

Metódo Molecular para Certificação de Origem de Farinha de Trigo

Edna Maria Morais Oliveira¹
Andrea Matos²
Ivanilda Santos de Lima³
Thiago Ferreira⁴
Rogério Germani⁵

Introdução

A maior parte do trigo consumido no Brasil é importada, aumentando os custos de uma grande variedade de produtos fabricados com esta matéria-prima. Na tentativa de obter material genético com características agrônômicas semelhantes às do trigo e diminuir os custos para a produção e aquisição deste cereal, foi produzido o triticale, por meio do cruzamento do trigo com o centeio. Nascimento Junior et al. (2008) evidenciaram que a adição de farinha de triticale em farinha de trigo seria uma alternativa para a redução da dependência do trigo importado. Além disso, o triticale apresenta algumas características importantes para a produção: rusticidade, tolerância a solos ácidos e resistência a diversas doenças, sendo uma opção para ocupar e proteger o solo durante o inverno, além de apresentar características especiais que contribuem para a melhoria da produção de biscoitos, massas e bolos. No entanto, o seu uso na alimentação humana ainda é limitado quando comparado ao trigo, que apresenta um tipo de glúten de qualidade superior para panificação (BRUM et al., 1998; PRADO et al., 2000). As propriedades físico-químicas do trigo e triticale são similares, o que dificulta a diferenciação entre farinhas de trigo e de

triticale, que podem ser misturadas sem que o comprador consiga identificar a mistura. Devido à crescente demanda pela certificação de origem da farinha de trigo, surge a necessidade da aplicação de metodologias moleculares que garantam a ausência de triticale.

Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar variedades de trigo e de triticale usando métodos moleculares que permitem a identificação de diferenças no perfil genotípico de cada espécie, o que será importante no desenvolvimento de metodologia molecular para detecção de adição de triticale em farinha de trigo.

Material e Métodos

Amostras de trigo e de triticale

As amostras de trigo e triticale foram obtidas junto a Embrapa Trigo. Estas foram pesadas em triplicata para

Extração de DNA

¹ Engenheira Química, D.Sc. em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, edna@ctaa.embrapa.br

² Química, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, andreams@ctaa.embrapa.br

³ Nutricionista, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, ivanildalima@gmail.com

⁴ Biólogo, Mestrando em Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, thfsctaa@gmail.com

⁵ Engenheiro Químico, Ph.D. em Ciência de Cereais, pesquisador da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, germani@ctaa.embrapa.br

As amostras de trigo e de triticale foram pesadas (100 mg \pm 0,1 mg) e o DNA genômico isolado como recomendado pelo fabricante do "DNeasy plant mini kit" (Qiagen). A concentração de DNA foi determinada usando o Qubit® fluorometer and Quant-iT™ assay kits (Invitrogen). As soluções contendo os DNA de trigo e de triticale foram misturadas para a obtenção de amostras contendo diferentes concentrações de DNA de triticale (0%, 5%, 10%, 20%, 50% e 100%).

RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA)

As misturas de DNA genômico foram usadas na amplificação com o protocolo para RAPD adaptado de Araujo et al. (2003), usando o kit OPW (*Operon Technologies*). As amplificações foram conduzidas com volume final de 50 μ L para cada reação contendo 10ng de DNA genômico, mistura de dNTP (0,4mM de cada: dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 200nmoles dos primers (OPW), 1X tampão da reação 10X, 1 U *Taq* polimerase. Em seguida, a ciclagem ocorreu no termociclador GeneAmp 9.700 (*Applied Biosystems*) com 45 ciclos de pré-incubação a 94°C por 5 min; 45 ciclos (94°C por 30s – 37°C por 1 min – 72°C por 1 min); e extensão final a 72°C por 1 min. Os fragmentos foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 1,7% (150V, 150mA) por 4h. extração e purificação do DNA genômico.

Resultado e Discussão

Após a condução de PCR-RAPD usando os 20 *primers* da série W da Operon, foram selecionados os OPW 08 e OPW 15, que apresentaram os melhores resultados quanto à presença de bandas específicas de triticale. A seleção de apenas dois *primers* confirma a dificuldade em diferenciar o triticale do trigo. Na figura 1, pode ser observado que a RAPD usando o OPW8 apresenta duas bandas muito intensas no perfil genotípico do triticale que não estão presentes no genoma do trigo, quando adicionamos acima de 50% de triticale.

A reação com o OPW15 também apresenta evidência da presença de uma banda específica para triticale. No entanto, o limite de detecção da técnica RAPD ainda é muito alto (acima de 10%, pois, com 20%, já se tem uma evidência clara da presença da banda polimórfica de triticale em trigo).

Conclusão

Diante disso, é necessário o seqüenciamento das bandas identificadas como específicas para triticale para subsequente desenho de *primers* específicos e condução de PCR. Dessa forma, o limite de detecção

poderá ser diminuído, aumentando a sensibilidade de uma metodologia molecular para detectar triticale em farinha de trigo.

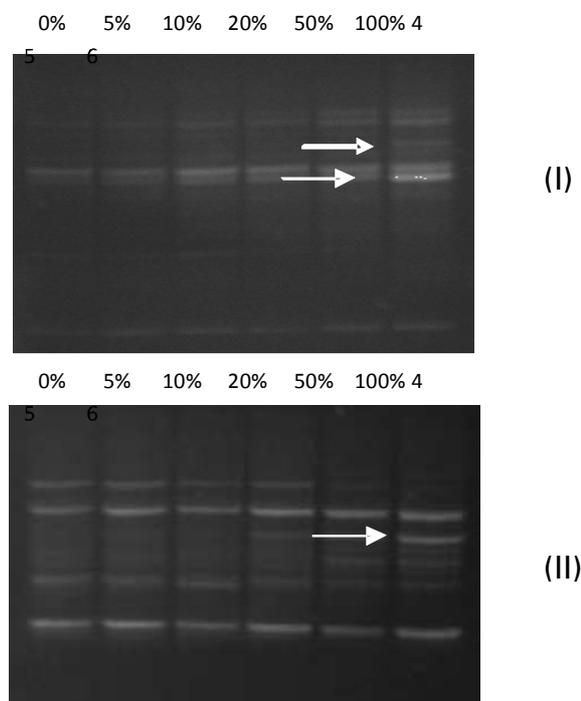


Figura 1 - RAPD das amostras com 0%, 5%, 10%, 20%, 50% e 100% de DNA de triticale em solução de DNA de trigo, usando os *primers* OPW8 (I) e OPW15 (II).

Referências

- ARAUJO, E. S. de; SANTOS, A. M. dos; AREIAS, R. G. de B. M.; SOUZA, S. R. de; FERNANDES, M. S. **Uso de RAPD para análise de diversidade genética em arroz.** Revista Agronomia, Seropédica, v. 37, n. 1, p. 33-37, 2003.
- BRUM, P. A. R. de; ZANOTTO, D. L.; GUIDONI, A. L.; LIMA, G. J. M. M. de. **Utilização do triticale em rações para frangos de corte.** Concórdia: EMBRAPA-CNPSA, 1998. 2 p. (EMBRAPA-CNPSA. Instrução técnica para o avicultor, 2).
- NASCIMENTO JUNIOR, A. do; AMABILE, R. F.; YAMANAKA, C. H.; RIBEIRO JÚNIOR, W. Q.; ALBRECHT, J. C.; SILVA, M. S. e; BIANCHIN, V.; CAIERÃO, E.; SCHEEREN, P. L. **Desempenho de genótipos de triticale no Brasil Central.** Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2008. 14 p. (Embrapa Trigo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento Online, 58). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/bp/p_bp58.htm>. Acesso em: 12 mar. 2009.
- PRADO, I. N. dos; NASCIMENTO, W. G. do; ZEOULA,

L. M.; ALCALDE, C. R.; MEDRONI, S.; VINOCUR, K.
Níveis de triticales em substituição ao milho no
desempenho zootécnico e digestibilidade aparente de
novilhas nelore confinadas. **Revista Brasileira de
Zootecnia**, v. 29, n. 5, p. 1545-1552, 2000

Comunicado Técnico, 151

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Agroindústria de Alimentos

Endereço: Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba
23020-470 - Rio de Janeiro - RJ

Fone: (0XX21) 3622-9600

Fax: (0XX21) 3622-9713

Home Page: <http://www.ctaa.embrapa.br>

E-mail: sac@ctaa.embrapa.br

1ª edição

1ª impressão (2009): tiragem (50 exemplares)

Comitê de publicações

Presidente: *Virgínia Martins da Matta*

Membros: *Marcos José de Oliveira Fonseca, Marília
Penteado Stephan, Renata Torrezan, Ronoel Luiz de
O. Godoy, Nilvanete Reis Lima e André Luis do
Nascimento Gomes*

Secretária: *Michele Belas Coutinho*

Supervisor editorial: *Comitê de Publicações*

Revisão de texto: *Comitê de Publicações*

Normalização bibliográfica: *Luciana S. de Araújo*

Editoração eletrônica: *Marcos Moulin e André Luis do
Nascimento Gomes*

Expediente