente das empresas detentoras dos registros no MAPA e aquelas de domínio público nos bancos de germoplasma da Embrapa Milho e Sorgo e do Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA).

Os progenitores das cultivares testadas ADR são os seguintes: Híbrido ADR 7010 - mãe BM 1 x pai BM 2; Híbrido ADR 7020 - mãe BM 1 x pai BM 7; Híbrido ADR 8010 - mãe BM 30 x pai BM 15. As cultivares ADR 300 e ADR 500 foram obtidas por seleção dentro de populações introduzidas da África e Índia. A linhagem fêmea BM 30 foi derivada da linhagem BM 1. As linhagens machos BM 2, BM 7 e BM 15 têm origem da mesma população inicial. Todos os parentais e as variedades são do banco de germoplasma Bonamigo Adriana Melhoramentos – BAM (BONAMIGO, 2013).

A cultivar AN 17, é originária do cruzamento natural entre a variedade Mangangolo Cinzano e a variedade de milheto “comum”. A variedade Mangangolo Cinzano é de origem africana e a variedade de milheto “comum” há décadas vem sendo utilizada pelos produtores rurais da região norte do Mato Grosso (Sinop, Sorriso e Lucas do Rio Verde). As cultivares ANM 17 e ANM 30 são irmãs (REZENDE, 2013).

A variedade IPA BULK 1BF, foi desenvolvida pelo Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA) e pela Universidade Federal de Pernambuco

UFPE). Lançada em 1977 (PEREIRA FILHO et al., 2003), foi obtida através de um processo de seleção a partir de 400 progênies (TABOSA et al., 1999).

A variedade BRS 1501, lançada pela Embrapa Milho e Sorgo em 1999 é uma variedade de polinização aberta, originada por seleção massal de uma população americana (PEREIRA FILHO et al., 2003).

Segundo Bonamigo (1999), na Fazenda Bonamigo, em Bandeirantes-MS, iniciou-se em 1981 um trabalho de seleção massal fenotípica com o intuito de melhorar características em cultivares locais de milheto, resultando no lançamento das duas variedades BN-1 em 1986 e BN-2 em 1991. A variedade BN-2 é uma variedade sintética, oriunda de diversas introduções da África (PEREIRA FILHO et al., 2005).

### 3.3 Extração de enzimas e análises eletroforética

Foram amostradas 200 sementes de milheto de cada cultivar, as quais foram maceradas com o auxílio de um almofariz e pistilo, em presença de polivinil pirrolidona (PVP) e armazenadas a - 86°C.

Para a extração das enzimas, foi utilizado o tampão Tris-HCl 0,2M pH 8 e 0,1% de  $\beta$ -mercaptoetanol, na proporção de 250 $\mu$ l por 100mg do pó das sementes. A mistura foi homogeneizada em vortex e mantida por 12 horas a 4°C. A seguir foi centrifugada a 14.000 rpm por 30 minutos a 4°C.

A corrida eletroforética foi realizada em sistema de géis de poliacrilamida a 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador). O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi o Tris-glicina pH 8,9. Foram aplicados 50  $\mu$ L do sobrenadante da amostra e a corrida efetuada a 120 V por cinco horas (ALFENAS, 2006). Terminada a corrida, os géis foram revelados para os sistemas: **álcool desidrogenase** (ADH - EC 1.1.1.1), **catalase** (CAT - EC 1.11.1.6), **esterase** (EST - 3.1.1.1), **glutamato oxaloacetato transaminase**

(GOT - EC 2.6.1.1), **malato desidrogenase** (MDH - EC 1.1.1.37), **isocitrato desidrogenase** (IDH - EC 1.1.1.42), **fosfatase ácida** (ACP - EC 3.1.3.2), conforme metodologia descrita por Alfenas (2006).

### **3.4 Extração de DNA**

O DNA de cada cultivar foi extraído utilizando-se 200 sementes inteiras. As sementes foram maceradas em nitrogênio líquido com a adição do antioxidante polivinil pirrolidona (PVP). Após a maceração, uma pequena quantidade de material de cada amostra, aproximadamente 100mg, foi transferida para um microtubo com a adição de 350µl de tampão CTAB 2% (CTAB 2%; 1M Tris-HCl pH 7,5; 0,5M EDTA pH 8; 5M NaCl e 2% de β-mercaptoetanol) e 1,56µl de proteinase K a 20ng/µl, vortexada vigorosamente por 20 segundos. Os microtubos foram incubados a 65°C por uma hora, sendo homogeneizados a cada 15 minutos. Posteriormente foram adicionados 350µl de solução clorofórmio: álcool isoamílico na proporção 24:1 com o objetivo de separar os ácidos nucleicos (sobrenadante) das proteínas (precipitado). As amostras foram homogeneizadas por 25 minutos em agitador por inversão e centrifugadas a 14000 rpm por 10 minutos. Retirou-se o sobrenadante o qual foi transferido para um novo microtubo, contendo 250µl de álcool isopropílico refrigerado para a precipitação dos ácidos nucleicos. As amostras foram homogeneizadas cinco vezes por inversão e incubadas a -4°C por no mínimo uma hora e centrifugadas a 14000 rpm por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante.

Ao precipitado foram adicionados 140µl de álcool etílico 70% a -20°C, que foi homogeneizado e centrifugado a 14000 rpm por 10 minutos para a limpeza. Descartou-se o sobrenadante. Para limpeza final foram utilizados 140µl de álcool etílico 95%. O sobrenadante foi descartado com auxílio de uma pipeta.

Os microtubos foram colocados abertos em capela de exaustão em temperatura ambiente para a secagem do precipitado formado, pellet. Em cada microtubo, foram adicionados 50 $\mu$ l de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8, 1 mM EDTA), contendo 0,2 $\mu$ l de RNase (10mg/ml) para ressuspensão do DNA. As amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos em banho-maria e acondicionadas a -4°C.

### 3.5 Quantificação e diluição do DNA

Para a quantificação e análise da qualidade do DNA extraído foram utilizados o espectrofotômetro NanoVue da marca GE Healthcare e gel de agarose a 0,8%. As amostras apresentaram concentrações diversas, variando de 200ng/ $\mu$ l a 500ng/ $\mu$ l, e ótima qualidade, com as relações A260/280 de aproximadamente 1,8. Em amostras de DNA livres de contaminação por proteínas, o valor da relação A260/A280 igual a 1,8, sendo que valores abaixo sugerem contaminação protéica e acima contaminação por RNA (BRITO et al., 2004; ZAHA, 1996). O DNA extraído apresentou-se semelhante ao padrão Lambda DNA (INVITROGEN Life Technologies), sem degradação aparente. Após a quantificação, o DNA foi diluído para a concentração de trabalho de 10ng/ $\mu$ L.

### 3.6 Amplificação

Para as análises moleculares foram feitas reações em cadeia de polimerase (PCR), utilizando marcadores moleculares de microssatélites (SSR) em um termociclador marca Labnet Modelo TC9600-G, em um meio com volume final de 25 $\mu$ l, contendo 3 $\mu$ l da solução de DNA genômico (10ng/ $\mu$ L), 0,75 $\mu$ l de cada *primer* (10 $\mu$ M de *primer* forward, 10 $\mu$ M de *primer* reverse),

juntamente com um *mix* composto de: 15,55µl de água ultrapura; 2,5µl de tampão 10X (INVITROGEN Life Technologies); 1,0µl de MgCl<sub>2</sub> 25mM (INVITROGEN Life Technologies); 1,25µl de DNTP 10mM (INVITROGEN Life Technologies); 0,2µl de Platinum® Taq DNA Polimerase 5U/µl (INVITROGEN Life Technologies). Em seguida procedeu-se a amplificação e a corrida eletroforética a 120V por duas horas em gel de poliacrilamida e a visualização após a revelação.

O programa de amplificação consistiu de 94°C de temperatura inicial por cinco minutos, cinco ciclos de amplificação a 94°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos. Nesta etapa foi adaptado um ToCh Down, reduzindo-se 0,5°C a cada ciclo, 72°C por 30 segundos. Seguido de mais 25 ciclos, iniciados à 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. A extensão foi feita a 72°C por cinco minutos. Após as reações, os produtos da amplificação do DNA foram armazenados em freezer à 4°C.

### **3.7 Primers microssatélites (SSR)**

Foram testados 123 pares de *primers* específicos para a espécie, descritos em trabalhos sobre melhoramento assistido (SENTHILVEL et al., 2004); diversidade genética (BUDAK et al., 2003; KAPILA et al., 2008; MARIAC et al., 2006; YADAV et al., 2007); mapeamento de microssatélites (ALLOUIS et al., 2001; QI et al., 2001); mapas genéticos (QI et al., 2004). Os *primers* utilizados no trabalho estão descritos na Tabela 1A.

Para o cálculo da temperatura de melting (TM) dos *primers* foi utilizado o aplicativo web: Temperatura de Melting: Um Estudo Comparativo (ARRUDA JÚNIOR, 2010). A TM utilizada foi a temperatura média fornecida pelo aplicativo, e o cálculo foi realizado para cada par de *primers*.

### 3.8 Eletroforese e visualização dos géis

Em cada microtubo contendo 25µl de DNA amplificado foram adicionados 5µl de corante stop solution. Desta mistura, 10 µl foram aplicados nas canaletas do gel de poliacrilamida 10% submetidos à eletroforese em tampão TBE 1X a 120 volts por duas horas utilizando uma fonte de eletroforese marca PWSys modelo PW300. Esses géis foram constituídos de 10% de acrilamida:bis-acrilamida 30:1, TBE 1X, 0,1% de persulfato de amônio e 0,06% de TEMED. Para efeito de comparação do tamanho dos fragmentos, foi utilizado como padrão o 100 pb DNA Ladder (INVITROGEN Life Technologies).

Para a revelação dos géis utilizou-se o método de coloração com nitrato de prata. Após a eletroforese, as placas foram separadas e o géis foram imersos em solução fixadora (10% de etanol e 0,5% ácido acético 0,5%) e mantido sob lenta agitação por 15 minutos. Em seguida, o gel foi submerso em um litro de solução de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) na concentração de 0,2%, sob agitação lenta por 15 minutos. O gel, então, foi lavado com água corrente e mantido sob agitação lenta em solução de revelação (NaOH 3%, formaldeído 0,5%) até a obtenção de bandas de forma nítida e visualizado no transiluminador da marca Hoefer MacroVue modelo Vis-45.

Após a caracterização molecular e posterior avaliação foram selecionados aqueles *primers* que apresentaram polimorfismo entre as cultivares avaliadas.

### 3.9 Similaridade genética

Os produtos da amplificação, visualizados no gel, produzidos por cada primer e pelas enzimas, foram utilizados na elaboração de uma matriz de

similaridade genética, por meio do registro da presença (1) e da ausência (0) de bandas no perfil eletroforético de cada cultivar.

As matrizes binárias foram usadas para a obtenção das estimativas de similaridades genéticas ( $S_{gij}$ ), com auxílio do programa XLSTAT (ADDINSOFT®, Versão 2013.1.01), empregando-se o coeficiente de Jaccard (1901), para os genótipos conforme abaixo:

$$S_{gij} = \frac{a}{a + b + c}$$

Em que:

a: presença de bandas em ambos os genótipos i e j;

b: presença de banda no primeiro genótipo i e ausência no segundo j;

c: presença no segundo j e ausência no primeiro i;

Com base na matriz de similaridade genética Jaccard, foi realizado o agrupamento dos genótipos, utilizando o método de médias não ponderadas das similaridades (UPGMA - Unweighted Pair-Group Method), por meio do programa XLSTAT (ADDINSOFT, 2013).

Com a matriz binária, também, calculou-se a porcentagem de polimorfismo obtida com cada primer segundo Pinheiro (2011) e Stracieri (2012) como proposto abaixo :

$$P = \frac{nbp}{nbt} \times 100$$

Em que:

P: porcentagem de polimorfismo (ou taxa de polimorfismo);

nbp: número de bandas polimórficas;

nbt: número de bandas total.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Marcadores enzimáticos

Neste trabalho não foram consideradas as diferenças relativas às intensidades das bandas formadas nos géis. Assim para facilitar a visualização dos resultados, também foram construídos os zimogramas na forma de esquemas nos quais cada banda foi representada por um traço, após a análise do polimorfismo em transiluminador.

Estão apresentados a seguir, os padrões eletroforéticos relativos aos sete sistemas enzimáticos adotados para a identificação das doze cultivares de milho avaliados nesse trabalho. Na Figura 1 pode-se observar que pelo sistema ADH foi possível distinguir as cultivares em dois grupos. O primeiro constituído pelas cultivares ADR 300; ADR 7010; ADR 7020; ADR 8010 e BRS 1501 e o segundo pelas cultivares ADR 500; ANM 17; ANM 30; ANSB MC; IPA BULK 1BF; BN-2 e BN-1. Foi possível por meio deste sistema diferenciar as cultivares do primeiro grupo daquelas do segundo grupo pela presença de uma terceira isoforma com menor peso molecular. ADH é uma enzima que converte o acetaldeído em etanol quando existe restrição de oxigênio na célula (CUNNINGHAM; HORN, 2003).

No primeiro grupo a isoenzima é dímera, formada a partir de dois peptídeos e no segundo grupo monômera formada por um peptídeo.

Diversos autores utilizaram o sistema ADH em pesquisas para identificação de cultivares, com resultados diversos. Bonow (2004), trabalhando com sementes de arroz; Ferreira et al. (2009) com a espécie Gladiolo e Salgado et al. (2006) trabalhando com híbridos de milho, não conseguiram separar cultivares por esse sistema. Já Mendonça Neto et al. (2013) observaram polimorfismo entre as cultivares de milho quando da utilização da enzima

ADH como marcador. Vieira et al. (2009), trabalhando com soja conseguiram identificar as cultivares Garantia e Ft 2000 pela enzima ADH. Menezes et al. (2008) observaram estabilidade dos padrões polimórficos das enzimas ADH, CAT; EST; MDH e SOD, em sementes de milho de linhagens e híbridos com diferentes níveis de qualidade.

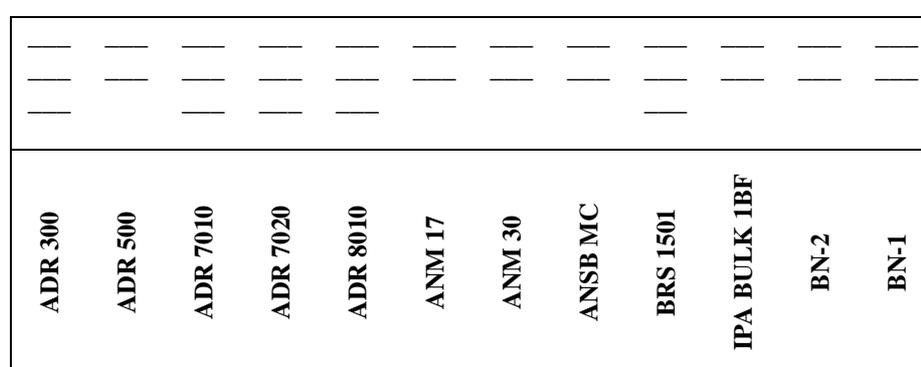


Figura 1 Zimograma da isoenzima álcool desidrogenase (ADH) em sementes de cultivares de milho

Pelos critérios adotados no presente trabalho, o padrão eletroforético da enzima CAT, não foi polimórfico suficientemente para ser utilizado para auxiliar na distinção das cultivares avaliadas. Esta enzima reduz o peróxido de hidrogênio no glioxissoma em água e O<sub>2</sub> contribuindo para eliminação de Espécies Reativas de Oxigênio nas células (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Imolesi et al. (2001), ao utilizar esta enzima para a caracterização de cultivares de milho observou a influência da adubação nitrogenada sobre a expressão desta enzima. Neste mesmo trabalho não foi possível distinguir as cultivares de milho avaliadas pelo sistema enzimático da catalase. Salgado et al. (2006) trabalhando com esse sistema em milho, conseguiram separar os híbridos UFLA 8/3 e UFLA7/4 de seus respectivos progenitores. Já Bonow (2004)

trabalhando com arroz e Ferreira et al. (2009) com gladiolos não conseguiram distinguir cultivares por esse sistema.

No zimograma da enzima esterase, Figura 2, observou-se polimorfismo, por meio do qual foi possível distinguir as cultivares em sete grupos. O primeiro constituído pelas cultivares ADR 300, ADR 7010, o segundo constituído pela ADR 500; o terceiro pelas cultivares ADR 7020; ANM 17; ANM 30; o quarto pela ADR 8010; o quinto pela ANSB MC; o sexto pela BRS 1501; BN-2 e BN-1 e o sétimo pela IPA BULK 1BF. Nota-se que por esse sistema enzimático as cultivares ADR 500; ADR 8010; ANSB MC e IPA BULK 1BF, foram distinguidas entre si.

A enzima esterase está ligada à degradação de ésteres, constituindo um sistema enzimático complexo e heterogêneo (TAIZ; ZEIGER, 2004).

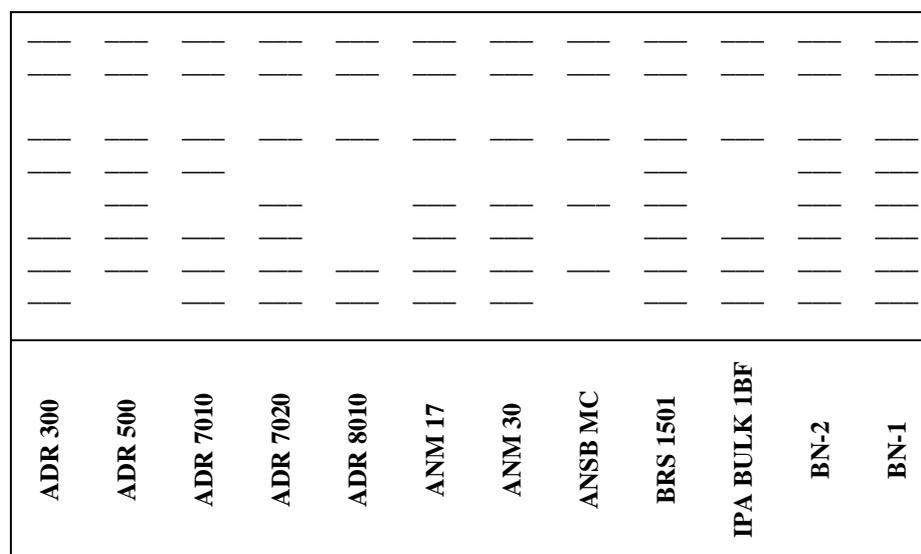


Figura 2 Zimograma da isoenzima esterase (EST) em sementes de cultivares de milho

As esterases tem sido consideradas importantes marcadores para a caracterização de cultivares por serem de fácil detecção e com expressão frequente em sementes. Bonow (2004) observou polimorfismo entre cultivares de arroz quando da utilização deste sistema. Observou ainda que mesmo em sementes de arroz infectadas com patógenos e deterioradas este marcador mostrou-se como importante recurso para a identificação de cultivares. Mendonça Neto et al. (2013) também observaram polimorfismo quando da utilização da enzima esterase para a caracterização das cultivares de milho BN-2, ADR 300 e ADR 500. Essa caracterização também foi observada no presente trabalho visto que as cultivares BN-2; ADR 300 e ADR 500, foram inseridas em diferentes grupos. Salgado et al. (2006) observaram que por esse sistema, houve segregação mendeliana para o híbrido UFLA 8/3 de milho o que tornou a certificação de pureza genética mais segura. Vieira et al. (2009) observaram polimorfismo para a separação de duas cultivares de soja com a enzima esterase. Ferreira et al. (2009), extraindo as enzimas de folhas de gladiolos conseguiram separar todas as cultivares quando da utilização deste sistema.

Pelo padrão eletroforético da enzima GOT, Figura 3, apenas dois grupos foram formados, o primeiro pelas cultivares ADR 300; ADR 7010; ADR 7020; ADR 8010; ANM 17; ANM 30; ANSB MC; BN-2; BN-1, e o segundo pelas ADR 500; BRS 1501 e IPA BULK 1BF. Esta enzima catalisa a reação específica de transferência de um aminogruppo de um aminoácido ao ácido  $\alpha$  cetoglutarato para formar o ácido glutâmico e produzir cetoácido. Esta enzima tem um papel importante no metabolismo de aminoácidos (TAIZ; ZEIGER, 2004). Mendonça Neto et al. (2013), usando esse sistema em milho conseguiram distinguir as cultivares ADR300; ADR500; BN-2; IPABULK1BF; BRS 1501 e ADR7010. No presente trabalho as cultivares ADR500; BRS1501 e IPABULK 1BF não

foram distintas entre si, mas foram separadas das cultivares ADR300, ADR7010 e BN-2, as quais não foram distintas entre si.

Em outras pesquisas, por esse sistema enzimático, não foi possível a separação de cultivares, Salgado et al. (2006) trabalhando com milho; Bonow (2004) com Arroz e Menezes et al. (2008) com feijão.

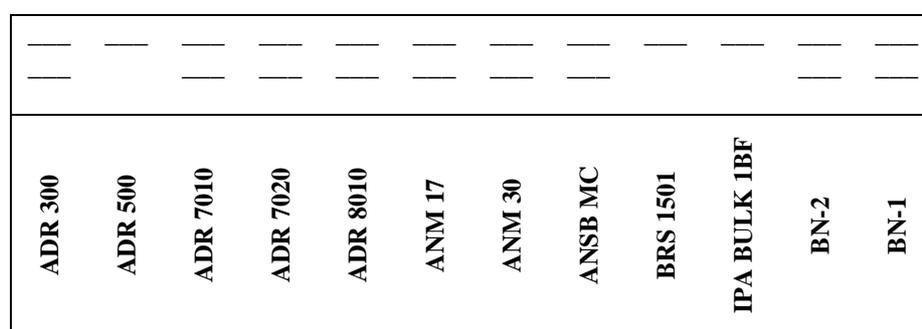


Figura 3 Zimograma da isoenzima glutamato oxaloacetato transaminase (GOT) em sementes de cultivares de milho

Pelo sistema MDH, Figura 4, foi possível separar as cultivares em três grupos sendo o primeiro composto pela ADR 300; o segundo pelas cultivares ADR 500; ADR 8010; BRS 1501 e BN-2 e o terceiro pelas ADR 7010; ADR 7020; ANM 17; ANM 30; ANSB MC; IPA BULK 1BF e BN-1. Por este sistema foi possível distinguir a cultivar ADR300 de todas as outras cultivares avaliadas. Uma ação importante dessa enzima é a transformação de malato a oxalocetato no final do Ciclo de Krebs, sendo nesse caso relacionada com a respiração celular (TAIZ; ZEIGER, 2004).

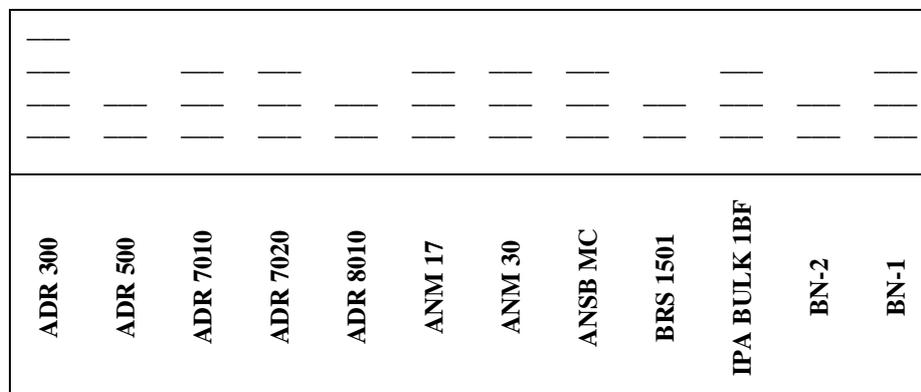


Figura 4 Zimogramas da isoenzima malato desidrogenase (MDH) em sementes de cultivares de milho

Esta isoenzima está presente em diferentes organelas celulares, sendo que em cada organela é codificada por genes diferentes. Tem sido utilizada para a caracterização de cultivares. Bonow (2004), trabalhando com sementes de Arroz; Salgado et al. (2006) com milho e Ferreira et al. (2009) com gladiolo, não conseguiram identificar cultivares por esse sistema. Já Menezes et al. (2008) separou cultivares de algodão independentemente da qualidade fisiológica das sementes de onde foi extraída a enzima.

Observa-se pela Figura 5 que pelo sistema IDH foi possível distinguir as cultivares BRS 1501 e IPA BULK 1BF entre si e elas de todas as outras que compõe um único grupo. Esta enzima promove a oxidação do isocitrato para  $\alpha$  cetoglutarato no ciclo de Krebs (TAIZ; ZEIGER, 2004). Com esse sistema Salgado et al. (2006) conseguiram separar os híbridos de Milho UFLA 8/3 e UFLA 7/4 de seus respectivos progenitores. Vieira et al. (2009) conseguiram diferenciar as cultivares de soja UFV16 e Garantia com esse sistema e Bonow (2004) trabalhando com arroz não obteve sucesso em separar cultivares.

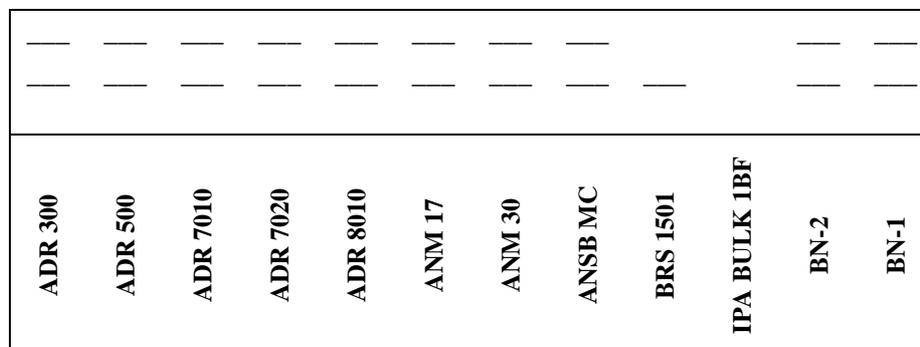


Figura 5 Zimograma da isoenzima isocitrato desidrogenase (IDH) em sementes de cultivares de milho

Pelo sistema ACP não foi observado polimorfismo para a distinção das cultivares. Fosfatases ácidas são um amplo grupo enzimático que se caracteriza por atuar em baixos valores de pH removendo grupos fosfatos de ésteres orgânicos. São enzimas que estão presentes na maioria dos organismos e praticamente em todas as suas células e tecidos (LANELLA; ITOYAMA, 2004). Freitas et al. (2000), trabalhando com sete cultivares de capim elefante e seu híbridos com milho, concluíram que mesmo não sendo útil para identificação de cultivares esse sistema contribuiu para análise do grau de similaridade genética.

Em relação ao estudo de similaridade genética, considerando a linha de corte, Figura 6, foram formados quatro grupos de cultivares assim constituídos: Grupo 1: ADR 300; ADR 7010; ADR 7020; ANM 17 ; ANM 30; ANSB MC, BN-2; BN-1; Grupo 2: ADR 500; BRS 1501 Grupo 3: ADR 8010; Grupo 4: IPA BULK 1BF.

Pelas Figura 6 e Tabela 2, observa-se menor similaridade genética entre a cultivar IPA BULK 1BF (0,68) e as demais cultivares avaliadas. Este fato pode explicado pelo fato de a cultivar IPA BULK 1BF ter sido desenvolvida de uma seleção a partir de 400 diferentes progênies (TABOSA et al., 1999). Para as

cultivares BRS 1501 e ADR 500 foi observada similaridade de 0,81 formando um grupo que apresenta similaridade de 0,74 em relação aos grupos formados pelas demais cultivares.

Neste mesmo dendrograma (Figura 6) pode ser observado o maior valor de similaridade 1,0 entre as cultivares ANM 17 e ANM 30 tendo similaridade de 0,94 com a cultivar ADR 7020.

Entre as cultivares BN-1 e BN-2 foram observada similaridade de 0,94 estas cultivares foram desenvolvidas a partir de seleção massal fenotípica com intuito de melhorar características de cultivares do Mato grosso do Sul (BONAMIGO, 1999).

Entre as cultivares ADR 7010 e ADR 300 foram observadas similaridade de 0,94. A cultivar ADR 7010 é um híbrido e provavelmente a cultivar ADR 300 tenha sido utilizada no processo de desenvolvimento desta cultivar. A cultivar ANSB MC tem similaridade de 0,80 com as demais cultivares do grupo 1.

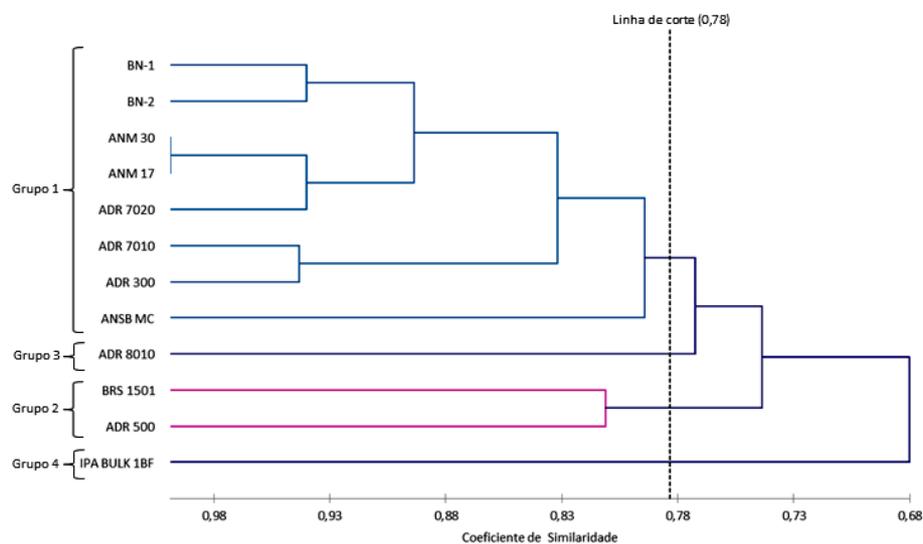


Figura 6 Dendrograma de similaridade das doze cultivares de milho, obtido pela análise de agrupamento UPGMA, estimada pelo coeficiente de Jaccard, com base na análise de isoenzimas em sementes

De uma maneira geral observam-se maiores valores de similaridade entre os materiais de uma mesma empresa obtentora. Assim as cultivares da empresa Adriana Sementes (ADR) foram agrupadas no grupo 1, com exceção da ADR 500 que é variedade de uma população introduzida da África e Índia e a ADR 8010 que é um híbrido derivado de pais diferentes das outras cultivares desenvolvidas pela empresa (BONAMIGO, 2013). Neste mesmo grupo 1 estão inseridas todas as cultivares da empresa Agronorte Pesquisa e Sementes (AN). O grupo 2 contém as cultivares ADR 500 e BRS 1501 da Embrapa Milho e Sorgo, no grupo 3 está a cultivar ADR 8010 e no grupo 4 a cultivar do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) IPA BULK 1BF.

Mendonça Neto et al. (2013), trabalhando com identificação de cultivares de milho observaram similaridade variando de 0,50 a 1,00 entre as cultivares testemunhas e os lotes comercializados. No mesmo trabalho, foi

observado similaridade de 0,5 da cultivar BN-2 em relação as outras cultivares estudadas, as cultivares ADR 500, ADR 7010, e BRS 1501 apresentaram similaridade de 0,80 entre si, a cultivar IPA BULK 1BF apresenta similaridade de 0,87 com a cultivar ADR 300.

É importante ressaltar que os sistemas enzimáticos avaliados são promissores para a identificação de algumas cultivares, sendo necessário, entretanto, avaliar mais sistemas enzimáticos para a distinção de mais cultivares. Ressalta-se que a expressão de enzimas é com frequência influenciada por condições ambientais, sendo necessária a validação dessa metodologia, sob condições distintas de qualidade fisiológica das sementes, de infecção de patógenos e mesmo sob condições distintas de produção (FREITAS et al., 2000).

Dos sistemas enzimáticos avaliados o da esterase foi o que propiciou a distinção do maior número de cultivares. Assim este sistema enzimático é promissor para a utilização em programas de controle de qualidade para a certificação da pureza genética em sementes de milho.

Tabela 2 Similaridade genética entre doze cultivares de milho, estimada pelo coeficiente de Jaccard, com base na análise de isoenzimas em sementes

	ADR 300	ADR 500	ADR 7010	ADR 7020	ADR 8010	ANM 17	ANM 30	ANSB MC	BRS 1501	IPA BULK 1BF	BN-2	BN-1
ADR 300	1											
ADR 500	0,68	1										
ADR 7010	0,94	0,72	1									
ADR 7020	0,84	0,72	0,89	1								
ADR 8010	0,78	0,65	0,82	0,82	1							
ANM 17	0,79	0,76	0,83	0,94	0,76	1						
ANM 30	0,79	0,76	0,83	0,94	0,76	1,00	1					
ANSB MC	0,68	0,75	0,72	0,82	0,75	0,88	0,88	1				
BRS 1501	0,74	0,81	0,78	0,78	0,71	0,72	0,72	0,61	1			
IPA BULK 1BF	0,67	0,63	0,71	0,71	0,63	0,75	0,75	0,63	0,69	1		
BN-2	0,79	0,88	0,83	0,83	0,76	0,88	0,88	0,76	0,82	0,65	1	
BN-1	0,84	0,82	0,89	0,89	0,72	0,94	0,94	0,82	0,78	0,71	0,94	1

## 4.2 Marcadores microssatélites

Dentre os 123 primers testados, 60 apresentaram-se polimórficos, conforme a Tabela 3, para a caracterização das cultivares de milho analisadas. Os demais primers que se apresentaram monomórficos ou que não se amplificaram foram desconsiderados nas análises subsequentes.

Pela Tabela 3, foram observados valores de polimorfismo acima de 80% quando foram utilizados os primers Cump009, PSMP2085, PSMP2224 e PSMP2271.

Tabela 3 Primers SSR, número de fragmentos totais, número de fragmentos polimórficos e porcentagem de polimorfismo

<b>Primer</b>	<b>NF</b>	<b>NFP</b>	<b>P(%)</b>	<b>Primer</b>	<b>NF</b>	<b>NFP</b>	<b>P(%)</b>
3006	132	64	48,48%	PSMP2056	40	16	40,00%
3013	84	37	44,05%	PSMP2060	120	52	43,33%
3016	88	56	63,64%	PSMP2063	99	51	51,52%
3025	60	41	68,33%	PSMP2064	204	65	31,86%
3026	84	41	48,81%	PSMP2068	96	53	55,21%
3029	108	69	63,89%	PSMP2069	96	45	46,88%
3038	88	28	31,82%	PSMP2076	84	43	51,19%
CTM2	88	24	27,27%	PSMP2078	144	65	45,14%
CTM10	156	37	23,72%	PSMP2080	132	60	45,45%
CTM12	110	64	58,18%	PSMP2081	88	23	26,14%
CTM21	198	73	36,87%	PSMP2084	60	28	46,67%
CTM25	88	53	60,23%	PSMP2085	36	33	91,67%
CTM27	121	62	51,24%	PSMP2086	84	54	64,29%
CTM57	110	53	48,18%	PSMP2088	84	55	65,48%
CTM58	93	36	38,71%	PSMP2089	96	39	40,63%

“Tabela 3, conclusão”

<b>Primes</b>	<b>NF</b>	<b>NFP</b>	<b>P(%)</b>	<b>Primers</b>	<b>NF</b>	<b>NFP</b>	<b>P(%)</b>
Cump003	216	102	47,22%	PSMP2206	115	58	50,43%
Cump005	48	24	50,00%	PSMP2214	84	40	47,62%
Cump006	168	77	45,83%	PSMP2218	96	24	25,00%
Cump007	84	24	28,57%	PSMP2220	120	59	49,17%
Cump009	72	58	80,56%	PSMP2224	60	53	88,33%
Cump010	88	38	43,18%	PSMP2229	96	51	53,13%
Cump015	99	67	67,68%	PSMP2237	144	63	43,75%
Cump016	90	48	53,33%	PSMP2247	72	40	55,56%
PSMP2001	156	72	46,15%	PSMP2255	144	43	29,86%
PSMP2008	180	102	56,67%	PSMP2261	130	69	53,08%
PSMP2013	144	51	35,42%	PSMP2263	120	79	65,83%
PSMP2027	176	92	52,27%	PSMP2266	66	42	63,64%
PSMP2043	108	52	48,15%	PSMP2271	60	50	83,33%
PSMP2045	252	92	36,51%	PSMP2273	77	45	58,44%
PSMP2048	40	16	40,00%	PSMP2274	156	85	54,49%

Legenda: NF – número de fragmentos; NFP – número de fragmentos polimórficos e P(%) – porcentagem de polimorfismo.

Como foi observado polimorfismo para 60 primers, foram selecionados para apresentação neste trabalho aqueles que apresentaram maior polimorfismo e foram capazes de separar maior número de cultivares.

Por meio do primer Cump009 (Figura 7) foi possível observar sete padrões polimórficos distintos. Padrões semelhantes foram observados entre as cultivares ADR 300 e ADR 500; ADR 8010, ANM 30, ANSB MC e BN-1; BRS 1501 e IPA BULK 1 BF. As cultivares ADR 7010, ADR 7020, ANM 17 e BN-2 foram distinguidas das demais cultivares. Pelo zimograma apresentado na Figura 7 ADR 300 e ADR 500 estão agrupadas em um mesmo nível de similaridade isto pode ser explicado em função das populações utilizadas para o

desenvolvimento destas cultivares. Este primer foi desenvolvido a partir de seqüência de milho existente e testado em oito cultivares de milho (Rib335/74; J 28; J 35; Tift 23A; ICMB 841-P3; 863B-P2; 81B-P6 e ICMP – 451-P8) que são linhas parentais de quatro populações e representam ampla faixa de diversidade em termos de origem fenotípica e geográfica (YADAV et al., 2007).

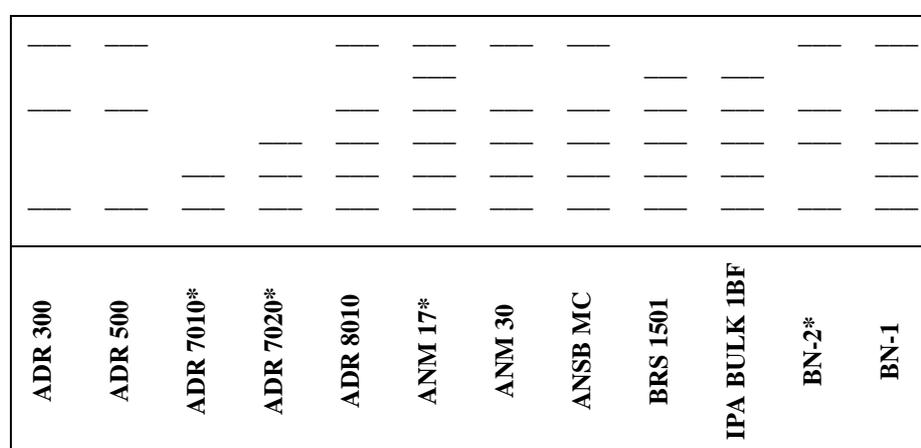


Figura 7 Zimogramas a partir da amplificação do primer Cump009 em sementes de cultivares de milho

Nota: \* Cultivares identificadas.

Pelo primer PSMP2085 (Figura 8) foi possível observar sete padrões distintos de polimorfismo entre as doze cultivares avaliadas. Por este primer não foi possível distinguir as cultivares ADR 7010, ADR 8010, ADR 500, BN-2, ANM 17 e ANM 30. No entanto, para algumas cultivares foram observados padrões únicos a exemplo do verificado para as cultivares ADR 7020, ADR 300, BN-1, IPA BULK 1BF, BRS 1501 e ANSB MC.

Também pelo primer PSMP2224 (Figura 9) observa-se três padrões polimórficos. Apenas para a cultivar ADR 300 foi observado padrão polimórfico

que a distingue das demais. Pelo zimograma as demais cultivares foram separadas em dois grupos sendo um grupo formado pelas cultivares ADR 500, ADR 7010, ANM 30 e BRS 1501 e o outro grupo pelas ADR 7020, ADR 8010, ANM 17, ANSB MC, IPA BULK 1BF, BN-2 e BN-1.

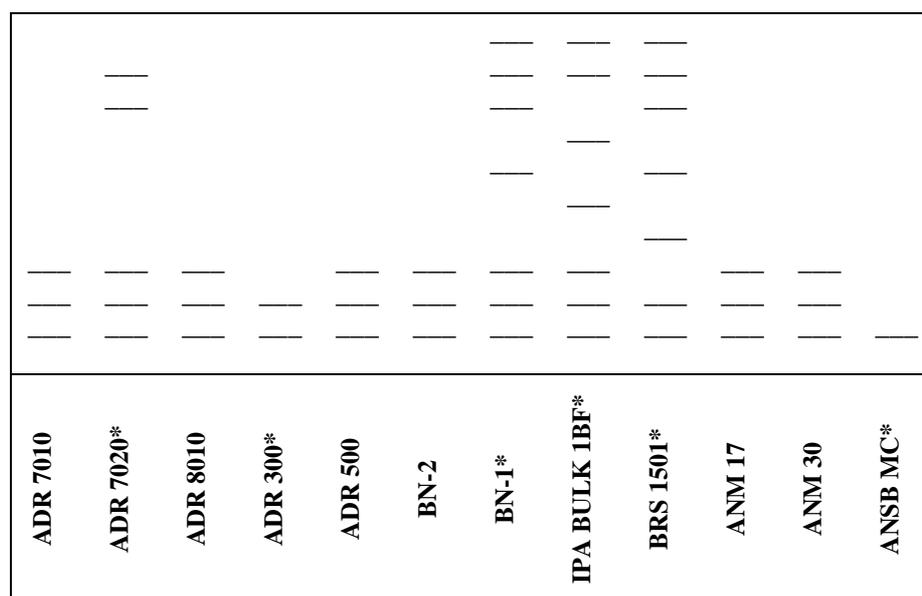


Figura 8 Zimograma a partir da amplificação do primer PSMP2085 em sementes de cultivares de milho

Nota: \* Cultivares identificadas.

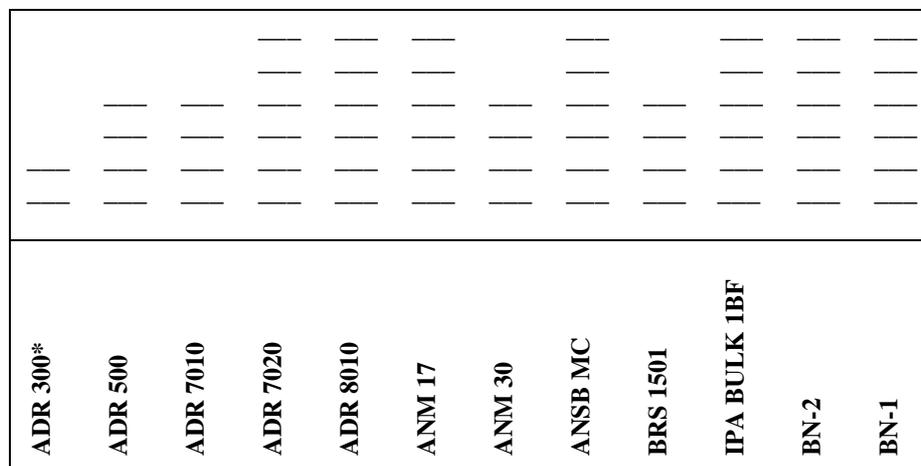


Figura 9 Zimograma a partir da amplificação do primer PSMP2224 em sementes de cultivares de milho

Nota: \* Cultivares identificadas.

Pelo primer PSMP2271 (Figura 10) observou-se sete padrões polimórficos. As cultivares ADR 8010, ANM 30, BRS 1501, IPA BULK 1BF e BN-2 apresentaram padrões polimórficos únicos que as distinguem das outras. Essas outras cultivares foram agrupadas em dois grupos com mesmo padrão polimórfico, sendo o primeiro grupo formado pelas cultivares ADR 300, ADR 500, ADR 7010 e ANSB MC e o segundo grupo pelas cultivares ADR 7020, ANM 17 e BN-1.

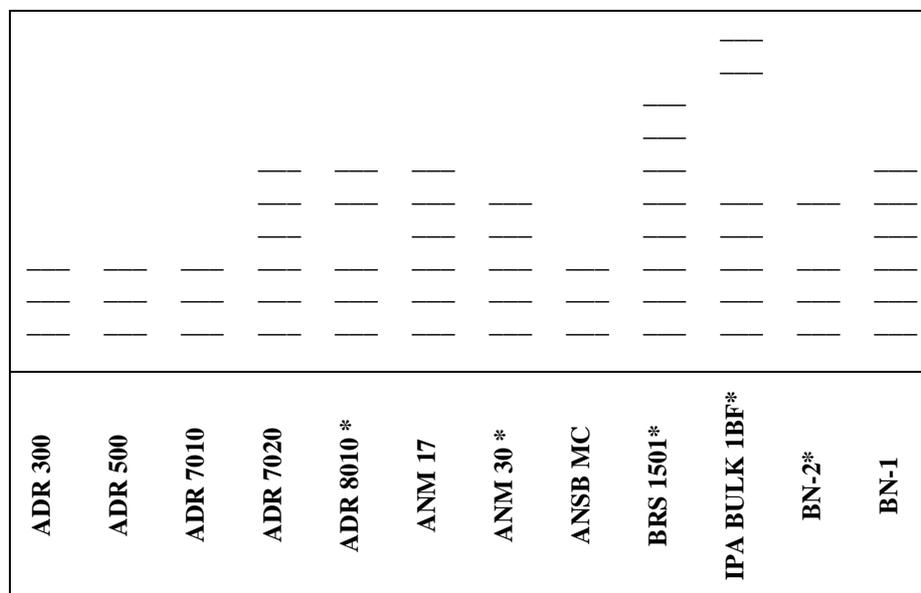


Figura 10 Zimograma a partir da amplificação do primer PSMP2271 em sementes de cultivares de milho

Nota: \* Cultivares identificadas.

Pelos primers PSMP2008 (Figura 11), PSMP2045 (Figura 12) e PSMP2056 (Figura 13) foi possível distinguir todas as cultivares utilizadas neste trabalho. Nesses primers o padrão polimórfico de cada cultivar foi único, sendo com isso possível a separação de cada cultivar.





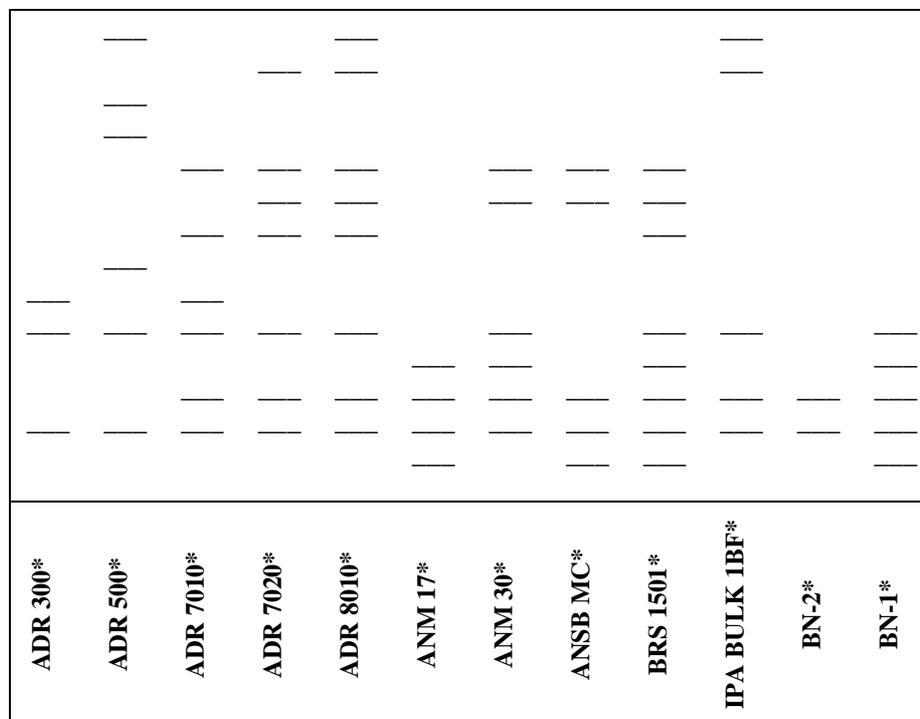


Figura 13 Zimograma a partir da amplificação do primer PSMP2056 em sementes de cultivares de milho

Nota: \* Cultivares identificadas.

Diversos autores utilizaram microssatélites em pesquisas para identificação de cultivares, com resultados diversos. Mendonça Neto et al. (2013), trabalhando com sementes de milho conseguiram distinguir as cultivares ADR 300, ADR 500, ADR 7010, BN-2, IPA BULK 1BF e BRS 1501 com quatro primers. Também trabalhando com milho Kapila et al. (2008) utilizaram 25 primers para avaliar a diversidade genética de 421 acessos de milho da Nigéria e verificaram baixo número de fragmentos polimórficos. Bonow et al. (2009), trabalhando com arroz, ressaltaram que apenas cinco primers foram suficientes para a distinção de todos os genótipos estudados e que a análise dos microssatélites permitiu a caracterização e a individualização de

todas as cultivares estudadas quanto à subespécie. Vieira et al. (2009), trabalhando com 53 cultivares de soja e 283 marcadores microssatélites, concluíram que 53 microssatélites avaliados apresentaram alta informatividade e que é possível detectar diferenças nos germoplasmas avaliados. Salgado et al. (2006), trabalhando com milho, verificaram que marcadores microssatélites foram capazes de diferenciar os híbridos estudados de suas linhagens parentais de forma segura.

Diversos autores trabalhando com soja e marcadores microssatélites em pesquisas para identificação de cultivares obtiveram resultados diversos. Oliveira (2009) avaliou 32 cultivares de soja com 48 marcadores microssatélites, e distinguiu todas as cultivares, inclusive cultivares com alta taxa de similaridade. Priolli et al. (2002) identificaram 184 de 186 cultivares de soja avaliadas. Garcia et al. (2007) avaliaram 69 microssatélites e selecionaram 10 para serem utilizados rotineiramente na caracterização de cultivares de soja. Passianotto (2009) identificou seis primers com elevados valores de diversidade genética, que foram capazes de diferenciar todas as 48 cultivares analisadas. Alcântara Neto (2001) identificou que a combinação dos primers SATT186, SATT094, SATT070 e SATT197 possibilitou a identificação de 28 genótipos de soja avaliados.

A partir de padrões únicos observados para as cultivares é possível a utilização do marcador para a certificação da pureza genética de uma determinada cultivar em relação às demais.

No caso específico do milheto não há muitas cultivares registradas para a comercialização de sementes e protegidas, o que torna viável este tipo de marcador para a certificação da pureza genética e para certificação de origem das sementes.

Em relação ao estudo de similaridade genética, considerando a linha de corte, Figura 14, foram formados três grupos de cultivares assim constituídos:

Grupo 1: ADR 300 e ADR 500; Grupo 2: ADR 7010, ADR 7020 e ADR 8010 e o Grupo 3: ANM 17, ANM 30, ANSB MC, BRS 1501, IPA BULK 1BF, BN-2 e BN-1.

Para o cálculo de similaridade, Figura 14 e Tabela 4, foram utilizadas os zimogramas dos 60 primers polimórficos. Pelos resultados obtidos por meio dos marcadores de microssatélites pode-se observar que o maior valor de similaridade (0,71) foi encontrado entre as cultivares ADR 8010 e ADR 7020, podendo inferir que populações em comum possam ter sido utilizadas no desenvolvimento das mesmas. Essas duas cultivares apresentaram índice de similaridade de aproximadamente 0.58 em relação à cultivar ADR 7010.

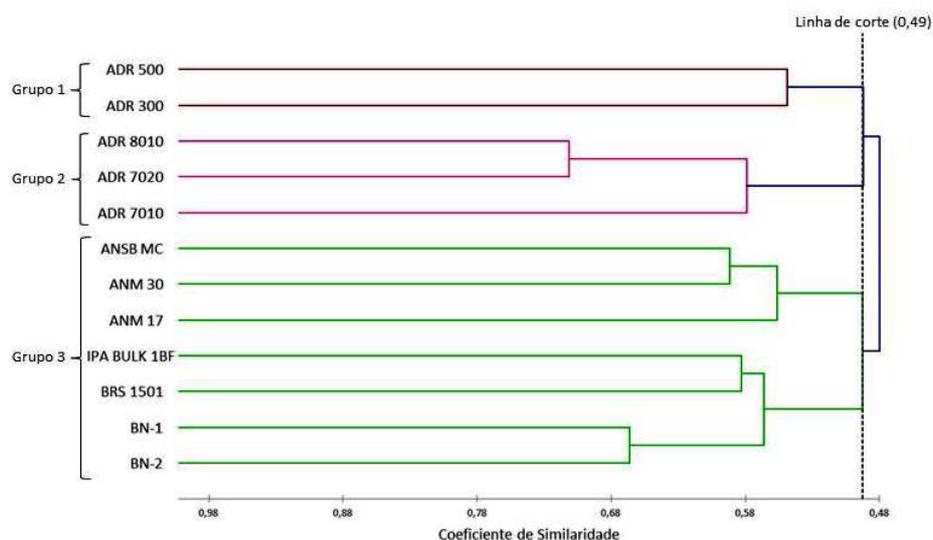


Figura 14 Dendrograma de similaridade das doze cultivares de milho, obtido pela análise de agrupamento UPGMA, estimada pelo coeficiente de Jaccard, com base na análise de microssatélites

Assim como observado para os marcadores de proteínas as cultivares BN-1 e BN-2 se agruparam com 0,66 de similaridade e apresentaram

similaridade 0,56, com as cultivares IPA BULK 1BF e BRS 1501, estas com 0,58 de similaridade. Neste mesmo grupo pode ser verificado que a cultivar ANSB MC e ANM 30 têm similaridade de 0,59 e que são similares a ANM 17 em 0,55. A similaridade entre as cultivares deste grupo é de 0,49.

A cultivar ADR 300 apresenta similaridade de 0,55 em relação a cultivar ADR 500. De acordo com Bonamigo (2013), estas cultivares foram selecionadas dentro de populações introduzidas da África e Índia.

O número de marcadores SSR utilizados foi superior ao utilizado para as enzimas. Como as regiões do genoma avaliadas por meio destes marcadores são distintas espera-se índices distintos de similaridade quando comparados entre si.

Para a identificação de cultivares visando à certificação da pureza genética, quanto maior a similaridade, maior a dificuldade de encontrar um marcador que possa ser utilizado para a certificação da pureza genética em lotes de sementes, principalmente visando à comercialização de sementes legais.

Tabela 4 Similaridade genética entre doze cultivares de milho, estimada pelo coeficiente de Jaccard, com base na análise de microssatélites em sementes

	ADR 300	ADR 500	ADR 7010	ADR 7020	ADR 8010	ANM 17	ANM 30	ANSB MC	BRS 1501	IPA BULK 1BF	BN-2	BN-1
ADR 300	1											
ADR 500	0,55	1										
ADR 7010	0,50	0,52	1									
ADR 7020	0,47	0,46	0,58	1								
ADR 8010	0,52	0,47	0,57	0,71	1							
ANM 17	0,49	0,47	0,46	0,50	0,55	1						
ANM 30	0,45	0,47	0,47	0,44	0,46	0,55	1					
ANSB MC	0,43	0,44	0,47	0,44	0,45	0,56	0,59	1				
BRS 1501	0,45	0,51	0,50	0,49	0,52	0,54	0,48	0,47	1			
IPA BULK 1BF	0,44	0,49	0,45	0,46	0,50	0,53	0,45	0,45	0,58	1		
BN-2	0,50	0,50	0,46	0,47	0,51	0,54	0,49	0,48	0,57	0,55	1	
BN-1	0,50	0,49	0,46	0,51	0,52	0,54	0,46	0,45	0,57	0,57	0,66	1

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A caracterização de cultivares de milho pode ser realizada com sucesso utilizando-se marcadores enzimáticos e, ou, moleculares. Porém cada um deles com potencialidades e limitações em diferentes níveis.

Os marcadores enzimáticos podem ser considerados úteis na distinção das cultivares de milho. Destaca-se a rapidez na obtenção dos resultados, pois as análises podem ser realizadas a partir de sementes, além da fácil interpretação desses e a simplicidade na execução da técnica. É importante ressaltar que esses marcadores podem sofrer influência de diversos fatores, como por exemplo, ambiente, qualidade fisiológica e presença de microrganismos. Dessa forma, é importante serem analisados sistemas enzimáticos em que há influência não altere os padrões de bandas que são necessários para a distinção das cultivares. Esses descritores são recomendados como uma alternativa da análise dos marcadores moleculares.

Por meio dos marcadores microssatélites foi possível diferenciar e identificar todas as cultivares de milho utilizadas nesse estudo. Esses apresentam resultados de fácil interpretação e com pequeno número de análises é possível identificar com clareza e precisão um grande número de cultivares. Os resultados são obtidos em poucas horas, além da possibilidade de análise de qualquer tecido em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, sendo a semente importante, pois quando utilizada ganha-se tempo na análise em relação a outros tecidos da planta. A partir do presente estudo tem-se os primers mais eficientes para a identificação das principais cultivares de milho utilizadas no Brasil. Os marcadores moleculares são, dessa forma, os recomendados para a distinção e identificação de cultivares sempre que for necessário esse tipo de análise.

## **6 CONCLUSÕES**

É possível identificar cultivares de milho por meio de marcadores de enzimas e microssatélites.

Dos sistemas enzimáticos avaliados o da esterase apresenta-se mais polimórfico para a distinção das cultivares avaliadas.

Pelos primers PSMP2008, PSMP2045 e PSMP2056 é possível distinguir todas as cultivares de milho utilizadas nesta pesquisa.

Para os marcadores de microssatélites foi observado polimorfismo variando de 20 a 90%.

## REFERÊNCIAS

- ADDINSOFT. **Xlstat**. Versão 2013.1.01. Disponível em: <<http://www.xlstat.com>>. Acesso em: 20 fev. 2013.
- ALCÂNTARA NETO, F. **Marcadores microssatélites na identificação de cultivares de soja**. 2001. 46 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.
- ALFENAS, A. C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. Viçosa, MG: UFV, 2006. 627 p.
- ALFENAS, A. C. et al. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungo e essências florestais**. Viçosa, MG: UFV, 1991. 242 p.
- ALLOUIS, S. et al. Construction of a BAC library of pearl millet, *Pennisetum glaucum*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 102, n. 8, p. 1200-1205, June 2001.
- ANDREWS, D. J.; RAJEWSKIM, J. F. Origin, characteristics and use os pearl millet. In: NATIONAL GRAIN PEARL MILLET, 1., 1995, Tifton. **Proceedings...** Athens: University of Georgia, 1995. p. 1-4.
- ARRUDA JÚNIOR, R. G. **Temperatura de Melting: um estudo comparativo**. 2010. 51 p. Monografia (Graduação em Ciência da Computação) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2010.
- BERNHARDT, S. M. High plains drifting: wind-blown seeds and the Intellectual property implications of the GMO revolution. **Northwestern Journal of Technology and Intellectual Property**, Chicago, v. 4, n. 1, p. 1-13, 2005.
- BERTINI, C. H. C. M. et al. Characterization and genetic diversity analysis of cotton cultivars using microsatellites. **Genetics Molecular and Biology**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 321-329, 2006.
- BIANCHI, V. J.; SANSAVINI, S.; FACHINELLO, J. C. Microsatellite markers for identification of *Prunus* spp. rootstocks. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 61, n. 3, p. 303-306, May/June 2004.

BONAMIGO, L. A. **Cultivares de milho da empresa Adriana Sementes** [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <adrianoas@msn.com> em 31 jan. 2013.

\_\_\_\_\_. Cultura do milho no Brasil, implantação e desenvolvimento no cerrado. In: WORKSHOP INTERNACIONAL DE MILHETO, 2., 1999, Planaltina. **Anais...** Planaltina: EMBRAPA Cerrados, 1999. p. 31-65.

BONOW, S. **Caracterização morfológica, isoenzimática e molecular de cultivares de arroz de sequeiro**. 2004. 90 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

BONOW, S. et al. Microsatellite markers in and around rice genes: applications in variety identification and dus testing. **Crop Science**, Madison, v. 49, n. 3, p. 880-886, June 2009.

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2009. 532 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília: LANARV/SNAD/MA, 1992. 360 p.

BRASIL. Ministério da Saúde, Pecuária e Abastecimento. Ato nº. 2, de 17 de janeiro de 2003. Estabelece regras para análises de sementes. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 23 jan. 2003. Seção 1, p. 2-3.

BRITO, L. G. et al. Avaliação de diferentes protocolos de extração de DNA celular a partir de adultos de *Haematobia irritans* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae). **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 4, p. 168-172, 2004.

BRUNKEN, J. N. A systematic study of pennisetum sect. pennisetum (Germineae). **American Journal of Botany**, Bronx, v. 64, n. 2, p. 161-176, 1977.

BUDAK, H. et al. Development and utilization of ssrs to estimate the degree of genetic relationships in a collection of pearl millet germplasm. **Crop Science**, Madison, v. 43, n. 6, p. 2284-2290, Nov. 2003.

CARVALHO, L. P. de et al. Análise da diversidade genética entre acessos de banco ativo de germoplasma de algodão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 10, p. 1149-1155, out. 2003.

CHOWDHARY, B. P. et al. Emerging patterns of comparative genome organization in some mammalian species as revealed by Zoo-FISH. **Genome**, Ottawa, v. 8, n. 6, p. 577-589, June 1998.

CUNNINGHAM, C. C.; HORN, C. G. van. Energy availability and alcohol-related liver pathology. **Alcohol Research & Health**, Washington, v. 25, n. 4, p. 291-299, 2003.

DURÃES, F. O. M.; MAGALHÃES, P. C.; SANTOS, F. G. **Fisiologia da planta de milheto**. Sete Lagoas: EMBRAPACNPMS, 2003. 13 p. (Circular Técnica, 28).

FERRARIS, R. **Pearl millet (*Pennisetum typhoides*)**. Hurley: Commonwealth Bureau of Pastures and Field Crops, 1973. 69 p.

FERREIRA, C. A. et al. Identificação de cultivares de *Gladiolus* sp. por meio marcadores genético-bioquímico e de RAPD. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 115-126, 2009.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introducción al uso de marcadores moleculares em el análisis genético**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 61 p.

FREITAS, N. S. A. et al. Caracterização e diversidade genética do capim-elefante e seus híbridos com milheto mediante padrões isoenzimáticos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 6, p. 1125-1133, jun. 2000.

GARCIA, A. F. et al. Microsatellite molecular markers in the cultivar identification of Brazilian soybean for human consumption. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 7, n. 2, p. 155-164, 2007.

GRATAPAGLIA, D.; FERRERA, M. E. Proteção de cultivares por análise de DNA. In: ANUÁRIO Abrasem 1996. Brasília, 1996. p. 44-50.

IMOLESE, A. S. et al. Efeito da adubação nitrogenada em características morfo-agronômicas e nos padrões eletroforéticos de proteínas e isoenzimas de sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 17-25, 2001.

JACCARD, P. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. **Bulletin de la Société Voudoise des Sciences Naturelles**, Payot, n. 37, p. 547-579, 1901.

KAPILA, R. K. et al. Genetic diversity among pearl millet maintainers using microsatellite markers. **Plant Breeding**, Berlin, v. 127, n. 1, p. 33-37, Feb. 2008.

LANELLA, P.; ITOYAMA, M. M. O papel das fosfatases nos organismos. **Revista UNORP**, São José do Rio Preto, v. 5, n. 12, p. 63-77, dez. 2004.

LIRA, M. de A. Cultura do milho. In: INSTITUTO AGRONÔMICO DE PERNAMBUCO. **Cultura do milho**: curso para extensionista agrícola. Fortaleza: BNB-ETENE, 1982. p. 9-22. (BNB Monografias, 8).

MARIAC, C. et al. Diversity of wild and cultivated pearl millet accessions (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) in Niger assessed by microsatellite markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 114, n. 1, p. 49-58, Dec. 2006.

MARTINS NETTO, D. A. **A cultura do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 1998. 6 p. (Comunicado Técnico, 11).

MARTINS NETTO, D. A.; BONAMIGO, L. A. Milho: características da espécie e usos. In: MARTINS NETTO, D. A.; DURÃES, F. O. M. (Ed.). **Milho**: tecnologias de produção e agronegócio. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2005. p. 20-36.

MENDONÇA NETO, R. et al. Identification of pearl millet cultivars using both microsatellites and enzymatic markers. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 1, p. 1-14, Jan. 2013.

MENEZES, M. et al. Identificação de cultivares de milho, feijão, algodão e soja por meio de enzimas e proteínas resistentes ao calor. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 30, n. 2, p. 111-122, 2008.

MILACH, S. C. K. Principais tipos de marcadores e suas características. In: \_\_\_\_\_. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: SCK, 1998. p. 17-28.

OLIVEIRA, M. B. **Caracterização molecular de cultivares de soja utilizando marcadores microssatélites genotipados em sequenciador automático**. 2009. 88 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Paranaense, Umuarama, 2009.

OLUFOWOTE, J. O. et al. Comparative evaluation of within-cultivar variation of rice (*Oryza sativa* L.) using microsatellite and RFLP markers. **Genome**, Ottawa, v. 40, n. 3, p. 370-378, June 1997.

PADILHA, L.; GUIMARÃES, C. T.; PAIVA, E. **Avaliação da pureza genética em sementes de milho utilizando marcadores microssatélites**. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2003. 32 p.

PASSIANOTTO, A. L. L. **Identificação molecular de cultivares de soja (*Glycine max* L. Merrill) utilizando um sistema semi-automatizado de genotipagem**. 2009. 50 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2009.

PEREIRA FILHO, I. A. et al. Manejo da cultura do milheto. In: MARTINS NETTO, D. A.; DURÃES, F. O. M. (Ed.). **Milheto: tecnologias de produção e agronegócio**. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2005. p. 59-92.

\_\_\_\_\_. **Manejo da cultura do milheto**. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2003. 65 p. (Circular Técnica, 29).

PINHEIRO, R. L. **Diversidade genética e desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya labiata* Lindl.** 2011. 56 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristovão, 2011.

PINHO, E. V. R. von.; MENDONÇA NETO, R. P. Uso de marcadores moleculares para identificação de cultivares. **Seed News**, Pelotas, v. 11, n. 4, p. 14-15, 2007.

PRIOLLI, R. H. G. et al. Characterization of Brazilian soybean cultivars using microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 2, p. 185-193, Mar./Apr. 2002.

PROVAN, J. et al. A low mutation rate for chloroplast microsatellites. **Genetics**, Austin, v. 153, n. 2, p. 943-947, Oct. 1999.

QI, X. et al. Development of simple sequence repeat markers from bacterial artificial chromosomes without subcloning. **BioTechniques**, Natick, v. 31, n. 2, p. 355-361, Mar. 2001.

\_\_\_\_\_. Integrated genetic map and a new set of simple sequence repeat markers for pearl millet, *Pennisetum glaucum*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 109, n. 7, p. 1485-1493, Nov. 2004.

QUIRÓS, C. F. Isoenzimas como marcadores genéticos para identificar híbridos en el cultivo de tejidos. In: ROCA, W. M.; MROGÍNSKI, L. A. (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, 1991. p. 857-876.

RAMOS JÚNIOR, E. U. et al. Crescimento de plantas sob déficit hídrico. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 1, p. 47-56, jan./fev. 2013.

REZENDE, D. **Cultivares de milho da empresa Agronorte Pesquisa e Sementes** [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <adrianoas@msn.com> em 2 fev. 2013.

SALGADO, K. C. C. **Caracterização da pureza genética em sementes híbridas de milho por meio de marcadores morfológicos e moleculares**. 2001. 67 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

SALGADO, K. C. P. et al. Genetic purity certificate in seeds of hybrid maize using molecular markers. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 169-175, 2006.

SCHUSTER, I.; BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG: UFV, 2006. 207 p.

SCHUSTER, I. et al. Determinação da pureza varietal de sementes de soja com o auxílio de marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 3, p. 247-253, mar. 2004.

\_\_\_\_\_. Genetic variability in Brazilian wheat cultivars assessed by microssatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 32, n. 3, p. 557-563, May/June 2009.

SENGUPTA, S.; CHATTOPADHYAY, N. C. Rice varietal identification by SDS-PAGE. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 28, n. 3, p. 871-873, 2000.

SENTHILVEL, S. et al. New SSR markers for pearl millet from data mining of expressed sequence tags. In: INTERNATIONAL CROP SCIENCE CONGRESS, 4., 2004, Ibadan. **Proceedings...** Ibadan: ICSC, 2004. Disponível em: <[http://www.cropscience.org.au/icsc2004/poster/3/1/1223\\_hashct.htm](http://www.cropscience.org.au/icsc2004/poster/3/1/1223_hashct.htm)>. Acesso em: 10 dez. 2012.

SETOTAW, T. A. et al. Breeding potential and genetic diversity of “Híbrido do Timor” coffee evaluated by molecular markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, MG, v. 10, n. 4, p. 298-304, Dec. 2010.

SMITH, L. S. C.; WICH, R. D. The identification off male selfs in hybrid maize: a comparison using electrophoresis and morphology. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 14, p. 1-8, June 1986.

SMITH, R. L.; HOVELAND, C. S.; HANNA, W. W. Water stress and temperature in relation to seed germination of pearl millet and sorghum. **Agronomy Journal**, Madison, v. 81, n. 2, p. 303-305, Mar. 1989.

STAPF, O.; HUBBARD, C. E. *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. In: PRAIN, D. (Ed.). **Flora of tropical Africa**. Ashford: Reeve, 1934. p. 954-1070.

STRACIERI, J. **Diversidade genética entre acessos de pera (*Pyrus communis* L.) detectados por marcadores moleculares**. 2012. 58 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

STRUSS, D.; PLIESKE, J. The use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barley populations. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 97, n. 1/2, p. 308-315, July 1998.

TABOSA, J. N. et al. Programa de melhoramento de sorgo e milheto em Pernambuco. In: QUEIROZ, M. A.; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o nordeste brasileiro**. Brasília: EMBRAPA, 1999. Disponível em: <<http://www.cpatia.embrapa.br/catalogo/livrorgr/>>. Acesso em: 10 dez. 2012.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TERREL, E. E. The correct names for pearl millet and yellow foxtail. **Taxon**, Utrecht, v. 25, p. 297-304, June 1976.

TOSTAIN, S. Enzyme diversity in pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.) Wild millete. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 83, n. 6/7, p. 733-742, Apr. 1992.

VIEIRA, E. S. N. et al. Development of microsatellite markers for identifying Brazilian *Coffea arabica* varieties. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 33, n. 3, p. 507-514, May/June 2010.

\_\_\_\_\_. Similaridade genética entre cultivares de feijão do grupo carioca por meio de marcadores morfológicos e moleculares de dna visando a certificação da pureza genética. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 2, p. 43-50, 2001.

\_\_\_\_\_. Variabilidade genética em cultivares de soja determinada com marcadores microssatélites em gel de agarose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 11, p. 1460-1466, Nov. 2009.

WITT, M.; EASTIN, J. Pearl millet, grain sorghum, and corn responses to watering levels. In: NATIONAL GRAIN PEARL MILLET SYMPOSIUM, 1., 1995, Tifton. **Proceedings...** Athens: University of Georgia, 1995. p. 40.

YADAV, O. P. et al. Development of new simple sequence repeat markers for pearl millet. **Journal of ICRISAT**, Hyderabad, v. 3, n. 1, p. 1-4, Dec. 2007.

YANG, Z. PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 24, n. 8, p. 1586-1591, Aug. 2007.

ZAHA, A. **Biologia molecular básica**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 1996. 56 p.

## ANEXOS

**TABELA 1A** Pares de primers polimórficos.

Primer		Sequência (5'-3')	Tamanho (pb)	Referência
3002	F	AAAGTTACCGGGAGGGTAAAAA	205	Senthilvel et al. (2004)
	R	TCGCCTAAAACTGGAGGAA		
3005	F	CGCGGTGTTCTCACACAC	140	Senthilvel et al. (2004)
	R	TGTGAATTCCGCGGGTATAG		
3006	F	AAATCGGTTCGTGGTGAAGTT	180	Senthilvel et al. (2004)
	R	GAGAATGTGGGAGACACACG		
3009	F	CTGTACCATGTGCGCTGATT	320	Senthilvel et al. (2004)
	R	GCGCATATATGTGGGTGTGT		
3011	F	CACGCCCTTTTACCTTGAC	150	Senthilvel et al. (2004)
	R	CGCGACACGTCCTACTAA		
3013	F	TGTGGGAGAGAGGAGAGTCC	370	Senthilvel et al. (2004)
	R	CGCGAGATGATGTGTGGT		
3014	F	TGCTTCACAGCCTCTCCATA	280	Senthilvel et al. (2004)
	R	CCACCATGCAACAGCAATAA		
3016	F	TTGTGGCTGAAGAAGAGATCC	450	Senthilvel et al. (2004)
	R	AATGTGGGGAGAGACACACG		
3017	F	CACCAAACAGCATCAAGCAG	200	Senthilvel et al. (2004)
	R	AGGTAGCCGAGGAAGGTGAG		
3018	F	CGATGACACCTGTGCGTATT	215	Senthilvel et al. (2004)
	R	ATCGAACTGCACGTTAGCAA		

3019	F	GCGCACCACTGTGTCTAT	210	Senthilvel et al. (2004)
	R	CATGCAGAGAAAAATCAAGCA		
3020	F	GTTCCATGGAGCTGGAAGTC	180	Senthilvel et al. (2004)
	R	GCTAGAACAGGGCCGTTACA		
3021	F	GCCGACAGGAAGATTACGAT	175	Senthilvel et al. (2004)
	R	AGCAAAACGCAGAACAACAG		
3022	F	CTGGAAGTCCTTCTCGGTTG	190	Senthilvel et al. (2004)
	R	CTGCTCCGCTCTGAATCTG		
3025	F	GTTGCAGATGAGCGATCGTA	180	Senthilvel et al. (2004)
	R	AGCGCAAAGAGTGTAACCTGG		
3026	F	GTGAGGCCTCGAACAAACAC	130	Senthilvel et al. (2004)
	R	GCCGACCAAGAACTTCATACA		
3027	F	ACACCATCACCGACAACAAA	210	Senthilvel et al. (2004)
	R	AGTGACCTGGGGTACAGACG		
3028	F	ACGATTCTTCGTCTCCAG	170	Senthilvel et al. (2004)
	R	ATACGATACGCGGAGCTAC		
3029	F	ACCAGCAACAGCAGCAGAG	260	Senthilvel et al. (2004)
	R	ACACACTGCGACAAGTGGAG		
3032	F	AGGTAGCCGAGGAAGGTGAG	190	Senthilvel et al. (2004)
	R	CAACAGCATCAAGCAGGAGA		
3033	F	GAGGGCCAGCTCTCCTAGAT	220	Senthilvel et al. (2004)
	R	CCCTAACACAGAGGGACAC		
3035	F	GCCAAGGAGGTCAAGATCG	280	Senthilvel et al. (2004)
	R	ACACGACTCGACTCAGACCA		
3037	F	CGTCGCTGCTCTTCTTCTT	200	Senthilvel et al. (2004)
	R	ATTCAGAAACGGCAACCAA		
3038	F	CTCTCGGTTTGACGGTTTGT	180	Senthilvel et al. (2004)

	R	GGGGAAAACAAAGTTGCTCA		
3039	F	GGCACGAGGGGCTAAGTAA	180	Senthilvel et al. (2004)
	R	GGAACGCCGAGTACACAGAT		
CTM-1	F	TCTGGGGATTGGCTGGAATTACA	222	Budak et al. (2003)
	R	AAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTTC		
CTM-2	F	GGTGATTAATAATCGAGGGTT	255	Budak et al. (2003)
	R	AGCAACTTGAGCAGCGG		
CTM-3	F	GTCCATCGTCGCCGACGAA	195	Budak et al. (2003)
	R	GGATTTGCTAGTTGTGGGCT		
CTM-8	F	GCTGCATCGGACATAGGGAA	210	Budak et al. (2003)
	R	CTCAGCAAGCACGCTGCTCT		
CTM-9	F	GCCTCCTCTTGATACCATATT	219	Budak et al. (2003)
	R	TAGCCTTGGCTGCTATATTC		
CTM-10	F	GAGGCAAAAGTGGAAGACAG	235	Budak et al. (2003)
	R	TTGATTCCCGGTTCTATCGA		
CTM-11	F	GACCGATCTTCTTTGCTGTTG	230	Budak et al. (2003)
	R	TCTATCGTACGTTAACCTCA		
CTM-12	F	GTTGCAAGCAGGAGTAGATCGA	189	Budak et al. (2003)
	R	CGCTCTGTAGGTTGAACTCCTT		
CTM-21	F	ATGCCTCCCACCCACGTCG	260	Budak et al. (2003)
	R	CGTCGCACTAGCCACAGTCA		
CTM-25	F	GCGAAGTAGAACACCGCGCT	225	Budak et al. (2003)
	R	GCACTTCCTCCTCGCCGTC		
CTM-26	F	GCAAGTGATCCATGACATTACGA	188	Budak et al. (2003)
	R	ACTTGCTAGCTGCTGCTCTTG		
CTM-27	F	GTTGCAAGCAGGAGTAGATCGA	255	Budak et al. (2003)
	R	CGCTCTGTAGGTTGAACTCCTT		

CTM-55	F	CGTCTTCTACCACGTCCT	140	Budak et al. (2003)
	R	CATAATCCCCTCAACAATCC		
CTM-56	F	GCGTTGTTTCGGTGACCAC	165	Budak et al. (2003)
	R	GCGTATCTTTAAATTGCCTTTGTT		
CTM-57	F	TGGTGGCAATGCAGGCTACAG	172	Budak et al. (2003)
	R	AGCGAGACGATCGACAGGG		
CTM-58	F	TACGTGCTACAAGAATGG	155	Budak et al. (2003)
	R	GCTGGCTAGGACACAA		
CTM-59	F	TCCTCGACATCCTCCA	183	Budak et al. (2003)
	R	GACACCTCGTAGCACTCC		
CTM-60	F	AAGCCCCGATCACATCAA	218	Budak et al. (2003)
	R	AGCCGAGCCTCATCCC		
Cump 001	F	GCACGAGGCTTATCTGTGTTTC	157	Yadav et al. (2007)
	R	CAACTCTTGCCTTTCTTGGCCT		
Cump 002	F	GCACGAGGCAAATATAAAGGTG	198	Yadav et al. (2007)
	R	ACGTAGACTTGCACCACCAGA		
Cump 003	F	CATGCGACGTGGTCTATCTG	118	Yadav et al. (2007)
	R	GAGAGAGAACCAGCAGCACC		
Cump 004	F	CACGAGGCTCACTAGGGTTT	113	Yadav et al. (2007)
	R	ACCCGGGTCTGGTTAGACTT		
Cump 005	F	GCACGAGGGCCAGATTCTAGAA	164	Yadav et al. (2007)
	R	CACGGTGATGACACGACATGGT		
Cump 006	F	GAAATCGGCAGAGGGCAT	100	Yadav et al. (2007)
	R	CAATGAGTATGTGCACGCTGCA		
Cump 007	F	GAGGGATTCCAGGCGGTTT	201	Yadav et al. (2007)
	R	GCGAGGAGCACATTCGATGAA		
Cump 008	F	GTTGACTACCACTATTATGCTCC	175	Yadav et al. (2007)

	R	GACCAAGAACTTCATACAATTCAG		
Cump 009	F	ATCTGATCGTGAGGCCTCAAC	225	Yadav et al. (2007)
	R	GCCGACCAAGAACTTCATACAAT		
Cump 010	F	GCTGAACTATTCTGTAAACTTAAAC	173	Yadav et al. (2007)
	R	TATCGAAACGGTACTAAAATCATG		
Cump 011	F	TGATGGGAACCGAGAGCATGA	196	Yadav et al. (2007)
	R	TAGCACAGCAATAACATGGCATC		
Cump 012	F	TGTGATCTGTGGTCTCAGGC	165	Yadav et al. (2007)
	R	CGTGAAAGCTCTCCAGGACT		
Cump 013	F	ACCGACAGCAACAAATCCTCC	194	Yadav et al. (2007)
	R	GCTCTTGTGTGTAGTTGTGCTT		
Cump 014	F	CTGACCTCTCCTCTCCTTCG	185	Yadav et al. (2007)
	R	GAGCAGATCCTTGGCCTTCTTG		
Cump 015	F	GAAGCATAGGAGAGGAGGG	158	Yadav et al. (2007)
	R	CTTGCTGCTCGGACTTCTCT		
Cump 016	F	CATTCTCTCGCCAGTGCTC	250	Yadav et al. (2007)
	R	ATCTCCAGAACCGAGCGCA		
Cump 017	F	ATAGCTGGGTGTTGTCTGGC	124	Yadav et al. (2007)
	R	CCCTGGCGCTTAATTGTAAG		
Cump 018	F	TGCTTTCTTCCCAACCAGTGG	264	Yadav et al. (2007)
	R	TGCTGAGTGGGGTGCTGCT		
Cump 019	F	GGCCTAACTCTCTGTTCTTCTTC	212	Yadav et al. (2007)
	R	GAGAAGCTAACATTTGGGGCCTA		
PSMP2008	F	GATCATGTTGTCATGAATCACC	238	Qi et al. (2004)
	R	ACACTACACCTACATACGCTCC		
PSMP2013	F	GTAACCCACTAACCCCTTACC	153	Qi et al. (2004)
	R	GTCGCACAGAAAAAGAATAG		

PSMP2019	F	TGTGCCACAGCTTGTTTCCTC	248	Qi et al. (2004)
	R	CAAGCAGCCAGTTCCTCATC		
PSMP2027	F	AGCAATCCGATAACAAGGAC	273	Qi et al. (2004)
	R	AGCTTTGGAAAAGGTGATCC		
PSMP2040	F	CATTACACGTTTCTTCAAACGC	163	Qi et al. (2004)
	R	TCTTCGGCCTAATAGCTCTAAC		
PSMP2043	F	TCATATTCTCCTGTCTAAAACGTC	192	Qi et al. (2004)
	R	ACAAATCGTACAAGTTCCACTC		
PSMP2045	F	TCATCTTCCCCTATCCGAAAC	203	Qi et al. (2004)
	R	ACTTGCCAATGCTATCTTCAC		
PSMP2048	F	TGAATTGGGAATAAAGGAGACC	252	Qi et al. (2004)
	R	ACGTGTGCCTGCTTTTAGTAAC		
PSMP2050	F	ATCAAACGGCATCAGACAAC	102	Qi et al. (2004)
	R	GGATCTCTTAGTGTGGTGGAGAGC		
PSMP2056	F	ACCTGTAGCTTCAAAATTCAAAA	213	Qi et al. (2004)
	R	AATTCAGTGTGATTTTCGATGTTGC		
PSMP2059	F	GGGGAGATGAGAAAACACAATCAC	119	Qi et al. (2004)
	R	TCGAGAGAGGAACCTGATCCTAA		
PSMP2060	F	AGTTATAATGTATGTGCGACACG	220	Qi et al. (2004)
	R	TACCACAATTTCAATATACATGGC		
PSMP2063	F	GAGCACATGAAATAGGAAGCAG	166	Qi et al. (2004)
	R	AAGGTAGTTATAGTTAGCTTGATC		
PSMP2064	F	ACCGAATTAAGTCATGGATCG	190	Qi et al. (2004)
	R	TTGATTCTTCTGACACAAATGAG		
PSMP2066	F	ATATTAGAGCATTGCATCGC	267	Qi et al. (2004)
	R	GCATAGCAGCATAACAGCAGCAACTAA		
PSMP2068	F	CAATAACCAAACAAGCAGGCAG	105	Qi et al. (2004)

	R	CTTCACTCCCACCCTTTCTAATTC		
PSMP2069	F	CCCATCTGAAATCTGGCTGAGAA	225	Qi et al. (2004)
	R	CCGTGTTTCGTACAAGGTTTTGC		
PSMP2070	F	ACAGAAAAAGAGAGGCACAGGAGA	226	Qi et al. (2004)
	R	GCCACTCGATGGAAATGTGAAA		
PSMP2072	F	GAAATCTACACAAGGGTCTCCA	165	Qi et al. (2004)
	R	GTACGGCAGAATGACATCTGAA		
PSMP2074	F	AGGACTGTAGGAGTGTGGACAACACAA	227	Qi et al. (2004)
	R	CCAGACCTACCAGTGAATGAGA		
PSMP2076	F	GGAATAGTATATTGGCAAAATGTG	161	Qi et al. (2004)
	R	ATACTACACACTGTAAGCATTGTC		
PSMP2077	F	GCCAATATTATTCCCAAGTGAACA	180	Qi et al. (2004)
	R	CTCTTGGTTGCATATCTTTCTTTT		
PSMP2078	F	CATGCCCATGACAGTATCTTAAT	172	Qi et al. (2004)
	R	ACTGTTCGGTTCCAAAATACTT		
PSMP2079	F	AGCCGAAGGCTAATCAACAA	165	Qi et al. (2004)
	R	GTGGTCAGCAGCAGATGTAA		
PSMP2080	F	CAGAATCCCCACATCTGCAT	181	Qi et al. (2004)
	R	TGCAACTGAGCGAAGATCAA		
PSMP2081	F	CTGTGCTGTCATTGTTACCA	167	Qi et al. (2004)
	R	TCAGATCACCTATTACTTTCCCT		
PSMP2084	F	AATCTAGTGATCTAGTGTGCTTCC	245	Qi et al. (2004)
	R	GGTTAGTTTGTGTTGAGGCAAATGC		
PSMP2085	F	GCACATCATCTCTATAGTATGCAG	176	Qi et al. (2004)
	R	GCATCCGTCATCAGGAAATAA		
PSMP2086	F	CGCTTGTTTTCTTTCTTGCTGTT	122	Qi et al. (2004)
	R	CCTTCTCAGATCCTGTGCTTTCTT		

PSMP2087	F	GGAACAGACTCCATACCTGAAA	126	Qi et al. (2004)
	R	TACCTGCCTGTGCTGTTAGT		
PSMP2088	F	AAGAAGCCACCAGCACAAAA	149	Qi et al. (2004)
	R	TGCATGAAAGTAGAGGATGGTAAA		
PSMP2089	F	TTCGCCGCTGCTACATACTT	127	Qi et al. (2004)
	R	TGTGCATGTTGCTGGTCATT		
PSMP2090	F	AGCAGCCCAGTAATACCTCAGCTC	178	Qi et al. (2004)
	R	AGCCCTAGCGCACAAACAAACTC		
PSMP2201	F	CCCGACGTTATGCGTTAAGTT	364	Qi et al. (2001)
	R	TCCATCCATCCATTAATCCACA		
PSMP2203	F	GAACTTGATGAGTGCCACTAGC	357	Qi et al. (2001)
	R	TTGTGTAGGGAGCAACCTTGAT		
PSMP2206	F	AGAAGAAGAGGGGGTAAGAAGGAG	203	Qi et al. (2001)
	R	AGCAACATCCGTAGAGGTAGAAG		
PSMP2208	F	GAAAGAGCAAACCTGAACAATCCC	253	Qi et al. (2001)
	R	ACTTTGCCCTGGATGATCCTC		
PSMP2209	F	TTGGACGATTTGGAAGCATAG	334	Qi et al. (2001)
	R	GAGGAAAAGAGCCATACAGAGAC		
PSMP2210	F	CAATGATGACCGTAATCTGGGTG	313	Qi et al. (2001)
	R	GGGCAAGATATGTGAAATCAAG		
PSMP2214	F	CGCACAGTACGTGTGAGTGAAG	246	Qi et al. (2001)
	R	GATTGAGCAGCAAAAACCAGC		
PSMP2218	F	CTCTGTAAGTTCCTGGTGCTCAA	250	Qi et al. (2001)
	R	TCAGGCCAGTAACACATCTCAA		
PSMP2220	F	GCATCCTTCACCATTCAAGACA	128	Qi et al. (2001)
	R	TGGGAAACAGAATGGAGAAAAGAG		
PSMP2221	F	TTGCCGTCAGCAATGTGCCT	203	Qi et al. (2001)

	R	CCGAAGTGCCCAAGTGCCCAA		
PSMP2224	F	GGCGAAATTGGAATTCAGATTG	155	Qi et al. (2001)
	R	CGTAATCGTAGCGTCTCGTCTAA		
PSMP2225	F	CCGTAATCGTAGCGTCTCGTCTAA	238	Qi et al. (2001)
	R	TGGGAGGTAAGCTCAGTAGTGT		
PSMP2229	F	CCACTACCTTCGTCTTCCTCCATTC	241	Allouis et al. (2001)
	R	GTCCGTTCCGTTAGTTGTTGCC		
PSMP2231	F	TTGCCTGAAGACGTGCAATCGTCC	229	Allouis et al. (2001)
	R	CTTAATGCGTCTAGAGAGTTAAGTTG		
PSMP2232	F	TGTTGTTGGGAGAGGGTATGAG	233	Allouis et al. (2001)
	R	CTCTCGCCATTCTTCAAGTTCA		
PSMP2233	F	TGTTTTCTCCTCTTAGGCTTCGTTT	258	Allouis et al. (2001)
	R	ACCTTCTCCGCCACTAAACAAC		
PSMP2237	F	TGGCCTTGGCCTTTCCACGCTT	233	Allouis et al. (2001)
	R	CAATCAGTCCGTAGTCCACACCCCA		
PSMP2247	F	CCAAACCGTAACCTGAAAAGCTACTG	203	Allouis et al. (2001)
	R	GTGTCGGTTTGCTTCGTTCCCTT		
PSMP2253	F	CAGGTGATCTGTCTGGTTTCCTAATC	159	Allouis et al. (2001)
	R	TAGCCACTGGAGTGCTACTGAA		
PSMP2255	F	CATCTAAACACAACCAATCTTGAAC	264	Allouis et al. (2001)
	R	TGGCACTCTTAAATTGACGCAT		
PSMP2261	F	AATGAAAATCCATCCCATTTTCGCC	193	Allouis et al. (2001)
	R	CGAGGACGAGGAGGGCGATT		
PSMP2263	F	AAAGTGAATACGATACAGGAGCTGAG	238	Allouis et al. (2001)
	R	CATTTAGCCGTTAAGTGAGACAA		
PSMP2266	F	CAAGGATGGCTGAAGGGCTATG	181	Allouis et al. (2001)
	R	TTCCAGCCCACACCAGTAATC		

PSMP2267	F	GGAAGGCGTAGGGATCAATCTCAC	241	Allouis et al. (2001)
	R	ATCCACCCGACGAAGGAAACGA		
PSMP2270	F	AACCAGAGAAGTACATGGCCCG	153	Allouis et al. (2001)
	R	CGACGAACAAATTAAGGCTCTC		
PSMP2271	F	CCTTATATTGGACCGACTGCTGAC	184	Allouis et al. (2001)
	R	CTCCCCATACACGAGCGAGAA		
PSMP2273	F	AACCCCACCAGTAAGTTGTGCTGC	169	Allouis et al. (2001)
	R	GATGACGACAAGACCTTCTCTCC		
PSMP2274	F	CACCTAGACTCTACACAATGCAAC	265	Allouis et al. (2001)
	R	AATATCAAGTGATCCACCTCCCAA		

Legenda: F - Forward; R - Reverse.