

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA A DETECÇÃO ESPECÍFICA DE SOJA TRANSGÊNICA INTACTA RR2 PRO

Rafael Fabiano Müller¹, Nilo Ikuta², Vagner Ricardo Lunge³

¹ Aluno do curso de Agronomia - Bolsista PROBIT - FAPERGS - rrafaelmuller@gmail.com

³ Professor do PPGBioSaúde - vagner.lunge@gmail.com

INTRODUÇÃO

A soja (*Glicine Max*) é a cultura agrícola brasileira que mais cresceu nas últimas três décadas e representa atualmente 49% da área plantada em grãos do país. A estimativa é que 31,46 milhões de Hectares da área de plantio corresponde a lavouras de soja na safra 2014/2015 no Brasil (CELERES, 2015).

Entre as novas tecnologias associadas ao aumento de produtividade, destaca-se o uso de sementes transgênicas. O Brasil é o segundo maior produtor de organismos geneticamente modificados (OGM) e estima-se que 29,1 milhões de hectares (93,2%) são de cultivares transgênicas (CELERES, 2014).

OBJETIVO

O presente trabalho tem como finalidade a validação de práticas de detecção de genes presentes no DNA da soja. Tendo como meta a detecção dos genes exógenos responsáveis pela expressão da resistência à molécula de herbicidas a base de glifosato, presentes nas cultivares transgênicas Roundup Ready e Intacta RR2 PRO.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para o desenvolvimento da pesquisa foram utilizadas práticas de extração do DNA feita a partir de um protocolo do método de sílica, partindo de amostras de plântulas e sementes, PCR em tempo real para experimentos quantitativos, Para testar os novos primers utilizados na detecção de soja RR2 foram feitos experimentos, partindo de uma reação aberta, onde o mix é preparado durante o processo de amplificação, PCR convencional e eletroforese em gel de poliacrilamina para experimentos qualitativos e aferimento das temperaturas de ciclagem.

Foram obtidas 45 amostras de soja, sendo 2 amostras de cultivares convencionais, 29 amostras de cultivares transgênicas RR, 12 amostras de cultivares transgênicas Intacta e duas amostras não identificadas (Tabela 1).

Tabela 1: Referencia as amostras e resultados dos experimentos realizados para lectina e para RR feitos a partir de PCR em tempo real, e resultados de experimentos qualitativos em eletroforese para RR2.

AMOSTRA	DESCRIÇÃO	EVENO	LECTINA	RR	RR2 qualitativo
SJR008	Vanguarda 6060	RR2	26.04	Negativo	Positivo
SJR010	8849 INTACTA	RR2	26.87	Negativo	Não realizado
SJR012	SYN 13670 IPRO INTACTA	RR2	26.5	Negativo	Positivo
SJR013	SYN 13671 IPRO INTACTA	RR2	23.49	Negativo	Não realizado
SJR015	SYN 13850 IPRO INTACTA	RR2	24.57	Negativo	Positivo
SJR016	SYN 13561 IPRO INTACTA	RR2	24.94	Negativo	Positivo
SJR022	SYN1 360C IPRO INTACTA	RR2	26.3	Negativo	Não realizado
SJR023	SYN 13870 IPRO INTACTA	RR2	23.68	Negativo	Não realizado
SJR025	SYN1378C IPRO INTACTA	RR2	22.91	Negativo	Não realizado
SJR027	SYN1 366C IPRO INTACTA	RR2	23.27	Negativo	Não realizado
SJR028	SYN 1359S IPRO INTACTA	RR2	24.02	Negativo	Não realizado
SJR029	SYN 13610 IPRO INTACTA	RR2	24.26	Negativo	Não realizado
SJR001	Semente Orgânica	Semente orgânica	22.26	Negativo	Negativo
SJR007	RR1 cultivar Força	RR	22.72	Negativo	Não realizado
SJR009	CD 235 RR	RR	25.73	25.19	Não realizado
SJR011	DON MARIO 7.0i RR	RR	26.53	26.35	Não realizado
SJR014	SYN 1387 RR	RR	25.34	25.44	Não realizado
SJR017	SYN 9078 RR	RR	26.49	29.2	Não realizado
SJR018	SYN 1152 RR	RR	24.78	24.04	Não realizado
SJR019	SYN 1279 RR	RR	25.67	25.36	Não realizado
SJR020	SYN 1080 RR	RR	26.78	28.25	Não realizado
SJR021	SYN 1059 RR	RR	25.31	25.02	Não realizado
SJR024	SYN 1157 RR	RR	25.68	29.12	Não realizado
SJR026	SYN 1285 RR	RR	25.09	29.96	Não realizado
SJR030	SYN9070 RR	RR	30.33	32.87	Não realizado
SJR031	SYN 1183 RR	RR	27.9	29.30	Não realizado
SJR032	NK 7059 RR	RR	25.34	27.15	Não realizado
SJR033	SYN 1283 RR	RR	23.76	28.21	Não realizado
SJR034	SYN 1288 RR	RR	23.86	24.49	Não realizado
SJR035	SYN 1163 RR	RR	22.98	23.59	Não realizado
SJR036	SYN 1281 RR	RR	22.7	23.71	Não realizado
SJR037	SYN 1385 RR	RR	23.73	24.91	Não realizado
SJR038	SYN 1257 RR	RR	22.1	22.4	Não realizado
SJR039	SYN 1363 RR	RR	23.45	24.72	Não realizado
SJR040	SYN 1258 RR	RR	22.88	24.1	Não realizado
SJR041	SYN 1158 RR	RR	22.72	23.36	Não realizado
SJR042	SYN 1365 RR	RR	22.68	24.09	Não realizado
SJR043	Produto alimentar	Convencional	23.25	Negativo	Negativo
SJR044	6663 RSF	RR	24.43	23.61	Negativo
SJR045	Grão para Ração	RR	23.81	22.77	Negativo
SJR046	5953 RSF	RR	22.02	21.51	Negativo
SJR047	NS 4823	RR	22.89	22.48	Negativo
SJR048	DON MARIO 5.9 I	RR	24.9	24.3	Negativo
SJR049	NS 6262	RR	22.96	22.29	Negativo
SJR050	Sem identificação	Desconhecido	23.35	Negativo	Positivo

Figura 1. Gráfico obtido no oitavo experimento no Real Time testando a positividade para o gene da Lectina.

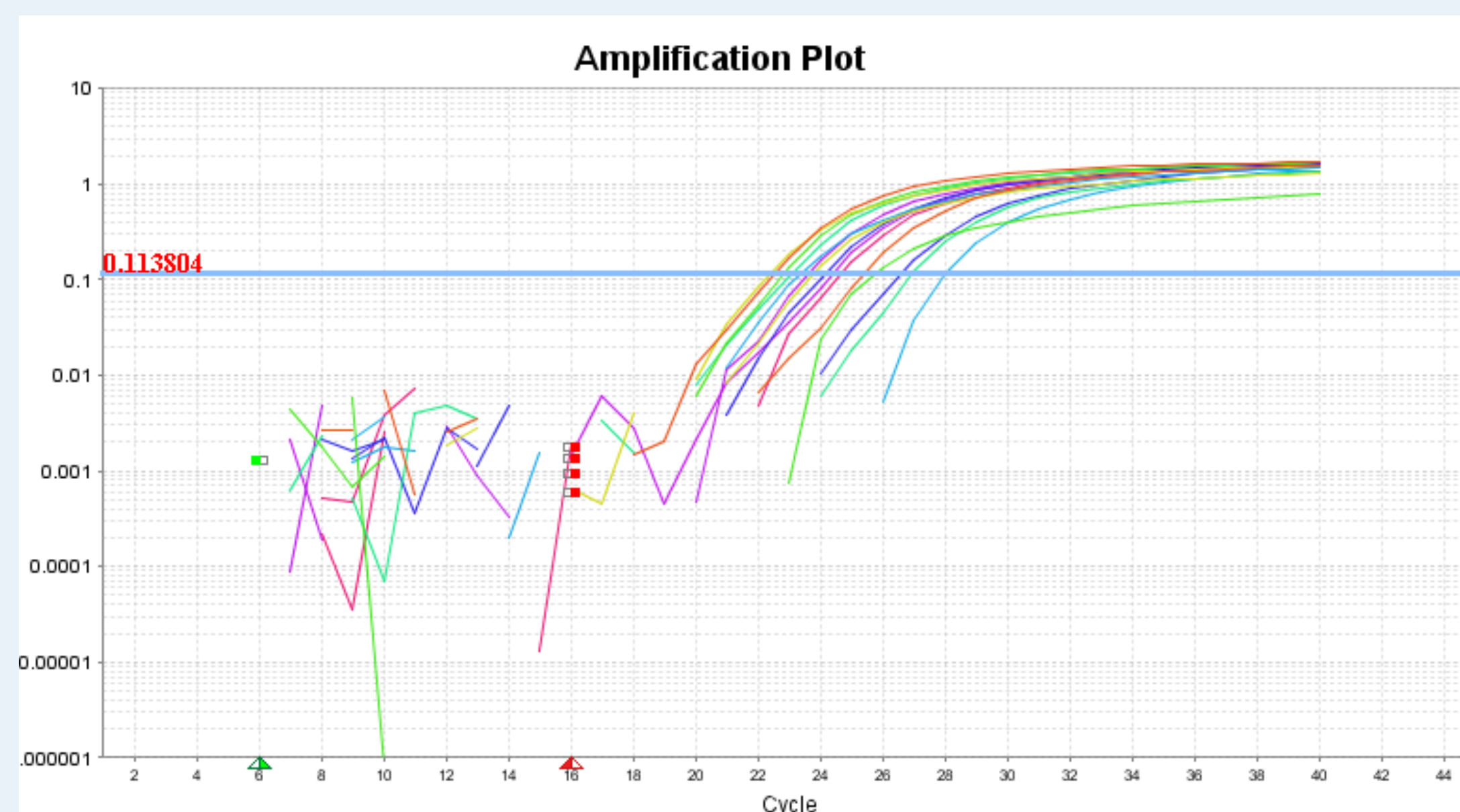
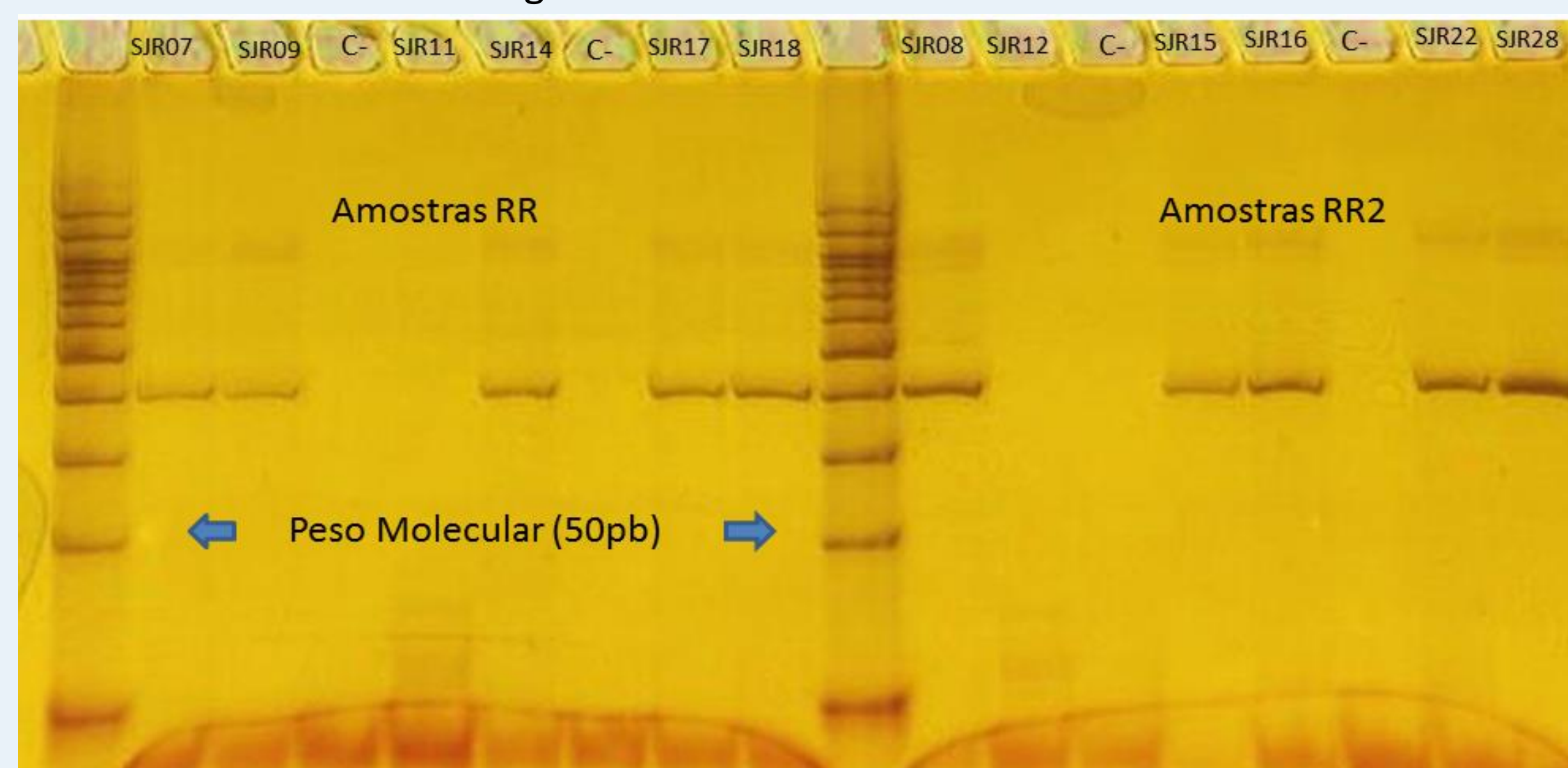


Figura 2. Gel de poliacrilamina obtido do décimo primeiro experimento para testes das condições de temperaturas para a amplificação qualitativa dos primers M1F e M2R, testados em amostras transgênicas RR e RR2.



RESULTADOS

Até a elaboração deste trabalho foram feitos testes com 45 amostras com primers e sondas que possibilitam detectar os genes de lectina e CP4-EPSPS de soja RR, sendo: 2 amostras de semente não transgênicas, 12 de semente Intacta e 29 de semente RR,

Mostrando resultados satisfatórios para os dois métodos de extração utilizados, e apontando números de Ct mais baixos para as amostras extraídas diretamente da semente. A detecção para os primers ocorreu como esperado, tendo detectando todas as amostras para os primers específicos para lectina, e detectar apenas amostras de semente RR para os primers específicos para o gene CP4-EPSPS uma das amostras de grão sem identificação apresentou CT para o mix de detecção para CP4-EPSPS enquanto a outra amostra não (Tabela 1).

Os experimentos qualitativos com os primers M1F e M2R apontaram na detecção em gel de poliacrilamina amplificação para as amostras RR2 testadas, enquanto não apresentaram amplificação para as amostras convencionais e RR testadas(Tabela 1).

CONCLUSÕES

Os testes para a Soja Roundup Ready se mostraram eficientes e confiáveis, e também o processo de extração de DNA diretamente da semente apresentou bons resultados. Há a necessidade de realizar-se novos experimentos com os primers para RR2 afim de aferir a técnica de detecção para DNA de soja Intacta RR2 PRO, para a validação do método.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CELERES 2014. Informativo sobre biotecnologia, utilização de soja transgênica (RI/TH) no Brasil <http://www.celeres.com.br/wordpress/wp-content/uploads/2014/12/IB1403.pdf>. Acesso em 02 de agosto de 2015.
CELERES 2015. Estimativa de produção brasileira de soja safra 2014/2015 <http://celerres.com.br/ic15-07-projecao-de-safra-soja-julho-2015/>. Acesso em 02 de Agosto de 2015.