

SENSIBILIDADE DOS MICROSSATÉLITES PARA DETERMINAR A PUREZA VARIETAL EM SEMENTES DE MILHO¹

NILZAPATRICIARAMOS², KATIA REGIANE BRUNELLI³, LUIS EDUARDO ARANHA CAMARGO⁴, JULIO MARCOS FILHO⁵

RESUMO - Em um sistema de produção de sementes, o limite de contaminação varietal em lotes de linhagens de milho é zero, de modo que a presença de apenas uma semente de genótipo estranho acarreta a reprovação do lote. Várias técnicas vêm sendo estudadas para determinar a pureza varietal, incluindo marcadores moleculares baseados em polimorfismo de DNA. Nessa pesquisa foi avaliada a sensibilidade da técnica de microsatélites para detectar a presença de sementes de outros genótipos em lotes de linhagens de milho. Utilizaram-se quatro linhagens (L1, L2, L3 e L4), onde as sementes da L2 eram contaminantes da L1 e, as da L4, contaminantes da L3. Para simulação de diferentes níveis de contaminação, 0, 1, 2, 5 e 10 sementes do genótipo estranho foram misturadas a “bulks” de 100 sementes da linhagem comercial. Em seguida, efetuou-se a extração de DNA das amostras de sementes das quatro amostras preparadas. Por outro lado, para simular níveis inferiores de contaminação, foram misturados DNA do genótipo contaminante em níveis de 0,01; 0,013; 0,02; 0,04; 0,1; 0,2; 1; 2; 5; 10 e 100%. A amplificação dos microsatélites foi realizada utilizando o iniciador *BNLG125* para a L1+L2 e o *BNLG240* para L3+L4. Observou-se que os marcadores microsatélites foram eficientes para determinar a pureza varietal de lotes de sementes de linhagens de milho, utilizados neste estudo, com sensibilidade para detecção de concentrações de DNA iguais ou superiores a 0,01%, apresentando nitidez e repetibilidade, especialmente com a utilização de gel de poliacrilamida. Ao mesmo tempo, a presença de DNA estranho nas amostras constituídas por “bulks” foi detectada eficientemente por essa técnica, indicando a possibilidade de sua utilização em testes de rotina para avaliar a presença de outras cultivares, em lotes de sementes de milho.

Termos para indexação: *Zea mays*, análise de sementes, marcadores moleculares, linhagens.

MICROSATELLITE MARKERS TO DETERMINE MAIZE INBRED SEED PURITY

ABSTRACT - Genotype contamination in seed production of maize inbred seed lots is not tolerated, i.e. the presence of only one seed from another genotype in a lot is sufficient to discard this lot. Many procedures have been studied to detect genotype purity in different crops, including molecular markers based on DNA polymorphism. This research aimed to evaluate the sensitivity of the microsatellite technique to detect the contaminating seeds in maize inbred lines. Four inbred lines (L1, L2, L3 and L4) were used. Samples of 100 seeds each of L1 were prepared considering L2 as a contaminant while seeds of L4 were contaminants in L3 seed lots. To simulate different contamination levels, 0, 1, 2, 5 and 10 seeds of the foreign genotype were mixed with the inbred line and then DNA was extracted from each treatment. Successive DNA samples dilutions of 0.01; 0.013; 0.02; 0.04; 0.1; 0.2; 1; 2; 5; 10 and 100% were also realized with to simulate low contamination levels. For both analysis microsatellites amplifications were performed with the primers *BNLG125* for L1+L2 and *BNLG240* for L3+L4. The results showed that the microsatellite technique is efficient to determine the varietal purity of inbred maize used in this research. The sensitive technique is

¹ Submetido em 23/09/2004. Aceito para publicação em 18/11/2005. Parte da tese de doutorado do primeiro autor apresentado à USP/ESALQ.

² Eng. Agr^o., doutoranda do depto de produção vegetal, USP/ESALQ, Bolsita CAPES. npramos@esalq.usp.br

³ Eng. Agr^o., doutoranda do depto de Entomologia, Fitopatologia e Soologia

Agrícola, USP/EsALQ krbrunel@esalq.usp.br

⁴ Eng Agr^o., Professor Doutor do Depto Entonomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, USP/ESALQ, leacamar@esalq.uspbr

⁵ Eng. Agr^o.Dr. Professor Titular do Depto de Produção Vegetal, USP/ESALQ, bolsista CNPq. jmarcos@esalq.usp.br

able to detect a 0.01% DNA contaminant level. Standardization and intensity were better when a polyacrylamide matrix was used. The presence of foreign DNA in the contaminated lots was efficiently detected with the microsatellite technique, indicating the usefulness of this procedure to detect the presence of foreign seeds within maize inbred lots.

Index terms: *Zea mays*, seed analysis, molecular markers, DNA markers.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, com produção de 46,7 milhões de toneladas (FAO, 2004), sendo 2% desse montante referentes à produção de sementes (Santos et al., 2003), mercado em que predomina a participação da iniciativa privada. A qualidade das sementes é determinada pela interação de atributos genéticos, físicos, fisiológicos e sanitários, os quais interferem diretamente no potencial de desempenho em campo e durante o armazenamento (Marcos Filho, 1999). A adoção de programa de controle de qualidade é fundamental e envolve todas as etapas de produção, com destaque para as classes de sementes genéticas e básicas, cuja multiplicação descuidada amplia o risco de contaminação de lotes das classes subseqüentes.

A mistura de sementes de diferentes cultivares não é tolerada em sementes básicas de milho (CATI, 1999). Por esse motivo, testes de rotina são realizados para verificar a presença e a quantidade de genótipos estranhos na amostra (Carvalho, 2000). Esses testes devem ser rápidos, de fácil execução, baixo custo e reproduzíveis dentro e entre laboratórios (Smith e Register III, 1998). Entre os procedimentos disponíveis atualmente, destacam-se os baseados em marcadores morfológicos, cujos resultados sofrem influência significativa das condições ambientais. Esses marcadores são muitas vezes insuficientes para marcar alelos de interesse (Ramalho et al., 1990), além do que a observação apenas fenotípica pode não oferecer informações precisas a respeito dos atributos genéticos de interesse (Menezes et al., 2002), exigindo complementação com o uso de técnicas mais apuradas como as moleculares.

Marcadores moleculares (bioquímicos e de polimorfismo de DNA) são precisos e rápidos, embora exijam a participação de técnicos especializados. Para a análise de pureza genética e varietal ainda predominam testes baseados em marcadores morfológicos e bioquímicos (AOSA, 1991; Brasil, 1992; ISTA, 1996). Porém, com o desenvolvimento de pesquisas voltadas para as técnicas baseadas no polimorfismo de DNA, esse

panorama está se modificando.

Os microssatélites (SSR) destacam-se entre os marcadores moleculares por serem de simples execução, apresentar alta resolução em matriz de poliacrilamida ou agarose, amplificarem regiões específicas do genoma, com uso de pequenas quantidades de DNA, não exigindo conhecimento aprofundado de biologia molecular por parte do analista nem equipamentos sofisticados de laboratório (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Desta maneira, a técnica pode ser utilizada para compor programas de controle de qualidade realizados em laboratórios de pesquisa, em programas de melhoramento genético e de análise de sementes (Smith e Register III, 1998).

Atualmente, as análises envolvendo marcadores moleculares na área de produção e tecnologia de sementes são realizadas, principalmente, a partir de amostras de plântulas, sendo necessária a germinação das sementes, implicando em tempo adicional para a avaliação. De forma alternativa, o uso de DNA obtido diretamente de tecidos de sementes foi pesquisado com sucesso para várias espécies (Benito et al., 1993; Chunwongse et al., 1993; McDonald et al., 1994; Shatters Jr. et al., 1995; Zhang et al., 1996; Marcos Filho et al., 1997; Salgado, 2001). Porém, a necessidade de uso de sementes individualizadas ainda representa um entrave prático para os testes de rotina. Os procedimentos para análise da pureza varietal em lotes de sementes (Brasil, 1992) determinam o uso de quatro repetições de 100 sementes. Seriam necessárias, portanto, 400 extrações de DNA e 400 ampliações via PCR para a amostragem de apenas um lote de sementes. Isso implica em elevado consumo de tempo, trabalho, reagentes, além de elevar consideravelmente o custo da análise. Assim, a otimização de métodos de extração de DNA, envolvendo amostras constituídas por várias sementes, é indispensável e contribui para a implementação do uso de marcadores moleculares para análise de sementes.

Staub et al. (1996) usando marcadores RAPD em pepino, simularam contaminações em amostras de duas linhagens, em diversas proporções; detectaram níveis de até 5% de

mistura. Também Zhang et al. (1996), trabalhando com DNA de duas cultivares de soja, analisadas com marcadores RAPD, identificaram níveis de mistura iguais ou superiores a 10%. Schuster et al. (2004) detectaram a mistura varietal em lotes de sementes de soja por meio de microssatélites, utilizando tanto amostras constituídas por DNA extraído a partir de sementes individuais como amostras compostas por cinco a oito indivíduos.

Os principais benefícios dos microssatélites para a avaliação da pureza varietal de cultivares, são a elevada eficiência e confiabilidade nos resultados; pode ser otimizada, em relação ao custo e tempo, a partir do uso de amostra constituída por vários indivíduos para o isolamento de DNA. Neste contexto, os objetivos nesse trabalho foram avaliar a possibilidade da utilização de amostras constituídas por misturas de sementes (“bulks”) na detecção molecular de contaminações varietais, bem como verificar a sensibilidade dos marcadores microssatélites nesta detecção.

MATERIALE MÉTODOS

Foram utilizadas sementes de quatro linhagens de milho, L1, L2, L3 e L4, com a finalidade de simular diferentes níveis de contaminação em lotes de sementes. Sementes de L2 foram utilizadas como contaminantes da L1, o mesmo ocorrendo para L4 em relação a L3.

Inicialmente foram constituídas amostras com 100 sementes, representando misturas da linhagem L1 com a L2, nos níveis de 0, 1, 2, 5, 10 e 100%. Assim, o nível 0% apresentava 100 sementes de L1, o nível 1% correspondeu à presença de uma semente contaminante (L2) em 99 sementes de L1 e assim sucessivamente. Para os lotes com as linhagens L3 e L4 foram estabelecidos os mesmos níveis de contaminação. Todos os tratamentos foram analisados em três repetições.

Cada amostra constituída pelo “bulk” de 100 sementes foi triturada em moinho comum e resfriada em nitrogênio líquido, com posterior isolamento do DNA seguindo o protocolo proposto por Hoisington et al. (1994) com modificações. Foram utilizados três gramas de cada amostra, colocados em tubo plástico de 50mL e ressuspensos em 10 mL de tampão de extração CTAB (hexadecil-trimetilamônio de bromida), (70mM de NaCl; 50mM de EDTA pH 8,0; 100mM Tris-HCl pH 7,5; 1% de p/v de CTAB; 1% de p/v de polivinil pirrolidone; 140mM de b-mercapto-etanol e água destilada e deionizada). A amostra foi mantida a 65°C por 60 minutos, quando foram acrescentados 4,5mL de clorofórmio/

álcool isoamílico (CIA) na proporção de 24:1 (v:v), seguido pela centrifugação a 3400rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para novo tubo, onde este procedimento foi repetido. O DNA foi precipitado da fase sobrenadante com álcool isopropanol absoluto, o qual foi lavado com etanol absoluto e etanol 75%. Após secagem em temperatura ambiente, o DNA foi ressuspensado em 100mL de TE pH 8,0 (10mM de Tris-HCl e 1mM de EDTA). Ao final da extração, adicionou-se 1mL de RNase (1mg.mL⁻¹), seguida de incubação a 37°C por duas horas. A quantificação da amostra foi realizada em fluorímetro.

As reações de amplificação dos locos microssatélites foram conduzidas seguindo metodologia proposta por Senior et al. (1996), com modificações. Para a reação de PCR com volume final de 40mL, foram adicionados 80ng de DNA molde, 1,0 unidade de *Taq* DNA polimerase, 1x tampão de *Taq*, 2,25mM de MgCl₂, 60mM de cada dNTP (A, C, G, T), 0,5mM de iniciador anverso e reverso e 19,7mL de água ultrapura autoclavada. A partir de informações obtidas em estudos prévios, desenvolvidos no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ, 27 iniciadores ou “primers” foram avaliados em função dos padrões polimórficos apresentados para as linhagens estudadas. Para analisar as amostras contendo misturas entre as linhagens L1 e L2 selecionou-se o iniciador *BNLG 125* e para L3 e L4 selecionou-se o *BNLG 240*.

O programa de amplificação foi realizado com um ciclo inicial de três minutos a 94°C, seguido de 10 ciclos a 94°C por um minuto, 65°C por um minuto e 72°C por dois minutos, com redução de 1°C a cada ciclo até atingir 55°C. Em seguida, foram realizados 19 ciclos a 94°C por um minuto, 55°C por um minuto e 72°C por dois minutos com extensão final de cinco minutos a 72°C (Ogliari et al., 2000).

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 3,5% e em gel de poliacrilamida 6%. O gel de agarose foi tratado com brometo de etídio (0,5mg.mL⁻¹) e fotografado com o ImageMaster[®] VDS (Pharmacia Biotech), sob luz ultra-violeta. Os fragmentos separados em gel de poliacrilamida foram corados com prata seguindo o protocolo de Creste et al. (2001). Os resultados foram avaliados considerando a presença de uma banda característica da linhagem contaminante juntamente com uma banda característica da linhagem convencional como pura, nas diferentes proporções de mistura.

Simulações de contaminação foram, também, realizadas pelas diluições sucessivas de alíquotas de DNA, com a

finalidade de verificar as concentrações mínimas de contaminação detectadas pela técnica de microssatélites. Ao DNA isolado da linhagem padrão foi misturado, em níveis crescentes, o DNA extraído da linhagem considerada contaminante. Foram testadas as concentrações de 0, 0,01, 0,013, 0,02, 0,04, 0,1, 0,2, 1, 2, 5, 10 e 100%, que simularam as contaminações em lotes de sementes (L1 contaminada com L2 e L3 com L4).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantidade média de DNA isolado não ultrapassou 30ng.mL⁻¹ para todas as amostras de sementes; entretanto, esses valores foram suficientes para a amplificação satisfatória dos locos microssatélite. Em geral, amplificações de locos microssatélites exigem quantidade reduzida de DNA molde, com variação de 10 a 50ng (Ferreira e Grattapaglia, 1998), dependendo do volume final da reação de amplificação.

A baixa concentração de DNA por grama de semente de milho foi observada anteriormente por Zhang et al. (1996), que verificaram ainda a predominância do DNA obtido do tecido embrionário, seguido do endosperma. O valor reduzido é atribuído à perda de DNA pelo tecido endospermático durante a fase de acúmulo de reservas nas sementes (McDonald et al., 1995). Quando o amido é formado, ocorrem rupturas em organelas e o conteúdo celular é modificado, com redução expressiva da quantidade de ácidos nucléicos, culminando com a morte da célula e total preenchimento pelas reservas. Uma vez que as sementes de milho são constituídas, em maior parte, pelo tecido endospermático, mesmo com elevado

conteúdo de DNA no embrião a quantidade em relação à semente inteira é baixa, explicando os resultados apresentados no presente trabalho. Também, a presença de quantidade elevada de impurezas associadas ao DNA isolado a partir de sementes, contribui para a redução na concentração de DNA extraído. As sementes são estruturas de multiplicação vegetal, com tecido de reserva rico de carboidratos, lipídios e proteínas, responsáveis pelos suprimentos do embrião durante o processo de germinação (Carvalho e Nakagawa, 2000). Essas substâncias de reserva dificultam o isolamento do DNA, exigindo maior número de lavagens com solvente orgânico (clorofórmio-álcool isolamílico), durante o protocolo de extração. Esse procedimento implica, também, em redução na quantidade total de DNA isolado, pois parte dessas moléculas não se separam de outros compostos orgânicos e são conseqüentemente descartadas.

Tecidos de plântulas ou plantas são usados na maioria dos protocolos para extração de DNA vegetal, pois permitem o isolamento de concentrações elevadas de DNA por amostra. Porém, para laboratórios de análise de sementes, o período necessário para o desenvolvimento dessas estruturas é indesejável e pode comprometer o uso de técnicas moleculares em análises de rotina (McDonald et al., 1994). Portanto, com base nos resultados obtidos, pode-se recomendar o uso de sementes para isolamento de DNA em testes de rotina quando se utiliza a técnica de microssatélites, pois a quantidade e a qualidade do DNA são satisfatórias para a amplificação via PCR.

Pelos padrões das bandas do microssatélite *BNLG125* amplificadas para a mistura da linhagem L1 com a L2 e do

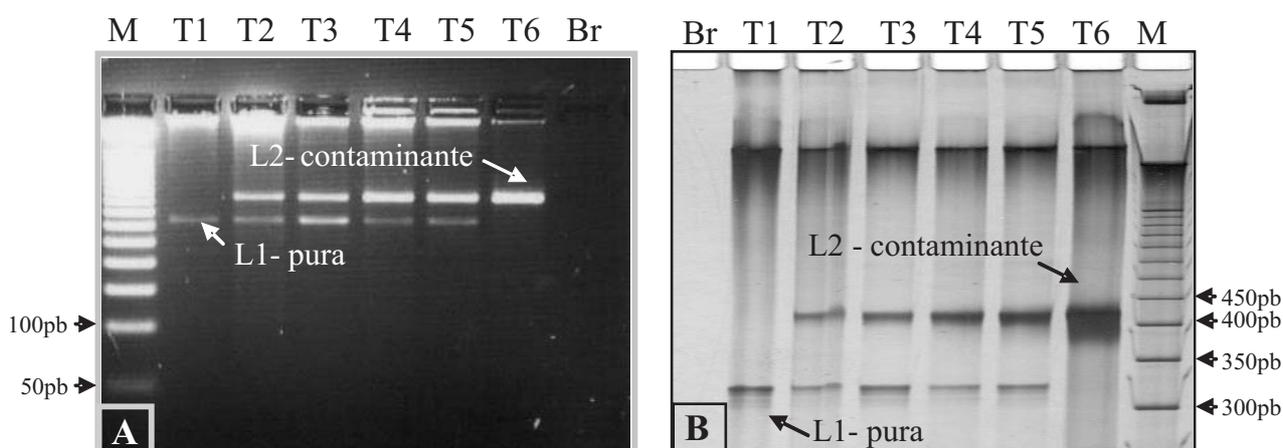


FIGURA 1. Padrões de amplificação do microssatélite *BNLG125*, resolvidos em gel de agarose (A) e de poliácridamida (B), obtidos a partir de DNA extraído da mistura de sementes de linhagens de milho L1 e L2 (Br: - amostra sem DNA ou branco; T1: 100%L1+ 0%L2; T2: 99%L1+1%L2; T3: 98%L1+2%L2; T4: 95%L1+5%L2; T5: 90%L1+10%L2; T6: 0%L1+100%L2 e M: marcador de peso molecular 50pb (Promega).

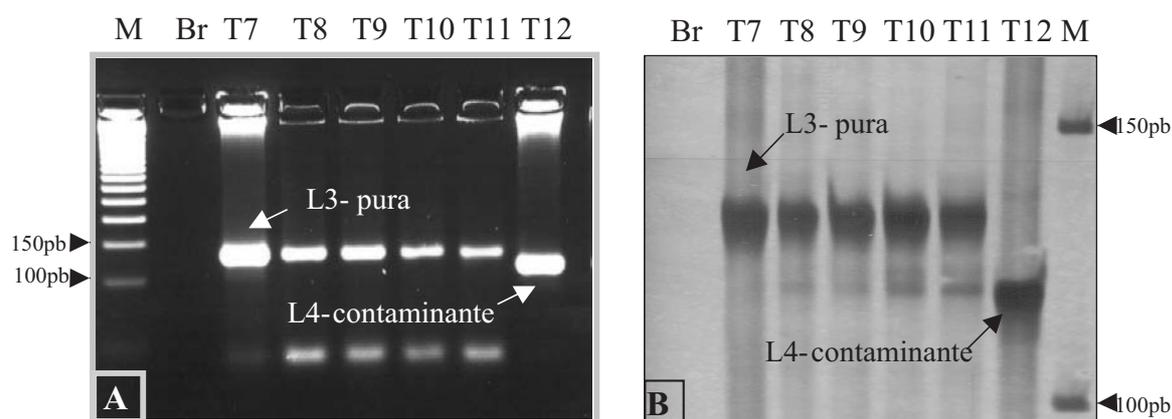


FIGURA 2. Padrões de amplificação do microssatélite *BNLG 240*, resolvidos em gel de agarose (A) e de poliacrilamida (B), obtidos a partir de DNA extraído da mistura de sementes de linhagens de milho L3 e L4 (Br: amostra sem DNA ou branco, T7: 100%L3+0%L4; T8: 99%L3+1%L4; T9: 98%L3+2%L4; T10: 95%L3+5%L4; T11: 90%L3+10%L4; T12: 0%L3+100%L4 e M corresponde ao marcador de peso molecular 50pb (Promega)).

BNLG240, amplificadas para a mistura da L3 com a L4 (Figuras 1 e 2) verificou-se que a presença da linhagem contaminante foi detectada na amostra com até 1% de mistura. Esta constatação seria suficiente para impedir a utilização do lote em avaliação, uma vez que não é tolerada a mistura de genótipos para aprovação de lotes de sementes básicas de milho.

O tipo de matriz utilizada interferiu na observação das bandas obtidas a partir do iniciador *BNLG240*, não sendo possível identificar os diferentes níveis de contaminação quando os fragmentos foram resolvidos em gel de agarose 3,5%. No entanto, utilizando-se gel de acrilaminada 6% as contaminações foram detectadas ao nível de 1% (Figura. 2B). Essa observação não é surpreendente, pois o polímero poliacrilamida permite melhor separação de fragmentos de baixo peso molecular, como no caso dos microssatélites. Ferreira e Grattapaglia (1998) recomendam o uso de matriz de alta resolução para a visualização dos fragmentos, pois dependendo do número de nucleotídeos do elemento repetido no microssatélite, a visualização em gel de agarose pode não ser possível.

Para ambos iniciadores foi possível verificar variação da intensidade da banda contaminante, de maneira proporcional aos níveis de contaminação. Assim, no tratamento correspondente a 10% de mistura, a banda contaminante foi mais intensa do que a verificada para o nível de 1% de mistura. Deve ser ressaltado que a técnica de microssatélites não permite quantificar o nível de contaminação e, dessa maneira, a observação de variação na intensidade dos fragmentos permite apenas visualizar o menor ou maior grau de contaminação.

Schuster et al. (2004), trabalhando com oito cultivares de soja e marcadores microssatélites, obtiveram sucesso na avaliação da pureza varietal, utilizando tanto sementes individuais quanto amostras constituídas por até oito sementes. Esses autores confirmaram a possibilidade de uso da técnica microssatélites, associada ao uso de amostras contendo várias sementes para a determinação de pureza varietal de lotes. Vale ressaltar, que para análise de pureza em lotes de cultivares híbridos, o uso de sementes individualizadas é essencial, em função da característica de codominância dos marcadores microssatélites (técnica que detecta ambos os alelos em um loco heterozigoto), não permitindo identificar se as bandas são decorrentes apenas do híbrido resultante da contaminação com um dos parentais (Salgado, 2001).

Com a detecção segura de 1% de sementes contaminando as amostras, novos níveis de contaminação foram avaliados. Assim, pelas simulações com misturas de DNA entre amostras foi possível detectar, com clareza e repetibilidade, concentrações de até 0,1% de DNA contaminante, correspondendo à proporção de uma semente contaminante em 1000 sementes (Figura 3 A e B). Esse resultado é totalmente satisfatório e confere maior rigor à análise, uma vez que quanto maior a sensibilidade menor a probabilidade de erro no diagnóstico. O risco de aceitar lotes impuros ou rejeitar indevidamente lotes puros é elevado e quase impossível de ser eliminado (Andreoli, 1992). Assim, o uso de técnicas que minimizem a possibilidade de ocorrência de erros, em função da alta sensibilidade de detecção, torna a análise mais confiável.

Deve ser ressaltado que, a possibilidade de detecção segura até o nível 1% de contaminação foi confirmada neste

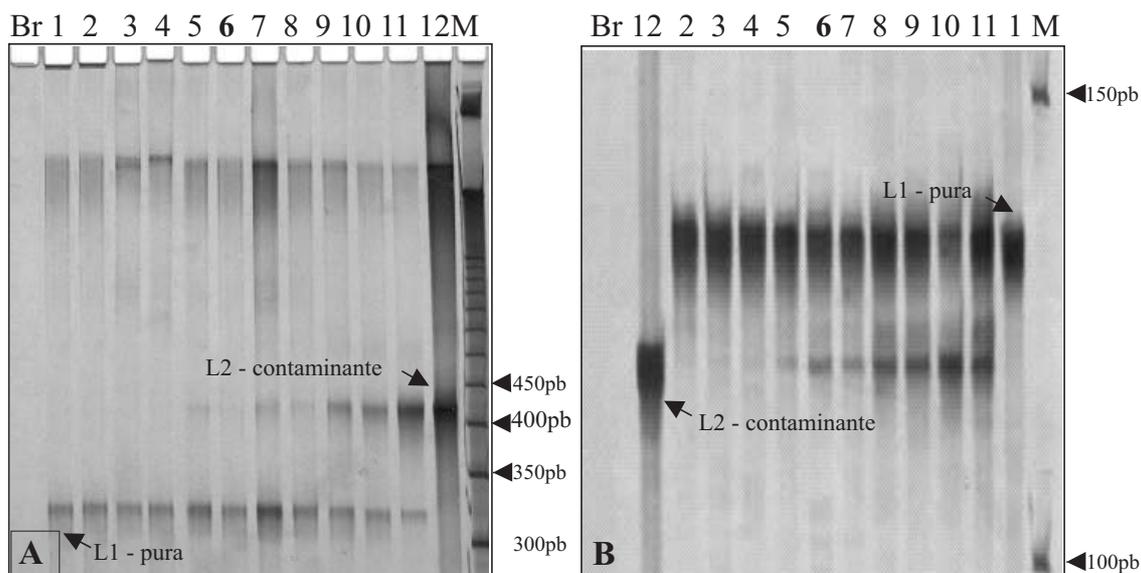


FIGURA 3. Padrões de amplificação dos microssatélite *BNLG 125* (A) para as linhagens L1 e L2 e *BNLG 240* (B) para L3 e L4, resolvidos em gel de poliacrilamida, obtidos a partir da mistura de DNA extraído de sementes, (Br: amostra sem DNA branco, 1: 0% de contaminação; 2: 0,01%; 3: 0,013%; 4: 0,02%; 5: 0,04%; 6: 0,1%; 7: 0,2%; 8: 1%; 9: 2%; 10: 5%; 11: 10%; 12: 100% e M corresponde ao marcador de peso molecular 50pb (Promega)). Em negrito o tratamento 6, que corresponde a mínima concentração de DNA contaminante cujo fragmento pode ser visualizado no gel.

presente estudo e que a avaliação com o nível de 0,1% foi realizada por meio de simulação. Essa possibilidade é vantajosa para as análises de sementes, pois permite a amostragem de maior número de sementes, melhorando a representatividade do lote e elevando a precisão e eficiência do teste.

CONCLUSÕES

A técnica de microssatélites é eficiente para determinar a pureza varietal de lotes de sementes de linhagens de milho, utilizados neste estudo, com sensibilidade de detecção de níveis iguais ou superiores a 0,1% de concentração de DNA, apresentando nitidez e repetibilidade, especialmente quando se utiliza gel de poliacrilamida. Ao mesmo tempo, a utilização de amostras constituídas por “bulks” de sementes para extração de DNA oferece segurança, para avaliar a presença de cultivares não desejáveis em lotes de sementes, podendo ser adotada em testes de rotina.

REFERÊNCIAS

ANDREOLI, C. Mistura varietal: aspectos genéticos e físicos na produção de sementes. **Informativo ABRATES**, Brasília, v.1, n.3, p.32-36, 1992.

ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYST – AOSA.

Cultivar purity testing. Lansing, 1991. 371p.

BENITO, C.; FIGUEIRAS, A.M.; ZARAGOZA, C.; GALLEGU, F.G.; DE LA PEÑA, A. Rapid identification of triticeae genotypes from single seeds using polymerase chain reaction. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.21, p.181-183, 1993.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.

CARVALHO, M.L.M. Aplicação de técnicas moleculares na avaliação da qualidade de sementes. In: BORÉM, A.; GIUDICE, M.P.D.; DIAS, D.C.S.S.; ALVARENGA, E.M. (Ed.) **Biotechnologia e Produção de Sementes**. Biowork III. Viçosa: UFV, 2000. p.129-160.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4 ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588p.

CATI. **Padrões de sementes para 1999/2000**. Campinas: Coordenadoria de Assistência Técnica Integral, Secretaria de Agricultura e Abastecimento, Governo do Estado de São Paulo, 1999.

CHUNWONGSE, J.; MARTIN, G.B.; TANKSLEY, S.D. Pre-germination genotypic screening using PCR amplification of half-seeds. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v.86, p.694-698, 1993.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v.19, p.299-306, 2001.

FOOD AGRICULTURAL ORGANIZATION. Disponível em: <http://

/www.fao.org> Acesso em 10 mai. 2004.

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

HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZÁLEZ DE LEON, D. **Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory**. 2 ed., México: CIMMYT, 1994.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION . **Rules for seed testing**. Zürich, 1996. 44p.

MARCOS FILHO, J. Testes de vigor: importância e utilização. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999a. p.1.1-1.21.

MARCOS FILHO, J.; McDONALD, M.B.; TEKRONY, D.M.; ZHANG, J. RAPD fragment profiles from deterioration soybean seeds. **Seed Technology**, Lincoln, v.19, n.1, p.34-44, 1997.

McDONALD, M.D. Genetic purity: from eletrophoresis to RAPDs. **Proceeding of 50th Annual Corn and Soeghum Industry Research Conference 1995**. Washington, D.C: American Seed Trading Association, 1995. p.256-271.

McDONALD, M.D.; ELLIOT, L.J.; SWEENEY, P.A. DNA extraction from dry seeds for RAPD analyses in varietal identification studies. **Seed Science and Technology**, Zürich. v.22, n.1, p.171-176, 1994.

MENEZES, C.C.E.; SEDIYAMA, T.; McDONALD, M.B.; DIAS, D.C.F.S. Análise de pureza genética e discriminação de cultivares de vinca (*Catharanthus roseus* L.) usando "Random Amplified Polymorphic DNA" em DNA extraído de sementes e folhas. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.24, n.1, p.279-285, 2002.

OGLIARI, J.B.; BOSCARIOL, R.L.; CAMARGO, L.E.A. Optimization of PCR amplification of maize micosatellite loci. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.23, n.2, p.395-

398, 2000.

RAMALHO, M.A.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.B. **Genética na agropecuária**. Lavras: FAEPE, 1990. 359p.

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

SANTOS, C. **Anuário Brasileiro de Milho 2003**. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 2003. 136p.

SCHUSTER, I.; QUEIROZ, V.T.; TEIXEIRA, A.I.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Determinação da pureza varietal de sementes de soja com auxílio de marcadores moleculares microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.3, p.247-253, 2004.

SENIOR, M.L.; CHIN, E.C.L.; LEE, M.; SMITH, J.S.C.; STUBER, C.W. Simple sequence repeat markers developed from maize found in GENBANK Database: map construction. **Crop Science**, Madison, v.36, p.1676-1683, 1996.

SHATTERS JR, R.G.; SCHWEDER, M.E.; WEST, S.H.; ABDELGHANY, A.; SMITH, R.L. Environmentally induced polymorphisms detected by RAPD analysis of soybean seed DNA. **Seed Science Research**, Wallingford, v.5, p.109-116, 1995.

SMITH, J.S.C.; REGISTER III, J.C. Genetic purity and testing technologies for seed quality: a company perspective. **Seed Science Research**, Wallingford, v.8, n.2, p.285-293, 1998.

STAUB, J.; BACHER, J.; POETTER, K. Sources of potential errors in the application of random amplified polymorphic DNAs in cucumber. **HortScience**, Alexandria, v.31, n.2, p.262-266, 1996.

ZHANG, J.; McDONALD, M.B.; SWEENEY, M.P. Random amplified polymorphic DNA (RAPDs) from dry seeds of differing soybean and mayze genotypes. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.24, n.2, p.513-522, 1996.

