

Método não destrutivo para isolamento DNA de sementes de milho visando à genotipagem em larga escala

Non-destructive and high-throughput method for DNA isolation from maize seeds

Abner Souza¹
Juliana Yassitepe²
Fernanda Rausch Fernandes³

Resumo – A genotipagem em larga escala a partir de sementes oferece muitas vantagens em um programa de melhoramento, tal como facilitando o uso de marcadores de Ácido Desoxirribonucleico, da sigla em Inglês Deoxyribonucleic Acid (DNA), em um programa de Seleção Assistido por Marcadores (SAM). A extração de DNA a partir de tecido foliar requer a germinação prévia das sementes e consome bastante tempo. A remoção de parte do endosperma para a extração de DNA não compromete a porcentagem de germinação ou vigor da semente. Neste trabalho verificou-se a possibilidade de realizar a polymerase chain reaction (PCR), para um gene cópia única, enzima lisina cetoglutarato redutase/sacaropina desidrogenase, da sigla, em inglês, Lysine-ketoglutarate reductase (LKR) a partir de extrato de sementes de milho. O método testado mostrou-se eficiente para a amplificação do gene-alvo a partir do extrato de sementes, possibilitando, posteriormente, a sua aplicação na análise de várias centenas de amostras simultaneamente em um programa de genotipagem via sementes em larga escala.

Termos para indexação: milho, PCR, detecção de marcadores.

Abstract – A high throughput genotyping system offers many advantages in a breeding program such as the use of DNA markers in a marker-assisted selection program (SAM) in a simpler way. DNA extraction from leaf tissue requires prior seed germination and is often time-consuming. Removing part of endosperm from the seed had no effect on seed germination percentage or seedling vigor. In this work, the possibility of performing the polymerase chain reaction (PCR) for a single copy gene (LKR, lysine ketoglutarate reductase / saccharopine dehydrogenase enzyme) from maize seed extract was verified. The method tested proved to be efficient for the amplification of the target gene from the seed extract, in order to make possible its application in the analysis of several hundred samples simultaneously in a large-scale seed genotyping system.

Index terms: corn, PCR, marker detection.

¹ Estudante de Ciências Biológicas (Pontifícia Universidade Católica de Campinas), estagiário da Embrapa Informática Agropecuária, Campinas, SP.

² Agrônoma, doutora em Genética e Melhoramento de plantas, pesquisadora da Embrapa Informática Agropecuária, Campinas, SP.

³ Agrônoma, doutora em Fitopatologia, pesquisadora da Embrapa Informática Agropecuária, Campinas, SP.

Introdução

A busca por metodologias adequadas, simples e econômicas empregadas no preparo de DNA genômico para a amplificação via PCR a partir de pequena quantidade de tecido vegetal é cada vez maior. Métodos analíticos vêm sendo extensivamente desenvolvidos para a genotipagem em larga escala a partir de lote de sementes, e os critérios relevantes na avaliação da performance de cada teste consistem em exatidão, precisão, sensibilidade, especificidade, repetibilidade das operações e reprodutibilidade dos resultados (Bertheau et al., 2002; Liang et al., 2016). As vantagens da genotipagem a partir de sementes são muitas, destacando-se: identificação dos genótipos desejáveis antes do plantio; eliminação da necessidade de coleta e armazenamento de tecido foliar em campo e conseqüentemente do rastreamento das plantas amostradas; redução do espaço utilizado no campo, permitindo a manutenção de um número maior de populações; possibilidade de realizar a genotipagem em qualquer época do ano, entre outras. Assim, o presente trabalho teve como objetivo verificar a eficiência de um método não destrutivo de isolamento e amplificação de DNA via semente, o que permitiria uma seleção prévia dos materiais sem a necessidade do cultivo da planta para coleta de tecido foliar. Os resultados demonstram a aplicabilidade do método de extração de ácidos nucleicos a partir de sementes de milho visando à genotipagem em larga escala.

Materiais e Métodos

O teste foi conduzido com o QuickExtract Seed DNA Extraction Solution (Epicentre, Madison, WI, USA) seguindo as instruções recomendadas pelo fabricante. Foram usadas, para a análise, sementes de milho do genótipo B73. Um total de sete amostras foram testadas, a partir de sementes do genótipo B73. Cada amostra foi constituída por 2 mg de tecido de endosperma de semente, que foi macerado à temperatura ambiente com o auxílio de pistilo até a consistência de pó. A cada amostra foi adicionado um total de 100 µL de QuickExtract Seed DNA Extraction Solution e homogeneizado com Vortex.

As amostras foram aquecidas a 65°C por 6 min e, posteriormente, a 98°C por 2 min.

Imediatamente após a desnaturação, as amostras foram imersas em gelo e em seguida iniciou-se a PCR com os oligonucleotídeos para a amplificação do gene LKR, que codifica a enzima lisina cetoglutarato redutase/sacaropina desidrogenase. Para tal, além das sete amostras foi incluído um DNA genômico obtido a partir de tecido foliar do genótipo HI2 como controle positivo.

As reações de amplificação de DNA foram realizadas em volume de 50 µL, sendo 5 µL de 10X KAPA Taq Buffer, 1 µL de 10mM dNTPs, 2 µL de oligonucleotídeo forward (LKRfw: 5'-TGGACTCAGGTATGGGTTCTGCTGCTA- 3') a 10 µM, 2 µL de oligonucleotídeo reverse (LKRrv: 5' - CCGGATGGGAAGTCCAAATGTTGCTATC- 3') a 10 µM, 1 µL de MgCl₂ a 25mM, 42,8 µL de água, 0,2 µL de KAPA Taq DNA Polymerase (1U) e 1 µL de DNA. O ciclo utilizado foi 94oC/2 min, 35 ciclos de 95oC/30 s, 60oC/30 s e 72oC/1 min e extensão final a 72oC/1 min. Após a reação no termociclador (Applied Biosystems, Foster City, CA), foram acrescidos 3 µL do corante azul de bromofenol a 5 µL das amostras em gel de agarose 1% preparado com tampão Tris-Borato EDTA (TBE) com corante fluorescente para ácidos nucleicos em água e submetidos, em seguida, a eletroforese. Posteriormente, procedeu-se a fotodocumentação do gel. Os fragmentos amplificados foram encaminhados para o sequenciamento no Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD, Unicamp, Campinas) e submetidos à análise em BLASTN.

Resultados e Discussão

Na Figura 1 pode-se observar o aspecto do extrato das sementes a partir da extração com o QuickExtract Seed DNA Extraction Solution.

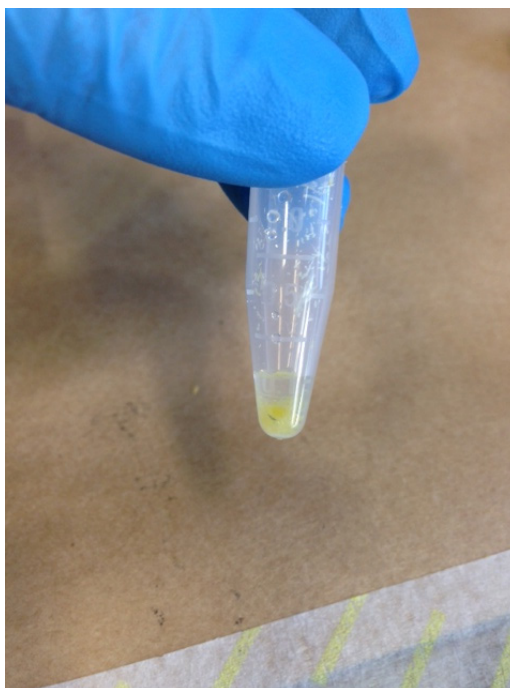


Figura 1. Aspecto do extrato de semente obtido a partir do QuickExtract Seed DNA Extraction Solution.

Em todas as amostras de extrato de sementes (1 a 6) houve a amplificação do fragmento esperado (Figura 2), assim como na amostra de tecido foliar de milho (Hi2).

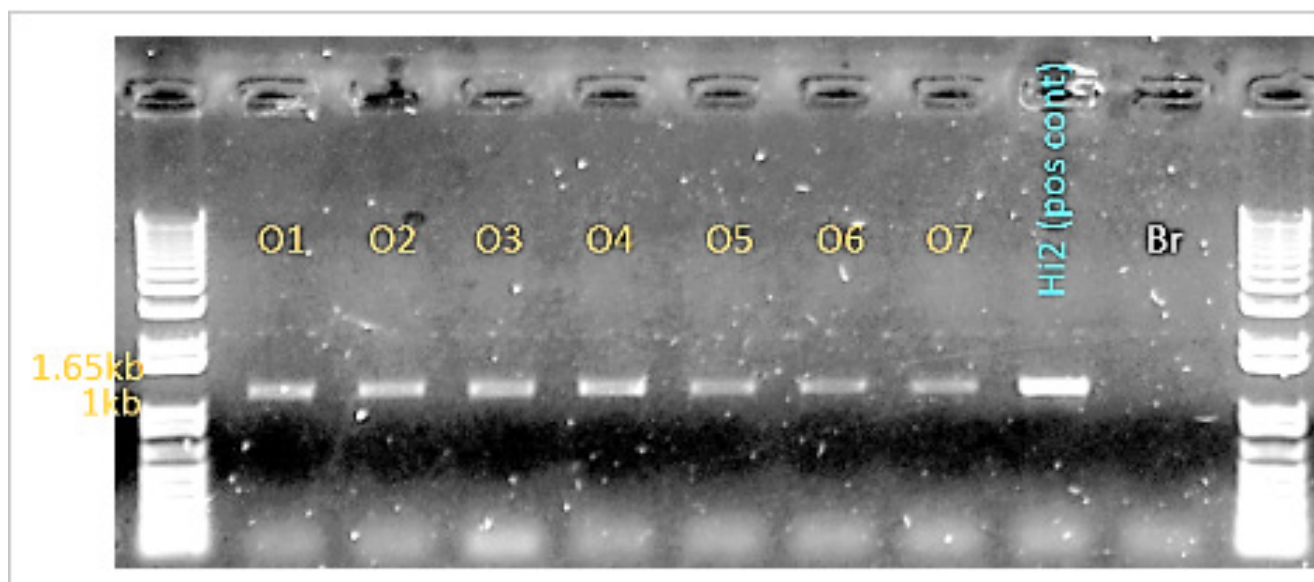


Figura 2. Gel de agarose 1% com os fragmentos amplificados do gene LKR a partir das amostras de extrato de semente. 1kb Plus Ladder; O1 a O7: amostras de extrato de semente; Hi2 (pos cont): positive control (amostra foliar de milho do genótipo HI2); Br: branco.

É importante destacar que o método proposto para a extração de DNA a partir de sementes mostrou-se satisfatório quanto à facilidade de uso, rapidez na extração e qualidade do DNA extraído. Adicionalmente, o DNA obtido no final do processo foi adequado tanto em quantidade

como em qualidade para a realização da PCR utilizando o gene LKR como alvo, com resultado semelhante à amostra obtida a partir de tecido foliar. O fragmento amplificado demonstrou elevada identidade (>95%) com o *Zea mays lysine ketoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase* (LKRSDH) gene, acesso NCBI AF271636.1 (dados não mostrados).

Considerações Finais

A utilização do extrato de semente para a genotipagem por PCR mostrou resultados satisfatórios. No experimento realizado, utilizou-se um gene cópia única como alvo (LKR) e a amplificação ocorreu conforme esperado. A utilização do kit para extração de DNA mostrou-se viável e com potencial de aplicação para a checagem rápida da presença de um determinado gene, permitindo agilidade na tomada de decisão, característica essa fundamental para aplicações como genotipagem em larga escala.

Agradecimentos

Às estagiárias Isabela de Camargo e Nathalia Barres pelo auxílio na execução dos testes em laboratório. Ao doutorando Vinícius Almeida por ceder as sementes para os testes.

Referências

BERTHEAU, Y.; DIOLEZ, A.; KOBILINSKY, A.; MAGIN, K. Detection methods and performance criteria for genetically modified organisms. **Journal of AOAC International**, v. 85, n. 3, p. 801-808, 2002.

LIANG, H.; DENG, Y.; WANG, C.; XU, X. A high-throughput DNA extraction method from rice seeds, **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 30, n.1, p. 32-35, 2016.