

Otimização de um método de extração de DNA eficiente, rápido e de baixo custo de sementes de soja para fins de seleção assistida por marcadores moleculares

Brumer, B.B.¹; Maia, M.S.¹; Dalcin, M.B.¹; Kuwahara, M.K.²; Novaes, R.M.L.²; Silva, D.C.G.²; Marcelino-Guimaraes, F.C.²; Abdelnoor, R. V.²

Universidade Estadual do Norte do Paraná/ Bolsista EMBRAPA-SOJA¹, EMBRAPA-SOJA²

Introdução

A seleção de genótipos superiores com o auxílio dos marcadores moleculares representa a perfeita associação entre o melhoramento genético convencional e as técnicas de biologia molecular disponíveis atualmente (FRONZA, 2003). A seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) é uma área promissora e pode proporcionar grandes avanços no melhoramento genético clássico (BORÉM; CAIXETA, 2006). A Embrapa tem implantado em suas unidades, vários laboratórios de seleção assistida como nas unidades de Soja, Milho e Sorgo e Arroz e Feijão. Em um programa de SAM, a extração de DNA ainda figura como um dos maiores gargalos, tanto em termos operacionais como de custos (COLLARD; MACKILL, 2008), e sua otimização é essencial para o sucesso do programa de melhoramento. Os métodos de extração de DNA comumente utilizados são de alto custo e/ou de difícil execução. Entre esses se encontram os kits comerciais de extração de DNA e os protocolos descritos por Dellaporta et al. (1983) e Doyle e Doyle, 1987. Contri (2006) conclui em seu trabalho que o método Doyle e Doyle, apesar do custo baixo, demora em torno de oito horas para ser realizado, além de, necessitar maiores cuidados devido à volatilidade e toxicidade do β -mercaptoetanol e do clorofórmio. Já o método de coluna de sílica (WIZARD) pode ser executado em até 1,5h dependendo do número de amostras, mas apresenta custo mais elevado. Portanto para contornar esse problema foi desenvolvido pelo Laboratório de Genética Molecular e Seleção Assistida (LGMSA) da EMBRAPA-SOJA um protocolo de extração de DNA de baixo custo e de rápida e fácil execução, que atende as necessidades do laboratório. O método foi denominado SAM, sendo desenvolvido inicialmente para a extração de DNA de amostras de folhas de soja, e posteriormente, adaptado para extração de DNA de sementes de soja, necessitando assim, aprimoramentos. Com isso, o presente trabalho teve como objetivo otimizar o protocolo de extração de DNA 'SAM' para extração de DNA em larga escala e a um baixo custo, em sementes de soja inteiras e moídas em diversas quantidades para atender fins de seleção assistida e às demandas do programa de melhoramento de soja e do Laboratório de Genética Molecular e Seleção Assistida da EMBRAPA-SOJA.

Material e Métodos

O presente trabalho foi realizado no LGMSA da EMBRAPA-SOJA em Londrina, Paraná. Foram utilizadas sementes oriundas de genótipos diferentes, com e sem o gene BT, provenientes do programa de melhoramento da unidade. Para a otimização da extração de DNA de sementes foram feitas modificações nas etapas e parâmetros do protocolo de extração de DNA SAM original (TABELA 1), o qual está protegido sob a forma de propriedade intelectual, e por isso, a composição de seus componentes deve ser omitida.

Tabela 1. Protocolo de extração de DNA "SAM", desenvolvido pela equipe do Laboratório de Genética Molecular e Seleção Assistida da EMBRAPA-SOJA para a extração de DNA de tecidos de folhas de soja

1ª Etapa	Adição de 50µL COMPONENTE A + 0,5% do volume total COMPONENTE C
2ª Etapa	Incubação no banho maria ou termociclador a 65°C durante 6 minutos e 95°C durante 2 minutos
3ª Etapa	Adição de 50µL COMPONENTE B e um ciclo no vortex a 1750 rpm por 1 minuto.
4ª Etapa	Diluição 1:25 das amostras extraídas.

Para atender ao objetivo proposto, o trabalho foi dividido em duas etapas, otimização da extração de DNA e otimização da maceração de sementes no aparelho Geno/Grinder 2010. Para a primeira etapa os parâmetros avaliados e as variações testadas foram: as quantidades dos componentes do protocolo de extração, as quantidades de amostras de sementes e tipos de plásticos. Os plásticos utilizados foram placas de 96 poços fundos (Deep well) de capacidade 1,5mL, 2mL, 7mL e placa de 96 poços de 0,2mL (TABELA 2). As amostras nesta etapa foram maceradas no triturador elétrico. Para a segunda etapa foi utilizado o *deep well* de 2mL e os parâmetros avaliados e as variações testadas foram: tempo de maceração, tamanho das esferas, forma de embebição da semente, quantidade de líquido usado para a embebição e forma de vedação do *deep well* (esteira, selo convencional e selo de maior aderência) (TABELA 3). Para a extração de DNA do material proveniente da maceração no aparelho Geno/Grinder foram utilizados os melhores resultados obtidos na primeira etapa para 100mg de sementes, equivalente a aproximadamente uma semente de soja inteira. Os critérios utilizados para se verificar a eficiência das modificações realizadas no protocolo de extração foram as performances dos ensaios de genotipagem na reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR) e os níveis de contaminações entre as amostras. As performances dos ensaios de genotipagem foram verificadas através das médias dos valores de *Cycle Threshold* (CT) em ensaios de quantificação absoluta com *primers* de genotipagem. O CT é o ciclo em que a amplificação é detectada através da fluorescência de uma sonda e quanto menor é o seu valor, melhor é a qualidade da amplificação e conseqüentemente da extração de DNA. As sondas utilizadas foram sonda 1 e sonda 2. A amplificação permite realizar a genotipagem das amostras e quanto maior a porcentagem de genotipagem correta, menor é o nível de contaminação entre as amostras. Os níveis de contaminações foram analisados através da genotipagem correta e incorreta das amostras e visualmente nas etapas de distribuição, maceração e agitação das amostras no vortex.

Resultados e Discussões

Primeira Etapa: Otimização da extração de DNA de sementes de soja

Inicialmente para a otimização do protocolo de extração de DNA SAM para amostras de sementes de soja foram utilizados 10mg de sementes, com 50µL de cada componente A e B, 1X de componente C e diluição 1:25, conforme Tabela 1. Entre os resultados obtidos apenas 81,3% das amostras foram amplificadas e as médias dos valores de CTs foi 38 para sonda 1 e 2 (TABELA 2). Para melhorar a qualidade da extração de DNA foram avaliados três parâmetros com duas variáveis testadas. Os parâmetros avaliados foram a quantidade de componente A, quantidade de componente C e diluição (dados não apresentados). O componente A foi reduzido para 35µL e a diluição aumentada 1:50 para minimizar a quantidade de polifenóis e polissacarídeos provenientes da constituição da semente que conseqüentemente minimizou a quantidade de DNA. O componente C foi aumentado de 1X para 10X. Entre os resultados, a diluição 1:50 reduziu a quantidade de inibidores de PCR porém reduziu também a quantidade de DNA, apresentando amostras com altos valores de CTs e baixa porcentagem de amplificação. O componente C apresentou melhores resultados para menor quantidade, 1X. Isso se deve ao fato que o aumento do componente C possa ter causado a inibição de algum dos componentes da PCR. Em relação à redução do componente A para 35µL, este apresentou resultados satisfatórios quando utilizado com 1X de componente C e diluição 1:25 amplificando 100% das amostras (TABELA 2). O uso de protocolos de extração de DNA simplificados como, que utilizam pouco material de origem, ou possuem poucos passos de purificação, tendem a produzir ácidos nucléicos com alto teor de polifenóis e polissacarídeos podendo interferir na PCR (DANTAS, 2010). Os melhores resultados obtidos para a extração de DNA de 10mg de

sementes de soja foram utilizados para iniciar a otimização do protocolo de extração de DNA SAM para maiores quantidades de sementes. Os parâmetros e suas variações testadas para a extração de DNA de sementes de soja e seus respectivos resultados estão detalhados na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros avaliados e variações testadas para a otimização da extração de DNA de sementes de soja e seus respectivos resultados

Quantidade de sementes (mg)	Plásticos	Comp. A/B (µL)	Quantidade de amostras	Média dos valores de CTs sonda1/sonda2	Amplificação das amostras (%)	Genotipagem correta (%)	Justificativas	
10 (equivalente a uma semente de soja)	Placa 96-C 0,2mL	35	32	34/34	100	100	A redução do componente A para 35µL provavelmente minimizou os contaminantes da extração apresentando melhores resultados.	
		50	32	38/38	81,3	100		
	Deep Well (1,5mL)	250	24	32/33	100	100	O tratamento com 250µL foi o único que não apresentou contaminação entre as amostras durante maceração e agitação no vortex	
		400	24	30,2/33	100	75		
	200	Deep Well (2mL)	200	24	34,4/35,4	50	50	O tratamento com 300µL foi o único que não ocorreu contaminação entre as amostras durante a maceração e agitação no vortex.
			300	48	35/32	100	100	
400			24	30,2/32	100	75		
300	Deep Well (2mL)	500	48	33,7/33,1	100	91,7	O tratamento com 500µL de cada componente A e B foi o único que ocorreu pequena contaminação entre as amostras durante a maceração e agitação no vortex.	
		600	48	29,1/30,9	100	75		
500	Deep Well (2mL)	700	48	30,5/32,5	100	87,5	Maiores quantidades de componentes A e B possibilitam melhor extração, pois na etapa de agitação no vortex o líquido envolve toda a amostra.	
		400	24	33/34	60	70		
1000	Deep Well (7mL)	1250	24	31,7/34,2	100	100	Para melhorar a qualidade da extração pode se utilizar facilitadores de PCR.	
1000	Deep Well (7mL)	2500	24	31,4/33,1	91,7	100		

As variações testadas que estão sublinhadas apresentaram os melhores resultados

Todos os tratamentos foram realizados com 1X de componente C e diluição 1:25 pois apresentaram os melhores resultados.

O método pôde ser otimizado para diferentes quantidades de sementes variando entre 10mg a 1000mg cuja extração de DNA apresentou melhores desempenhos em diferentes recipientes com diferentes quantidades dos componentes do protocolo SAM (TABELA 2). Mesmo tomando os devidos cuidados não foi possível impedir por completo a contaminação entre as amostras para a extração de 200mg de sementes, que ocorreram através do espalhamento de soja moída para os poços adjacentes durante a distribuição das amostras e agitação no vortex. Aprimoramentos estão sendo realizados para contornar esses problemas.

Segunda Etapa: Otimização da maceração no aparelho Geno/Grinder 2010

Um dos objetivos da primeira etapa dos testes foi otimizar a extração de DNA SAM para 100mg de sementes (equivalente a uma semente de soja inteira aproximadamente) e o protocolo que apresentou os melhores resultados foi 300µL de cada componente A e B, 1X de componente C e diluição 1:25 para ser utilizada na extração após a maceração no aparelho Geno/Grinder 2010. Com o objetivo de testar o processo de maceração no aparelho Geno/Grinder, para uso com o protocolo otimizado descrito acima, vários parâmetros e variações foram avaliados, e seus respectivos resultados estão listados na tabela 3.

Para a maceração no aparelho Geno/Grinder as sementes de soja foram embebidas em água destilada ou componente A, pois o tratamento com sementes sem embebição inicialmente utilizado, não macerou eficientemente as amostras. A melhor variação testada para tempo de maceração e tamanho de esferas foi de 2 minutos e 30 segundos e esferas de 5mm respectivamente, promovendo a maceração de 100% das amostras embebidas em água destilada ou componente A até a formação de material pastoso. Durante a maceração ocorreram vazamentos das amostras e com isso foram incluídos entre os parâmetros avaliados, a quantidade de líquido utilizado para a embebição e a forma de vedação da placa. A melhor variação testada para o parâmetro quantidade de líquido usado na embebição foi de 300µL de água destilada ou componente A, sendo essa a quantidade que a semente absorve

complemente o líquido adicionado e macera eficientemente as amostras. Para a forma de vedação da placa, a esteira foi a que promoveu melhor vedação entre as variações testadas. Apesar da otimização desses parâmetros, ainda ocorreram pequenos vazamentos. Para verificar se os vazamentos propiciaram erros de genotipagem das amostras, foram realizados testes de extração de DNA, sendo que o DNA obtido foi submetido à análise de RT-PCR. No teste de extração de DNA as sementes foram embebidas em 300µL de água destilada e em componente A e vedadas com a esteira. Em relação à contaminação e a média dos valores de CTs o melhor tratamento foi sementes embebidas em 300µL de água destilada. Das amostras utilizadas 81,3% foram amplificadas e dessas 100% foram genotipadas corretamente. Este teste mostrou que o pequeno vazamento observado durante a etapa de maceração não prejudicou a genotipagem correta das amostras, porém as amostras não amplificaram 100%. Em vista disso foi realizado um teste em larga escala utilizando sementes embebidas em 300µL de água destilada e vedadas com a esteira. Entre os resultados obtidos 87,5% das amostras foram amplificadas e dessas amostras 98,8% foram genotipadas corretamente, as médias dos valores de CTs para as sondas 1 e 2 foram 35,5 e 37,8 respectivamente. Estes testes atenderam ao objetivo da extração de DNA de sementes de soja em larga escala utilizando o protocolo de extração SAM e o aparelho Geno/Grinder para a maceração das sementes. Contudo, futuramente, aprimoramentos devem ser realizados a fim de contornar os problemas observados, como o vazamento das amostras durante a etapa de maceração, a não amplificação de pequena porcentagem das amostras, e os altos valores de CTs observados ao longo dos testes. Em sementes, os altos teores de polifenóis e polissacarídeos tornam-se um problema na extração do DNA, visto que esses podem inibir a PCR e resultar em altos valores de CTs. Para atenuar o efeito desses contaminantes, a utilização de facilitadores de amplificação na PCR, tais como polivinilpirrolidona (PVP), polivinil polipirrolidona (PVPP), BLOTTO (10% de leite desnatado em pó e 0,2% de NaN), dimetil sulfoxido (DMSO), soro de bovino albumina (BSA) (WILSON, 1997), pode ser uma maneira de atenuar esse problema.

Tabela 3. Parâmetros avaliados e variações testadas para a otimização do processo de maceração de sementes de soja inteiras no aparelho Geno/Grinder e seus respectivos resultados, para fins de extração de DNA de 100mg de sementes de soja.

Adesivo 1: selo convencional, adesivo 2: selo de maior aderência.

Parâmetros Avaliados	Variações testadas	Melhor variação	Justificativa
Tempo de maceração	1m	2m30s	O ciclo de 2m30s macerou 100% das sementes embebidas em água destilada e componente A até ao ponto de formação de material pastoso, após novo ciclo foi apresentado o mesmo resultado.
	1m30s		
	2m		
	2m30s		
Tamanho das esferas (mm)	4	5	As esferas de 5mm foram as únicas que maceraram 100% das amostras
	5		
	6		
Forma de embebição das sementes	Sem embebição	água ou componente A	O tratamento com sementes embebidas em água destilada e componente A apresentaram resultados menos propícios a vazamentos durante a maceração.
	Embebição com água		
Quantidade de líquido usado na embebição (uL)	Embebição com componente A	300	O volume de 300µL é o único que foi completamente absorvido pela semente e que produziu um macerado pastoso
	200		
	300		
	400		
Forma de vedação da placa	500	Esteira	A esteira foi a que promoveu a melhor vedação entre as variações testadas, porém em alguns testes de maceração ainda houve vazamentos.
	Esteira		
	Adesivo 1		
	Adesivo 2		

Conclusões

A partir das variações testadas, foi possível otimizar um protocolo eficiente, rápido e de baixo custo para a extração de DNA em larga escala de sementes de soja, tanto inteira como moída em diversas quantidades, para fins de seleção assistida por marcadores moleculares.

Adaptações futuras poderão aprimorar a qualidade do DNA extraído, bem como eliminar problemas de contaminação entre amostras.

Referências

- BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa: Universidade de Viçosa, 2006. 532p.
- COLLARD, B.C.Y.; MACKILL, D.J. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. **Philosophical Transactions Royal Society B**, Metro Manila, Philippines, v. 363, p. 557-572, fev. 2008.
- CONTRI, D.G. **Detecção de resíduos de DNA em alimentos**: avaliação da qualidade, da quantidade e da capacidade de amplificação por PCR de DNA extraído matérias-primas e produtos acabados para fins de análise em transgenia. 2006.113f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) - Faculdades de Ciências Farmacêuticas, São Paulo.
- DANTAS, A.C.M. **Extração e análise de DNA vegetal, Parte1**. Santa Catarina: Universidade Federal de Santa Catarina-Centro de Ciências Agrárias, 2010.18 p. Relatório técnico.
- DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J.B. A plant DNA minipreparation: version II. In: KORBAN, S.S. **Plant Molecular Biology Reporter**. 1. ed. Nova York, 1983. v.1, p.19-21.
- DOYLE, J.J.T.; DOYLE, J.L. **Isolation of plant DNA from fresh tissue**. 1987. v.12. p.13-15.
- FRONZA, V. **Genética da reação da soja a *Fusarium solani f.sp.glycines***. 2003. 166f. Tese (Doutorado em Genética e melhoramento de plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- WILSON, I.G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Applied Environmental Microbiology**, Irlanda, v. 63, p. 3741-3751, out.1997.