



CIÊNCIA E TECNOLOGIA:
IMPLICAÇÕES NO ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO

FEPEG

F Ó R U M
ENSINO • PESQUISA • EXTENSÃO • GESTÃO

REALIZAÇÃO:



APOIO:



ISSN: 1806-549X

EFICIÊNCIA DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE TECIDO FOLIAR DE ESPÉCIES TRANSGÊNICAS DE GLYCINE MAX E ZEA MAYS

Autores: LUIZ FELIPE LOPES CAMPOS, ALINE NATALY MOREIRA SILVA, MARIA EDUARDA DAMASCENO DAVID, JOSIANE DOS SANTOS, CARLOS HUMBERTO CHAMONE CANGUSSU, MAURO APARECIDO DE SOUSA XAVIER, ALESSANDRA REJANE ERICSSON DE OLIVEIRA XAVIER

Introdução

A história contemporânea considera o desenvolvimento e cultivo de transgênicos a tecnologia agrícola mais rapidamente difundida na agricultura moderna. Dados do ISAAA (*International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications*) apontam que a área global dedicada ao cultivo de Organismos Geneticamente Modificados (OGM) aumentou muito. Nos últimos 20 anos observou-se que dois bilhões de hectares de culturas biotecnológicas têm sido cultivadas, refletindo múltiplos benefícios alcançados por pequenos e grandes agricultores em países industrializados e em desenvolvimento que utilizam culturas biotecnológicas comercialmente, compreendidos principalmente por soja, milho, algodão e canola. O cultivo e o comércio de OGM vêm crescendo significativamente em todo o mundo, no entanto, a utilização da biotecnologia na agricultura é vista de forma diferente em distintas regiões. Variedades aprovadas em um país e usadas comumente na agricultura comercial, às vezes, são proibidas em outros países (MUMM et al., 2001). Vários métodos para identificação de OGM baseados na detecção de DNA por PCR são descritos na literatura dentre os quais: PCR clássico, PCR em tempo real com sondas químicas *TaqMan* ou *SYBR Green* (CARDOSO et al., 2017).

O passo chave na análise genética de populações de plantas, através de fragmentos de DNA, é o isolamento e a purificação de quantidades suficientes de DNA de boa qualidade, ou seja, o DNA obtido deve estar íntegro, livre de impurezas e ser passível de amplificação por PCR (MAZZA E BITTENCOURT, 2000). Vários kits comerciais para extração de DNA são disponíveis no mercado, bem como uma imensa gama de protocolos para esse processo. O ideal para um protocolo de extração de DNA é o rendimento máximo que não deve afetar a qualidade e pureza do DNA com contaminantes que podem atuar ao longo das etapas de extração, reduzindo significativamente a sensibilidade da PCR (FULTON et al., 1995). Vários autores descrevem problemas no isolamento e purificação de DNA vegetal os quais são resultantes, principalmente, do co-isolamento de polissacarídeos, proteínas, substâncias fenólicas e compostos secundários (MAZZA E BITTENCOURT, 2000). Diante do exposto o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de três métodos de extração de DNA de tecido foliar em amostras transgênicas de *Glycine max* e *Zea mays*, visando posteriormente a padronização de uma metodologia baseada na detecção de DNA para rastreamento de cultivares transgênicos de soja e milho.

Material e métodos

A. Obtenção de tecido foliar

Um total de 12 sementes de diferentes linhagens de soja (*Glycine max*) e 04 linhagens de milho (*Zea mays*) gentilmente cedidas pela UFMG e Sementes Shull Ltda foram plantadas em substrato Bioplant (Bioplant Misturadora Agrícola Ltda) mantidas em condições apropriadas de luminosidade e regadas diariamente com água. Após 10 dias surgiram às plântulas que foram utilizadas como fonte de tecido foliar para o procedimento de extração de DNA.

B. Extração de DNA

A análise comparativa dos métodos de extração baseou-se nos protocolos CTAB (*cetyltrimethylammonium bromide*) (DOYLE & DOYLE, 1990), Moog e Bond (2003) conforme descrito pelos autores e kit PrepMan™ (*Applied Biosystem*) conforme recomendações do fabricante. Os ácidos nucleicos foram quantificados por eletroforese em gel de agarose a 1,0%, fotodocumentados e utilizados em reações de PCR.

C. Reação PCR para detecção dos genes lecitina e zeína

A presença dos genes lecitina e zeína (marcadores endógenos das espécies *Glycine max* e *Zea mays*) foi verificada respectivamente com os primers LECF-5' TGCCGAAGCAACCAAACATGATCGT3', LEC-R 5' TGATGGATCTGATAGAATTGAGGTT3', ZEO-2F - 5' TGCATTGTTTCGCTCTCCTAG-3' e ZEO-2R - 5' GTCGCAGTGACATTGTGGCAT-3' gerando amplicons de 419 (ABRAÃO, 2008) e 329 pares de base (primer desenhado pelos autores), respectivamente. Os primers foram sintetizados pela *GenOne Biotechnologies*. As reações foram realizadas em um mix contendo 2x *Go taq Green Master Mix*® (Promega, Corporation, USA), MgCl₂ (1,5mM), 10 µM de cada primer e 50ng de DNA em um volume final de reação de 50 µl. As condições de amplificação foram as seguintes: um ciclo inicial de desnaturação a 95° C durante 2 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95° C por 2 minutos, temperatura de anelamento a 60°C por 50 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final por 10 minutos. Os amplicons foram visualizados em gel de agarose a 1,5% corados com brometo de etídeo e fotodocumentados.



CIÊNCIA E TECNOLOGIA:
IMPLICAÇÕES NO ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO

FEPEG

F Ó R U M
ENSINO • PESQUISA • EXTENSÃO • GESTÃO

REALIZAÇÃO:



APOIO:



ISSN: 1806-549X

Resultados e discussão

Na extração de DNA optou-se pelo congelamento com nitrogênio líquido, pistilo e cadinho como método inicial de ruptura da parede celular das plântulas (Fig.1F). Entretanto, devido ao perfil de degradação de DNA observado através da eletroforese em gel de agarose optou-se por maceração com areia estéril (Fig.1E). Os três protocolos de extração de DNA testados neste trabalho geraram perfis de bandas correspondentes a ácidos nucleicos quando visualizados em eletroforese gel de agarose a 1% (Fig.1A, Fig.1B e Fig.1C). O método de extração de Moog e Bond (2003) apesar de apresentar baixo rendimento e degradação de DNA (Fig.1C) permitiu a amplificação dos genes endógenos lecitina e zeína confirmando a identificação genética das espécies *Glycine max* e *Zea mays* (Fig. 1D). Entretanto, quando rastreado a presença de outros genes marcadores de transgenia (*Cry1Ac* e *P35S*) não foi possível à detecção em amostras transgênicas (resultados não mostrados). Autores na literatura revelam a dificuldade na reprodutibilidade de protocolos para extração de DNA de espécies vegetais dificultando estudos moleculares que dependem diretamente da qualidade da extração deste ácido nucleico. A presença de polissacarídeos, fenóis e compostos secundários e o principal desafio encontrado no isolamento e purificação do DNA podendo inibir a ação da Taq polimerase na reação de PCR (MAZZA E BITTENCOURT, 2000; VIEIRA et al., 2010).

O método de extração CTAB (DOYLE E DOYLE, 1990) apesar de mais trabalhosos e necessitando maiores cuidados devido à volatilidade e toxicidade do 2-Mercaptoetanol foi o que apresentou maior rendimento e menor degradação de DNA (Fig.1A). Também foi possível utilizar com êxito esse DNA para amplificação por PCR dos dois genes endógenos marcadores das espécies vegetais aqui estudadas. Como método com maior rendimento e pouca degradação será utilizado em experimentos para detecção de genes marcadores de transgenia de milho e soja, conforme já testado com amostras de DNA extraídas pelo método Moog e Bond (2003). O método de extração utilizando o kit PrepMan™ apesar de ser o que demandou menos tempo na execução, apresentou o menor rendimento (Fig. 1B) quando comparado ao CTAB (DOYLE E DOYLE, 1990) e ao Moog e Bond (2003) (Fig.1A e Fig.1C). Não foi possível amplificar os genes endógenos lecitina e zeína com os DNAs extraídos com esse kit devido ao baixo rendimento e degradação das amostras. Além disso, o custo deste kit inviabiliza o seu uso quando se pretende trabalhar com o grande número de amostras.

Conclusão

Os protocolos Moog e Bond e CTAB foram eficientes em proporcionar a extração de DNA de espécies e *Glycine max* e *Zea mays* utilizados com êxito na PCR para identificação de marcadores endógenos para essas espécies.

Agradecimentos

Ao Programa de Iniciação Científica PROINIC da Unimontes. CNPq e FAPEMIG.

Referências bibliográficas

- ABRAHÃO, O. S. **Rastreabilidade de soja Roundup Ready® em produtos agrícolas e derivados: produção de materiais de referência e uso de marcadores AFLP**. 2008. 124p. (Centro de Energia Nuclear na Agricultura) - USP, Piracicaba, 2008.
- CARDOSO, L. et al. Métodos baseados na detecção de DNA para rastreamento de modificações genéticas em cultivares transgênicos de milho e soja. **Cadernos de Ciências Agrárias**, v. 9, n.3, p. 101-114, dez. 2017.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. J. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, n.1, p. 13-15, 1990.
- FULTON T. M. et al. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. **Pant Molecular Biology Reporter**, v. 13, n.1, p. 207-209, 1995.
- ISAAA. International service for the acquisition of agri-biotech applications. *GM Approval Database*. New York, EUA. Disponível em: <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/>. Acesso em: 02 Out. 2018.
- MAZZA, M. C. M.; BITTENCOURT, J.V.M. Extração de DNA de tecido vegetal de *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). **Boletim de Pesquisas Florestais Colombo**, n. 41, p.12-17, jul./dez. 2000.
- MOOG, R. J.; BOND, J. M. A cheap, reliable and rapid method os extracting hight-quality DNA from plants. **Molecular Ecology Notes**, v.3, n.4, p. 666-668, 2003.
- MUMM, R.H.; WALTERS, D.S. Quality control in development of transgenics crop seed products. **Crop Science**, v.41, n. 45, p.1381-1389, set./out. 2001.
- VIEIRA, F. A. et al. Métodos de extração de DNA e seleção de primers cpDNA para *Ficus bonijesulapensis* (Moraceae). **Revista Caatinga**, v. 23, n.4, p.69-74, out./dez. 2010.



CIÊNCIA E TECNOLOGIA:
IMPLICAÇÕES NO ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO

FEPEG

F Ó R U M
ENSINO • PESQUISA • EXTENSÃO • GESTÃO

REALIZAÇÃO:



APOIO:



ISSN: 1806-549X

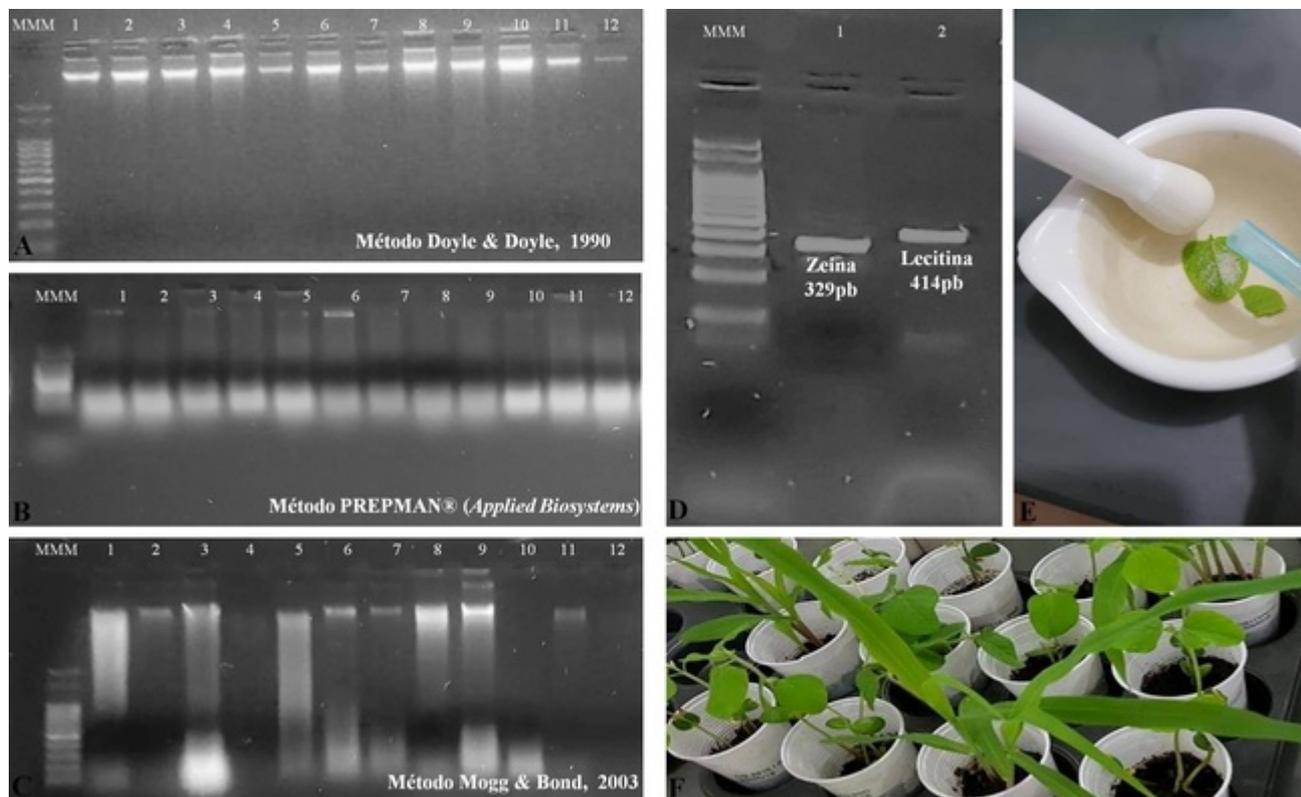


Figura 1. Resultados da padronização de metodologias para extração de DNA foliar de espécies transgênicas de *Glycine max* e *Zea mays*. **Fig1A.** Eletroforese em gel de agarose a 1,0% de 12 amostras de DNA de *Glycine Max* extraídas pelo método Doyle & Doyle, 1990. **Fig1B.** Eletroforese em gel de agarose a 1,0% de 12 amostras de DNA de *Glycine max* extraídas pelo kit PREPMAN® (*Applied Biosystems*). **Fig1C.** Eletroforese em gel de agarose a 1,0% de 12 amostras de DNA de *Glycine max* extraídas pelo método Mogg & Bond, 2003. MMM=Marcador de Massa Molecular 100pb (Luidwig). Amostras de DNA analisadas nas **Fig. 1A, 1B e 1C:** 1- Soja NS7338 IPRO; 2- Soja NS7300 IPRO; 3- Soja N5947 IPRO; 4- Soja CD2730 IPRO; 5- Soja NS5959 IPRO; 6- Soja NS7000 IPRO; 7- Soja DS5916 IPRO; 8- Soja M6210 IPRO; 9- Soja DM6563 RSF; 10- Soja BMX Ponta IPRO; 11- Soja M7110 IPRO; 12- Soja CD2728 IPRO. **Fig1D.** Eletroforese em gel de agarose a 1,5% com os produtos de PCR correspondentes a genes endógenos Lecitina e Zeína, respectivamente, marcadores de espécies de *Glycine max* e *Zea mays*. Marcador de Massa Molecular 100pb (Luidwig). 1- Milho DKB177PROIII e 2- Soja M6210 IPRO. **Fig1E.** Procedimento de maceração de tecido foliar de *Glycine max* com areia em um cadinho de porcelana. **Fig1F.** Aspecto do crescimento das espécies de *Glycine max* e *Zea mays* 10 dias após plantadas as sementes.