

Determinação da pureza varietal de sementes de soja com o auxílio de marcadores moleculares microssatélites

Ivan Schuster⁽¹⁾, Vagner Tebaldi de Queiroz⁽²⁾, Arlindo Inês Teixeira⁽²⁾,
Everaldo Gonçalves de Barros⁽²⁾ e Maurílio Alves Moreira⁽²⁾

⁽¹⁾Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola, Caixa Postal 301, CEP 85818-660 Cascavel, PR. E-mail: ivan@coodetec.com.br ⁽²⁾Universidade Federal de Viçosa, Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, CEP 36571-000 Viçosa, MG. E-mail: vqueiroz@alunos.ufv.br, aiteixeira@bol.com.br, ebarros@ufv.br, moreira@ufv.br

Resumo – Fatores ambientais contribuem para a produção de sementes de soja com características diferentes do padrão da variedade e a análise visual para determinação de pureza varietal não é suficiente. Marcadores moleculares de DNA podem auxiliar na identificação da pureza genética de sementes, durante o processo de certificação de sementes, uma vez que não sofrem influências ambientais. O objetivo deste trabalho foi avaliar um método de análise da pureza genética de sementes de soja, utilizando marcadores microssatélites. Amostras de DNA de sementes de soja, consideradas atípicas pelo método visual, foram analisadas com microssatélites e comparadas ao padrão da variedade. As amostras de DNA foram analisadas em bulk, o que permitiu diminuir os custos, com a mesma precisão da análise individual. De onze lotes de sementes avaliados como impuros na análise visual, e portanto, eliminados do processo de certificação, apenas quatro apresentaram número de sementes de outras cultivares acima do limite tolerado.

Termos para indexação: *Glycine max*, cultivar, marcador genético, método de melhoramento.

Determination of genetic purity of soybean seeds with the aid of microsatellite molecular markers

Abstract – Environmental factors contribute for production of soybean seeds with different characteristics from the standard pattern of a determined variety. DNA markers can contribute for the identification of genetic seed purity, once these type of markers are not influenced by the environment. The objective of this work was to evaluate a method for analysis of soybean seed genetic purity by using microsatellites markers. DNA samples from soybean seeds considered atypical by the visual method were analyzed by microsatellites and compared with the typical variety pattern. DNA samples were analyzed in bulks, reducing costs but keeping the same precision as the one obtained in the individual analysis. From eleven seed lots classified as contaminated by the visual method, and therefore eliminated through certification, only four were shown to present a number of contaminating seeds above the accepted limit through DNA analysis.

Index terms: *Glycine max*, cultivars, genetic markers, breeding methods.

Introdução

Para que todos os esforços realizados na obtenção de uma variedade melhorada sejam traduzidos em benefícios para a produção agrícola, é necessário que as sementes utilizadas pelos produtores tenham alta qualidade e, portanto, a certificação de sementes é fundamental como agente controlador.

Entre os aspectos observados durante a certificação de sementes de soja, talvez o de mais difícil determinação seja a pureza varietal, realizada com o auxílio de descritores morfológicos associados à semente, tais como tamanho médio, formato, coloração e aspecto do

tegumento, cor e formato do hilo, e que podem sofrer influência ambiental (Moreira et al., 1999).

De acordo com Moreira et al. (1999), algumas variedades de soja apresentam variação na cor do hilo causada pelo ambiente em que são produzidas, sem que haja variação genética entre as sementes. Esses autores observaram variações na cor do hilo em duas variedades de soja, em regiões com veranicos e altas temperaturas, durante a formação das sementes.

O controle genético da cor do hilo em soja está bem estabelecido e é relativamente simples, embora envolva interações alélicas com outros genes que governam as cores de pubescência e da flor (Sediyama et al., 1981;

Destro et al., 1990). O desenvolvimento de pigmentação em algumas cultivares com hilo amarelo foi descrito por Takahashi & Asanuma (1996) e Morrison et al. (1998). Estes autores relatam que temperaturas abaixo de 15°C na fase de maturação das sementes levam à produção de uma coloração marrom ao redor do hilo em cultivares com pubescência marrom e hilo amarelo.

O fato de a mesma variedade apresentar, em algumas circunstâncias, tonalidades diferentes da cor do hilo, pode levar ao descarte de lotes de sementes de elevado padrão, pela impossibilidade de comprovação da identidade genética de sementes atípicas (Moreira et al., 1999).

A avaliação da pureza genética de sementes com base em marcadores moleculares de DNA é conclusiva, uma vez que os mesmos não sofrem influência ambiental e os dados obtidos são reprodutíveis e estáveis. Marcadores moleculares microssatélites são indicados para este tipo de análise, por serem altamente polimórficos em soja, altamente reprodutíveis, codominantes e por apresentarem baixo custo, considerando que cerca de 650 pares de primers específicos para a soja estão disponíveis no mercado (Cregan et al., 1999).

O objetivo deste trabalho foi avaliar marcadores moleculares microssatélite na determinação da pureza genética de sementes de soja.

Material e Métodos

Sementes

Foram utilizadas sementes consideradas atípicas na avaliação visual de pureza genética, além de uma amostra padrão da variedade da qual foram retiradas as sementes atípicas (amostra de arquivo). As sementes utilizadas, enviadas por produtores de sementes, haviam sido reprovadas na análise para a certificação de sementes. Durante a otimização do método, foram avaliados 21 lotes das variedades/linhagens Conquista, Paiaguás, CD 207, CD 211, CD95-3006, OC95-3312, OC95-3194 e CS 301.

Extração de DNA

A extração de DNA das sementes de soja foi realizada de acordo com o protocolo descrito por McDonald et al. (1994), com algumas modificações. De cada semente, foram cortadas fatias de 20 e 30 mg do cotilédone. Estes fragmentos foram colocados em tubos de microcentrífuga com capacidade para 1,5 mL, e em seguida, foram adicionados 300 μ L de tampão de extração (Tris-HCl 200 mM, pH 7,5, NaCl 288 mM, EDTA 25 mM e SDS 0,5%). Os fragmentos foram macerados com pistilo, e em seguida foram acrescenta-

dos mais 700 μ L do tampão de extração e a mistura foi homogeneizada por 1 min em um agitador do tipo vortex. Os tubos foram centrifugados por 4 min a 10.144 g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e centrifugado novamente por 4 min à mesma velocidade.

O novo sobrenadante foi transferido, em igual volume, para dois novos tubos. As proteínas foram removidas pela adição de 10 μ L de proteinase K (10 mg/mL) e 10 μ L de CaCl₂ 1 mM em cada tubo. Os tubos foram colocados em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Após resfriar à temperatura ambiente, foram adicionados 900 μ L de isopropanol a cada tubo para precipitar o DNA. Após 2 min à temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados por 7 min a 10.144 g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi secado por 15 min à temperatura ambiente. Para a eliminação de RNA, o precipitado foi ressuscitado em 300 μ L de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 e EDTA 1 mM), contendo 40 μ L/mL de RNase A (10 mg/mL). Os tubos foram novamente colocados em banho-maria a 37°C por 30 min e, em seguida, a precipitação com isopropanol foi repetida. O sobrenadante foi descartado, o precipitado foi seco e o DNA foi ressuscitado em 300 μ L de TE. Foram testados protocolos alternativos sem tratamento com proteinase K e sem RNase para verificar o efeito dessas modificações na qualidade da amostra de DNA obtida.

Os testes de qualidade e a quantificação do DNA foram feitos em gel de agarose 0,8%, contendo 0,2 μ g/mL de brometo de etídio. Foram aplicados 7 μ L de cada amostra de DNA, com 3 μ L de corante tipo IV (azul de bromofenol 0,25% e sacarose 40%). O DNA foi quantificado no gel por comparação com padrões de DNA de concentrações conhecidas. Após a quantificação, o DNA foi diluído em TE para uma concentração de 10 ng/ μ L. A qualidade do DNA obtido pelo protocolo completo de purificação e pelos protocolos alternativos (sem RNase e sem proteinase K), foi avaliada também pela qualidade da amplificação por PCR, utilizando primers de microssatélites.

Construção dos bulks de DNA

Para a extração de DNA, foram utilizadas todas as sementes consideradas atípicas na avaliação visual, e pelo menos 15 sementes da amostra padrão. O número de sementes atípicas variou para cada lote avaliado, ficando entre 5 e 25 sementes. Para diminuir os custos das análises, as amostras de DNA foram divididas em bulks. Pelo fato de os marcadores microssatélites serem codominantes, mesmo utilizando um bulk de DNA,

é possível identificar se existe variação entre as sementes que compõem este bulk. Bulks em que não há variação apresentam uma única banda de DNA em um dado loco, ao passo que naqueles em que há variação, são produzidas tantas bandas quanto o número de alelos que os seus genótipos constituintes possuem. Como a soja é uma espécie autógama, todas as variedades são homocigotas e geneticamente puras. Por este motivo, espera-se a amplificação de um único alelo em cada loco, para todas as plantas de uma mesma variedade. Os bulks foram formados pela mistura de igual quantidade do DNA de 5 a 8 sementes. Assim, da amostra padrão da variedade, foram formados de dois a três bulks e das sementes atípicas, de um a cinco bulks, dependendo do número de sementes atípicas de cada lote.

Amplificação dos microssatélites

As reações de amplificação de microssatélites foram feitas em um volume total de 10 ou 25 σ L, contendo Tris-HCl 12,5 mM (pH 8,3), KCl 62,5 mM, MgCl₂ 2,5 mM, 125 σ M de cada um dos deoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,2 σ M de cada primer (senso e anti-senso), uma unidade da enzima Taq DNA polimerase e 30 ng de DNA. O volume total da reação

foi de 25 σ L quando a separação foi feita em gel de agarose 3% e de 10 μ L quando a separação foi feita em gel de poliacrilamida 10% (Machado et al., 2003). As amplificações foram realizadas em termociclador Perkin Elmer 9600, programado para uma etapa inicial de 7 min a 72°C, seguida de 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 50°C e 2 min a 72°C. Por fim, uma etapa de 7 min a 72°C. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 3%, contendo brometo de etídio (0,2 μ g/mL) e tampão TBE 1X (Tris-Borato 90 mM, EDTA 2 mM), ou em gel de poliacrilamida 10% em tampão TBE. Neste caso, os géis foram corados após a corrida, em TBE contendo brometo de etídio (2 μ g/mL). Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta. Como o objetivo das análises era identificar a existência de diferenças genéticas entre as sementes, e não a caracterização das variedades, não houve necessidade de estimar o tamanho dos alelos amplificados em cada variedade, e por este motivo, não foram usados marcadores de peso molecular.

Os primers utilizados (Tabela 1) são bem distribuídos no mapa genético da soja (Cregan et al., 1999). Para demonstrar que os primers são polimórficos, foram utilizados também na análise, dois bulks formados pela mis-

Tabela 1. Relação dos primers utilizados com mais frequência na determinação de pureza genética de lotes de sementes de soja.

Primers	Grupo de ligação ⁽¹⁾	Seqüência 5'-3' senso	Seqüência 5'-3' anti-senso
Sat_128	B1	GGGGTTTTGTTAATCATTGTCCTTAGAT	GGGAGAAAATTTTTAATGCCAGTAGTTA
Satt070	B2	TAAAAATTTAAATACTAGAAAGACAAC	TGGCATTAGAAAATGATATG
Sat_085	C1	GGTTTTAGATCCTTAAATTTGT	GGGGAAGCAAGTAGCT
Satt079	C2	AGTCGAAGATACACAATTAGAT	CTTTTAGACACAAAATTTATCACT
Sat_110	D1a+Q	AACATTTTTTCATCGCTTTTCTTAG	TCTTCTCAGGAAGTGAATTACTCA
Satt184	D1a+Q	GCGCTATGTAGATTATCCAAATTACGC	GCCACTTACTGTTACTCAT
Satt005	D1b+W	TATCCTAGAGAAGAACTAAAAAA	GTCGATTAGGCTTGAAATA
Satt141	D1b+W	CGGTGGTGGTGTGCATAATAA	CCGTCATAAAAAGTCCCTCAGAAT
Satt186	D2	GGGAAGTTATAAGCAGAT	GGGAATCCATTCTGATGAGT
Satt146	F	AAGGGATCCCTCAACTGACTG	GTGGTGGTGGTGA AAAACTATTAGAA
Sat_064	G	CCACAATTCCCAAAATAC	ATAAAAATGGCTGAATAATAGAC
Sat_094	G	CTTGAATAGGATGTATAAATTATTGTAG	AAAAATTTTAATATTGTGGAAGTCT
Satt163	G	AATAGCACGAGAAAAGGAGAGA	GTGTATGTGAAGGGGAAAAACTA
Satt181	H	TGGCTAGCAGATTGACA	GGAGCATAGCTGTTAGGA
Sat_105	I	TTCCATACAAGATATCAAGTGAATTG	GCTCCCCTACATTGGTAGTAAA
Satt162	I	GGGAAGAAGTATATGCTACATCAA	GGGTTAATTTTTATCTTCTAATAGTTT
Satt183	J	TAGGTCCCAGAATTTTATTG	CACCAACCAGCACAAAA
Satt167	K	GATTTACGGTACTTGGATTCAATA	AGCTACCCAATATGATACTCTACACAGT
Sat_099	L	GCGAAAATGGCAGAGATAA	AATGCTAAAAGAGGAATGAAATAA
Satt156	L	CGCACCCCTCATCCTATGTA	CCAATAATCCCAGGGACTTACTT
Satt150	M	AAGCTTGAGTTATTCGAAAATGAC	TGCCATCAGGTTGTGTAAGTGT
Satt175	M	GACCTCGCTCTCTGTTTCTCAT	GGTGACCACCCCTATTCTTAT
Sat_127	Não mapeado	GGGGTTTTGTGTCTAGTCTA	GGGATTA AAAAATAACAATACT
Satt136	Não mapeado	CCCCATATATTCAACATATCTTCA	AACTAAGCCAAATCTTTTCTACTA

⁽¹⁾Cregan et al. (1999).

tura de igual quantidade de DNA de variedades de soja conhecidamente divergentes entre si. Cada bulk foi formado pela mistura de DNA de quatro variedades. Apenas locos que apresentaram polimorfismo entre estas variedades foram considerados na análise.

Análise e interpretação dos dados

Quando ocorreu diferença entre as sementes atípicas e as sementes da amostra padrão em pelo menos um loco, as sementes atípicas foram consideradas como mistura varietal. Para que um lote de sementes seja reprovado na certificação, o número de sementes contaminantes de outras variedades deve ser maior do que o limite mínimo tolerado, que é de 5 sementes em 0,5 kg (4.000–5.000 sementes). Desta forma, pode-se adotar o limite de uma diferença (diferença em um loco), pois eventos mutacionais raramente ocorrerão em mais do que uma semente desta amostra, e assim, o limite mínimo tolerado não será atingido em razão desse tipo de evento.

Na falta de informações a respeito da frequência dos alelos na população, foram testados 15 locos de microssatélites para cada lote de sementes.

Resultados e Discussão

Nas amostras em que foi utilizada a proteinase K e a RNase A, a quantidade de DNA obtido foi maior e de melhor qualidade, em relação às amostras em que a proteinase K não foi utilizada (Figura 1). Além da quantidade menor de DNA obtida nas amostras sem o tratamento com proteinase K e RNase A, a sua qualidade também foi inferior (Figura 2). As amostras 1 e 2, que foram extraídas sem a utilização de proteinase K e RNase A, apresentaram qualidade de amplificação inferior às demais, sem amplificação da amostra 1 nos dois locos, e a amostra 2 apresentou menor intensidade de amplificação. Nas amostras em que foi utilizada apenas uma das enzimas (proteinase K ou RNase A), as amplificações apresentaram qualidades semelhantes às amostras em que foram utilizadas as duas enzimas.

O número de sementes constituintes dos bulks foi definido experimentalmente. O resultado da amplificação de um loco de microssatélite em uma mistura de amostras de DNA contendo dois alelos diferentes, nas proporções de 1:1 até 1:15, mostra que até a proporção de 1:7 é possível identificar, sem dificuldades, os dois alelos presentes no bulk (Figura 3). Esta proporção corresponde a um bulk de oito sementes, sendo que uma

delas apresenta um alelo, e as outras sete apresentam o outro alelo. Por segurança, nas análises de rotina foram utilizados bulks contendo DNA de 5 a 8 sementes.

Os bulks de DNA das sementes da amostra padrão foram usados para verificar se a variedade da qual foram retiradas as sementes atípicas, em cada teste, é geneticamente uniforme (linha pura). O número de sementes a ser analisado depende do grau de precisão que se pretende na análise, uma vez que a probabilidade

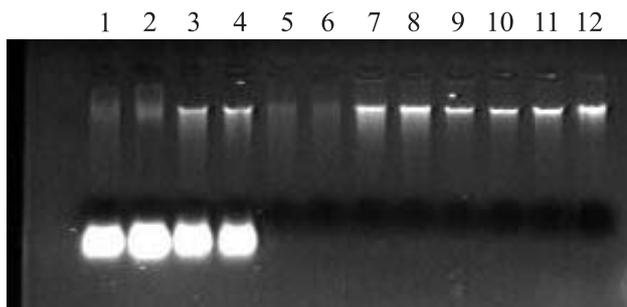


Figura 1. Análise eletroforética, em gel de agarose, de amostras de DNA de sementes de soja extraídas com e sem a utilização das enzimas proteinase K e RNase A. Canaletas 1 e 2 – sem proteinase K e sem RNase A; Canaletas 3 e 4 – com proteinase K e sem RNase A; Canaletas 5 e 6 – sem proteinase K e com RNase A; Canaletas 7 e 8 – com proteinase K e com RNase A; Canaletas 9 a 12 – padrões de concentração (350, 525, 700 e 1.050 ng, respectivamente) contendo DNA de soja, quantificado espectrofotometricamente.

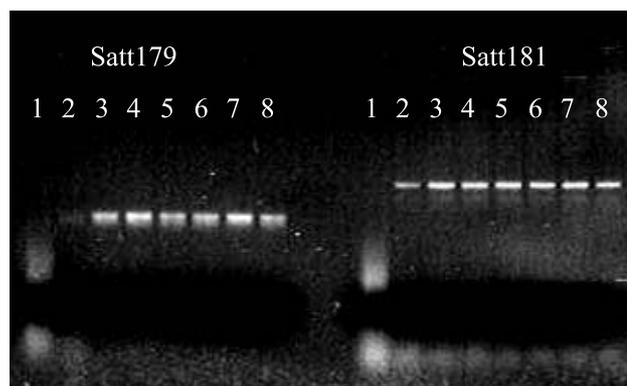


Figura 2. Análise eletroforética, em gel de agarose 3%, de produtos de amplificação de amostras de DNA de sementes de soja extraídas com e sem a utilização das enzimas proteinase K e RNase A. Os primers microssatélites utilizados estão identificados na parte superior. As amostras aplicadas nas canaletas de 1 a 8 são os respectivos produtos de amplificação das amostras descritas na Figura 1.

de não se observar um alelo que está presente na população (probabilidade de falso negativo) é dada pela expressão $P = (1-f)^n$, em que: P é a probabilidade de falso negativo; f é a frequência do alelo na população e n é o número de indivíduos amostrados na população. Por esta expressão, analisando-se 15 sementes, será detectado com 99% de probabilidade um alelo com frequência igual ou superior a 26% na população, e com 95% de probabilidade um alelo com frequência igual ou superior a 18%.

A análise molecular das sementes atípicas demonstrou que, em 13 dos 21 lotes, o número de sementes geneticamente diferentes da variedade original ultrapassou o limite tolerado. Nestes lotes, todas as sementes atípicas diferiram geneticamente das sementes da amostra padrão. Entre os lotes em que o número de sementes de outras cultivares não atingiu o limite tolerado, três apresentaram as sementes atípicas iguais às sementes da amostra padrão pela análise com microssatélites. Nos demais, havia uma mistura de sementes da cultivar original e de outras cultivares entre as sementes atípicas.

A Figura 4 apresenta o resultado da avaliação de três lotes de sementes da variedade CD 209 para o loco Satt141. Na Figura 4a está o resultado da análise utilizando os bulks, e as amostras de 1 a 14 contêm DNA de 5 sementes em cada canaleta. As três primeiras canaletas contêm ao todo, DNA de 15 sementes da amostra padrão. As canaletas 4 a 9 contêm DNA de 30 sementes atípicas do primeiro lote. As canaletas 10

a 12 contêm DNA de 15 sementes atípicas do segundo lote e as canaletas 13 e 14 contêm DNA de 10 sementes atípicas do terceiro lote. As canaletas 15 a 22 contêm amostras de DNA de oito diferentes variedades de soja (CD 201, CD 202, CD 203, CD 205, CD 206, CD 207, Segurança, Engopa 302) que foram utilizadas como controle de polimorfismo do loco. Caso não haja polimorfismo entre estes controles, também não é esperado polimorfismo entre as amostras em teste, não sendo possível concluir sobre pureza varietal, com base nestes locos. Na canaleta 23 foi utilizada uma mistura de DNA das amostras 15 a 18, e na canaleta 24, uma mistura de DNA das amostras 19 a 22, para demonstrar que, quando existem materiais diferentes no bulk, mais de um fragmento é amplificado.

Os resultados indicam que as sementes atípicas do primeiro lote (canaletas 4 a 9) são todas iguais entre si, e também iguais à amostra padrão. Não existe mistura varietal neste lote com base neste loco. Já para o segundo e terceiro lotes, está demonstrado pelos bulks (canaletas 10 a 14) que existe variação dentro de cada lote. Isto é confirmado na Figura 4b, em que estão amplificadas individualmente as amostras que compõem os bulks. Na canaleta 11 há evidência da presença de três alelos, o que foi confirmado pela amplificação. Entre as 15 sementes analisadas do segundo lote (amostras 10, 11 e 12), oito são diferentes da amostra padrão neste loco, sendo duas heterozigotas. Entre as 10 sementes analisadas do terceiro lote, três são diferentes da amostra padrão neste loco, também com duas heterozigotas.

A Figura 4 mostra também a utilidade do uso de bulks de DNA para a análise. Na Figura 4a estão apresentados os resultados de 70 sementes em 14 canaletas (1 a 14). Como alguns lotes apresentaram impureza genética, demonstrada pela amplificação de mais de um fragmento nos bulks de DNA, a análise deste loco teve que ser complementada pela Figura 4b. Então no total, foram necessários 40 pontos de análise neste loco (cada canaleta representa um ponto de análise). Caso a análise não utilizasse os bulks de DNA, seriam necessários 96 pontos. Isto representa uma vantagem, pois o custo desta análise é diretamente proporcional ao número de pontos de análise. Nos locos em que não há diferença entre os indivíduos que compõem o bulk, não há necessidade da análise complementar. Neste caso, a redução no custo é ainda maior (são apenas 14 pontos de análise em vez de 70). Estima-se que, em média, a utilização de

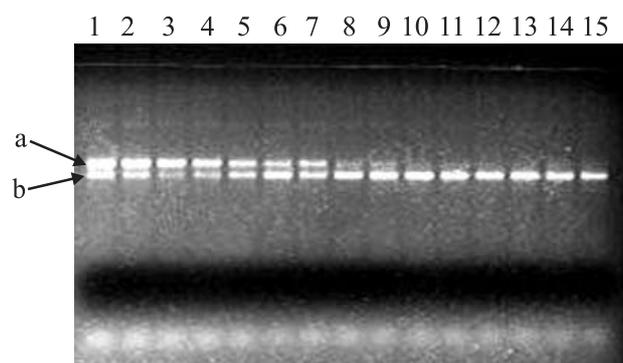


Figura 3. Análise eletroforética, em gel de agarose 3%, de produtos de amplificação de uma mistura em diferentes proporções, de amostras de DNA de soja contendo dois alelos distintos (a e b) para o loco Satt181. As canaletas 1 a 15 apresentam o resultado da amplificação das misturas na proporção 1:1 (a:b, canaleta 1), 1:2 (a:b, canaleta 2) e assim sucessivamente até 1:15 (a:b, canaleta 15). Para cada amplificação foram utilizados 30 ng de DNA molde.

bulks de DNA pode reduzir os custos das análises em cerca de 70%. Mesmo adotando a utilização de bulks, a análise molecular deve ser realizada apenas nas sementes identificadas como atípicas na análise visual, uma vez que é inviável analisar todas as sementes da amostra.

O número de locos a ser testado depende do grau de pureza das amostras. Para os casos em que são encontradas diferenças, as análises terminam quando as diferenças são detectadas. Nos casos em que não são encontradas diferenças, para excluir a possibilidade de mistura, o número de locos a ser testado dependerá da frequência, na população, dos alelos observados em cada loco. Como a soja é uma espécie de autofecundação, e infere-se que todas as plantas de uma variedade sejam homocigotas, a frequência (P_{ii}) do genótipo A_iA_i é igual a frequência (P_i) do alelo A_i . Para uma variedade A, a probabilidade devida ao acaso de que uma semente qual-

quer tomada da população de variedades de soja tenha o mesmo genótipo de A em n locos é igual a $\prod_{i=1}^n P_{ii}$ e a

probabilidade de que esta semente pertença à variedade A (probabilidade de exclusão da hipótese de mistura)

é igual a $14 \prod_{i=1}^n P_{ii}$.

Por exemplo, caso todos os alelos idênticos na comparação tenham frequência de 50% na população, o poder de exclusão de 99,99% é conseguido pela análise de 14 locos. Para alelos com frequência de 30%, a mesma probabilidade é conseguida pela análise de 8 locos. Por sua vez, em alelos com frequência média de 70%, a mesma probabilidade de exclusão é conseguida pela análise de 26 locos. Estes valores se modificam quando a mistura é de genótipos altamente aparentados. Neste caso, um número maior de locos deve ser

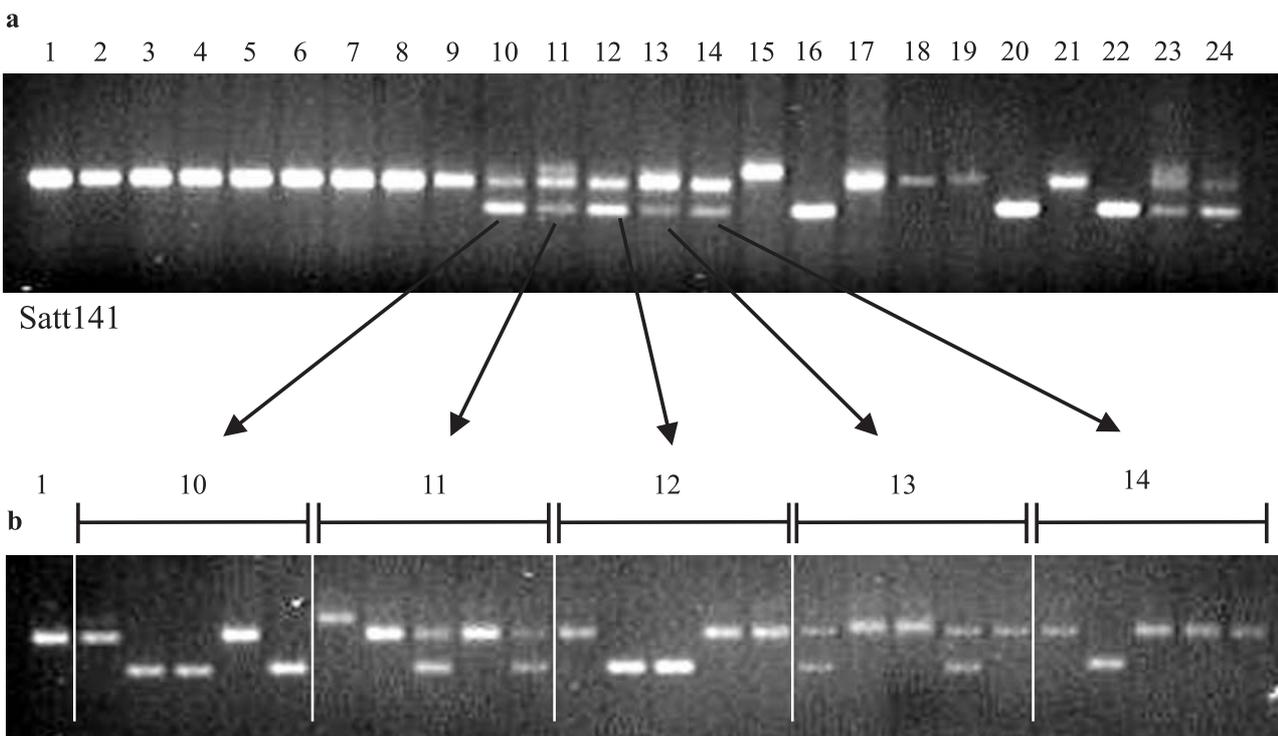


Figura 4. Análise de pureza varietal em sementes de soja, variedade CD 209, utilizando amplificação de DNA de sementes em bulks e de sementes individuais. **a)** Análise eletroforética da amplificação em bulk (canaletas de 1 a 14, 23 e 24) e individual (canaletas 15 a 22). Canaletas 1 a 3: amostra padrão; 4 a 9: lote nº 1; 10 a 12: lote nº 2; 13 e 14: lote nº 3; 23: mistura das amostras 15 a 18; 24: mistura das amostras 19 a 22. As canaletas 15 a 22 contêm DNA de 8 variedades de soja diferentes que foram utilizadas como controle de polimorfismo (Conquista, Paiaguás, CD 207, CD 211, CD95-3006, OC95-3312, OC95-3194 e CS 301, respectivamente); **b)** Amplificação do DNA de cada uma das sementes constituintes dos bulks que apresentaram variação. A canaleta 1 contém DNA de 5 sementes da amostra padrão. As canaletas seguintes contêm DNA de sementes individuais utilizadas na construção dos bulks analisados.

avaliado. Na prática, são analisados locos com diferentes frequências, e a probabilidade de exclusão deve ser calculada em cada caso. Para calcular essa probabilidade, é necessário conhecer a frequência dos alelos na população.

Conclusões

1. A análise de DNA extraído de sementes, consideradas atípicas pelo método de análise visual, com marcadores moleculares microssatélites é eficiente na determinação da pureza genética de lotes de sementes de soja.

2. A utilização de proteinase K e RNAse no processo de extração permite a obtenção de maior quantidade e melhor qualidade de DNA para as análises.

3. O método de análise em bulk de amostras de DNA de sementes atípicas permite obter resultados com a mesma precisão da análise individual e com custo inferior.

Referências

- CREGAN, P.; JARVIK, T.; BUSH, A.L.; SHOEMAKER, R.C.; LARK, K.G.; KAHLER, A.L.; VANTOAI, T.T.; LOHNES, D.G.; CHUNG, J.; SPECHT, J.E. An integrated genetic linkage map of the soybean. **Crop Science**, v.39, p.1464-1490, 1999.
- DESTRO, D.; SEDIYAMA, T.; GOMES, J.L.L. **Genes qualitativos em soja: alguns comentários e listagem**. Viçosa: Imprensa Universitária da UFV, 1990. 67p. (Cadernos Didáticos, 293).
- MacDONALD, M.B.; ELLIOT, L.J.; SWEENEY, P.M. DNA extraction from dry seeds for RAPD analyses in varietal identification studies. **Seed Science & Technology**, v.22, p.171-176, 1994.
- MACHADO, M.A.; SCHUSTER, I.; MARTINEZ, M.L.; CAMPOS, A.L. Genetic diversity of four cattle breeds using microsatellite markers. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, p.93-98, 2003.
- MOREIRA, C.T.; SOUZA, P.I.M.; FARIAS NETO, A.L.; ALMEIDA, L.A. **Ocorrência de variações na coloração do hilo de sementes de cultivares de soja [*Glycine max* (L.) Merrill]**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 1999. (Comunicado Técnico, 5).
- MORRISON, M.J.; PIETRZAK, L.N.; VOLDENG, H.D. Soybean seed coat discoloration in cool-season climates. **Agronomy Journal**, v.90, p.471-474, 1998.
- SEDIYAMA, T.; ALMEIDA, A.L.; MIYASAKA, S.; KIIHL, R.A.S. Genética e melhoramento. In: MIYASAKA, S.; MEDINA, J.C. (Ed.). **A soja no Brasil**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1981. p.209-226.
- TAKAHASHI, R.; ASANUMA, S. Association of T gene with chilling tolerance in soybean. **Crop Science**, v.36, p.559-562, 1996.

Recebido em 9 de junho de 2003 e aprovado em 27 de novembro de 2003