



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

Rafael Fabiano Müller¹
Vagner Ricardo Lunge²
Nilo Ikuta²

RESUMO

O presente trabalho tem como finalidade a validação de práticas de detecção de genes presentes no DNA da soja (*Glicine Max*), que é a mais difundida cultura agrícola em território brasileiro. 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.

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 feitos testes com 45 amostras para detectar os genes de lecitina e CP4-EPSPS de soja RR, sendo: 2 amostras de semente convencional, 12 de semente Intacta e 29 de semente RR, mostrando resultados satisfatórios, uma das amostras de grão sem identificação apresentou CT para o mix de detecção para RR. Os experimentos qualitativos detectaram as amostras RR2 testadas até então.

Palavras-chave: Transgênicos; Soja; PCR; Intacta; Roundup Ready;

INTRODUÇÃO

O Brasil tem uma extensa área territorial aproveitável e é um dos maiores produtores mundiais de alimentos de origem vegetal. A soja 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).O grão de soja é componente essencial na fabricação de rações animais e com uso crescente na alimentação humana (MAPA 5).

Recentemente a cultura da soja teve incrementos de produtividade associado aos avanços tecnológicos, ao manejo e a eficiência dos produtores. Entre as novas tecnologias, 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

1 Aluno do curso de graduação Agronomia – Bolsista PROBIT/FAPERGS – rrafaelmuller@gmail.com

2 Professor do PPGBioSaúde – vagner.lunge@gmail.com

(93,2%) são de cultivares transgênicas (CELERES, 2014). Atualmente são cinco os eventos transgênicos aprovados para lavouras comerciais de soja pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBIO) em território brasileiro: A-2704-12 (Liberty Link), A5547-127 (Liberty Link), BPS-CV127-9 (Cultivance) e GTS-40-3-2 (RR, *Roundup Ready*), BtRR2Y (Intacta RR2 PRO)(CIB, 2015). A variedade Intacta RR2 PRO foi a mais recentemente introduzida após sua liberação pela CTNBIO (em 2010) e está em seu segundo ano de plantio comercial. Nesta variedade, existe a combinação dos eventos MON 87701 e MON 89788 que definem as características de resistência a insetos da ordem das lepidópteras e tolerância a herbicidas à base de glifosato, respectivamente. O evento MON 87701 possui o gene *CryIAc*, oriundo de *Bacillus thuringiensis*, enquanto o evento MON 89788 possui o gene *cp4 epsps*, oriundo de *Agrobacterium tumefaciens* mas que teve sua seqüência bastante modificada artificialmente para aumento da expressão da enzima correspondente.

A tendência é que a área de cultivo de soja Intacta aumente gradativamente, pois a combinação das características transgênicas facilita o manejo, reduz o tempo gasto em operações na lavoura e aumenta a produtividade. Na safra 2014/2015 o cultivo desta variedade correspondeu à 16,5% da área total de plantio de soja no Brasil (CELERES, 2014).

Diante do crescimento na produção de OGMs, políticas de controle na comercialização de produtos alimentícios produzidos com ingredientes GM foram adotadas em inúmeros países (COBAIASHI, 2012). No Brasil a regulamentação sobre a rotulagem está prevista no Decreto nº 4680/03, o qual determina que todos alimentos ou ingredientes destes que contiverem acima de 1% de OGM em sua composição final, devem ser rotulado como produto transgênico (CIB).

Devido à necessidade de rotulagem de OGM pela regulamentação vigente em território brasileiro e na garantia do direito à informação e escolha no momento da compra, o presente trabalho visou o desenvolvimento e validação da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a detecção específica de soja transgênica Intacta RR2 PRO.

METODOLOGIA

Amostras

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 de grãos não identificados (Tabela 1).

Extração de DNA

Os procedimentos para a extração do DNA partiram primeiramente da germinação das sementes, passando para a etapa de maceração das plântulas, e recolhimento das amostras em tubos Eppendorf. A extração do DNA é feita a partir de um protocolo do método de sílica, no qual, por causa de sua carga negativa, o DNA se adere à sílica e após algumas lavagens é transferido para um eluidor.

Posteriormente, a fim de otimizar o processo de extração, foram feitas mudanças na metodologia, passando a fazer extração diretamente da semente, que era colocada em banho-maria com água destilada durante 20 minutos antes de ser macerado para prosseguir com o processo de extração.

Tabela 1: Amostras e resultados dos experimentos de amplificação para o genes constitutivo da soja (lectina) e eventos transgênicos (RR e RR2).

AMOSTRA	DESCRIÇÃO	EVENTO	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	SYN1360C IPRO INTACTA	RR2	26.3	Negativo	Não realizado
SJR023	SYN 13870IPRO INTACTA	RR2	23.68	Negativo	Não realizado
SJR025	SYN1378C IPRO INTACTA	RR2	22.91	Negativo	Não realizado
SJR027	SYN1366C 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	22.78	Não realizado
SJR009	CD 235 RR	RR	25.73	25.19	Não realizado
SJR011	DON MARIO 7.Oi 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

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real

Os primeiros testes foram realizados para detecção da lecitina utilizando os primers: Le1n02F(5'-GCC CTC TAC TCC ACC CCA-3'), Le1n02R (5'-GCC CAT CTG CAA GCC TTT TT-3') e sonda Le1probe (5'-FAM-AGC TTC GCC GCT TCC TTC AAC TTC AC-MGB-3' gerando fragmentos com 120 pares de base, e para detecção do CP4-EPSPS utilizou-

se os primers RRS01F (5'-CCT TTA GGA TTT CAG CAT CAG TGG-3'), RRS01R(5'-GAC TTG TCG CCG GGA ATG-3') e sonda RRS probe (5'-FAM-CGC AAC CGC CCG CAA ATC C-MGB-3') que gera um fragmento de 117 pares de base. A parte prática da amplificação tem início ao misturar o DNA extraído a um mix específico composto por: H₂O milli-Q, Tampão 10x, MgCl₂, DNTP, Primer M1F, Primer M2R, Taq polimerase e a amostra de DNA, em um volume final de 30µL que após é colocado no StepOne Plus (SOP), aparelho que proporciona as condições de temperatura ideais para o trabalho da enzima. As condições de ciclagem foram: 1 ciclo a 95°C por 3 minutos, e 40 ciclos com temperaturas de 95°C por 15 segundos, 60°C por 60 segundos. A detecção é feita praticamente de forma simultânea a amplificação, por meio de gráficos e número de Ct. A leitura das informações obtidas é feita de forma simples, visto que, se apresentar número de Ct a amostra é positiva, caso contrário, negativa. A quantificação também é feita a partir do número do Ct, assim, quanto menor o valor detectado, maior a concentração da amostra.

Reação em cadeira da Polimerase qualitativa com detecção por eletroforese

Para testar os novos primers M1F (5'-TTC CTG CTC CAC TCT TCC TT-3') e M2R (5'-TTG AGG CTT TGG ACT GAG AAA A-3') (LIU, 2009) que geram fragmentos de 205 pares. Foram feitos experimentos, partindo de uma reação aberta, onde o mix é preparado durante o processo de amplificação, sendo composto por H₂O milli-Q, Tampão 10x, MgCl₂, DNTP, Primer M1F, Primer M2R, Taq polimerase e a amostra de DNA, em um volume final de 30µL. Na sequência o material era posto no SOP para sua amplificação. As condições de ciclagem foram: 1 ciclo de 95°C por

5 minutos, 35 ciclos com temperaturas de 95°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, e um último ciclo de 72°C por 7 minutos. Após o final da ciclagem de temperaturas no aparelho, as amostras eram levadas para fazer a detecção em gel de poliacrilamina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Até a elaboração deste trabalho foram feitos testes com 45 amostras com primers e sondas que possibilitam detectar os genes de lecitina 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 lecitina, 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).

A perspectiva para os próximos experimentos é aferir o método de detecção para soja RR2, visando otimizar a reprodutibilidade e confiabilidade do método, dando continuidade as análises de amostras comerciais e cultivares.

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.

REFERÊNCIAS

CELERES, 2014. **Informativo sobre biotecnologia, utilização de soja transgênica (RI/TH) no Brasil.** Disponível em <<http://www.celeres.com.br/wordpress/wp-content/uploads/2014/12/IB1403.pdf>>. Acesso em 02/08/2015.

CELERES, 2015. **Estimativa de produção brasileira de soja safra 2014/2015.** Disponível em <<http://celeres.com.br/ic15-07-projecao-de-safra-soja-julho-2015/>>. Acesso em 02/08/2015.

CIB. **Conselho de Informações sobre Biotecnologia.** Eventos Aprovados. Disponível em <<http://cib.org.br/biotecnologia/regulamentacao/ctnbio/eventos-aprovados/>>. Acesso em 02/08/2015.

COBAIASHI D.M., **Avaliação da Metodologia de detecção e quantificação por PCR em tempo real de organismos geneticamente modificados em alimentos: aspectos de produção, processamento e amostragem, SP.** São Paulo, 87p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos, Área de Bromatologia) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. 2012.

Liu J; Guo J; Zhang H; Li N; YANG L; Zhang D; Development and In-House Validation of the Event-Specific Polymerase Chain Reaction Detection Methods for Genetically Modified Soybean MON89788 Based on the Cloned Integration Flanking Sequence. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, n. 22. 2009.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Situação da cultura da soja no Brasil.** Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/soja>>. 2015.