

DETECÇÃO DE MISTURAS EM SEMENTES DE SOJA POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES E ELETROFORESE CAPILAR

Eng. Agrônomo Carlos Magno Quirino de Farias

Cultura da soja

Safra 13/14 Brasil - 86.120,8 mil toneladas (Conab)

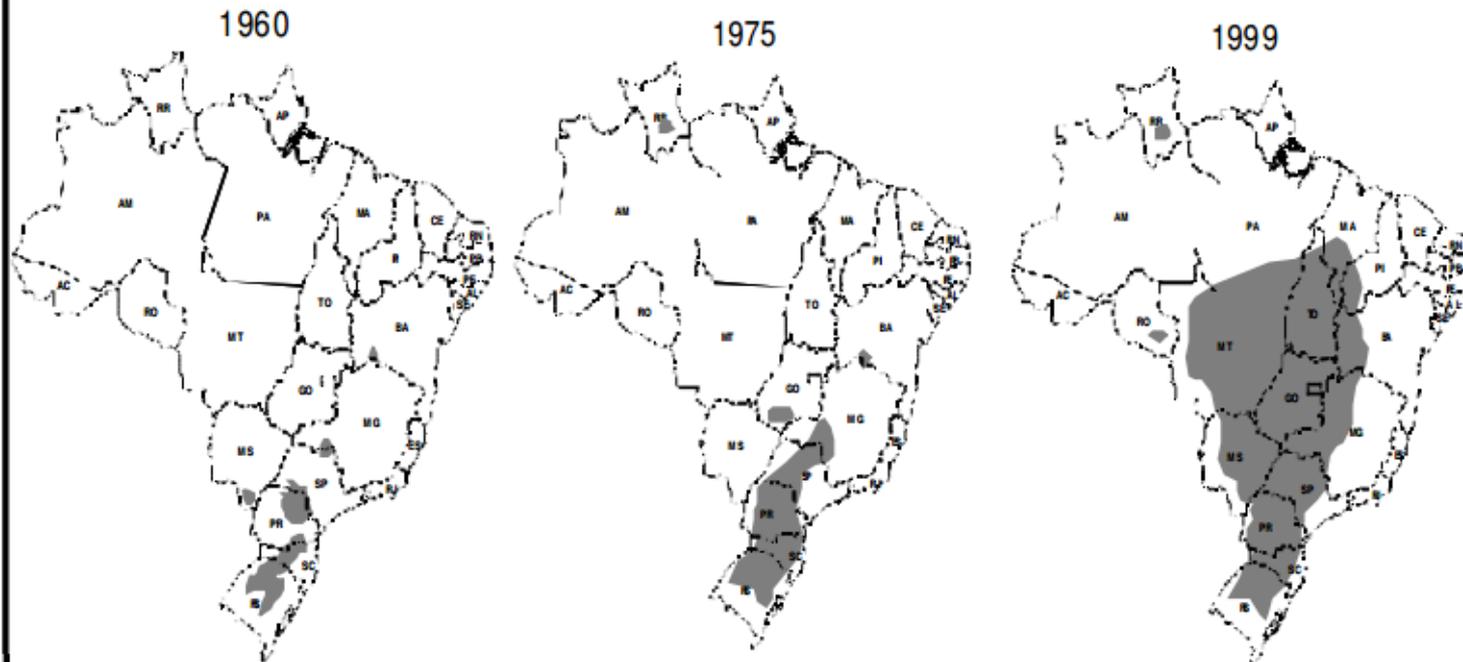
Aumento de 5,7% em relação à 12/13

Estimativa para safra 14/15 – 94.000 mil toneladas (Conab)

Grande importância na alimentação

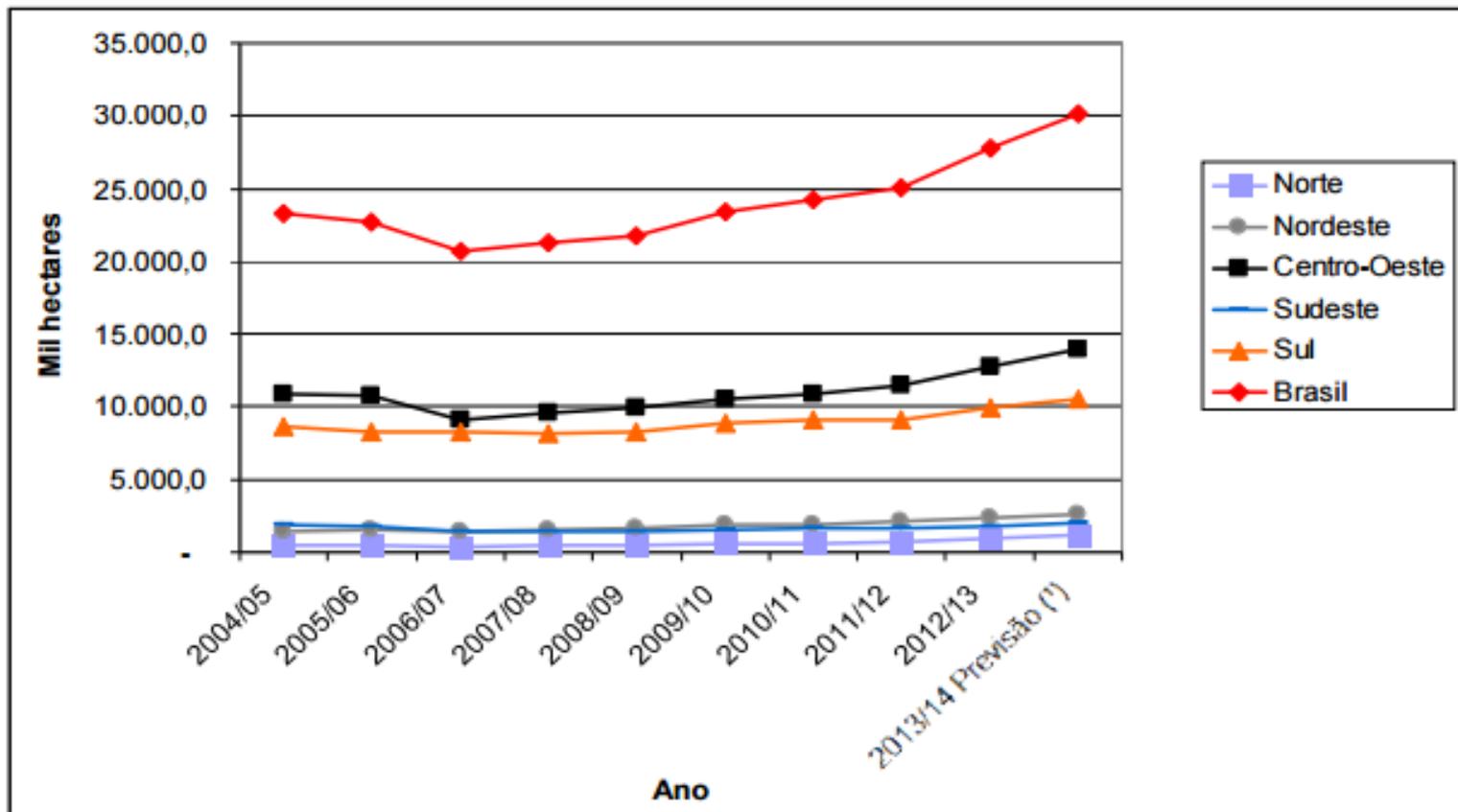
Cultura da soja

A SOJA TROPICAL: EXPANSÃO DA CULTURA



- ✓ CULTIVARES ADAPTADAS
- ✓ FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO
- ✓ PLANTIO DIRETO
- ✓ MANEJO & SANIDADE

Cultura da soja



Fonte: Conab.

Cultura da soja

Metas:

Aumento de produção.....e área?

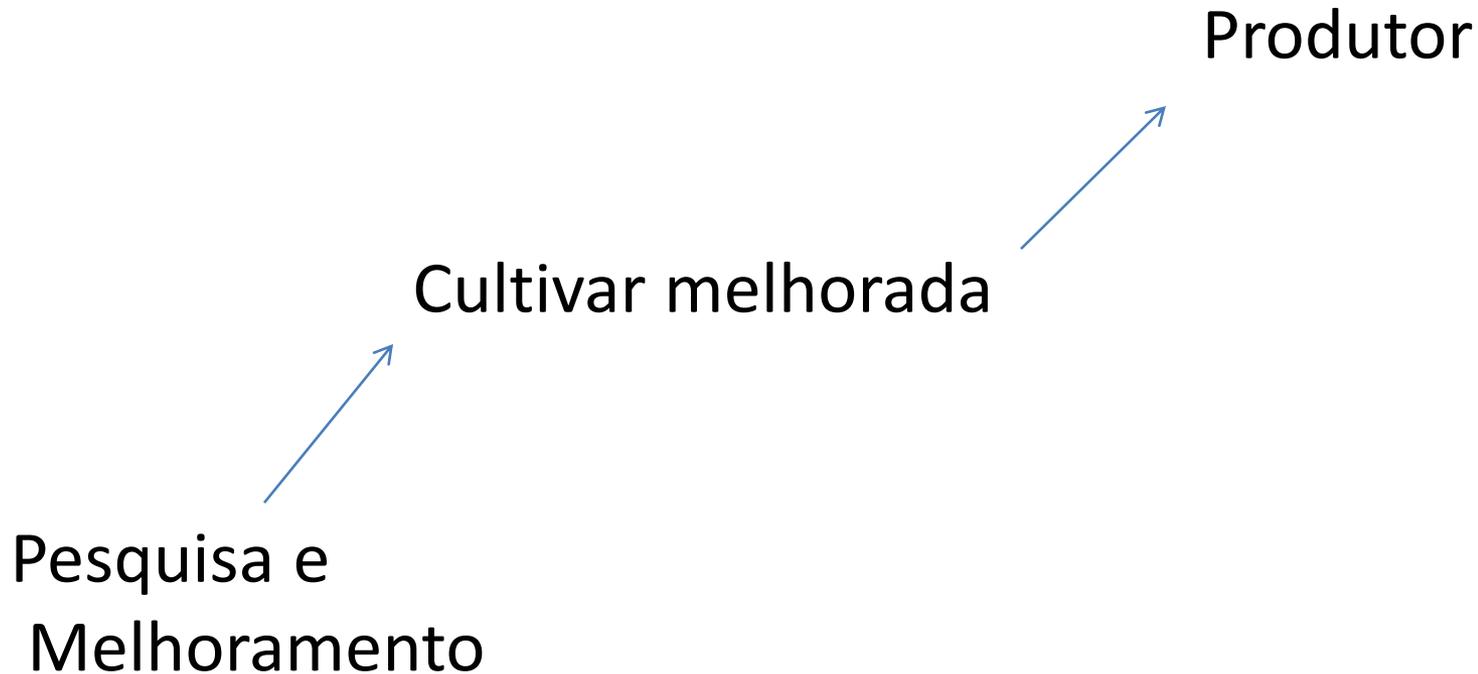
Reduzir riscos (manejo adequado)

Reduzir custos (manejo adequado)

A resposta pode estar no melhoramento de plantas.

Introdução

- Qualidade de Sementes



Qualidade de sementes

- Qualidade física
- Qualidade fisiológica
- Qualidade sanitária
- Qualidade genética

Introdução

- Qualidade de Sementes
 - ✓ Pureza varietal
 - ✓ Garantia do potencial genético
 - ✓ Produção
 - ✓ Uniformidade

Mistura Varietal

- Como ocorre mistura varietal?
- Efeitos da mistura varietal
- Como garantir a pureza varietal?

Testes de pureza

- Realizados geralmente através de descritores morfológicos de sementes, plântulas e plantas.

Testes de pureza

Descritores utilizados pelo SNPC:

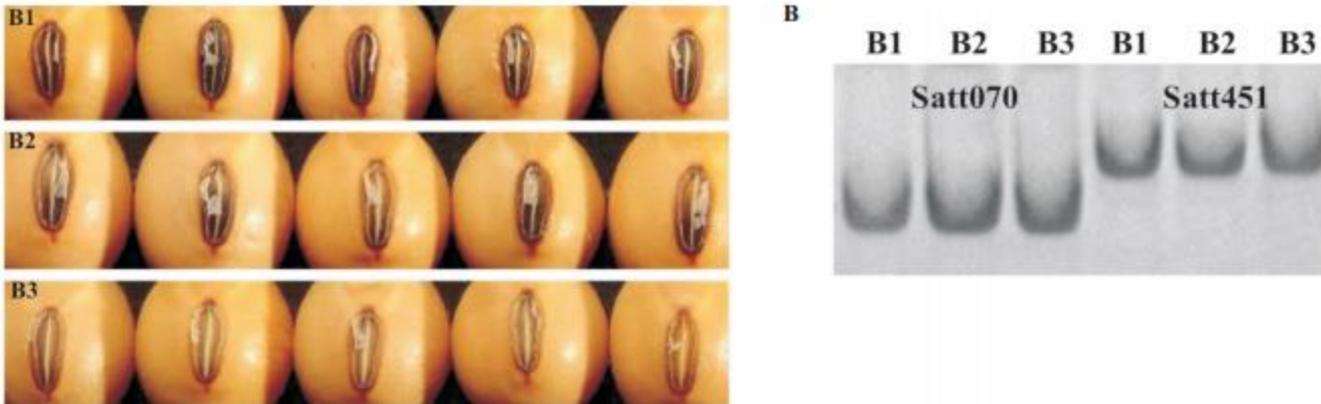
Estádio	Característica correspondente
Semente	Forma da semente
	Intensidade do brilho do tegumento
	Cor do tegumento
	Cor do hilo
	Reação à peroxidase
Plântula	Pigmentação antociânica do hipocótilo
Planta	Cor predominante da flor
	Tipo de crescimento da planta
	Cor da haste principal da planta
	Cor da vagem com pubescência
Demais testes	Grupo de maturidade relativa
	Transgenia

Testes de pureza



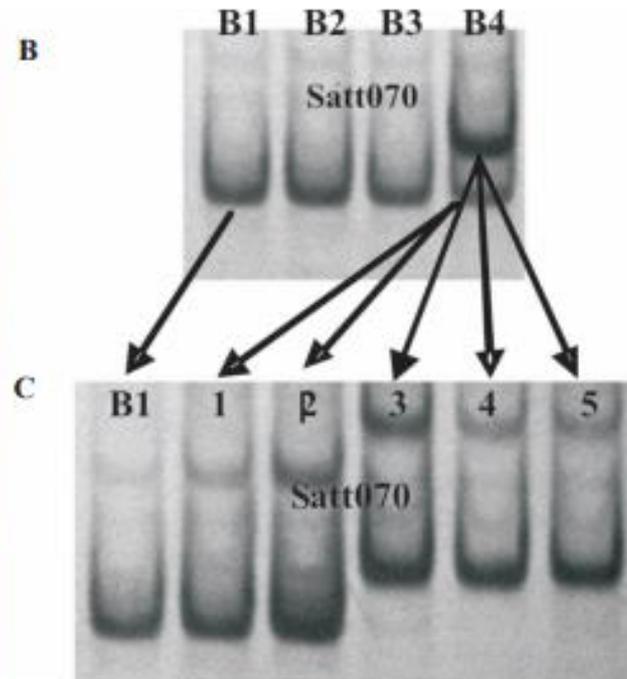
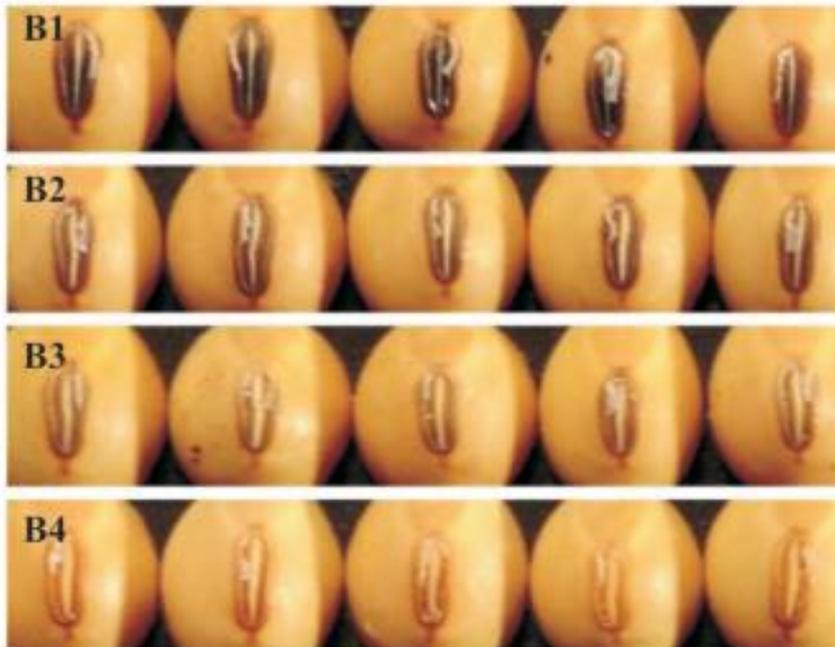
Embrapa

Testes de pureza



RABEL, M. et al, 2010

Testes de pureza



RABEL, M. et al, 2010

- Peroxidase em sementes de soja

Enzima encontrada no parênquima lacunoso do tegumento da soja

Codificada pelo loco dominante Ep, o qual é responsável pela atividade no tegumento das sementes

- Peroxidase em sementes de soja

Sementes com o genótipo EpEp ou Epep apresentam atividade da enzima no tegumento

Sementes com o genótipo epep apresentam pouca ou nenhuma atividade

A ausência de atividade da enzima peroxidase é resultado da deleção de 87 pares de bases, na extremidade 5' do gene.

Peroxidase em semente de soja

```
1  atggggttcca tgcgtctatt agtagtggca ttgttggtg catttgctat gcatgcaggt
61  ttttcagtct cttatgctca gcttactcct acgttctaca gagaaacatg tccaaatctg
121  ttccctattg tgtttggagt aatcttcgat gcttctttca ccgatccccg aatcggggcc
181  agtctcatga ggcttcattt tcatgattgc tttgttcaag gttgtgatgg atcagttttg
241  ctgaacaaca ctgatacaat agaaagcgag caagatgcac ttccaaatat caactcaata
301  agaggattgg acgttggtcaa tgacatcaag acagcgggtg aaaatagttg tccagacaca
361  gtttcttggt ctgatattct tgctattgca gctgaaatag cttctgttct gggaggaggt
421  ccaggatggc cagttccatt aggaagaagg gacagcttaa cagcaaaccg aacccttgca
481  aatcaaaacc ttccagcacc tttcttcaac ctcaactcaac ttaaagcttc ctttgctggt
541  caaggtctca acacccttga tttagttaca ctctcaggtg gtcatacgtt tggaagagct
601  cggtgcaagta cattcataaa ccgattatac aacttcagca aacttggaac cctgatcca
661  actctgaaca caacatactt agaagtattg cgtgcaagat gccccagaa tgcaactggg
721  gataacctca ccaatttggg cctgagcaca cctgatcaat ttgacaacag atactactcc
781  aatcttctgc agctcaatgg cttacttcag agtgaccaag aacttttctc cactcctggt
841  gctgatacca ttcccattgt caatagcttc agcagtaacc agaatacttt cttttccaac
901  tttagagttt caatgataaa aatgggtaat attggagtgc tgactgggga tgaaggagaa
961  attcgcttgc aatgtaattt tgtgaatgga gactcgtttg gattagctag tgtggcgctc
1021 aaagatgcta aacaaaagct tgttgctcaa tctaaataaa ccaataatta atggggatgt
1081 gcatgctagc tagcatgtaa aggcaaatta ggttgtaaac ctctttgcta gctatattga
1141 aataaaccaa aggagtagtg tgcatgtcaa ttcgattttg ccatgtacct cttggaatat
1201 tatgtaataa ttatttgaat ctctttaagg tacttaatta atca
```

- Peroxidase em sementes de soja

Peroxidase ativa no tegumento → peroxidase positiva

Pouca atividade peroxidase no tegumento → negativa

Teste de rotina para peroxidase → teste do Guaiacol

Prático, porém influenciado pela umidade da semente

Marcadores moleculares

- Marcador PCR-específico
- Marcadores microsatélite (SSR)

- Marcadores Microssatélite

Sequência de pares de base que ocorrem em tandem

Natureza co-dominante e multialélica

Marcadores passíveis de automação

Marcadores microssatélite

- Seedcalc (299 sementes)
- Custo?
- Alternativa -> Utilização de bulks
- Trabalhos com bulks

Eletroforese

- O que é?
- Pode ser realizada por meio de eletroforese em gel (agarose e poliacrilamida) ou capilar.
- Vários trabalhos com detecção de mistura por meio de eletroforese em gel foram realizados
- Ausência de trabalhos com eletroforese capilar.

Eletroforese Capilar

- Vantagens:
 - Rapidez
 - Uso de meio aquoso
 - Baixo volume de amostra
 - Alta eficiência de separação

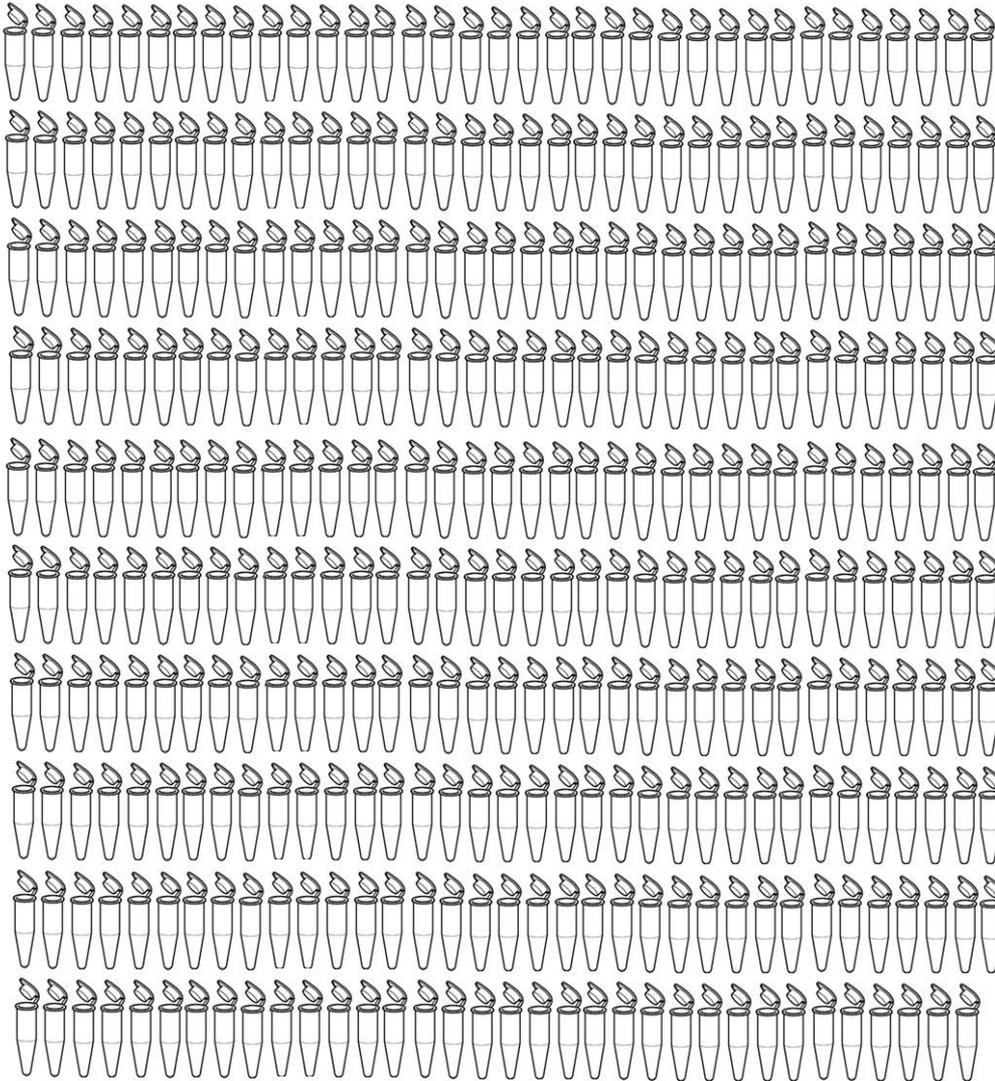
Objetivo

- O objetivo do trabalho foi avaliar a sensibilidade na detecção de mistura varietal em soja, utilizando eletroforese capilar.

Desenvolvimento

- Como avaliar?
- Materiais utilizados
- Construção dos bulks
- Simular mistura

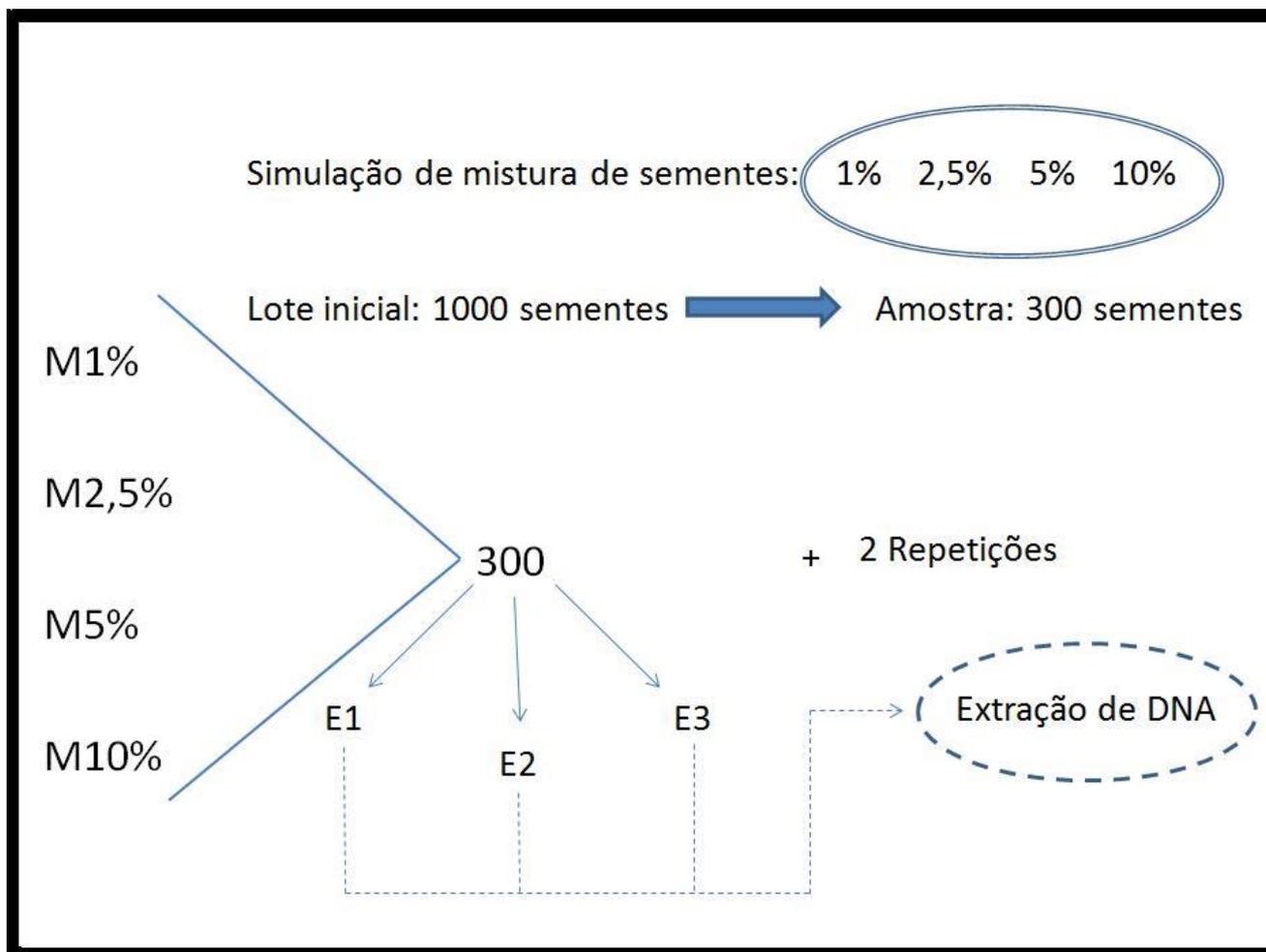
Desenvolvimento



299 extrações de DNA
299 reações PCR
299 eletroforeses

Custo?

Desenvolvimento



Avaliação de sensibilidade

- Mistura de DNA de 15 diferentes proporções

Referente ao teste de sensibilidade dos métodos de genotipagem em detectar misturas em diferentes proporções

Avaliação de sensibilidade

- Mistura de DNA de 15 diferentes proporções

Amostra	Proporção	Amostra	Proporção
1	1% CD237RR + 99%CD219RR	9	60% CD237RR + 40%CD219RR
2	2% CD237RR + 98%CD219RR	10	70% CD237RR + 30%CD219RR
3	5% CD237RR + 95%CD219RR	11	80% CD237RR + 20%CD219RR
4	10% CD237RR + 90%CD219RR	12	90% CD237RR + 10%CD219RR
5	20% CD237RR + 80%CD219RR	13	95% CD237RR + 5%CD219RR
6	30% CD237RR + 70%CD219RR	14	98% CD237RR + 2%CD219RR
7	40% CD237RR + 60%CD219RR	15	99% CD237RR + 1%CD219RR
8	50% CD237RR + 50%CD219RR		

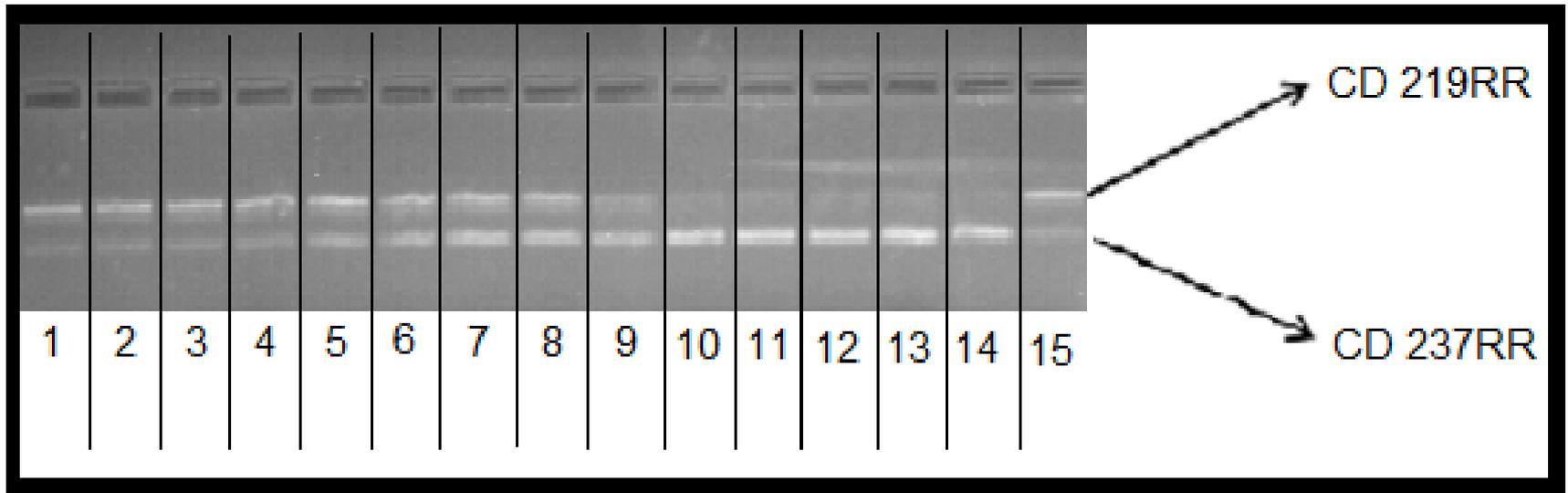
Análise de dados

- A análise consiste na observação dos diferentes alelos gerados para cada marcador

Cultivares	Marcadores		
	PO1-PO2	Satt309	Satt114
CD 237RR	138pb	130pb	77pb
CD 219RR	227pb	133pb	93pb

Análise de dados

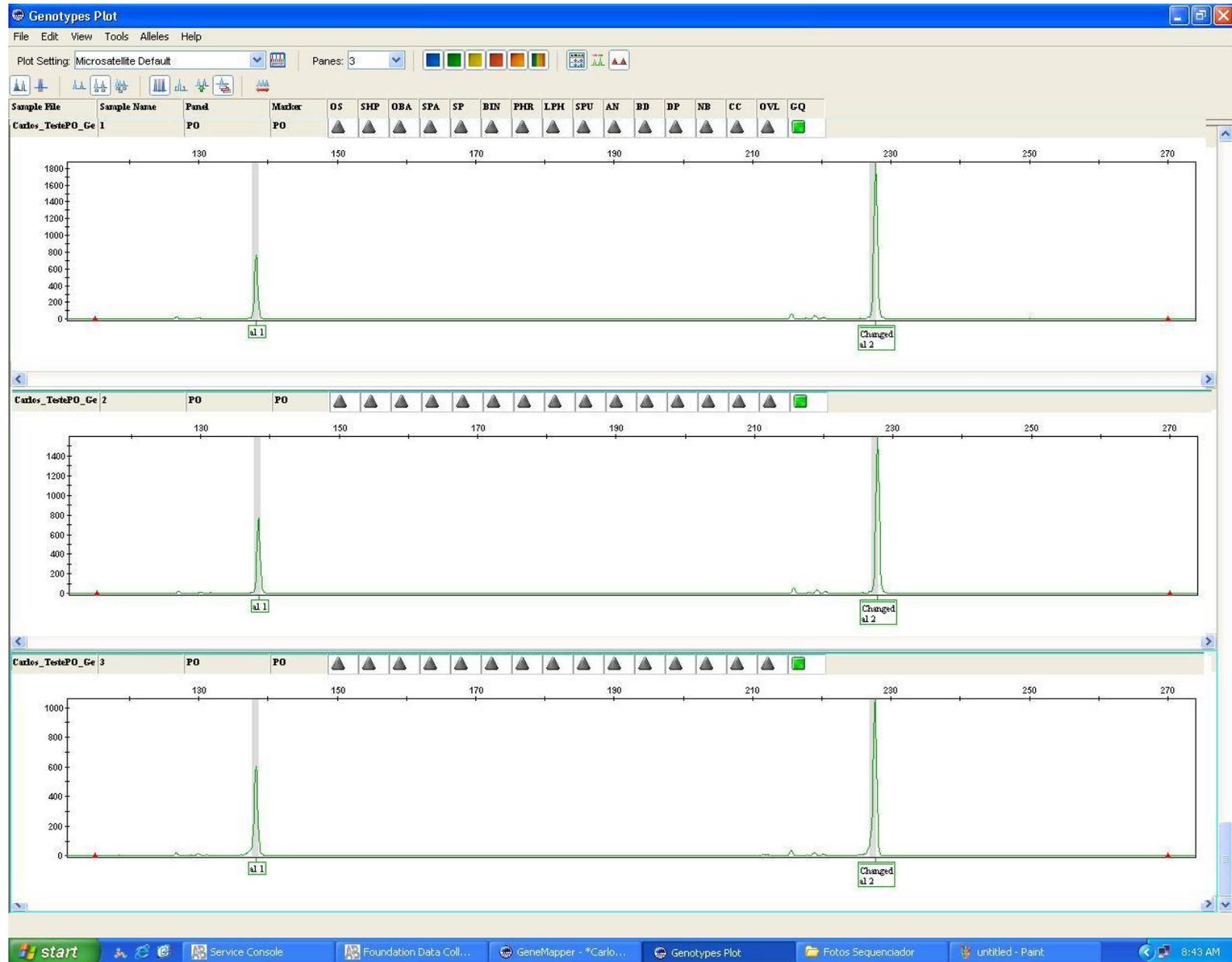
Perfil eletroforético obtido com o marcador PO1-PO2 separado por eletroforese em gel de agarose 3%.



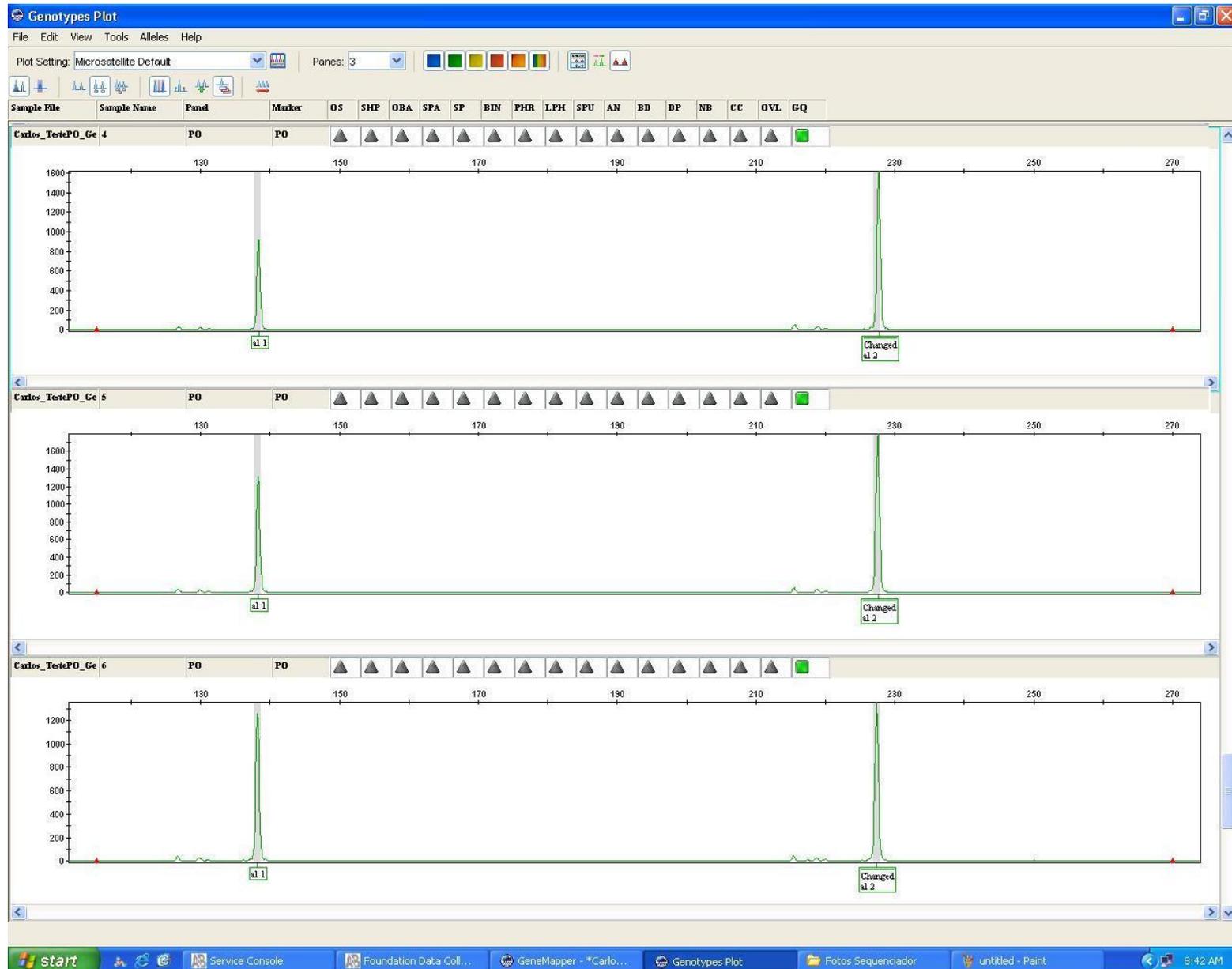
Análise de dados

Amostra	Marcador	Alelo 1	Alelo 2	Intens. Fluor.* Al. 1	Intens. Fluor.* Al. 2
1	PO	138.27	227.79	769	1876
2	PO	138.37	227.8	767	1598
3	PO	138.28	227.69	606	1061
4	PO	138.37	227.69	918	1620
5	PO	138.26	227.54	1319	1798
6	PO	138.15	227.38	1258	1353
7	PO	138.27	227.21	112	184
8	PO	138.37	227.9	1622	1187
9	PO	138.27	227.73	2034	999
10	PO	138.27	227.67	2229	351
11	PO	138.27	227.63	2352	339
12	PO	138.27	227.53	2972	432
13	PO	138.15	227.21	2563	372
14	PO	138.03	227	2447	325
15	PO	138.15	227.32	494	1021

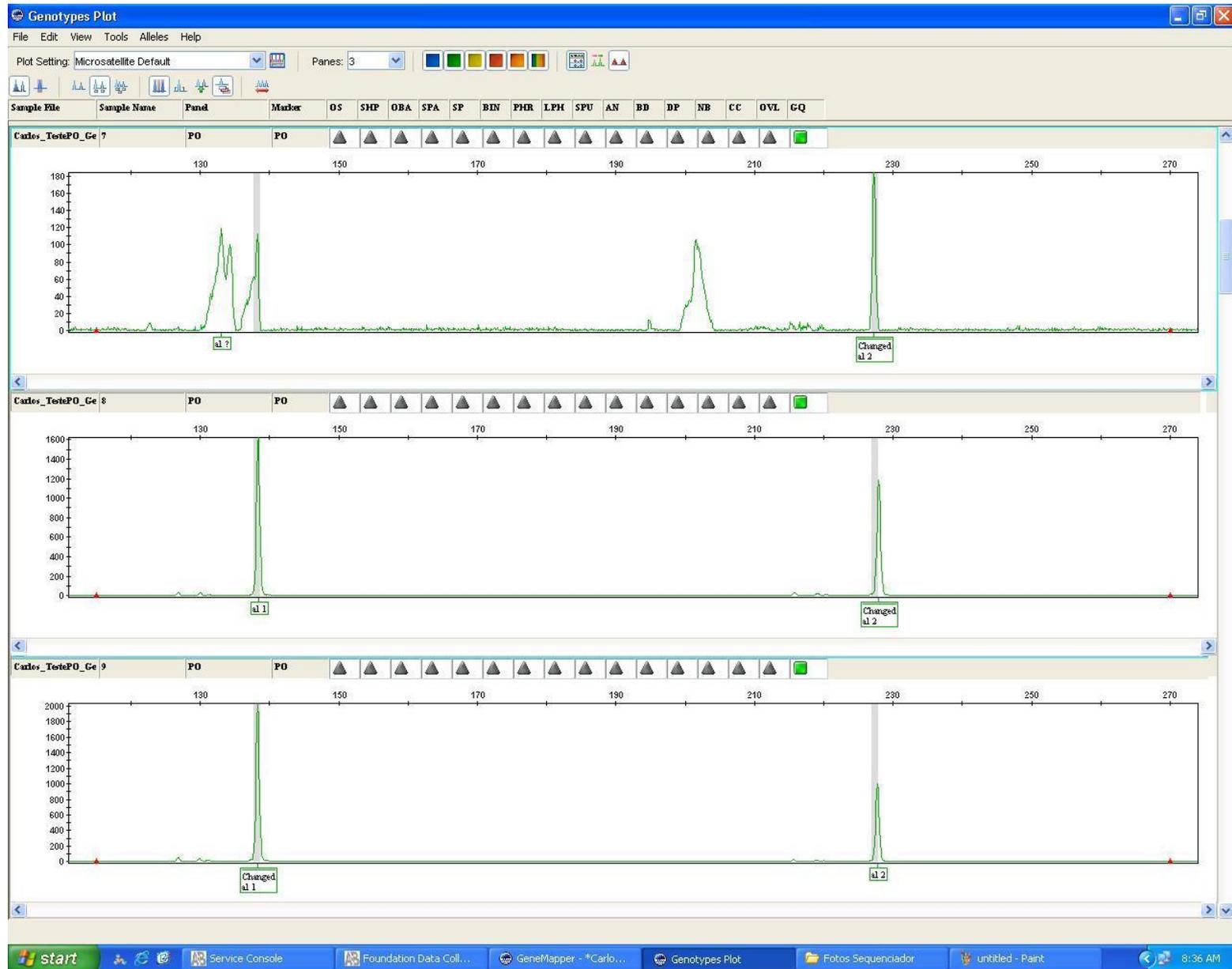
Análise de dados



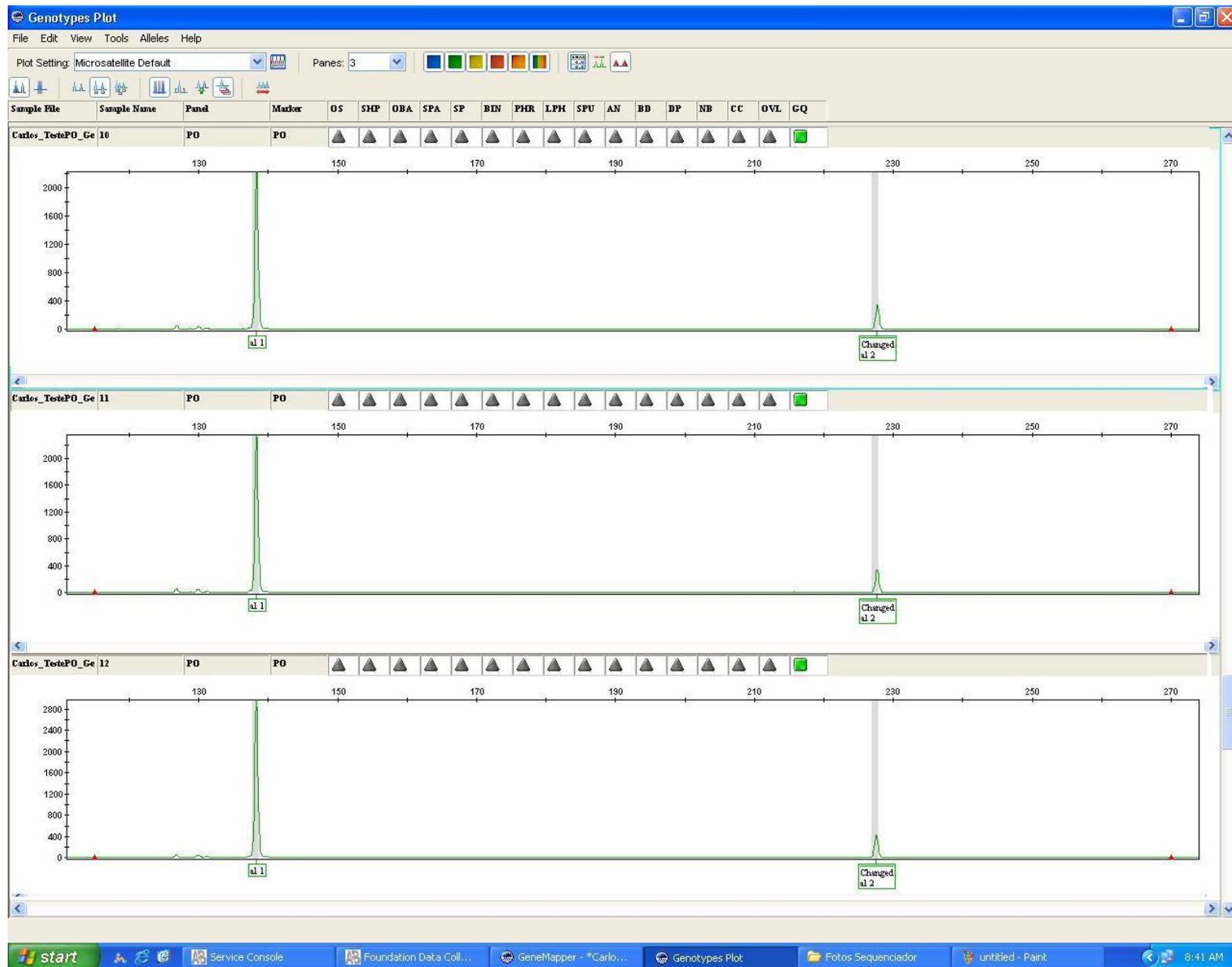
Análise de dados



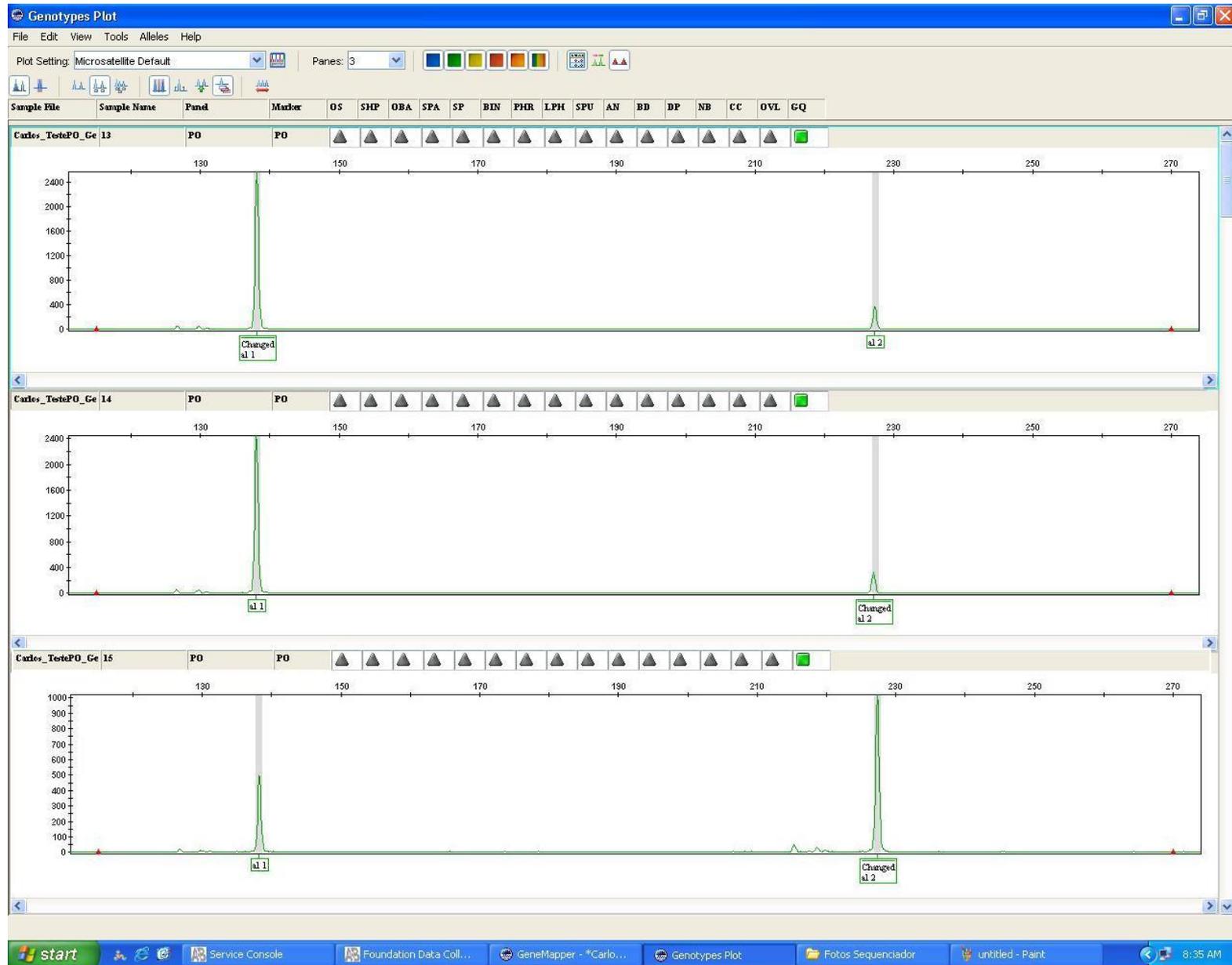
Análise de dados



Análise de dados



Análise de dados

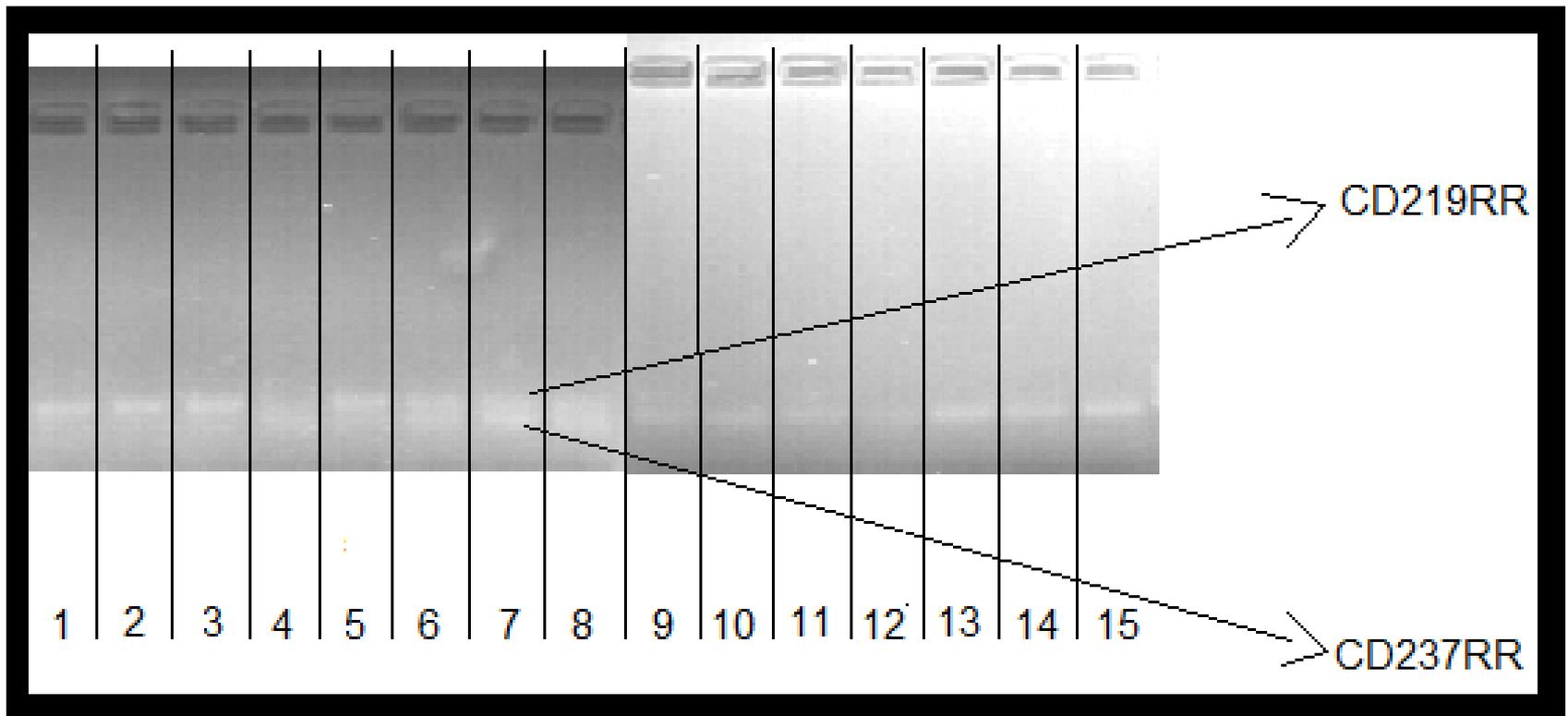


Análise de dados

Amostra	Marcador	Alelo 1	Alelo 2	Intens. Fluor.* Al. 1	Intens. Fluor.* Al. 2
1	Satt309	130.01	133.06	2394	51
2	Satt309	130.01	133.03	838	20
3	Satt309	130.01	132.95	1182	71
4	Satt309	130	132.99	2219	265
5	Satt309	130.03	133.07	1727	432
6	Satt309	130.05	133.09	1197	556
7	Satt309	129.9	132.91	885	596
8	Satt309	130.09	133.12	601	634
9	Satt309	130.07	133.1	945	1526
10	Satt309	129.99	133.05	108	1381
11	Satt309	130.01	132.95	484	3063
12	Satt309	129.91	132.99	7	88
13	Satt309	129.9	132.99	274	5073
14	Satt309	129.96	132.96	96	2080
15	Satt309	130.02	132.93	150	1556

Análise de dados

Perfil eletroforético obtido com o marcador Satt 309 separado por eletroforese em gel de agarose 3%.

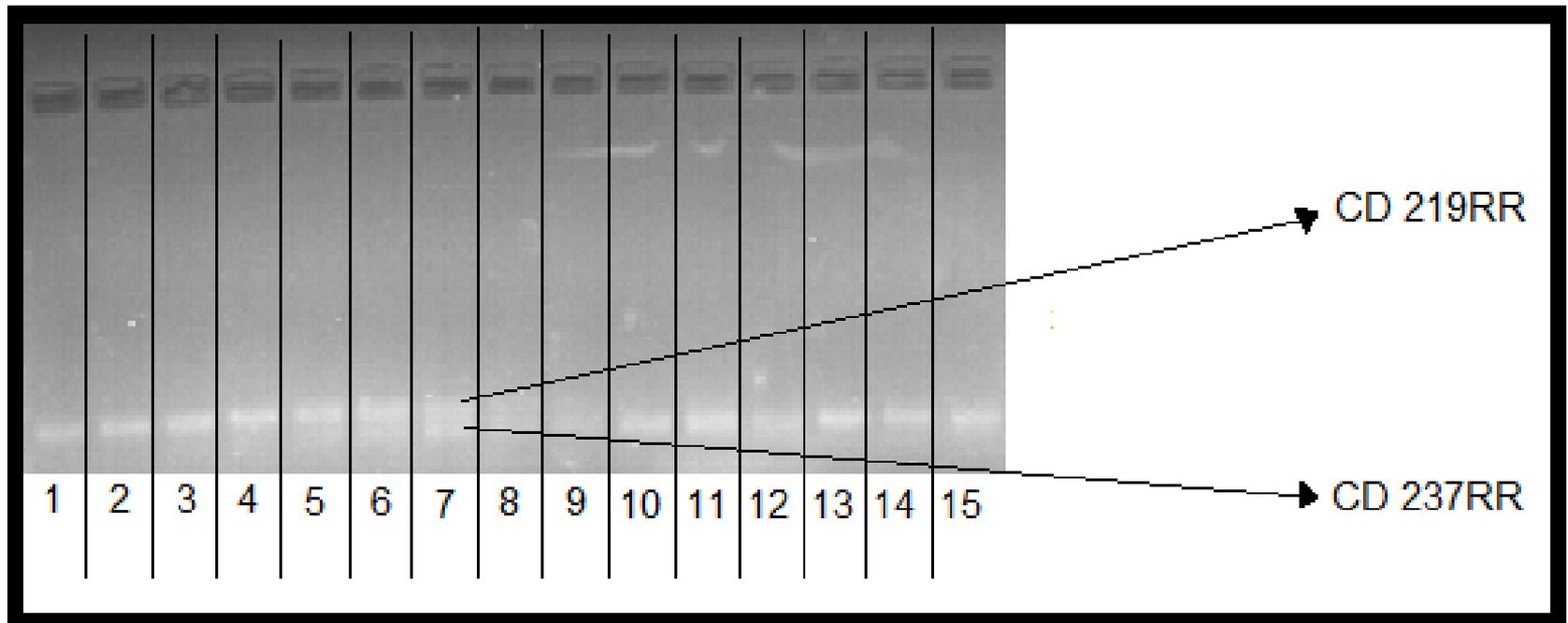


Análise de dados

Amostra	Marcador	Alelo 1	Alelo 2	Intens. Fluor.* Al. 1	Intens. Fluor.* Al. 2
1	Satt114	77.72	93.16	151	1066
2	Satt114	77.86	93.16	79	589
3	Satt114	77.77	93.21	88	425
4	Satt114	77.81	93.22	131	379
5	Satt114	77.82	93.19	266	443
6	Satt114	77.65	93.19	466	494
7	Satt114	77.81	93.22	428	285
8	Satt114	77.83	93.37	419	262
9	Satt114	77.74	93.13	660	210
10	Satt114	77.74	93.25	848	39
11	Satt114	77.74	93.14	1023	150
12	Satt114	77.63	93.25	600	26
13	Satt114	77.64	93	1029	24
14	Satt114	77.67	92.95	670	18
15	Satt114	77.67	93.27	882	22

Análise de dados

Perfil eletroforético obtido com o marcador Satt 114 separado por eletroforese em gel de agarose 3%.

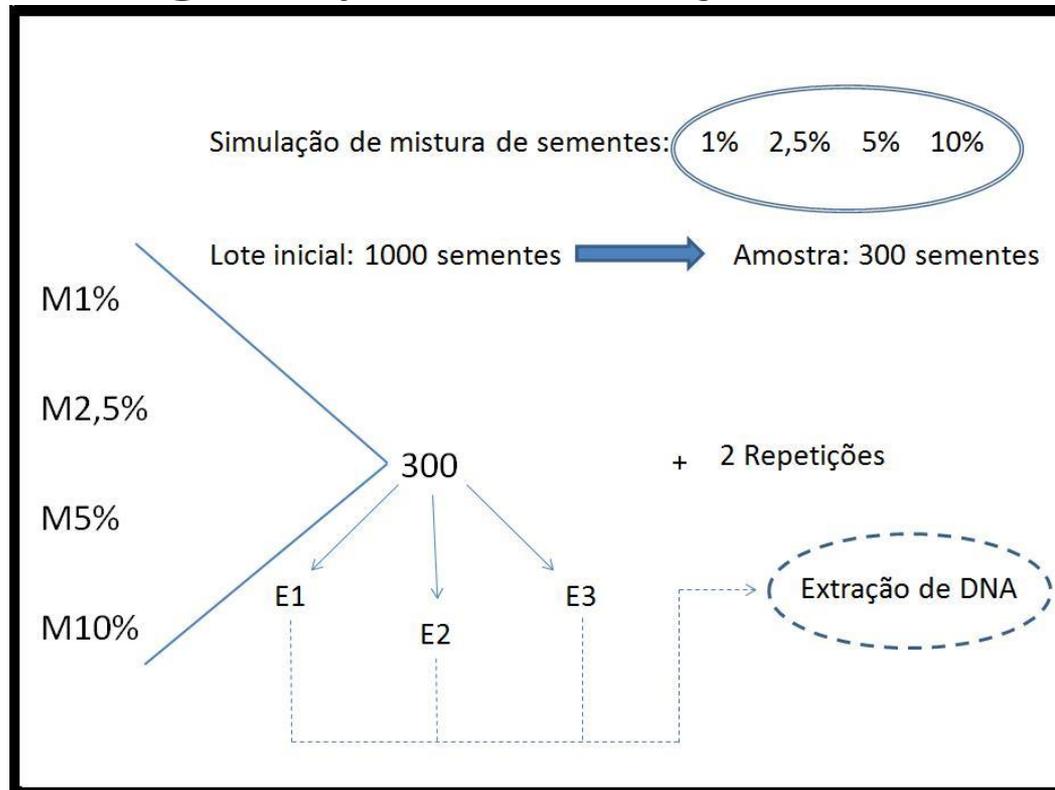


Primeira conclusão

- A eletroforese capilar é mais sensível para detecção quando comparado à eletroforese em gel de agarose 3%.
- A eletroforese capilar é método mais eficiente para detectar pequenas proporções de contaminantes em lotes de sementes.

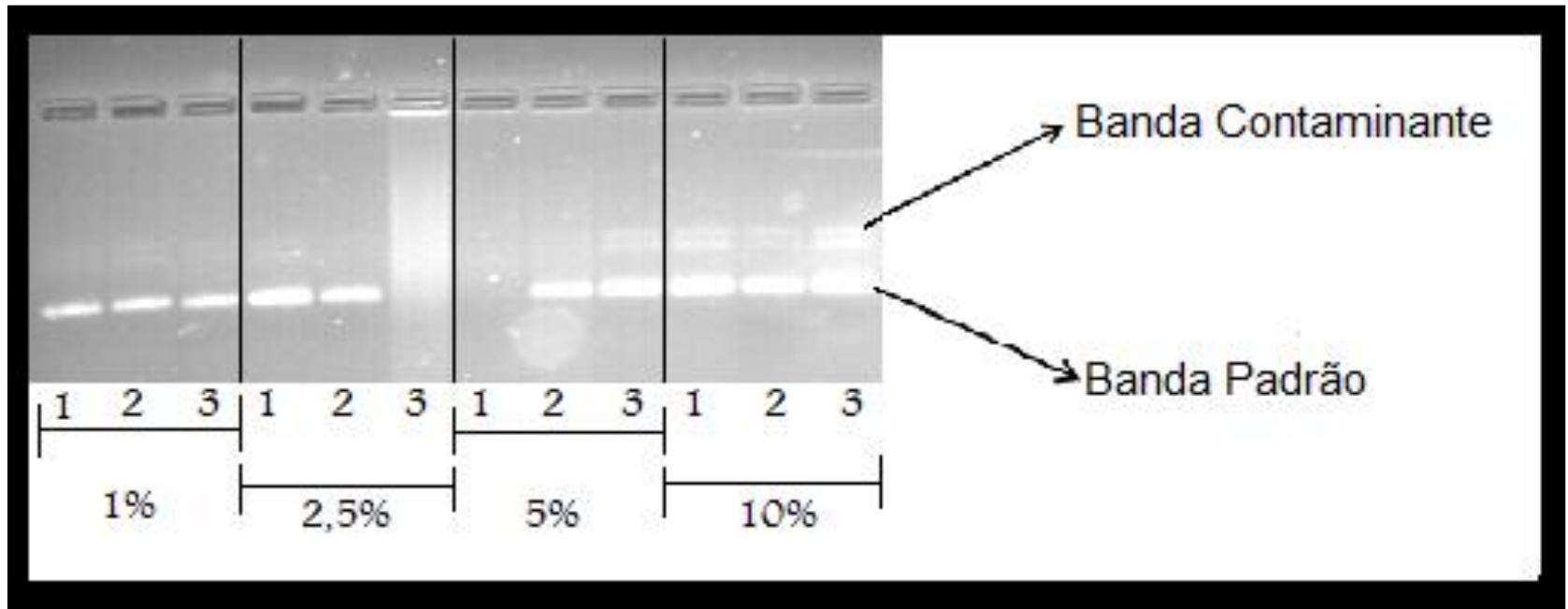
Análise de dados

E o teste de eficiência do método de amostragem para extração do DNA?



Análise de dados

Perfil eletroforético obtido com o marcador PO1-PO2 separado por eletroforese em gel de agarose 3%.



Análise de dados

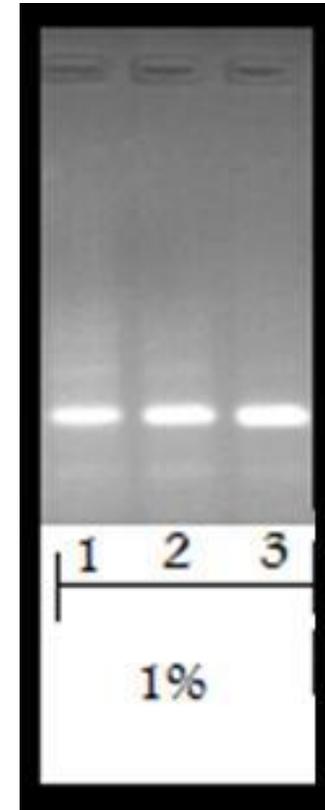
Eficiência do método de amostragem para extração de DNA (Satt114)

Contaminação	Extração	Tam. médio alelo 1	Tam. médio alelo 2	Intensidade alelo 1	Intensidade alelo 2
1%	1	138.47	227.55	7881	472
1%	2	138.20	227.38	4129	278
1%	3	138.16	227.25	4371	413
2,5%	1	138.23	227.54	8419	674
2,5%	2	138.16	227.29	4562	185
2,5%	3	138.10	226.99	5840	627
5%	1	138.10	226.95	8914	731
5%	2	138.23	227.57	5949	382
5%	3	138.19	227.71	8242	811
10%	1	138.16	227.34	8775	983
10%	2	138.16	227.42	5302	947
10%	3	138.16	227.40	5913	1120

Análise de dados



Perfil eletroforético com o marcador Satt 309 das três extrações para 1% de mistura de sementes. (capilar)

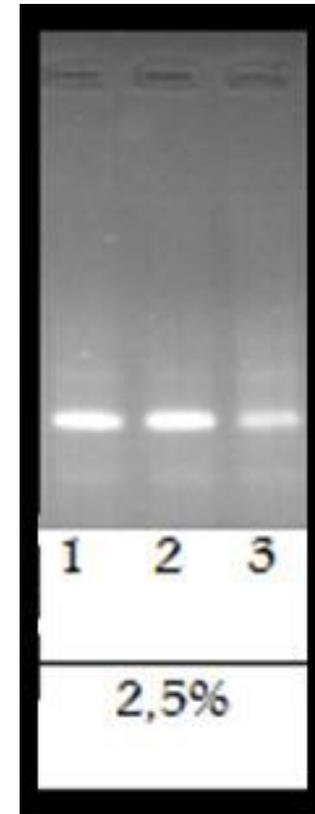


Perfil eletroforético com o marcador Satt 309 das três extrações para 1% de mistura de sementes. (gel)

Análise de dados

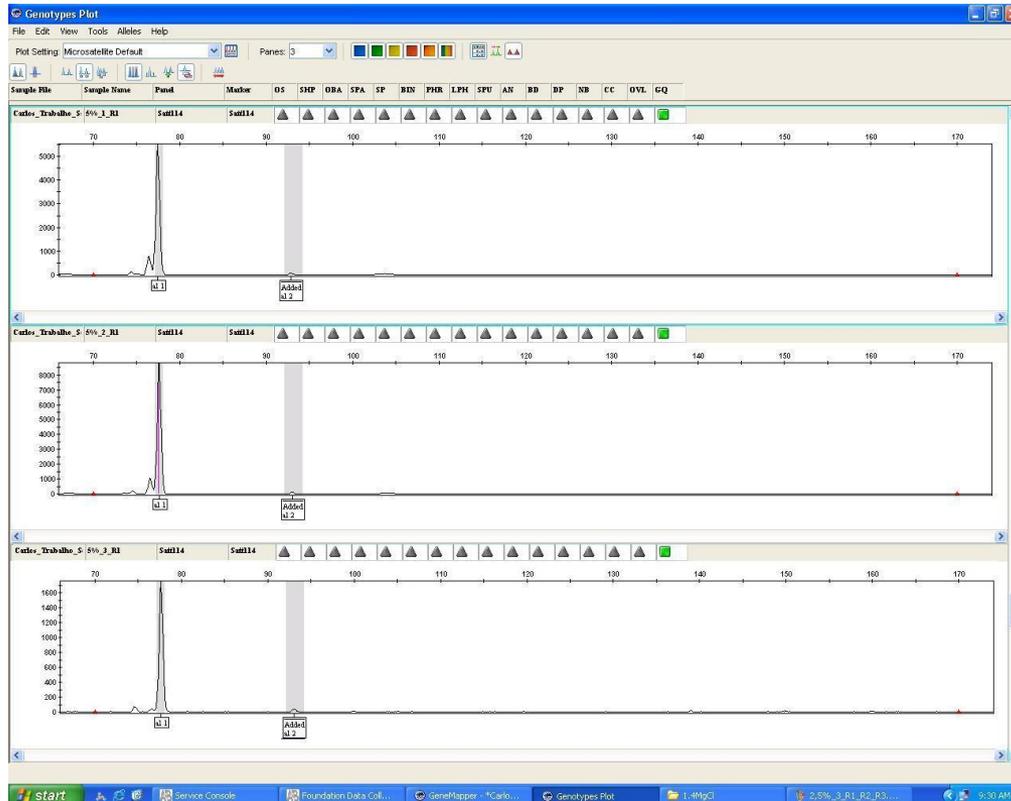


Perfil eletroforético com o marcador Satt 309 das três extrações para 2,5% de mistura de sementes. (capilar)

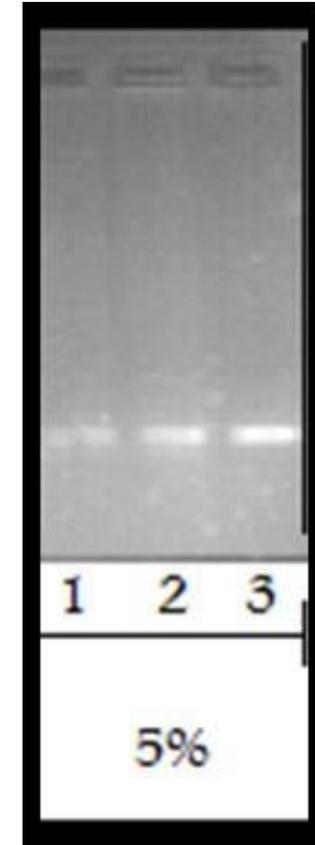


Perfil eletroforético com o marcador Satt 309 das três extrações para 2,5% de mistura de sementes. (gel)

Análise de dados

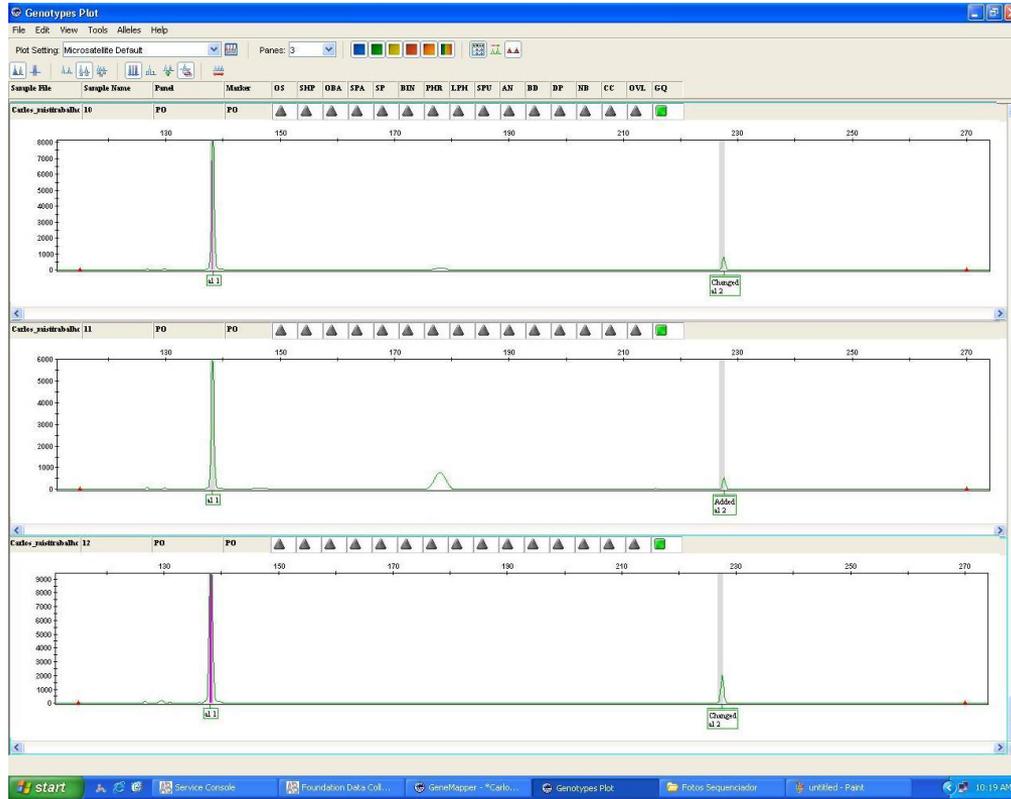


Perfil eletroforético com o marcador Satt 114 das três extrações para 5% de mistura de sementes. (capilar)

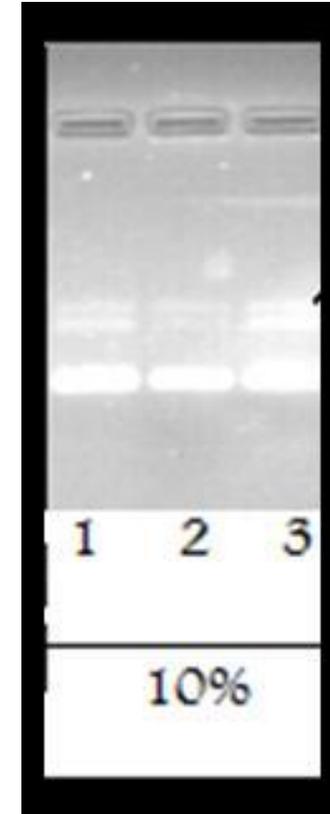


Perfil eletroforético com o marcador Satt 114 das três extrações para 5% de mistura de sementes. (gel)

Análise de dados



Perfil eletroforético com o marcador PO1-PO2 das três extrações para 10% de mistura de sementes. (capilar)



Perfil eletroforético com o marcador Satt PO1-PO2 das três extrações para 10% de mistura de sementes. (gel)

Segunda conclusão

- A estratégia de amostragem para extração de DNA utilizando bulks com 300 sementes e três extrações por bulk é eficiente e viável para todos os marcadores, visando detecção de mistura de sementes com contaminação de 1%, 2,5%, 5% e 10%.

Considerações finais

Obrigado!