

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Centro de Energia Nuclear na Agricultura

OTHON SILVA ABRAHÃO

Rastreabilidade de soja Roundup Ready® em produtos agrícolas e derivados: produção de materiais de referência e uso de marcadores AFLP

Piracicaba - SP
2008

OTHON SILVA ABRAHÃO

Engenheiro Agrônomo

**Rastreabilidade de soja Roundup Ready® em produtos agrícolas e derivados:
produção de materiais de referência e uso de marcadores AFLP**

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Siu Mui Tsai

Piracicaba – SP
2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Abrahão, Othon Silva

Rastreabilidade de soja Roundup Ready[®] em produtos agrícolas e derivados: produção de materiais de referência

e uso de marcadores AFLP / Othon Silva Abrahão; orientadora Siu Mui Tsai. - - Piracicaba, 2008.

124 f. : fig.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Alimentos transgênicos 2. Análise de alimentos 3. Marcador molecular 4. Qualidade dos alimentos I. Título

CDU 577.21:633.34

À Roberta, companheira de vida, de muitos caminhos, com todo amor

DEDICO

Aos meus queridos pais, Magda e Darcy e às
minhas amadas filhas, Ana Luísa e Clara, com carinho

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Profª. Drª. Siu Mui Tsai pela confiança, apoio, amizade e pelo exemplo constante de coragem, abnegação e determinação, que transformam sua orientação em uma lição de ciência e de vida;

Ao Prof. Dr. Valdemar Tornisielo por fornecer o primeiro par de variedades de soja brasileira, que permitiram o início do desenvolvimento do projeto;

À Drª. Ana Christina Sagebin Albuquerque pelas variedades brasileiras de soja transgênica RR desenvolvidas pela EMBRAPA;

Ao Prof. Dr. Luiz L. Coutinho, à Dra. Helena Javiel Alves e aos alunos do Laboratório de Biotecnologia Animal da ESALQ pelo suporte e amizade durante o uso do equipamento para PCR em tempo real;

Ao Prof. Dr. Francisco José Krug, ao Dr. Dario Santos e à técnica Iolanda Rufini pela disposição e ajuda no uso do moinho criogênico;

À Profª. Drª. Elisabete De Nadai Fernandes e ao Prof. Dr. Peter Bode por me iniciar e indicar os caminhos na área da Metrologia;

Ao Prof. Dr. Emanuel Carrilho e à Drª. Maribel F. Huacca do Instituto de Química de São Carlos pela orientação e disponibilidade de uso do equipamento de eletroforese capilar;

Aos funcionários do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA, Fábio Duarte, Francisco Montrazzi, José Elias Gomes, Ludmila Campos, Wagner Picinini e demais funcionários do CENA pela ajuda cotidiana e amizade;

À Comissão de Pós-Graduação CENA, em especial à Profª. Drª. Adriana P. M. Rodriguez, pelo constante incentivo e amistosa convivência;

À Pró-Reitoria e ao Conselho de Pós-Graduação da USP pelo apoio e oportunidade de aprender mais sobre a Universidade e de conviver com seus atores e idiosincrasias;

À Secretaria de Pós-Graduação do CENA: Neuda, Alzira, Regina (*in memoriam*), Claudia e Sônia pela paciência, presteza e simpatia;

A Marília R. G. Henyei pela disposição na revisão das referências;

Aos meus queridos pais e irmãos, Magda, Darcy, Alessandra, Alan, Daniel e Luciana pelo amor incondicional, pelos sobrinhos lindos, pelo incentivo constante, pelos valores transmitidos e vivências compartilhadas;

Aos colegas de Pós-Graduação: Lea, Luciana, Fabiana, Marina, Edmilson, Juliana, Carlos Moldes, Raphael, Jeanedy, Rejane, Milene e Daniela pela amizade, ajuda e companheirismo;

Às colegas Dra. Adriane Sousa e Dra. Camila Patreze pela ajuda com materiais, discussões sobre técnicas moleculares e encaminhamentos sobre os resultados;

Aos estagiários: Júlia, Flávia, Danielle, Bianca e Ézio pela colaboração nos trabalhos de laboratório;

Aos companheiros e amigos de APG-CENA Carla, Julio, Gleuber, Glauco, Glauber, Rodrigo, Graziela, Karla, Rodrigos, Robson, Claudinéia e Cherrine pela ativa convivência e pela organização dos nossos Encontros Científicos de Pós-Graduandos no CENA;

Aos amigos do CECu - Centro Cultural Celina Valdés: Sady, Guilherme, Luciana, Henrique, Biba, Camila, Renata e Franklin pelos ótimos papos, filmes, refeições e momentos compartilhados;

A Lister Parreira Duarte e Roberta Bottino Montolar Sparovek, amigos de todas e várias horas, pelos ombros, ouvidos e, principalmente, pelos conselhos e palpites – nem sempre seguidos;

Aos meus queridos tios, quase pais, Jorge (*in memoriam*), Ceni, Luiz e Mariluz, por terem estado sempre presentes na minha vida, com amor e atenção, fundamentais nessa caminhada até aqui;

Aos meus primos, quase irmãos, pelo carinho, amizade e presença em todas as etapas da minha vida, pela referência nas conquistas e pela ajuda nos tropeços;

À minha família Capezzuto Ferreira Fernandes Dias, pelo carinho, presença constante e força;

Ao Dr. Shiro Miyasaka e ao Eng. Agr. Kunio Nagai, por me apontarem os caminhos da ciência e do saber na agricultura natural;

A D. Dianda e família pela amizade vizinha e pelos cuidados dispensados;

Ao Batuk (*in memoriam*), pela companhia fiel e feliz amizade;

A todos que de alguma forma acreditaram em mim e me apoiaram pelo estímulo para esta importante empreitada.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento do meu projeto.

CANÇÃO ÓBVIA

Escolhi a sombra desta árvore para
repousar do muito que farei,
enquanto esperarei por ti.
Quem espera na pura espera
vive um tempo de espera vã.
Por isto, enquanto te espero
trabalharei os campos e
conversarei com os homens
Suarei meu corpo, que o sol queimará;
minhas mãos ficarão calejadas;
meus pés aprenderão o mistério dos caminhos;
meus ouvidos ouvirão mais,
meus olhos verão o que antes não viam,
enquanto esperarei por ti.
Não te esperarei na pura espera
porque o meu tempo de espera é um
tempo de quefazer.
Desconfiarei daqueles que virão dizer-me,
em voz baixa e precavidos:
É perigoso agir
É perigoso falar
É perigoso andar
É perigoso, esperar, na forma em que esperas,
porque esses recusam a alegria de tua chegada.
Desconfiarei também daqueles que virão dizer-me,
com palavras fáceis, que já chegaste,
porque esses, ao anunciar-te ingenuamente ,
antes te denunciam.
Estarei preparando a tua chegada
como o jardineiro prepara o jardim
para a rosa que se abrirá na primavera.

Paulo Freire
Geneve, Março 1971.

RESUMO

ABRAHÃO, O. S. **Rastreabilidade de soja Roundup Ready® em produtos agrícolas e derivados: produção de materiais de referência e uso de marcadores AFLP**. 2008. 114 f. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

A introdução de variedades transgênicas de soja provocou grandes alterações no mercado mundial e na legislação de países produtores e compradores, principalmente no que se refere à certificação, rastreabilidade, biossegurança e rotulagem. A soja é responsável por quase metade das receitas com exportação do Brasil, estando presente na forma de matéria-prima ou ingrediente em parte significativa dos alimentos no mercado brasileiro. O limite estabelecido de 1,0 % para presença de transgênicos em alimentos, acima do qual a rotulagem passa a ser obrigatória, gerou a demanda por materiais de referência para controle e quantificação em matérias-primas e alimentos, para harmonização e uniformização dos resultados obtidos em diferentes equipamentos e laboratórios, atualmente produzidos com exclusividade pelo Instituto de Materiais de Referência e Medidas – IRMM, na Bélgica. Diante do alto custo e da dificuldade de obtenção destes produtos, foram elaborados, utilizando-se técnica de moagem e mistura criogênica, com verificação por PCR em tempo real, candidatos a materiais de referência para soja transgênica Roundup Ready® (soja RR) em pó nas concentrações de 0%, 0,1%, 0,5%, 1,0%, 2,0% e 5% de material transgênico. Para rastrear a origem da soja transgênica, aplicou-se o método de marcadores AFLP sobre 29 variedades de soja RR, sendo 21 argentinas e 8 brasileiras, encontrando-se 6 bandas polimórficas, produtos de 4 pares de *primers*, selecionados de um total de 67 reações usando diferentes combinações de *primers* seletivos. Por este método, foram caracterizadas 15 das variedades argentinas e todas as variedades brasileiras. Para alimentos processados em análise de PCR, adotou-se a estratégia de detecção de fragmentos curtos (cerca de 100 pb) de soja RR, com desenho de primers usando programas computacionais de livre acesso na Internet (Primer3, NetPrimer, Rebase) e validação por digestão com endonucleases e sequenciamento. Foram estabelecidos dois novos conjuntos de *primers* para detecção e quantificação de fragmentos dos genes da lectina e CP4 EPSPS de soja RR, testados nas 29 variedades de soja RR e três matrizes de alimentos à base de soja.

Palavras-chave: Soja RR, detecção de transgênicos, quantificação de OGM, qualidade de alimentos.

ABSTRACT

ABRAHÃO, O. S. **Roundup Ready® transgenic soybean traceability in agrifood products and derivatives: reference materials production and the use of AFLP markers.** 2008. 114 f. Thesis (Doctoral) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

The introduction of soybean transgenic cultivars brought several changes in both world trade and regulation rules for producers and consumers, mainly in relation to certification, traceability, biosafety and labeling. Soybean is one of the largest commodities in the world trade and responsible for half of the Brazilian export incomings, present as raw material or ingredient in significant part of foods in the local market. The adoption of the threshold of 1,0 % for non-intentional presence of GMO in food, requiring obligatory labeling for contents above this level, demands reference materials for the control and quantification of transgenics in raw material and processed food, allowing the harmonization of results from different methods and laboratories, currently being produced exclusively by the Institute for Reference Materials and Measurements – IRMM, in Belgium. Due to the high costs and difficulty to obtain these products, candidate reference materials of Roundup Ready® transgenic soybean (RR soybean) were produced at levels of 0 %, 0,1 %, 0,5 %, 1,0 %, 2,0 % and 5,0 % of transgenic material, using cryogenic milling and mixing techniques, with subsequent verification by real time PCR. Tracing of Roundup Ready cultivars by origin was done through AFLP molecular markers in a total of 29 RR soybean cultivars: 21 Argentinean and 8 Brazilian cultivars. Fingerprinting was possible in 15 Argentinean and all Brazilian cultivars through 6 bands obtained from 4 selective pairs of primers, singled out from 67 different combinations of selective primers. For PCR analysis of processed food, primers were designed using freeware sources over the Internet (Primer3, NetPrimer, Rebase) for short fragments amplification (around 100 bp). Primers sets for the amplification of lectin and CP4 EPSPS gene fragments from RR soybean were designed for the detection of these genes in the 29 RR soybean cultivars and three soybean based food matrices, with the results validated by endonucleases digestion and sequencing.

Keywords: RR soybean, transgenic detection, GMO quantification, food quality.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 A soja transgênica Roundup Ready®	15
2.2 Regulação e cultivo de soja transgênica RR no Brasil.....	18
2.3 Rastreabilidade de transgênicos - Métodos de detecção e controle.....	20
3. OBJETIVOS.....	23
4. PRODUÇÃO DE MATERIAIS DE REFERÊNCIA PARA SOJA Roundup Ready®	24
4.1 Introdução	24
4.2 Material e Métodos.....	27
4.3 Resultados e Discussão	32
4.4 Conclusões	44
5. MARCADORES MOLECULARES AFLP NA CARACTERIZAÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA Roundup Ready®	45
5.1 Introdução	45
5.1.1 Marcadores AFLP e caracterização de cultivares.....	47
5.2 Material e Métodos	53
5.2.1 Variedades utilizadas	54
5.2.2 Método AFLP	55
5.3 Resultados e Discussão	62
5.3.1 Análise de imagens dos géis.....	76
5.3.3 Seqüenciamento das bandas	79
5.3.2 Análise por eletroforese capilar em <i>microchip</i>	81
5.4 Conclusões	86
6. CONSTRUÇÃO DE <i>PRIMERS</i> PARA DETECÇÃO DE SOJA RR EM ALIMENTOS PROCESSADOS.....	87
6.1 Introdução	87
6.2 Material e Métodos.....	89
6.3 Resultados e Discussão.....	93
6.4 Conclusões	99
7. CONCLUSÕES FINAIS	100
REFERÊNCIAS	102
APÊNDICES	112

1. INTRODUÇÃO GERAL

A soja (*Glycine max*, (L.)Merril) é um dos mais importantes produtos agrícolas do mundo, sendo empregada como ingrediente em grande número de itens alimentícios, humanos e animais, além de fonte de divisas para o Brasil, com a exportação na forma de grãos, farelo, óleo e outros derivados.

A introdução de cultivares transgênicas comerciais Roundup Ready[®], produzida pela Companhia Monsanto, com tolerância ao uso de herbicida glifosato, promoveu grandes mudanças no mercado mundial da soja, exigindo a construção de um aparato de controle complexo, que fosse capaz de classificar e segregar as produções entre aquelas transgênicas (contendo Organismos Geneticamente Modificados - OGMs) e as livres de transgênicos (GM-free). A Ásia e a Europa, grandes consumidores de soja e seus derivados, tanto para consumo humano como animal, ainda assustadas com os recentes casos de contaminação de alimentos, como o dos frangos com dioxina na Bélgica, o mal-da-vaca-louca (BSE) nos rebanhos ingleses e franceses ou a gripe aviária, criaram restrições ao consumo e comercialização de produtos transgênicos em países membros de suas respectivas comunidades, desenvolvendo regulamentação própria e, em alguns casos, estabelecendo moratórias para o seu cultivo em seus territórios.

No Brasil a proximidade com países produtores de transgênicos provocou, num primeiro momento, a ocorrência de casos de contaminação da produção agrícola e de alimentos com material transgênico, antes que fosse discutida sua regulamentação, seja pelo plantio de variedades modificadas clandestinamente introduzidas ou pela utilização de matérias-primas ou subprodutos oriundos dessas regiões produtoras. Além do controle exigido pelos compradores dos produtos de exportação, o Protocolo de Cartagena (Convenção sobre Diversidade Biológica, 2000), assinado pelo Brasil em setembro de 2003, criou restrições ao livre trânsito de transgênicos no comércio mundial e determina a obrigatoriedade da devida rotulagem para produtos e ingredientes com conteúdo GM acima do determinado nas respectivas leis locais. No País, o Decreto 4.680 de 24 de abril de 2003 (BRASIL, 2003) determina que alimentos que contenham mais de 1% do conteúdo total de seu DNA identificado como transgênico devem trazer

esta informação em seu rótulo. Além disso, a Lei de Biossegurança (Lei nº 11.105/2005, Brasil, 2005) de 24 de março de 2005, além de criar o Conselho Nacional de Biossegurança (CNBS), regulamentar a constituição e atribuições da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), regulamentar as atividades de pesquisa com OGM, células-tronco embrionárias e clonagem, estabelece as regras para comercialização e produção de transgênicos, reforçando e obrigatoriedade da rotulagem segundo o respectivo decreto para os produtos transgênicos destinados ao consumo humano.

A crescente realização de análises para classificação e controle da presença de produtos transgênicos, dentro de estreitos limites estabelecidos para a presença não declarada de transgênicos em alimentos (como os 0,9 % na Europa) traz consigo a necessidade do uso de materiais de referência que permitam a comparação e harmonização de resultados obtidos em diferentes laboratórios ou em diferentes matrizes, bem como a calibração e validação de métodos e equipamentos, de forma que se estabeleçam padrões bem definidos para que sejam atendidos os regulamentos vigentes. O mundo conta hoje com um único fornecedor de materiais de referência certificados para detecção e quantificação de soja transgênica, tornando seu acesso difícil e com alto custo, inviabilizando muitas vezes sua aquisição e utilização. Dominar a elaboração de materiais de referência confiáveis para uso em escala local garante autonomia, precisão e garantia de uniformidade nos resultados de análises fiscais ou de certificação.

A definição de um método preciso que permita a caracterização de cultivares de soja transgênica em relação à origem brasileira ou argentina abre novas possibilidades para a rastreabilidade dos produtos transgênicos que se encontram no mercado, permitindo a identificação da pureza e natureza do material, servindo como instrumento de controle nos processos de comercialização, certificação, inspeção e fiscalização previstos nas leis e nos acordos de comércio, nacionais ou internacionais. A base genética significativamente estreita da soja no continente americano exige uma ferramenta molecular com alto poder de resolução determinar onde se encontram as pequenas diferenças entre indivíduos ou grupos de indivíduos de origem tão próxima. O método de marcadores por fragmentos amplificados com polimorfismo

de tamanho – AFLP, do Inglês Amplified Fragment Length Polymorphism – vem sendo cada vez mais utilizado para solucionar problemas de caracterização de variedades para os mais variados fins, da aplicação em programas de melhoramento, a processos preservação de identidade e de conservação de diversidade ou para objetivos comerciais. A revelação dos resultados de AFLP por eletroforese capilar também é avaliada em comparação com o tradicional método de eletroforese por gel de poliacrilamida, uma vez que se apresenta como técnica rápida, eficiente e limpa de leitura de moléculas como ácidos nucleicos (DNA e RNA) e proteínas.

Métodos baseados em DNA, notadamente a Reação em Cadeia de Polimerase - PCR (do Inglês Polymerase Chain Reaction) - vêm sendo recomendados pelas instâncias mundiais de pesquisa, comércio e certificação para a realização das análises de detecção e quantificação de transgênicos em matérias-primas e alimentos, principalmente devido à maior estabilidade das moléculas em relação às proteínas. Outros métodos baseados em bioensaios, no uso de *chips* e na análise de proteínas também vêm sendo utilizados e aperfeiçoados, mas sem o consenso de que goza a PCR nos meios científicos e regulatórios, ainda que a técnica tenha suas limitações e imprecisões. O desenvolvimento de oligo-nucleotídeos iniciadores (*primers*) que sejam eficientes, sensíveis e que apresentem grande especificidade é uma das condições para a realização de análises confiáveis. Sua configuração e avaliação por meio de programas de livre acesso na rede mundial de computadores viabilizam a rápida aplicação em análises de detecção para o controle dos novos eventos que chegam em grande número e em construções cada vez mais complexas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A soja transgênica Roundup Ready®

A soja transgênica Roundup Ready® foi desenvolvida pela Companhia Monsanto (St. Louis, MO, EUA) nos anos 80 com o objetivo de se disponibilizar um material tolerante à ação de herbicidas à base de glifosato, que são comumente utilizados para dessecação de vegetação invasora em culturas perenes ou em operações de pré-plantio das anuais, principalmente no sistema de plantio direto (SPD), em que o solo não é revolvido e a semeadura se dá sobre palhada da cultura anterior ou das ervas espontâneas do terreno. O glifosato (N-fosfometil glicina) é um herbicida sistêmico, com largo espectro de ação, recomendado para o controle em pós-emergência de ampla gama de plantas, não seletivo na sua ação sobre mono ou dicotiledôneas, uma vez que inibe a enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase - EPSPS (YAMADA e CASTRO, 2007), envolvida na síntese de aminoácidos aromáticos, provocando atraso no desenvolvimento, desbalanço de aminoácidos e conseqüente morte das plantas.

O evento 40-3-2 da Monsanto recebeu o gene CP4 EPSPS, que codifica a enzima CP4 EPSPS, presente em bactérias de solo *Agrobacterium* sp. cepa CP4, utilizando-se a técnica de transformação por aceleração de partículas metálicas recobertas com material genético, denominada biolística ou biobalística. O inserto para transformação, ou cassete transgênico (Figura 1), contém uma parte do promotor do Vírus do Mosaico da Couve-Flor (CaMV 35S), seguido do peptídeo de trânsito de cloroplasto da epsps (CTP EPSPS) de petúnia híbrida, a seqüência codificadora *cp4 epsps* e parte do terminador de transcrição *nos* da nopalina sintetase de *Agrobacterium tumefaciens* (PADGETTE et al., 1996; WINDELS et al., 2001; CONCEIÇÃO; MOREIRA; BINSFELD, 2006). Semelhantes construções foram empregadas posteriormente na transformação de algodão, milho, beterraba e canola (DEISINGH; BADRIE, 2005).



Figura 1. Esquema molecular simplificado do cassete transgênico inserido no material genético da soja RR (adaptado de Padgett et al., 1996).

Dentre as vantagens destacadas para o uso da soja RR, a diminuição do uso de herbicidas mais tóxicos em termos de ação e efeito residual do que o glifosato, além da facilidade do manejo com esta mudança, estão entre as mais importantes. O glifosato teria um efeito residual bem menor no solo em relação aos princípios ativos utilizados para controle de plantas de folha larga e estreita, representando uma opção de menor impacto sobre o solo, a água e as culturas subseqüentes na área. O uso de herbicidas de pré-emergência ou de pós-emergência inicial, como os mais comumente usados na cultura da soja, exige, ainda, grande conhecimento técnico a respeito das plantas invasoras presentes na área e dos produtos que as controlam, bem como precisão logística na aplicação a fim de que se atinja o alvo no momento adequado de controle, uma vez que a partir de determinado ponto de desenvolvimento da cultura ou das plantas espontâneas, alguns produtos perdem eficácia na aplicação. Isso acaba sendo dificultado, muitas vezes, por razões ligadas ao clima (falta ou excesso de chuvas) ou à estrutura física das propriedades. Como conseqüência, o agricultor teria assim um custo menor por saca de soja devido ao uso de um só tipo de herbicida, com uma eficiência maior no controle das plantas invasoras, o que aumentaria sua produtividade e com um efeito residual menor para o plantio da cultura seguinte.

A crescente necessidade de aumento de produtividade, com conseqüente diminuição dos custos, facilidade de manejo e menor efeito residual do novo evento acabou promovendo o rápido crescimento da área cultivada com soja RR no mundo, fazendo com que esta cultura representasse em 2004 cerca de 60% da área de transgênicos mundial, ou seja, 48,4 milhões de hectares plantados com variedades de soja resistentes ao glifosato, destacando-se entre os principais produtores os Estados

Unidos, a Argentina, Canadá, China e Brasil, entre outros (CARVALHO, 2005; PATERNIANI, 2005).

Por outro lado, em análise comparativa de custos e benefícios entre a soja “convencional” e a transgênica, tomando por base dados de produção dos Estados Unidos, Argentina e Brasil, Pelaez, Albergoni e Guerra (2004) concluem, destacando que ainda não se tem uma série histórica que permita confirmar os dados obtidos: o consumo de herbicidas é, em média, 8 % maior no plantio de soja RR (variando de -30 a + 60% nos EUA, até + 180 % na Argentina); os custos de produção são de 7 a 20 % menores no cultivo de soja RR; a produtividade da soja “convencional” foi até 12 % superior à da soja RR. Outros pontos que podem ser levados em consideração na análise comparativa seriam os custos de preservação de identidade (IP), envolvendo análises e segregação das produções, o desenvolvimento de variedades geneticamente modificadas adequadas a cada sistema de produção, que melhorariam sua produtividade média e ainda os riscos, no caso da produção brasileira, de que se perca produtividade em função da interferência da nova tecnologia no processo de fixação de nitrogênio por *Rhizobium*. Flannery et al. (2004), analisando a relação custo-benefício de lavouras de beterraba tolerantes a herbicida na Irlanda, chegaram à conclusão de que a adoção deste tipo de tecnologia chega a trazer uma economia média de 6,06 % nos custos de produção, principalmente em função da redução do volume de pulverização e número de aplicações, levando-se em conta o aumento dos custos com aquisição das sementes geneticamente modificadas.

Outros pontos que colocaram em atenção a adoção das culturas transgênicas em larga escala e que vêm sendo alvo de grande número de pesquisas e de discussões legais, são os aspectos relacionados à segurança de consumo destes novos produtos e aqueles relacionados aos impactos sobre o ambiente a partir da sua adoção.

Uma vez inseridos os novos genes na planta ou animal, ocorrem alterações no seu metabolismo e composição, que podem gerar efeitos intencionais, ou desejados, e efeitos não-intencionais, previsíveis ou não. A ingestão de DNA, diretamente, não representa risco, uma vez que ocorre normalmente na alimentação, mas existe o risco de

ocorrer síntese ou mutação de proteínas que podem ser potencialmente tóxicas, apresentar ação antinutricional ou mudar o valor nutricional do alimento (LAJOLO; NUTTI, 2003). Outros aspectos que vêm sendo estudados e questionados dizem respeito ao uso de genes marcadores para resistência a antibióticos, que poderiam ser transferidos horizontalmente a microrganismos patológicos do trato digestivo humano ou animal, à alergenicidade das substâncias produzidas pelos organismos geneticamente modificados, efeitos de silenciamento de genes, instabilidade funcional de proteínas e uma série de outros efeitos pleiotrópicos (SHELTON, 2004).

Em relação ao ambiente, as preocupações estão voltadas para o fluxo de transgenes para espécies nativas, o desenvolvimento de resistência em plantas invasoras, pragas ou doenças pelo aumento da pressão de seleção, a transformação de culturas em espécies invasoras ou ainda os efeitos dos transgênicos sobre organismos não-alvo. Uma vez que a soja não tem espécies compatíveis para cruzamento na América, o primeiro problema fica descartado. Os outros efeitos vêm tendo seus critérios de estudo discutidos, uma vez que, em muitos casos, não são exclusivos das culturas transgênicas (FIGUEIRA, 2005).

2.2 Regulação e cultivo de soja transgênica RR no Brasil

A soja Roundup Ready[®], desenvolvida pela Monsanto nos anos 80 e lançada no mercado norte americano em 1996, ganhou rapidamente os campos de produção dos Estados Unidos e da Argentina, respectivamente, maiores produtores de soja transgênica no mundo. Por estar presente em área de fronteira com o Brasil, os problemas com a entrada do novo evento em lavouras brasileiras não tardaram a aparecer, motivados pela curiosidade e interesse dos produtores nacionais e reforçados pela ausência de uma expressa regulamentação em relação ao assunto.

A Convenção sobre a Diversidade Biológica – CDB, que teve origem na Eco-92, no Rio de Janeiro, vem sendo o fórum principal de discussão e de definição dos marcos legais e políticos no mundo. Em janeiro de 2000 a Conferência das Partes da CDB apresentou o Protocolo de

Cartagena sobre Biossegurança (CDB, 2000), que estabelece as regras para movimentação transfronteiriça de organismos geneticamente modificados. Incorporando diretrizes do Princípio da Precaução, este instrumento visa promover a troca de informações e o adequado controle na criação, manipulação e introdução de produtos de biotecnologia com objetivo de que sejam evitados efeitos adversos sobre a conservação e uso sustentável da biodiversidade, levando em conta ainda os riscos envolvidos para a saúde humana. O Protocolo entrou em vigor no Brasil em fevereiro de 2004, contando com mais de 130 países signatários.

Em julho de 2001 o Governo Federal publicou o Decreto de Lei nº 3871, que estabelecia a obrigatoriedade de rotulagem para os alimentos que contivessem mais de 4% de organismos geneticamente modificados em sua composição. O Decreto Presidencial nº. 4680, de 24 de abril de 2003 (BRASIL, 2003), revogou o anterior e estabeleceu um novo limite de 1% para a presença não-intencional de OGMs, acima do qual a sua presença na composição de produtos processados ou *in natura*, a granel ou embalados, para alimentação humana ou animal, inclusive para alimentos de origem animal que foram alimentados com transgênicos, deve ser informada no rótulo, exigindo a informação da espécie doadora do gene inserido (PESSANHA, 2004). A Portaria nº 2658/2003 (BRASIL, 2003) define o símbolo a ser empregado na identificação dos produtos que contêm transgênicos, conforme o definido no Decreto acima citado (Figura 2).



Figura 2. Símbolo definido na Portaria nº 2658/2003 (BRASIL, 2003) para composição da rotulagem de alimentos que contenham ou sejam produzidos a partir de OGMs.

A Lei nº 8.974, primeira versão da Lei de Biossegurança no Brasil, além de definir como crimes a manipulação genética de células embrionárias humanas e a intervenção em material genético humano, autorizava o Presidente da República a constituir a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), encarregada de elaborar instruções normativas de biossegurança para utilização de OGMs e emitir pareceres técnicos sobre sua liberação no ambiente em escala experimental ou comercial. Com pouco tempo de funcionamento, dentre outros pareceres para liberação de áreas experimentais com culturas transgênicas de variadas espécies, autorizou o primeiro plantio comercial de soja transgênica Roundup Ready® em solo brasileiro. A autorização foi contestada na justiça por entidades civis e pelo Ministério do Meio Ambiente, uma vez que dispensava o prévio Estudo de Impacto Ambiental – EIA e o respectivo Relatório de Impacto sobre o Meio Ambiente – RIMA, o que gerou uma medida cautelar que proibiu a continuidade do cultivo em solo brasileiro até o julgamento do mérito da ação. Foi substituída posteriormente pela Lei 11.105/05 (BRASIL, 2005), que reitera os poderes e reestrutura a CTNBio, cria a Comissão Nacional de Biossegurança – CNBS, composta por 10 Ministros e por representante da Presidência da República e dispõe sobre a Política Nacional de Biossegurança - PNB.

O plantio e a comercialização da soja transgênica Roundup Ready® vêm sendo efetivamente autorizados pela consecutiva edição de Medidas Provisórias presidenciais, convertidas em Lei pelo Congresso Nacional, desde o ano de 2003, como a MP nº113, posterior Lei nº10.688/2003 (BRASIL, 2003), a MP nº131, posterior Lei nº10.814/2003 (BRASIL, 2003) e a MP nº223, posterior Lei nº11.092/05) (BRASIL, 2005).

2.3 Rastreabilidade de transgênicos - Métodos de detecção e controle

Machado (2000) indica a definição de rastreabilidade, presente na norma NBR ISO 8402, como sendo “a capacidade de recuperação do histórico, da aplicação ou da localização de uma entidade (ou item) por meio de identificações registradas”. Pode apresentar, ainda, três significados, segundo a abordagem:

a) em relação a um produto, pode referir-se a:

- origem dos materiais e das peças;
- histórico do processamento do produto;
- distribuição e localização do produto depois da entrega;

b) referindo-se à calibração, a rastreabilidade relaciona o equipamento de medição aos padrões nacionais e internacionais, aos padrões primários, às propriedades ou constantes físicas básicas ou materiais de referência;

c) referindo-se à coleta de dados, a rastreabilidade relaciona os cálculos e os dados gerados em todo o ciclo da qualidade, remontando, às vezes, aos requisitos para a qualidade de uma entidade (NBR ISO 8402/1994, p.7).

Há poucos anos, a detecção de OGMs surgiu como um novo campo de aplicação de métodos analíticos, mais voltado para avaliação da qualidade em relação à pureza de sementes e na produção de grãos. Atualmente evoluiu para a satisfação dos regulamentos de rotulagem de alimentos em um número crescente de países (BERTHEAU et al., 2002), além de controle no comércio de sementes e grãos no mundo todo. Os métodos atualmente mais utilizados são os bioensaios e aqueles baseados em protocolos de detecção de proteínas e DNA.

Para a detecção de proteínas os métodos mais utilizados são baseados no princípio da imuno-reação, do tipo *enzyme-linked immunosorbant assay* - ELISA, que utiliza anticorpos, monoclonais ou policlonais, que se ligam especificamente a determinadas proteínas ou a seqüências de peptídeos e que, devidamente marcados, servem de sinalizadores de sua presença para detecção ou quantificação (AHMED, 2002). Uma variação bastante utilizada na detecção de grãos e plantas transgênicas é o ensaio por tiras de fluxo lateral ("*lateral flow strip*"), disponível em kits para aplicação a campo ou em entradas de portos e silos. Apresenta baixo poder de detecção e é afetado, principalmente, pelo grau de degradação da proteína, não sendo viável para aplicação sobre a maioria dos produtos que passaram por processamento físico ou químico.

Para análises em produtos processados, alimentos ou ingredientes, recomenda-se a aplicação de métodos baseados em ácido desoxirribonucléico - DNA, que é uma molécula mais estável em relação às proteínas. O principal método para detecção e quantificação de seqüências

específicas de DNA é a reação em cadeia de polimerase – PCR, devido à sua alta sensibilidade e especificidade. Dentre suas modalidades e variações destacam-se a PCR qualitativa, a PCR quantitativa-competitiva e a PCR em tempo real (AHMED, 2002; CONCEIÇÃO et al., 2006).

Uma das limitações da PCR é a ocorrência freqüente de falsos positivos, uma vez que a técnica não discrimina a amplificação de genes oriundos de OGMs daqueles existentes na natureza e utilizados nas construções, como o promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor ou o terminador *NOS* de *Agrobacterium tumefaciens*. Fatores como amostragem, tamanho de partículas das amostras, método de extração utilizado, matrizes contendo interferentes para extração e amplificação bem como o grau de processamento dos materiais exercem influencia nesse tipo de análise, seja para detecção ou para quantificação. Novos métodos vêm sendo desenvolvidos visando rapidez e confiabilidade nos resultados, como os biosensores, microarranjos, *chips* ou aqueles baseados em fluorescência de raios-X (DEISINGH; BADRIE, 2005).

3. OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivo geral o estudo de um método para caracterização da origem de variedades transgênicas de soja e o desenvolvimento de materiais que permitam detectar, identificar e quantificar soja transgênica Roundup Ready[®] (soja RR) em produtos agrícolas e derivados.

Especificamente serão desenvolvidas atividades que têm por objetivos:

- Produzir materiais de referência para quantificação de soja transgênica Roundup Ready[®] a partir de adaptação de método internacionalmente reconhecido (Item 4);
- Caracterizar variedades de soja RR comerciais, argentinas e brasileiras, em relação à sua origem com o uso do método de marcadores moleculares AFLP, com verificação por eletroforese capilar e em gel de poliacrilamida (Item 5);
- Desenvolver, utilizando programas de acesso livre na Internet, *primers* confiáveis para a detecção de soja RR em produtos agrícolas, derivados e alimentos processados (Item 6).

4. PRODUÇÃO DE MATERIAIS DE REFERÊNCIA PARA SOJA Roundup Ready®

4.1 Introdução

A segurança dos alimentos vem crescendo em importância no mundo, principalmente em função das preocupações com a qualidade de vida e seus impactos no mercado internacional. O assunto vem sendo crucial quando países em desenvolvimento, como o Brasil, têm que estabelecer políticas para promover o incentivo adequado para a adoção de medidas eficientes, que garantam abertura e competitividade no mercado agrícola. Nos últimos anos a participação de produtos agrícolas e alimentícios brasileiros no mercado mundial vem crescendo devido à modernização dos sistemas de gerenciamento na agricultura, além da implantação de políticas mais claras em relação ao contexto ambiental, devido principalmente a (a) novas restrições impostas por legislação da União Européia e/ou NAFTA e (b) os recentes problemas biológicos em países da Europa (p.ex. BSE em vacas, dioxinas em carne de frango, gripe aviária). Atender a esses novos níveis de exigência inclui a obtenção de níveis ótimos em relação a aspectos químicos, radiológicos, nutricionais, tecnológicos, sensoriais e higiênicos por parte do Brasil no seu contexto agro-alimentar.

A adoção de limites estreitos de rotulagem e certificação exige a aplicação de métodos apropriados, baseados em altos níveis de padrões metrológicos internacionais. A importância desses tipos de procedimentos para países em desenvolvimento passa a ser fundamental, uma vez que facilitarão o comércio internacional de produtos agrícolas e alimentares. No Brasil, um aspecto crítico para a exportação de grãos vem sendo a falta de regulamentação em relação aos limites estabelecidos para atender os requerimentos de qualidade internacional. Para o caso específico dos organismos geneticamente modificados em culturas agrícolas, a preocupação com os critérios de validação e desempenho dos métodos de detecção é freqüente, assim como a disponibilidade de materiais de referência padrões para avaliações qualitativas e/ou quantitativas, para uso em atividades de pesquisa ou controle, seja para produtos ou derivados para exportação ou para uso na indústria alimentícia.

Para tanto se faz necessária a presença de controles negativos e positivos com o mais alto grau de pureza, que servem de base para a validação de procedimentos analíticos e para avaliação do desempenho de métodos e laboratórios (AHMED, 2002). Bertheau et al. (2002) apontam que, embora a validação de métodos pelo uso de materiais de referência seja prática comum para a maioria dos métodos de análise, a disponibilidade destes materiais, internos ou certificados, acaba sendo um limitante do desenvolvimento ao uso em rotina de quase todos os métodos. Ahmed (2002) credita a limitação de disponibilidade destes materiais aos problemas relacionados aos direitos de propriedade intelectual e aos altos custos de produção e controle. Atualmente, os materiais de referência para quantificação de soja transgênica Roundup Ready[®] são produzidos unicamente pelo Institute of Reference Materials and Measurements – IRMM, em escala limitada, apresentando alto custo e dificuldade de acesso para sua aquisição em importação.

Trapmann et al. (2002a) destacam o papel dos materiais de referência certificados (CRMs) na melhoria da precisão de medições analíticas e na possibilidade de comparação de resultados obtidos. Dentre as funções dos materiais de referência, cita a calibração de medições, desenvolvimento e validação de novos métodos e a verificação da correta aplicação de métodos padronizados. Meyer (1999) coloca a produção de materiais de referência como condição tão importante para o desenvolvimento das técnicas de análise dos OGMs aprovados e processados quanto a produção de *primers* e sondas específicas. Por outro lado, a discussão a respeito de quantificação ainda está bem viva, como demonstra Weighardt (2006) em carta à Nature Biotechnology. Ele afirma que a legislação europeia de rotulagem é impraticável e não tem base científica em função da variação entre a razão das doses do ingrediente transgênico e o gene transgênico. Aponta quatro fontes de variação para tal afirmação: falta de dados sobre a conservação da razão peso / número de genomas em diferentes linhagens da mesma espécie de planta; algumas espécies de plantas mostram grande variação de conteúdo de DNA, com grande variação no valor-C; ao considerarmos organismos diplóides e o modo de produção de híbridos, poder-se-ia encontrar os genes-alvo para amplificação, o marcador do transgene e o gene espécie-específico, em homozigose ou heterozigose, não necessariamente em uniformidade ao longo de diferentes híbridos com a mesma construção ou lotes do mesmo híbrido e, finalmente, a ploidia dos tecidos

pode variar numa mesma espécie, como o caso do endosperma de diversas plantas cultivadas que apresentam ploidia distinta do restante da planta.

O método indicado pelo IRMM para a produção de materiais de referência, parte da obtenção de materiais candidatos negativos (livres de OGMs) e positivos (GM), com alto grau de pureza e de variedades geneticamente próximas entre si, a fim de que sejam diminuídas as diferenças de quantidade e qualidade do DNA obtido na extração (Trapmann, 2002b). Após limpeza cuidadosa para retirada de impurezas externas, os grãos são desintegrados, liofilizados e secos em estufa para retirada de umidade e têm a qualidade e quantidade de seu DNA verificados. As diluições do material transgênico com base no material convencional são feitas levando-se em conta a quantidade de DNA obtida na extração de cada uma das variedades, descontando-se a umidade presente em cada uma. Desta forma, obtém-se uma diluição baseada somente na quantidade de DNA realmente presente em cada variedade e não somente uma diluição massa/massa, que poderia levar a uma grande imprecisão em função da diferença dos fatores mencionados entre os diferentes materiais (eficiência de extração, umidade).

Para aplicação em análises qualitativas, quantitativas e semi-quantitativas foram elaborados e avaliados materiais de referência (MR) contendo soja transgênica Roundup Ready® nos níveis de 0,0%, 0,1%, 0,2%, 0,5%, 1,0%, 2,0% e 5,0%, tomando por referência a metodologia do IRMM para elaboração de materiais de referência certificados. Como dados adicionais, foram testados os métodos de extração de DNA em relação à repetibilidade e medidas as diferenças nas quantidades de DNA extraídas do material transgênico e não-transgênico.

4.2 Material e Métodos

Grãos de soja – soja geneticamente modificada variedade MSoy 7575 Roundup Ready® e soja “convencional” cultivar MSoy 7501 fornecidos pela empresa Monsanto foram os materiais de base, positivo e negativo, respectivamente, utilizados para o desenvolvimento deste trabalho. Todas as operações foram conduzidas em dias, ou períodos, alternados entre os materiais não-transgênico e transgênico, nesta ordem, para que se evitasse o risco de contaminação cruzada. Bancadas e equipamentos sofreram rigorosa limpeza com solução de hipoclorito de sódio 10 % e álcool 70% antes e entre as manipulações com os materiais candidatos a fim de prevenir contaminações que pudessem afetar o desenvolvimento do trabalho.

A Figura 4.1 apresenta o fluxograma de produção dos candidatos a materiais de referência, com os seguintes passos detalhados abaixo:

Limpeza – os grãos foram lavados com água destilada e com solução de EDTA 0,1 M para retirada de possíveis contaminantes de sua superfície. O excesso de água foi drenado em peneira e os grãos foram colocados em liofilizador para secagem.

Moagem - em micro moinho de rotor vertical e facas móveis para desintegração inicial dos grãos em micro moinho com peneira mesh 20.

Secagem em estufa a 30°C – durante 24 h, para retirada da umidade dos grãos depois da moagem.

Moagem criogênica – em moinho criogênico de impacto, com barras magnéticas, Freezer/Mill 6800 (Spex, Metuchen, NJ, EUA), condicionado em nitrogênio líquido a -196°C durante 1 hora. Recipientes de 100 mL e barras magnéticas, próprios para moagem criogênica, foram lavados e tratados com ácido nítrico para limpeza e descontaminação. A moagem foi conduzida em ciclos, da seguinte forma: 15 min de pré-congelamento, 3 ciclos de moagem de 2 min, com 1 min de resfriamento entre cada ciclo.

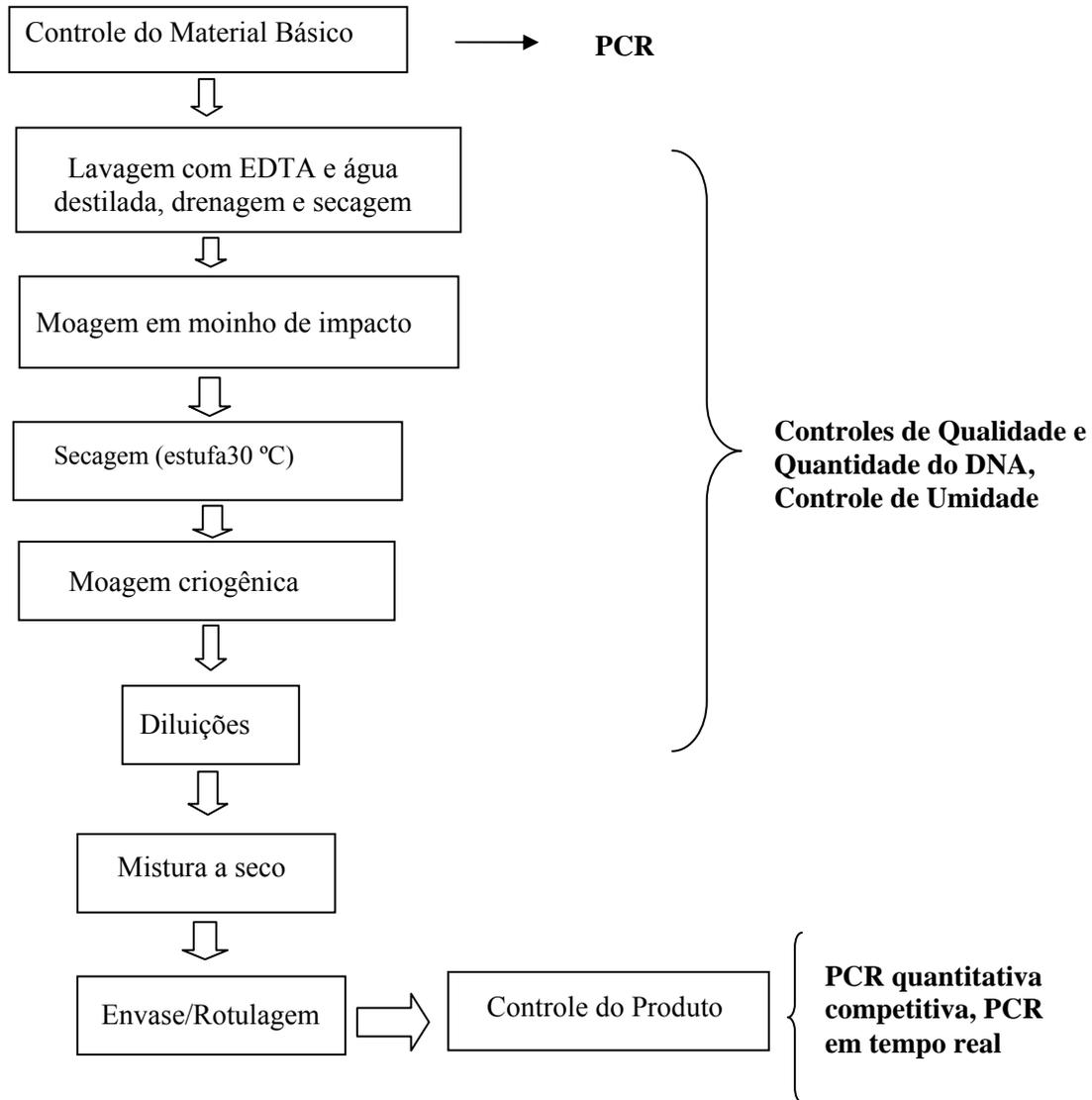


Figura 4.1. Fluxograma de produção do material de referência para análise de transgênicos (adaptado de Trapman et al., 2002).

Extração de DNA – foram testados dois métodos de extração para que se verificasse a variabilidade da quantidade de DNA extraído em cada um, sendo eles: o método de extração por brometo de hexadecyltrimethylammonium - CTAB, descrito por Doyle e Doyle (1990) e o DNeasy[®] Plant Mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). O método CTAB, com uso de protocolo de bancada, é 3 vezes mais barato mas exige um tempo de

aplicação cerca de quatro vezes maior que o envolvido com o uso do kit DNeasy[®]. Os resultados de quantidade e regularidade definiram o método de extração a ser utilizado no trabalho.

Verificação da presença dos genes da Lectina, CaMV 35S e CP4 EPSPS – foram realizadas PCRs com ambos os materiais para verificação da presença dos genes que indicam a transgenia, a fim de que se confirmassem as características de material transgênico (positivo) e não-transgênico (Tabela 4.1). Para o material positivo, foi realizada ainda PCR quantitativa competitiva com kit Tecna para verificação da quantidade de transgenia, que deve ser de 100%.

Tabela 4.1 - *Primers* utilizados para verificação dos materiais positivos e negativos em relação à transgenia, com respectivos tamanhos dos produtos de PCR.

<i>Primer</i>		Seqüências (5' – 3')	Produto (pb)
CaMV 35S	senso	GCTCCTACAAATGCCATCA	195
	anti-senso	GATAGTGGGATTGTGCGTCA	
CP4 EPSPS	senso	TGG CGC CCA TGG CCT GCA TG	509
	anti-senso	CCT TCG CAA GAC CCT TCC TCT ATA	
Lectina	senso	TGC CGA AGC AAC CAA ACA TGA TCC T	414
	anti-senso	TGA TGG ATC TGA TAG AAT TGA CGT T	

Quantificação do DNA – após a extração, as soluções de DNA foram diluídas em proporção de 1:50 e quantificadas em espectrofotômetro Hitachi 2000 (Hitachi, Tokyo, Japan), com leitura de absorbância em feixe de luz UV de 260 nm de comprimento, para verificação da quantidade e qualidade do DNA obtida para cada uma das variedades.

Realizou-se, ainda, eletroforese em gel de agarose 1% com pequena alíquota da solução de DNA para verificar a presença de contaminantes ou impurezas junto ao material obtido da extração.

Medição da Umidade – o pó obtido com a moagem dos grãos foi colocado em determinador de umidade Mark 2 HP (Denver Instrument Company, CO, USA) para medição da umidade presente em cada um dos materiais.

Diluições – o cálculo para as diluições do material transgênico sobre a base do material não-transgênico foi feito com os devidos descontos da umidade presente em cada um dos materiais e levando-se em conta a eficiência de extração de DNA de cada um deles.

As misturas do material transgênico (Soja RR - positivo) com material não-transgênico (negativo) foram realizadas com pesagem em balança analítica, na seguinte seqüência:

- obtenção do material com 10% de Soja RR. A partir deste:
 - material 5,0 % Soja RR
 - material 2,0 % Soja RR
 - material 1,0 % Soja RR
- obtenção do material 0,5% Soja RR a partir da diluição do material 5,0% Soja RR em soja não-transgênica;
- obtenção dos materiais 0,2% e 0,1% Soja RR a partir da diluição do material 1,0% Soja RR em soja não-transgênica.

As diluições foram feitas em fatores de diluição abaixo de 10, a fim de que fosse mantida maior homogeneidade do material. Em cada etapa de diluição as misturas retornam ao moinho criogênico para que se efetue sua homogeneização, de forma a promover a perfeita distribuição dos materiais por todo o conteúdo do preparado, sem que seja afetada a qualidade do DNA.

Mistura a seco – promovida no moinho criogênico, com os materiais devidamente aliquotados, a fim de se homogeneizar as misturas sem causar dano à qualidade ou

quantidade do DNA. A homogeneização foi realizada da seguinte forma: 15 min para condicionamento do equipamento e amostra, 3 ciclos de moagem de 2 min, com 1 min para refrigeração entre cada ciclo.

PCR competitiva (semi-quantitativa) – foi realizada utilizando-se kit Tecna para PCR quantitativa competitiva em soja Roundup Ready “GMO-free”² (Tecna Srl R&D Diagnostics-Biotechnology, Trieste, Italia) com materiais MR 0,1 % e MR 1,0% para averiguação preliminar da ordem de grandeza alcançada com o material elaborado.

Geração da curva-padrão em PCR em tempo real – geração de curva-padrão utilizando material de referência certificado (CRM) Soya Bean Powder SB-5 - 5,0% genetically modified (Roundup ready soya) (IRMM – Fluka, Geel, Belgium). O DNA do CRM foi extraído e quantificado em espectrofotômetro Hitachi 2000 (Hitachi, Tokyo, Japan). Diluições seriais de base 10 e base 2 foram realizadas para a obtenção dos pontos da curva-padrão. Os padrões foram quantificados em termociclador LightCycler® (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), com utilização do kit LightCycler FastStart DNA Master SYBR® Green I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) em duplicata para a obtenção da curva-padrão.

Quantificação das amostras por PCR em tempo real – as amostras em triplicata extraídas dos candidatos a material de referência foram submetidas à quantificação por PCR em tempo real segundo o Manual do Usuário do Curso de Treinamento para análises de amostras de alimentos para a presença de GMOs da Comunidade Européia (QUERCI, JERMINI, VAN DEN EEDE, 2004). O DNA das amostras foi diluído 10 vezes e submetido a PCR em tempo real nas seguintes condições, para uma reação de 20 µL: 2,0 µL de DNA; 2,0 µL de Master SYBR Green FastStart; 11,6 µL de água ultrapura; 2,4 µL de MgCl₂ 25 mM e 1 µL de cada primer, senso e anti-senso, na concentração de 5 pmoles. A programação do termociclador foi a seguinte: 96°C por 10 min; 45 ciclos de

96°C por 10”, 66°C por 5” e 72°C por 20”; resfriamento até 60°C, para então iniciar o ciclo para obtenção da curva de desnaturação (“melting curve”) para checar a formação de aparatos não específicos na reação.

Envase – em vidros âmbar de capacidade para 10 mL, a fim de se evitar a exposição do material à luz ultravioleta, que causa danos ou degradação do DNA, com uso de batoque plástico e tampa de rosca.

Rotulagem – cada material foi devidamente identificado com o seu conteúdo percentual de soja RR, constando ainda o nome do CENA e do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, responsável pela elaboração.

4.3 Resultados e Discussão

Métodos de extração – a Tabela 4.2 traz os valores de quantidade de DNA extraído por material transgênico e não-transgênico com os dois métodos avaliados, com suas respectivas médias e desvios-padrão. A umidade presente nos materiais não foi previamente determinada para este ensaio, o que faz com que as diferenças nas quantidades finais extraídas entre os materiais não possa ser levada em consideração para os cálculos de diluição. Pode-se notar que, apesar do kit extrair uma maior quantidade de DNA, este apresenta desvios-padrão significativamente maiores para ambos os materiais. Uma vez que o método CTAB mostrou-se mais regular em relação aos resultados, optou-se pela sua utilização nas extrações para medição do presente trabalho.

Tabela 4.2 – Quantidade de DNA extraído de materiais transgênicos (RR) e não-transgênicos (NT) por dois métodos de extração (CTAB e kit DNeasy), com três repetições.

Método	Amostra	DNA(ng/ml)	mgDNA/100mg	Média	Desvio Padrão
CTAB	RR F1	1466,50	117,32	114,97	2,77
	RR F2	1388,50	111,08		
	RR F3	1456,50	116,52		
	NT F1	1510,50	120,84	125,20	3,39
	NT F2	1570,50	125,64		
	NT F3	1614,00	129,12		
DNeasy®	RR F4	677,00	136,75	135,74	4,35
	RR F5	643,50	129,99		
	RR F5	695,50	140,49		
	NT F4	680,00	137,36	133,49	7,49
	NT F5	693,50	140,09		
	NT F6	609,00	123,02		

Verificação da transgenia – a variedade não-transgênica, candidata a material negativo na confecção dos materiais de referência, apresentou, como o esperado, resultados de ausência de transgenia, não amplificando fragmentos do gene CP4 EPSPS. As bandas referentes ao gene da Lectina comprovam a presença de DNA de soja nas soluções extraídas (Figura 4.2).

A variedade transgênica apresentou ampliações em todas as reações (Figura 4.2), demonstrando presença de modificação genética com inserção do respectivo gene da CP4 EPSPS. Para verificar se era um material transgênico puro ou se se tratava de uma mistura, promoveu-se uma reação de PCR quantitativa competitiva, cujo resultado esperado era um número de cópias do transgene (CP4 EPSPS) igual ao número de cópias do gene constitutivo (Lectina), como de fato ocorreu (Figura 4.3).

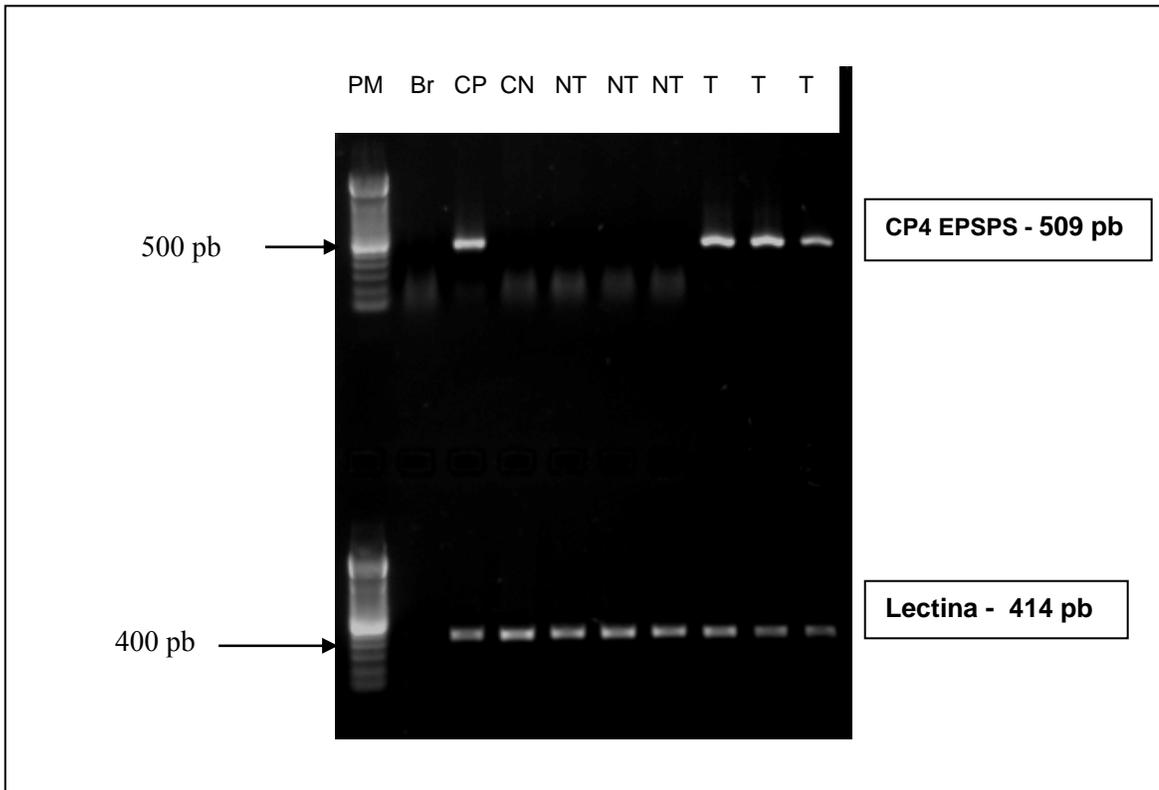


Figura 4.2. Gel de agarose 1,5 % com produtos de PCR com materiais candidatos negativo (NT) e positivo (T). PM = 100 pb; Br = Branco; CP = Controle positivo, CRM Fluka 5%; CN = Controle negativo, CRM Fluka 0%; NT= não-transgênico; T= transgênico.

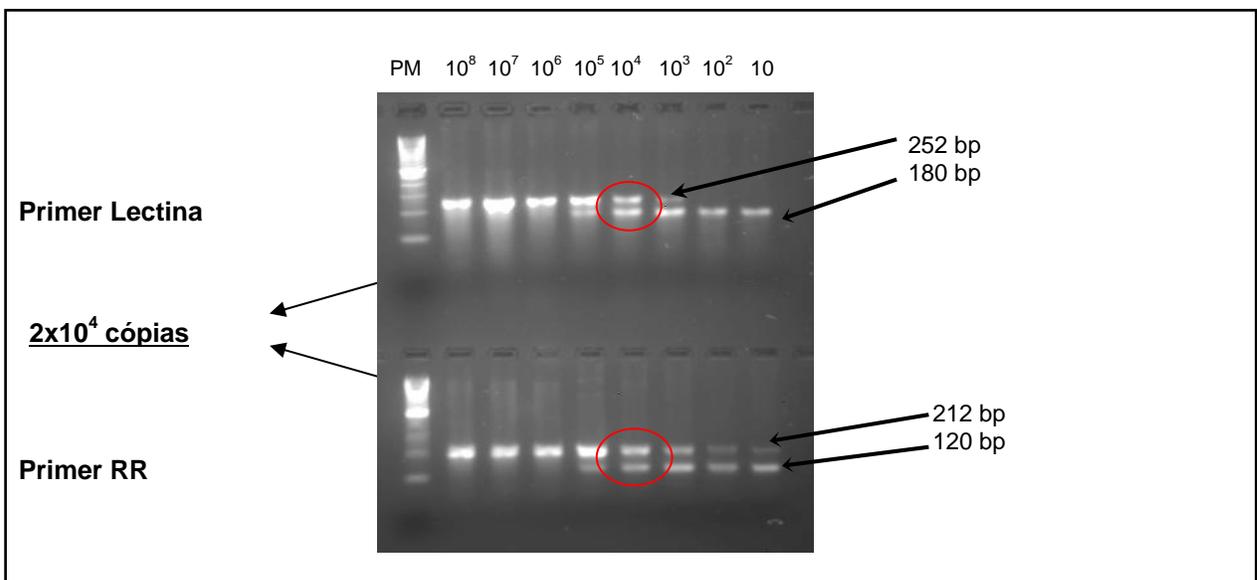


Figura 4.3. PCR quantitativa competitiva com material candidato positivo, mostrando o mesmo número de cópias (2×10^4 cópias) para os genes da Lectina e CP4 EPSPS. PM = 100 pb.

Determinação da umidade – os resultados obtidos no determinador de umidade por ocasião da extração do DNA dos materiais positivos e negativos encontram-se na Tabela 4.3:

Tabela 4.3 – Umidade média e matéria seca (MS) (%) dos materiais candidatos não-transgênico (NT) e transgênico (T)

	NT (%)	RR (%)
Média %	7,50	7,59
DP	1,55	1,22
MS %	92,50	92,41

No momento da mistura dos materiais foi realizada outra medição em triplicata a fim de verificar possível ganho ou perda de umidade durante o armazenamento, descongelamento ou manipulação das amostras. Como os resultados obtidos foram diferentes dos anteriormente indicados, os cálculos foram refeitos tomando-se em conta os novos valores de umidade encontrados. A soja não-transgênica (NT) apresentou nova umidade média de 8,05 % e a soja transgênica (T) umidade de 6,99 %.

Quantificação do DNA – os resultados de 16 medições obtidos para cada variedade foram ajustados para quantidades referentes a 100 mg de matéria-seca (MS) e depois foi aplicado o teste Q (Dixon), para que fossem calculadas as respectivas médias.

O teste Q (Dixon) – foi aplicado para o descarte de resultados suspeitos de não pertencerem ao conjunto por serem discrepantes, segundo a seguinte fórmula:

$$Q = \frac{|Valorsuspeito - Vproximo|}{(Valormaior - Valormenor)}$$

Cálculo das médias de quantidade de DNA - para cada uma das variedades segundo a fórmula:

$$\mu_i = \frac{\sum_i}{n}$$

Assim, de 12 medições do material não-transgênico (NT) e de 16 medições do material transgênico (T) têm-se as respectivas médias:

$$\mu_{NT} = 112,22 \text{ } \mu\text{g DNA}/100 \text{ mg de MS};$$

$$\mu_T = 115,74 \text{ } \mu\text{g DNA}/100 \text{ mg de MS}$$

Cálculo dos desvios-padrão – para cada uma das médias, segundo a fórmula:

$$s = \frac{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}}{(n-1)}$$

$$S_{NT} = 4,35$$

$$DPR_{NT} = S \times 100 / 112,22 = 3,87 \%$$

$$S_T = 1,64$$

$$DPR_T = S \times 100 / 115,74 = 1,42 \%$$

Aplicação do teste F de Snedecor - para verificar se os desvios-padrão são comparáveis:

$$F = S_1^2 / S_2^2 \text{ de forma que } F \geq 1$$

$$F = 4,35^2 / 1,64^2 = 18,92 / 2,68 = 7,06$$

Consulta a tabela de distribuição de F para $\alpha = 5\%$, $F = 2,54$.

Os desvios-padrão, para um intervalo de confiança de 95 %, não são, portanto, iguais.

Teste t de Student para comparação de médias - sendo a hipótese de que as populações não possuem desvios-padrão iguais mantida, então uma aproximação para t pode ser obtida pela equação:

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}}$$

$$t = \frac{(122,22 - 115,74)}{\sqrt{18,92/12 + 2,68/16}} = \frac{6,48}{\sqrt{1,58 + 0,17}} = \frac{6,48}{1,32} = \mathbf{4,91}$$

Na tabela, consultam-se os valores de t para os respectivos níveis de significância:

$$t(90\%) = 1,75$$

$$t(95\%) = 2,13$$

$$t(99\%) = 2,95$$

Como o valor obtido é maior que o valor de t na tabela, para qualquer nível de significância, admitiu-se que as médias obtidas são estatisticamente diferentes. Isso significa que os conteúdos de DNA extraídos da mesma massa de amostra, considerando-se como base a matéria seca de cada uma, são diferentes para as variedades não-transgênicas e transgênicas utilizadas no presente trabalho. Desta forma, os valores obtidos serão considerados como diferentes nos cálculos finais das diluições do material transgênico (positivo) em material não-transgênico (negativo), com uma relação média de conteúdo de DNA da soja RR : conteúdo de DNA da soja não-transgênica de 1,04 para o método de extração por CTAB. Trapmann et al. (2002b) chegaram a resultados próximos, com 1,08 de relação média para o método CTAB.

Diluições - as diluições foram determinadas através de cálculo de conteúdo de DNA extraído em cada material, aplicando-se os respectivos descontos da quantidade de água.

Os materiais produzidos e respectivas massas utilizadas de cada um dos materiais-base encontram-se na Tabela 4.4. Embora calculados para obtenção de cerca de 1 grama

de cada material, os valores foram dobrados para que a massa final de cada material produzida atingisse cerca de 2 gramas, o que seria suficiente para 40 extrações de 50 gramas para cada um, conforme protocolo otimizado de extração pelo método CTAB.

Tabela 4.4 - Massa dos materiais de base utilizada para a elaboração de materiais de referência com diferentes concentrações de soja RR.

Material	Soja RR (mg)				Soja NT (mg)	Final (mg)
	100 %	10%	5%	1%		
MR 10 %	117,24	-	-	-	1.054,94	1.172,18
MR 5%	-	515,55	-	-	572,83	1.088,38
MR 2%	-	189,84	-	-	803,10	992,93
MR 1%	-	94,92	-	-	949,41	1.044,33
MR 0,5 %	-	-	108,69	-	1.030,03	1.138,72
MR 0,1 %	-	-	-	113,17	1.028,84	1.142,01

PCR quantitativa-competitiva – realizada com os candidatos a materiais de referência MR 0,1% e MR 1,0% para verificação das ordens de grandeza alcançadas. Ambos apresentaram os resultados esperados nas co-amplificações com os padrões do kit de semi-quantificação (Figura 4.4).

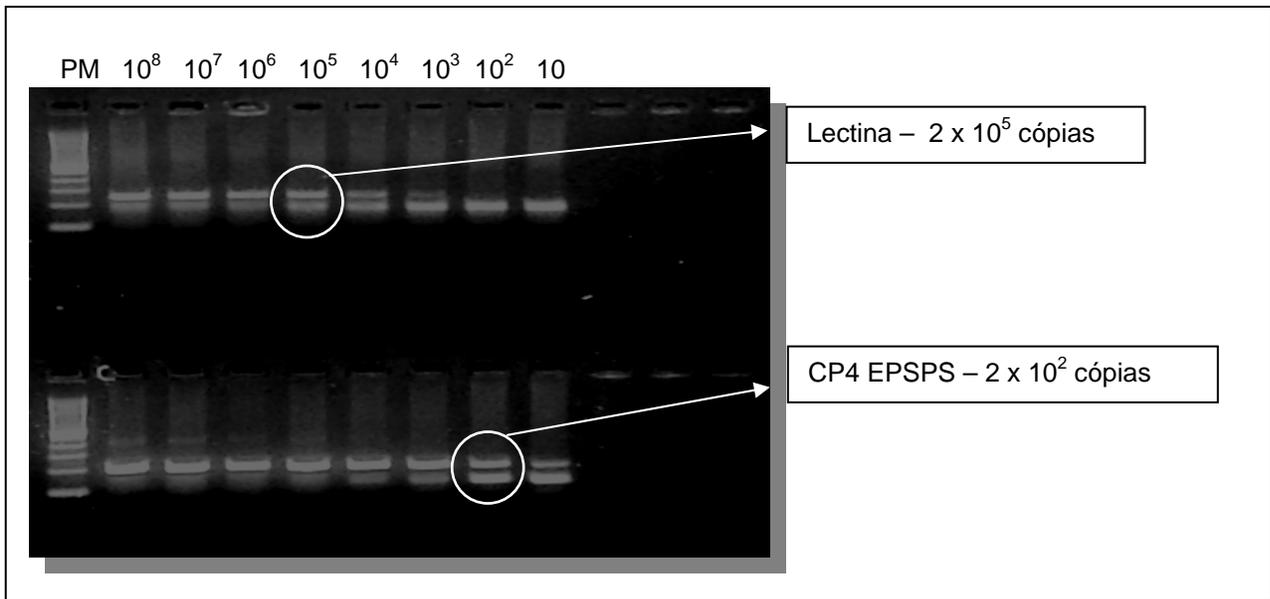


Figura 4.4. PCR quantitativa competitiva com material de referência 0,1% de soja RR. PM = 100 pb.
 Concentração de CP4 EPSPS/Lectina = $2 \times 10^2 / 2 \times 10^5 = 0,001 = 0,1 \%$. PM = 100 pb.

PCR em tempo real – as curvas-padrão para os genes da Lectina e do promotor CaMV 35S (Figura 4.5), foram determinadas com posterior verificação da presença de bandas inespecíficas na curva de desnaturação obtida no termociclador (Figura 4.6). As amplificações com os *primers* para o promotor 35S nas amostras sem DNA (Branco) ou com pequenas concentrações de material transgênico apresentaram, freqüentemente, formação de possíveis dímeros dos *primers*. Tendo sido definidas as curvas-padrão, realizou-se a quantificação dos genes da Lectina e do promotor CaMV 35S (Figura 4.7), para que, a partir da divisão do valor do segundo pelo valor do primeiro, se definisse a concentração de soja transgênica sobre o conteúdo total de soja de cada um dos materiais candidatos a material de referência. Outras curvas de amplificação e de desnaturação de PCR em tempo real podem ser visualizadas nos Apêndices A e B.

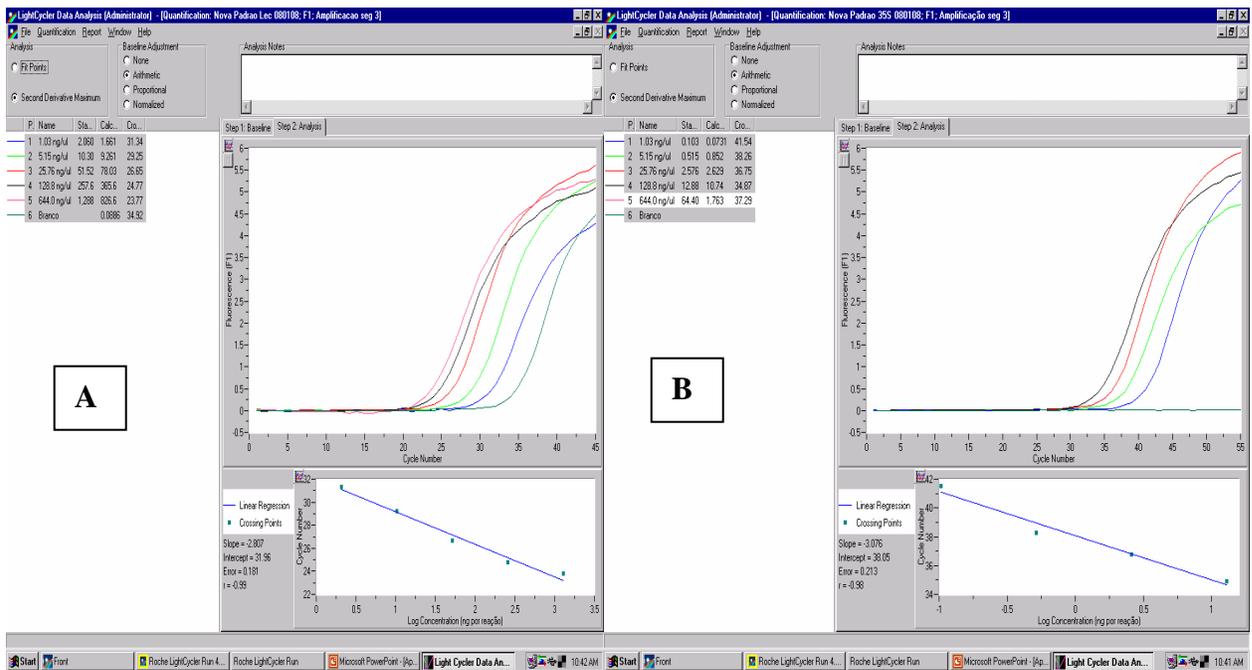


Figura 4.5. Curvas-padrão para quantificação dos genes da Lectina (A) e do promotor CaMV 35S (B) em soja transgênica Roundup Ready®.

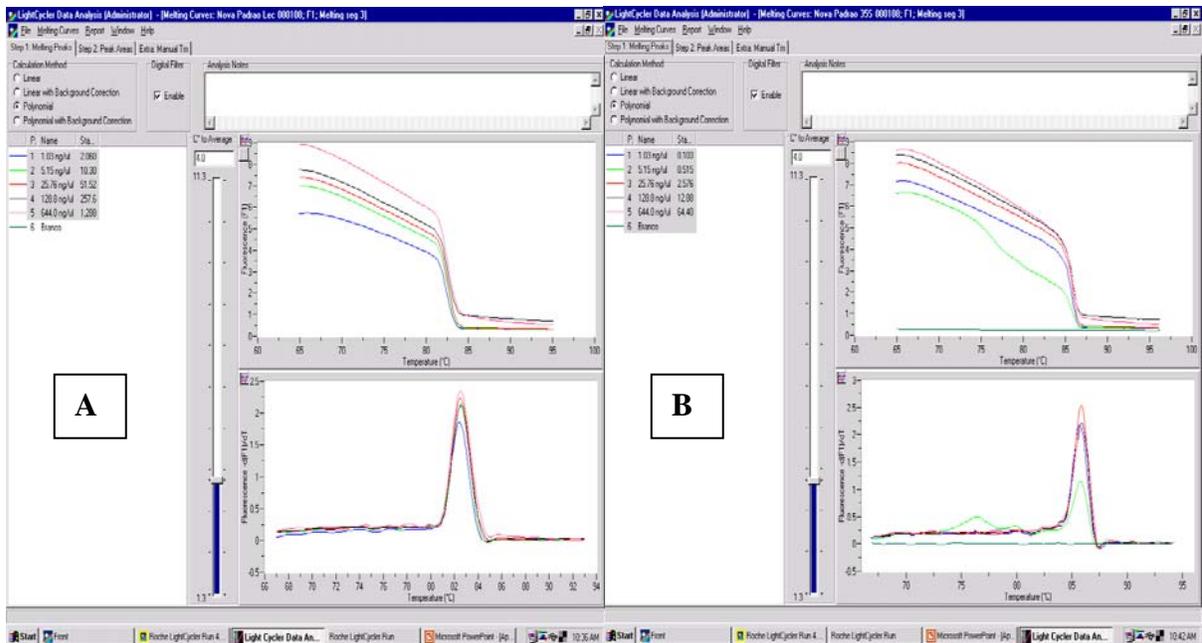


Figura 4.6. Curvas de desnaturação da amplificação em PCR tempo real dos genes da Lectina (A) e do promotor CaMV 35S (B) em soja transgênica Roundup Ready®.

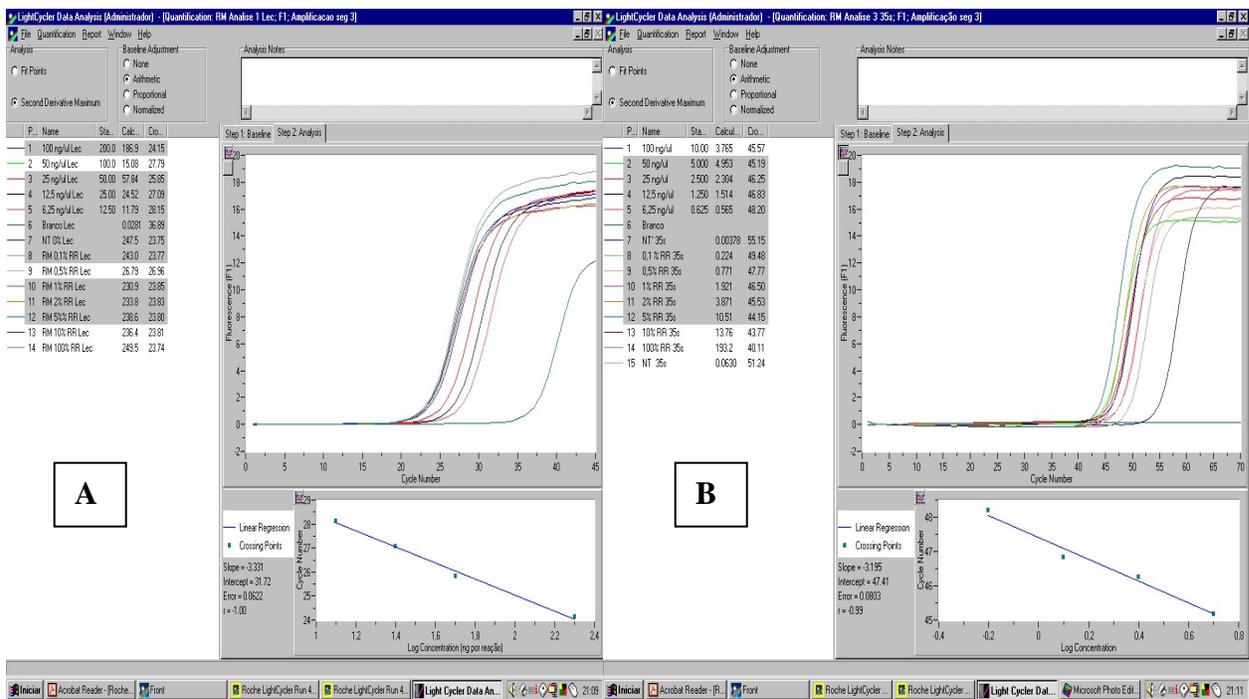


Figura 4.7. Curvas de PCR em tempo real com quantificação dos genes da Lectina (A) e do promotor CaMV 35S (B) dos candidatos a material de referência de soja transgênica Roundup Ready®.

O método de análise por PCR em tempo real é bastante sensível e, portanto, suscetível a variações devidas à manipulação ou ainda a variações decorrentes da determinação da concentração de DNA dos padrões por espectrofotômetro. Muitas das análises realizadas apresentaram problemas na amplificação de algumas reações, seja na constituição da curva-padrão ou na amplificação de amostras, o que gerou grande investimento de tempo na sua otimização e compilação dos dados.

O uso do método de quantificação com o corante intercalar de fita dupla de DNA SYBR® Green traz como vantagens o baixo custo e a simplicidade na aplicação, uma vez que não exige construção de sonda e utiliza os mesmos *primers* da análise qualitativa. Apresenta, porém, inespecificidade na produção de fluorescência, fato que pode afetar uma quantificação mais apurada, o que não ocorre com o uso de sondas específicas marcadas com fluoróforos. A necessidade de que a quantificação seja feita em duas reações distintas aumenta o erro analítico. O uso de equipamentos que permitam reações *multiplex*, com o uso simultâneo de sondas marcadas com diferentes fluoróforos, além da

adição de marcadores internos de referência, diminui o erro e aumenta a especificidade das reações, apresentando resultados mais confiáveis.

Os resultados das análises realizadas em dois anos consecutivos estão na Tabela 4.4, bem como os níveis de garantia dos materiais de referência certificados do Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM, Geel, Bélgica) (Figura 4.8). As curvas padrão apresentaram razão r próxima de 1,00, indicando uma boa correlação entre a fluorescência captada (relativa às concentrações) e o número de ciclos necessários para o início de captação. O “*slope*”, que corresponde à inclinação da reta na equação de regressão linear e é indicativo da eficiência de cada reação, apresentou valor próximo para as duas retas (-3,301 e -3,195, respectivamente), o que permite sua associação no cálculo das concentrações obtidas (Figura 4.7). Os resultados obtidos nas análises em dois anos consecutivos com os candidatos a materiais de referência (Tabela 4.5) foram comparados pelo teste t de Student com os valores de garantia dos materiais de referência certificados – CRM - e com os valores obtidos por Trapmann (2002b) com os mesmos *primers* utilizados no presente trabalho (Figura 4.8). Wurz et al.(1999) em análise dos materiais de referência disponíveis, encontraram valores de 0,07 % para o CRM 0,1 % e, ainda, 0,45 % para o CRM 0,5 % e de 1,8 % e 1,91 % para o material certificado em 2,0 %. Atribuem essas diferenças a efeitos inerentes ao sistema, mais do que a erros estatísticos.

Aplicando-se o teste t de Student em níveis de confiança de 90 e 95 %, os materiais de referência – MR - elaborados a 0,0 %; 0,5 %, 1,0 % e 5,0 % de soja RR são iguais, na média, aos materiais de referência certificados, com exceção do MR 0,1 % de soja RR, que apresentou valor t_{exp} (4,47) significativamente maior que o valor t crítico da tabela para ambos os níveis (1,53 e 2,13, respectivamente). Isso indica um valor significativamente diferente do esperado, ainda que o seu valor de concentração média encontrado esteja muito próximo do indicado.

Tomando-se por base os valores encontrados por Trapmann (2002b) com mesmos *primers* utilizados para quantificação (Figura 4.8), o teste t de Student também aponta diferença significativa de valor com o material de referência certificado a 0,1 % de concentração de soja RR ($t_{exp}=2,23$, para os mesmos valores de t crítico da tabela). Na comparação dos dois resultados, temos valores significativamente iguais nos níveis de

confiança de 90 e 95 % para os materiais candidatos e certificados 5,0 %, 2 % e 1 %, diferindo, entretanto, nos materiais a 0,5 % e 0,1 % de concentração de soja RR.

Pontos que merecem atenção e que influenciam os resultados de quantificação estão ligados, ainda, à degradação diferencial dos genes constitutivos e transgênicos durante o processamento (moagem e mistura no moinho criogênico), a diferenças na taxa extração de cada um ou ainda a diferentes taxas de amplificação dos genes em função do grau de degradação do DNA (CORBISIER et al., 2005).

Tabela 4.5 - Resultados de quantificação por PCR em tempo real para os candidatos a materiais de referência, extração de 50 mg/material. Curva-padrão a partir de IRMM 410-5 (5% RR).

Material candidato	1º ano	n	2º ano	n	Média	DP
MR 0 %	0.002	2	0.005	3	0.004	0.002
MR 0,1 %	0.09	2	0.09	3	0.09	0.001
MR 0,5 %	0.49	2	0.48	3	0.49	0.003
MR 1,0 %	0.83	2	1.10	3	0.97	0.19
MR 2,0 %	1.66	2	1.41	3	1.53	0.17
MR 5,0 %	4.41	2	4.78	3	4.59	0.26

Table 15: Quantitation of Roundup Ready™-DNA with 35S screening real-time PCR, DNA extracted with DNeasy Plant Mini, determination in triplicate using 20 mg/extraction.

CRM	Certified GMO Concentration [%]	Number of measurements [n]	Roundup Ready™ Concentration ¹	
			[%]	std dev
IRMM-410S-0	< 0.03	5	(0.02) ²	(0.01)
IRMM-410S-1	0.10 ± 0.05	5	0.05	0.01
IRMM-410S-2	0.50 ± 0.10	5	0.24	0.07
IRMM-410S-3	1.00 ± 0.2	5	0.75	0.20
IRMM-410S-4	2.0 ± 0.3	5	1.73	0.15
IRMM-410S-5	5.0 ± 0.6	5	4.93	0.24

Figura 4.8. Tabela com resultados obtidos com os materiais de referência certificados do IRMM utilizando-se os mesmos *primers* (extraído de TRAPMANN et al., 2002b).

4.4 Conclusões

Materiais de referência são ferramentas imprescindíveis para análises de detecção e quantificação de organismos geneticamente modificados, de forma a atender a legislação vigente e uniformizar resultados de detecção e quantificação entre diferentes métodos e laboratórios.

O método de extração pelo detergente brometo de hexadecyltrimethylammonium – CTAB – (DOYLE; DOYLE, 1990) mostrou variação menor na quantidade de DNA extraído de material transgênico e não-transgênico quando comparado com o DNeasy[®] Plant Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), além de apresentar um custo inferior, demonstrando ser um método adequado para extrações uniformes de DNA, embora exija um tempo maior para sua condução se comparado ao tempo gasto na extração com o kit.

Para as variedades utilizadas no presente trabalho, a quantidade total de DNA extraída da soja transgênica ($115,74 \mu\text{g}.100 \text{ mg MS}^{-1}$) é significativamente maior que aquela obtida na soja não-transgênica ($112,22 \mu\text{g}.100 \text{ mg MS}^{-1}$), confirmando resultados publicados na literatura (Trapmann et al. 2002).

O método de produção de materiais de referência com o uso de moinho criogênico para a desintegração, a mistura e a homogeneização do material geneticamente modificado com o material não-transgênico, com a verificação por PCR em tempo real com o uso do corante intercalar SYBR[®] Green, permitiu a obtenção de materiais com valores significativamente iguais aos materiais certificados nos níveis de 0%, 0,5 %, 1,0 %, 2,0 % e 5,0 % de soja transgênica Roundup Ready[®]. O material candidato 0,1 % de soja RR, utilizando os mesmos métodos de produção e avaliação, não atingiu valor de concentração significativamente igual ao esperado.

5. MARCADORES MOLECULARES AFLP NA CARACTERIZAÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA RR (Roundup Ready®)

5.1 Introdução

A caracterização e a determinação da diversidade genética em plantas podem ser realizadas por métodos isoenzimáticos ou pelo isolamento e análise de regiões particulares do DNA de seu genoma, que podem usadas como marcadores. O estudo do DNA permite a identificação de possíveis alelos importantes para a sua caracterização e diferenciação na população. Essas diferenças entre indivíduos ou grupos podem ser obtidas com o uso de diferentes estratégias moleculares que permitem isolar as diferenças em populações altamente endogênicas, com genomas muito semelhantes. A técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR na sua sigla derivada do Inglês - Polymerase Chain Reaction) possibilita efetuar uma análise simultânea de múltiplos indivíduos, através da presença/ausência de produtos de amplificação produzidos e, no caso de existência de diferentes grupos de indivíduos ou espécies, com o uso de iniciadores (*primers*) randômicos ou que visem à amplificação de regiões específicas, o método permite isolar preferencialmente grupos ou famílias através da identificação de seqüências únicas ou comuns dentro dos genomas em comparação.

Diversas técnicas de marcadores genéticos têm sido desenvolvidas, mas nenhuma é considerada universalmente ideal. A escolha do método depende da questão a ser pesquisada, da espécie envolvida e da resolução necessária, bem como do financiamento e da tecnologia disponíveis. Dentre eles podem ser citados: Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Simple Sequence Repeats (SSR ou microssatélites), Variable Number of Tandem Repeats (VNTR), Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) e, ainda, o seqüenciamento de regiões específicas do genoma (16S, 18S, ITS etc.).

Desde a sua introdução, marcadores do tipo RAPD têm se tornado populares pela sua versatilidade e facilidade na análise genética das plantas (WILLIAMS et al., 1990), tendo sido usados na identificação de cultivares (YANG; QUIROS, 1993), na determinação de

parentesco (ELISIÁRIO; JUSTO; LEITÃO, 1999), avaliação das relações genéticas (NICESE; HORMAZA; McGRANAHAN, 1998) e estimativa da variabilidade genética da população (HARRISON et al., 1997). Os marcadores RAPD são usados geralmente para detectar polimorfismos em organismos para os quais são disponíveis insuficientes informações genéticas, mas eles podem também gerar altos níveis de artefatos PCR. Estes marcadores são gerados pela amplificação de segmentos de DNA ao acaso com *primers* curtos (geralmente cerca de 10 nucleotídeos) de uma seqüência de nucleotídeos arbitrária. A PCR deve ocorrer sob relativamente baixa seletividade. Os produtos de amplificação devem ser presentes ou ausentes entre os indivíduos e se presentes, eles podem diferir em comprimento. RAPD são marcadores dominantes, mas alelos homólogos podem às vezes ser identificados com a ajuda de pedigrees.

As famílias de DNA repetitivo, objeto de análise em SSR ou microsatélites, são características livres de homoplasias e podem ser usadas para identificação de espécies em uma ampla variabilidade de situações ambientais. A ocorrência de seqüências repetitivas em forma de tandem, de DNA satélite altamente repetitivo, é uma característica de todos os organismos eucarióticos, sendo os tamanhos das repetições variando ao redor de 120-180 ou 320-370 pb. A seqüência de nucleotídeos das repetições satélites varia consideravelmente entre os diversos organismos, podendo ser usada para separação e identificação das relações evolutivas entre espécies relacionadas entre si.

Mais sofisticado e requerendo uma melhor resolução na biologia molecular para sua utilização através de detecção por fluorimetria ou radioatividade, os marcadores AFLP (amplified fragment length polymorphisms) (VOS et al., 1995) se tornaram populares para identificação de variedades (KIM et al., 1998), caracterização de germoplasma (CERVERA et al., 1998) e avaliação da diversidade genética (ZHU et al., 1998), seja para fins de gerenciamento de recursos genéticos como para uso em programas de melhoramento, entre outras funções. Tanto os marcadores RAPD como AFLP permitem, teoricamente, igual estimativa das seqüências de DNA ao longo do genoma, independente da sua localização nos cromossomos ou particularidades da sua seqüência de nucleotídeos. Porém, a maior razão multiplex dos marcadores AFLP fazem deles mais adequados para a distinção entre genótipos mais relacionados entre si, tais como

diferentes clones dentro de um determinado cultivar (CERVERA et al., 1998), que ocorrem muitas vezes sob pequenos eventos mutacionais, apresentando, portanto, diferenças genéticas mínimas, além de, com isso, permitir inferência sobre modos de reprodução sexual x assexual (MUELLER; WOLFENBARGER, 1999). Também têm sido amplamente aplicados em análises de variação genética dentro de populações (TRAVIS; MASCHINSKI; KEIM, 1996; WINFIELD et al., 1998).

Métodos semelhantes vêm sendo utilizados para controle e identificação de cultivares de uvas (CERVERA et al., 1998; VIGNANI et al., 2002), azeitonas (ANGIOLILLO; MENUCCINI; BALDONI, 1999; SENSI et al., 2003), soja (MIENIE; SMIT; PRETORIUS, 1995), banana (WONG et al., 2001), cevada (FACCIOLI et al., 1999) e outras matérias-primas de interesse na indústria alimentícia.

5.1.1 Marcadores AFLP e caracterização de cultivares

Muitos têm sido os trabalhos de avaliação da diversidade genética e variabilidade em espécies vegetais, alguns voltados para estudos filogenéticos, de mapeamento, aplicação em programas de melhoramento e, mais recentemente, para caracterização e identificação de variedades ou cultivares de produtos agrícolas ou indivíduos numa população (*fingerprinting*).

Karp, Seberg e Buiatti (1996), em revisão das principais técnicas moleculares que podem ser utilizadas para o estudo de diversidade botânica, ressaltam que cada uma difere no modo de resolução quanto às diferenças genéticas, aos tipos de dados que são gerados e ao nível taxonômico. Entre as técnicas apontadas estão RFLP, RAPD, AFLP, VNTR, SSR e seqüenciamento por PCR.

Visando verificar a diferença e pureza de sementes comerciais de soja da África do Sul, Mienie, Smit e Pretorius (1995) utilizaram a técnica de RAPD para identificar 37 cultivares. Vilarinhos (1994) também utilizou marcadores RAPD para caracterização de genótipos de soja no Brasil. Mais recentemente o método RAPD foi utilizado para

identificação de variedades transgênicas de milho e soja em amostras de grãos, produtos processados e materiais de referência certificados, mostrando clusterização para espécies, fonte de recurso e indicando, ainda, a separação de amostras suspeitas de conter OGMs (Yoke-Kqueen e Radub, 2006).

A técnica de AFLP para caracterização de DNA (“fingerprinting”), descrita por Vos *et al.* em 1995, é um método que associa o poder da técnica de PCR com a confiabilidade da técnica RFLP, sendo particularmente indicada para mapeamento e caracterização, bem como para o cálculo de distâncias genéticas entre genótipos. Os marcadores AFLP, junto aos RAPD, destacam-se pela sensibilidade, simplicidade, rapidez e pela capacidade de revelar locos dispersos pelo genoma sem exigência de conhecimento prévio das seqüências-alvo ou de uso de sondas para hibridização (LOPES *et al.*, 2002). AFLP é uma técnica baseada em PCR que envolve a restrição do DNA genômico, seguido pela ligação de adaptadores aos fragmentos gerados e amplificação seletiva por PCR de um subgrupo desses fragmentos. Os fragmentos amplificados são separados em gel e visualizados, geralmente por autoradiografia, coloração com nitrato de prata ou fluorescência. Diversas enzimas de restrição e *primers* para seleção estão disponíveis comercialmente, conferindo alto grau de flexibilidade e possibilitando a manipulação para diferentes aplicações e uma busca eficiente no genoma por polimorfismos.

No presente trabalho o DNA foi digerido com as enzimas *EcoRI* (corte raro) e *MseI* (corte freqüente) (Figura 5.1) e ligado aos adaptadores respectivos, que têm duas importantes características que asseguram uma alta eficiência: (i) não são fosforilados após terem sido sintetizados, e isto evita auto-ligação; (ii) suas seqüências são desenhadas de tal forma que a ligação do adaptador com DNA digerido não restaura um sítio *EcoRI* ou *MseI*, permitindo assim, que a digestão e ligação ajam simultaneamente (ZANE, 2002).

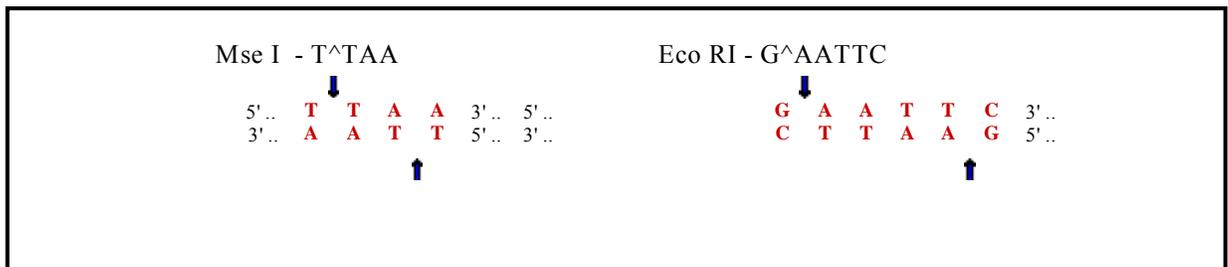


Figura 5.1. Características do sítio de restrição e do corte das enzimas *MseI* e *EcoRI* (REBASE, Roberts et al., 2007).

Savelkoul et al. (1999) apontam o método AFLP, como um dos mais promissores métodos moleculares de identificação e tipificação de organismos procariotos e eucariotos em nível de DNA. Acentuam ainda os altos graus de reprodutibilidade e poder discriminatório do método, que permite sua aplicação em taxonomia, diagnósticos e estudos epidemiológicos.

Bonato (2000) avaliou a diversidade genética entre 317 cultivares de soja liberados no Brasil entre 1962 e 1998 utilizando a técnica de AFLP, concluindo que o número de bandas polimórficas encontradas, em número de 78 em um total de 394 bandas, utilizando-se de 6 combinações entre diferentes tipos de *primers* para *EcoRI* e *MseI*, suficientes para avaliar a similaridade genética entre as cultivares, conforme análise de *bootstrap*. Seus resultados mostram ainda a alta similaridade genética entre as cultivares de soja liberadas no Brasil no período avaliado.

Ridout e Donini (1999) revisaram as aplicações da AFLP em pesquisas com cereais, comparando a técnica com outras três técnicas moleculares bastante utilizadas - RAPD, RFLP, SSR (Figura 5.2). Destacaram a necessidade de pequena quantidade inicial de DNA para o método AFLP, além de se constituir uma técnica simples e confiável de formação de um estoque de DNA molde. Ressaltaram também o poder discriminatório da AFLP, capaz de revelar mudanças ocultas do genoma que podem ocorrer em plantas transgênicas de arroz geradas por bombardeamento de partículas ou eletroporação. Concluem declarando a técnica como “sendo de valor inestimável para a análise de

características complexas, para a identificação de variedades e para o rápido isolamento de genes de importância”.

Table 1. Comparison of marker techniques commonly used in cereals research					
Feature	Marker system				Refs
	AFLP	RFLP	RAPD	SSR	
DNA required (μg)	0.5–1.0	10	0.02	0.05–0.10	24,25
PCR-based	Yes	No	Yes	Yes ^d	
Level of polymorphism (Hav ^b)	0.11	0.28	N/A ^c	N/A	3
	0.29–0.64	N/A	0.33–0.34	0.47–0.76	4
	0.32	0.41	0.31	0.6	22
	Medium	High	Medium	Very high	24
Effective multiplex ratio ^d	50–100	N/A	20–50	1.0	24
	19.2	0.25	1.56	1.0	22
	24.7	3.0	N/A	N/A	26
Marker index (MI ^e)	6.14	0.1	0.48	0.6	22
Reproducibility	Very high	Very high	Fair ^f	Very high	3,14,25
Cost	N/A	N/A	2x.AFLP	N/A	4
	\$105 ^g	\$178	N/A	N/A	26
	Medium	N/A	Low	High ^h	22
Ease of use	Difficult initially ⁱ	Labour intensive	Easy	Easy ^j	3,14,22

^aSequence information required.
^bHav, average heterozygosity. An average for the probability that two alleles taken at random can be distinguished.
^cN/A, data not available in the reference cited.
^dEffective multiplex ratio is the number of polymorphic loci analysed per experiment in the germplasm tested.
^eMarker index is the product of the average expected heterozygosity and the effective multiplex ratio.
^fBetween laboratories, influenced by *Taq* polymerase and thermocycler.
^gAlso savings of time compared to RFLP.
^hCost of initial sequencing high.
ⁱBecame easier with practise.
^jSome technical problems associated with silver staining.

Figura 5.2. Comparação entre técnicas de marcadores comumente utilizadas em pesquisas com cereais (fonte: RIDOUT e DONINI, 1999).

Santos e Simon (2002), em trabalho com duas populações distintas de cenoura, verificaram que as bandas que apresentavam a mesma posição na eletroforese em gel de poliacrilamida, após digestão dos respectivos DNAs com as mesmas enzimas e amplificação com os mesmos *primers* (AFLP), mostraram alto grau de identidade entre as seqüências. Isto permitiu o desenvolvimento de *primers*, que continham a região que inclui o sítio de restrição da enzima com mais 20 nucleotídeos, para serem utilizados como sequence characterized amplified regions (SCAR). SCARs, segundo definição de Paran e Michelmore (2004), são marcadores baseados em PCR que representam únicos,

geneticamente definidos, *loci* que são identificados por amplificação do DNA genômico por PCR, com pares de *primers* específicos. Por outro lado, a conversão de marcadores AFLP em marcadores específicos para PCR, com a construção de *primers* que se anelam a regiões externas das bandas polimórficas nem sempre é viável. Em estudo com centeio e trigo, no isolamento de dez fragmentos específicos da primeira espécie e 16 fragmentos específicos da segunda, somente de 20 a 30% dos *primers* desenvolvidos para a amplificação desses fragmentos obtiveram o resultado esperado, enquanto o restante amplificou regiões diferentes das esperadas ou não apresentaram resultado algum (SHAN; BLAKE; TALBERT, 1999).

Singh et al. (2002) utilizaram método AFLP para estudar a variação genética intra-populacional de *Azadirachta indica* A.Juss., o neem, encontrando resultados satisfatórios em relação à distinção e não-ambigüidade entre os fragmentos, indicando a robustez e reprodutibilidade da técnica. Wong et al. (2001) estudaram a diversidade genética da banana selvagem *Musa acuminata* Colla na Malásia através de AFLP, recomendando-a como técnica extremamente útil e confiável, embora Creste et al. (2003) afirmem que a técnica de microssatélites tenha provado ser a melhor para a caracterização de cultivares de banana comerciais, em geral organismos poliplóides, por sua característica de alto polimorfismo, reprodutibilidade e facilidade de interpretação, entre outras vantagens.

A variabilidade genômica de cultivar de uva (*Vitis vinifera*) “Sangiovese” por polimorfismo de microssatélite e por AFLP também foi analisada, apontando a importância do uso de testes biotecnológicos para verificação de identidade em programas de seleção e para avaliar relações genéticas e variabilidade dentro de populações (VIGNANI et al., 2002). Em estudo conduzido com 74 cultivares de tomate na Califórnia, o método AFLP demonstrou ser efetivo para a caracterização de cultivares, ainda que a variabilidade entre elas fosse bem menor que a encontrada para espécies selvagens de tomates (PARK; WEST; St. CLAIR, 2004).

Na avaliação de ensaios de marcadores moleculares AFLP, RAPD e SSR para a caracterização de germoplasma de inhame (*Dioscorea rotundata*) da África Ocidental e Central, o método AFLP obteve o melhor índice genótipo (IG), que é o número médio de

perfis gerados por *primer* (ou par de *primers*) por cultivar. A diferença na ordem de 2,5 vezes para mais em relação aos índices obtidos pelos outros dois métodos atesta seu alto poder discriminatório e adequação para a caracterização de cultivares de inhame (MIGNOUNA; ABANG; FAGBEMI, 2003). O mesmo tipo de ensaio conduzido para avaliação de técnicas de caracterização de DNA em germoplasma de batata tetraplóide apontou AFLP (IG = 1,0) como a técnica com maior IG, na razão de 1,5 vezes mais perfis gerados por par de *primers* por cultivar do que a segunda colocada, SSR multi-locus (IG = 0,77) (McGREGOR et al., 2000).

Em trabalhos mais recentes, ligados à rastreabilidade de alimentos, o método de marcadores AFLP foi empregado para discriminação de origem de carne de vaca japonesa e australiana (SASAZAKI et al., 2007) e para distinção de espécies e de origem de peixes e frutos do mar no controle de alimentos processados e no auxílio ao gerenciamento dos estoques marinhos, com constituição de um banco de dados de marcadores para permitir a correta identificação dos produtos (MALDINI et. al., 2006).

O uso da tecnologia de eletroforese capilar (CE) para a inspeção dos resultados de análises moleculares vem diminuindo o tempo de obtenção de resultados em relação à eletroforese em géis de agarose ou poliacrilamida. Sua associação á detecção por fluorescência a laser (LIF, do Inglês *laser induced fluorescence*) a torna uma técnica eficiente e precisa na separação e identificação de fragmentos de DNA (HUACCA, 2007). Apresenta-se como alternativa mais limpa de análise, uma vez que não gera resíduos de tampões, soluções de coloração e revelação ou de polímeros. No presente trabalho foram avaliados os resultados de leitura dos produtos de AFLP pelos métodos de gel de poliacrilamida e eletroforese capilar com detecção por fluorescência a laser com tecnologia de *microchip*, disponível no equipamento Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Alemanha), bem como comparados seus custos e rendimentos operacionais.

5.2 Material e Métodos

O presente trabalho foi desenvolvido em duas etapas em função da dificuldade legal de se obter um conjunto significativo de variedades de soja transgênicas por ocasião do início do projeto. A primeira etapa compreendeu a varredura para definição dos pares de *primers* que apresentam maior taxa de polimorfismo nas reações de PCR seletiva para variedades de soja. Para este *screening* foram utilizados dois pares de eventos próximos entre si, cada par composto por um evento convencional e um transgênico, sendo um par de variedades brasileiras (MonSoy 7501 e MonSoy 7575 RR) e um par de variedades argentinas (DM 48 e DM 4800). Os critérios para a seleção dos *primers* mais eficientes basearam-se na formação de bandas polimórficas entre os dois grupos e na análise de filogenia realizada para cada reação.

A segunda etapa visando a busca dos marcadores de origem sobre o conjunto de variedades argentinas e brasileiras utilizou pares de *primers* que apresentaram polimorfismo entre os grupos na análise de varredura inicial e aqueles que na análise filogenética obtiveram os maiores coeficientes de similaridade dentro dos grupos. As reações que apresentaram resultados significativos com bandas de interesse foram repetidas para fins de confirmação bem como para excisão e purificação dos fragmentos correspondentes aos marcadores procurados.

Complementarmente, foi realizada avaliação do método de eletroforese capilar com uso de *microchip* em equipamento Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha), aplicando-se reamplificações da etapa de varredura para definição das reações com polimorfismos para comparação dos resultados com aqueles obtidos por eletroforese em gel de poliacrilamida 6 %.

5.2.1 Variedades utilizadas

As variedades brasileiras utilizadas na etapa de varredura para definição dos pares de *primers* com polimorfismo foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Valdemar Tornisielo, do CENA.

As variedades da coleção de soja transgênica com resistência ao herbicida glifosato utilizadas neste trabalho são provenientes do Brasil e da Argentina (Tabela 5.1) e foram gentilmente cedidas pela Dra. Ana Christina Sagebin Albuquerque do Centro Nacional de Pesquisa de Trigo – CNPT, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA – e pelo Dr. Carlos Moldes, obtidas junto ao Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - INTA, respectivamente.

Tabela 5.1 – Variedades de soja brasileiras e argentinas utilizadas no trabalho.

Origem	Variedades para Varredura	Variedades da Coleção
Brasileiras	Msoy 7575 RR	(22) BRS 247 RR, (23) BRS 246 RR, (24) BRS 245 RR
	Msoy 7501	(25) BRS 244 RR, (26) BRS 243 RR, (27) BRS 242 RR, (28) BRS Pampa RR, (29) BRS Charrua RR
	DM48	(1) Coker 75 RR, (2) N. Maria 55, (3) DM 2000, (4) AW 2886, (5) DM 2900, (6) DM 3000, (7) DM 3100, (8) A 3550 RG, (9) DM 3700,
Argentinas	DM 4800	(10) A 3901 RG, (11) A 4201 RG, (12) A 4305 RG, (13) AW 4500, (14) DM 4600, (15) A 4725 RG, (16) A 4910 RG, (17) A 5409 RG, (18) A 5417 RG, (19) A 6019 RG, (20) A8100 RG, (21) A9000 RG

5.2.2 Método AFLP

Limpeza dos grãos – os grãos recebidos foram lavados em água destilada, depois imersos por 5 min em solução de hipoclorito 3% e novamente enxaguados em água destilada. Em seguida foram colocados sobre folhas de papel absorvente, para retirada do excesso de água, e levados a estufa a 37°C para secagem durante 24 horas.

Extração de DNA – moagem de doze a quinze grãos escolhidos ao acaso em nitrogênio líquido, evitando-se aqueles que apresentavam defeitos visuais como quebras, manchas ou depressões. Pesagem de 50 mg em tubo de microcentrífuga. Extração pelo método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990). Os processos de extração de DNA dos eventos não-transgênicos foram conduzidos em dias diferentes das extrações dos materiais transgênicos.

PCR qualitativa - em seguida à extração, foi conduzida reação de PCR com *primers* para os genes da Lectina da soja e para o transgene da CP4 EPSPS, que confere a característica de resistência à ação do glifosato, visando confirmar as características de cada uma das variedades. As reações de volume final de 25 µL continham tampão para PCR menos Mg (Invitrogen Brasil), 2,4 mM MgCl₂, 100 µM de cada dNTP, 1 U de *Taq* polimerase. Todas as etapas de amplificação foram conduzidas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, US).

Verificação e quantificação do DNA – eletroforese de alíquotas de 3 µL da solução de DNA em gel de agarose 1% para verificação da qualidade do DNA obtida. Quantificação em espectrofotômetro com leitura de absorbância em feixe de luz UV de 260 nm de comprimento da diluição de 50 vezes da solução de DNA.

Diluição do DNA – determinadas as concentrações de DNA após a extração procedeu-se às diluições para que se atingisse concentração determinada no protocolo de AFLP, que é entre 50 – 250 ng.µL⁻¹.

Digestão do DNA – a reação ocorreu nas seguintes condições para o volume final de 50 μL : 10,0 μL de DNA genômico (50 - 250 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 5,0 μL de tampão 10X OnePhorAll (Amersham Pharmacia), 0,5 μL BSA (10 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 1,25 μL de *MseI* (4 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$); 0,5 μL de *EcoRI* (10 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 37,75 μL de ddH₂O. A reação é incubada a 37°C por 3h, recebendo breves agitações em *vortex* a cada hora. As enzimas são inativadas a 70°C por um período de 15 min.

Preparação dos adaptadores AFLP – oligos sintetizados para cada uma das extremidades digeridas pelas respectivas enzimas:

EcoRI: 5'- CTC GTA GAC TGC GTA CC - 3' / 5'- AAT TGG TAC GCA GTC TAC - 3'

MseI: 5'- GAC GAT GAG TCC TGA G - 3' / 5'- TAC TCA GGA CTC AT- 3'

Os adaptadores são previamente preparados para que, a partir dos oligos sintetizados, formem um pequeno segmento de fita dupla com pontas coesivas que se ligarão às extremidades do DNA genômico digerido com cada uma das enzimas. Essa preparação consiste nas seguintes reações (para 120 ligações):

EcoRI – 3,4 μL oligo 1 (1 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$); 3,0 μL oligo 2 (1 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$); 6,0 μL de tampão OPA (One-Phor-All) e 107,6 μL de ddH₂O.

MseI – 64,0 μL oligo 1 (0,5 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$); 56,0 μg oligo2 (0,5 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$); 7,0 μL tampão OPA.

As preparações com os adaptadores foram levadas a um termociclador para um único ciclo com os seguintes parâmetros: 65°C – 10 min; 37°C – 10 min; 25°C – 10 min. Armazenar em congelador a - 20°C.

Ligação dos adaptadores – a seguinte mistura é preparada par um volume de 10 μL : 1,0 μL de tampão 10X da T4 DNA Ligase; 1,0 μL do adaptador da *EcoRI*; 1,0 μL do adaptador da *MseI*; 0,33 μL de T4 DNA Ligase a 3 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ (Promega). Essa mistura é

adicionada, no seu volume total, aos 50,0 μL da reação de digestão do DNA genômico. Misturam-se as soluções por inversão e vórtex, incubando a mistura a temperatura ambiente por 3 h, tomando-se o cuidado de agitá-la suavemente a cada hora. Armazena-se a preparação digerida e ligada aos adaptadores em congelador a -20°C para uso na próxima etapa.

Pré-seleção - A pré-seleção foi feita com o uso de *primers* contendo um único nucleotídeo seletivo ao final da ligação 3', que parecia com o primeiro nucleotídeo localizado logo após o sítio original de restrição. Dessa forma, com o uso simultâneo das bases seletivas (*EcoRI-N*, *MseI-N*), é possível amplificar todos os fragmentos adjacentes aos sítios de clivagem das endonucleases *EcoRI* e *MseI*, desde que eles gerem um tamanho apropriado após a reação de PCR. A mistura digestão-ligação é diluída (1:10) e amplificada diretamente em um volume total de 20 μL , com os *primers* de pré-seleção, contendo um nucleotídeo de seleção, que no presente caso foram os seguintes:



As condições para a PCR (VOS et al., 1995): tampão Taq polimerase 1X, MgCl_2 1,5 mM, primer *EcoRI-N/MseI-N* 120 μg , dNTPs 200 μM cada, 0,4 unidades de DNA Taq polimerase, 5 μL de 1/10 solução de DNA digerido-ligado. A reação foi realizada em termociclador GeneAmp PCR system 9700 (Perkin-Elmer), preparado para as seguintes condições: 94°C 30s, 56°C 1 min, 72°C 1 min, por 20 ciclos.

Amplificação seletiva - Em seguida, o produto da pré-amplificação foi diluído dez vezes com 10mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA pH 8,0 e usado como DNA molde em nova amplificação, desta vez com os *primers* contendo três nucleotídeos seletivos (indicados como NNN):



(5'- GAT GAG TCC TGA GTA A NNN - 3') = M-GNN

O laboratório conta com 15 *primers* seletivos (Tabela 5.2), com três nucleotídeos de seleção cada um, para cada uma das extremidades de digestão (*EcoRI* e *MseI*), permitindo um total de 225 combinações de amplificação para cada amostra analisada. A amplificação por PCR se deu nas seguintes condições (VOS et al., 1995): 36 ciclos = 30 s a 94°C, 30 s a 65°C (reduzindo 0,7°C por ciclo durante 12 ciclos, continuando a 56°C pelos 23 ciclos restantes), 72°C por 1 min.

Tabela 5.2 - Nucleotídeos de seleção de *primers* para AFLP

<i>EcoRI</i>	A	C	T	G	
T	TAT	TCT	TTT	TGT	T
T	TAG	TCG	TTG	TGG	G
T	TAA	TCA	TTA	TGA	A
T	TAC	TCC	TTC		C
<i>MseI</i>					
G	GAG		GTG	GGG	G
G	GAA	GCA	GTA	GGA	A
G	GAC	GCC	GTC	GGC	C
G	GAT	GCT	GTT	GGT	T

Certificação preliminar da amplificação – por eletroforese em gel de agarose 1,5% de 5 µL dos produtos da amplificação seletiva, juntamente com tampão de carregamento 6X (sacarose e azul de bromofenol), para verificar a presença de bandas AFLP amplificadas por PCR (Figura 5.3). Este procedimento, não presente no protocolo original, foi introduzido para que se evitasse a condução da eletroforese em poliacrilamida, procedimento que requer grande quantidade de tempo e reagentes, com produtos de amplificação comprometida ou defeituosa.

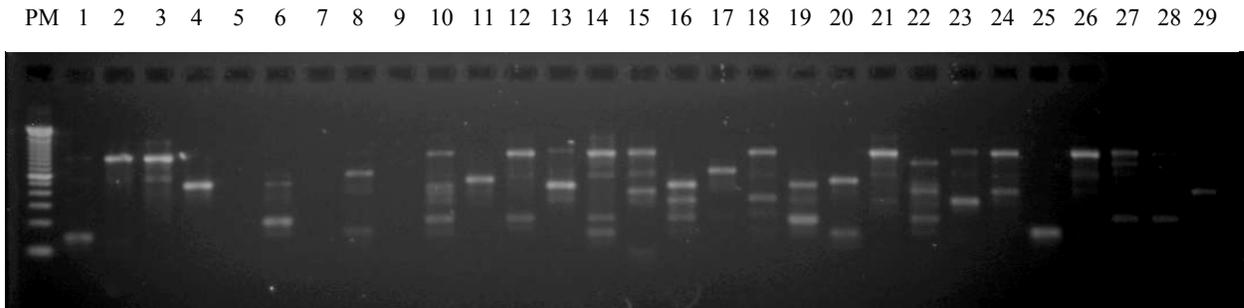


Figura 5.3. Padrão dos produtos da amplificação seletiva de AFLP em gel de agarose 1,5%. PM= 100 pb, 1-21= variedades de soja argentinas; 22-29 = variedades de soja brasileiras. Primers: $E_{TGG}M_{GAG}$.

Eletroforese em gel de poliacrilamida 6% - os produtos da amplificação foram, então, misturados em 8 μ L de corante formamida (98% formamida, 10mM EDTA pH 8,0 e azul de bromofenol e xylenocianol como corantes indicadores), aquecidos por 5 min a 94°C para desnaturação e rapidamente resfriados em gelo para evitar a renaturação das fitas duplas. Cada amostra de 5 μ l foi carregada em gel de poliacrilamida desnaturante (com uréia 7M) a 6%, previamente condicionado por 1 hora com corrente elétrica de 55 W de potência para atingir a temperatura de corrida adequada, em torno dos 50°C. A eletroforese foi conduzida em potência constante de 40 W por 3 h em equipamento Sequi-Gen GT da Bio-Rad (Hercules, CA, USA). O gel foi corado com solução de nitrato de prata e revelado com solução de carbonato de sódio, segundo protocolo de Creste, Tulmann Neto e Figueira (2001), e sua imagem capturada em scanner para registro e estudo das bandas. Todos os arquivos foram salvos como imagens do tipo .jpg e .tif, para uso posterior em diferentes programas e sistemas.

Análise das imagens – durante as etapas de varredura e análise, as imagens foram digitalizadas, normalizadas e as bandas presentes foram reconhecidas e registradas pelo programa Bionumerics 4.0 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). A partir da matriz de presença/ausência de bandas, o grau de similaridade genética foi estimado pelo coeficiente de Jaccard, servindo de base para a construção de dendrogramas pelo método UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean). As reações com pares

de *primers* seletivos que possibilitaram a formação de clusters com a mesma origem em comum e que, dentro do mesmo grupo de origem, apresentaram índice de similaridade maior que 50 % foram selecionadas para a realização das análises com a coleção de variedades argentinas e brasileiras.

Eletroforese capilar em microchip – com o equipamento Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha), 21 ampliações seletivas da etapa de varredura foram analisadas por eletroforese capilar com detecção por fluorescência a Laser (CE-LIF), utilizando o kit DNA 1000 LabChip® (Figura 5.4) e o software Agilent Biosizing versão A.02.12 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha). Para a aplicação das amostras e condução das análises, seguiu-se o protocolo do fabricante, em que cada chip comporta o carregamento de 12 amostras, utilizando-se somente 1 µL da cada uma, juntamente com uma matriz gel-corante e com o uso de marcadores internos em cada pocinho, além da presença de uma escala de DNA externa que serve de referência para cada corrida.



Figura 5.4. DNA LabChip para eletroforese capilar (Agilent Technologies, Alemanha)

Isolamento das bandas – realizadas as novas reações com *primers* seletivos sobre todas as variedades da coleção, as bandas consideradas polimórficas entre os grupos de

diferentes origens, foram recortadas e recuperadas do gel, segundo protocolo de Santos e Simon (2002), para reamplificação. Utilizando-se uma lâmina de bisturi, as bandas foram retiradas do gel de poliacrilamida logo após a coloração com nitrato de prata, sendo colocadas em tubos de microcentrífuga esterilizados de 1,5 mL. Os fragmentos de gel com as bandas foram macerados e esmagados com pontas da pipeta descartáveis esterilizadas em 500 μL de solução TE pH 8,0, sendo congeladas em freezer -80°C por 20 min, aquecidas a 94°C por 5 min e agitadas a 180 rpm por 2 horas. Em seguida, adicionou-se 500 μL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1 v/v) e homogeneizou-se a solução por inversão para formar uma emulsão. Após centrifugar a $9.000\times g$ por 10 min, retirou-se a solução aquosa e adicionou-se 2/3 do volume de isopropanol, misturando-o por inversão. Centrifugação a $9.000\times g$ por mais 10 min e descarte da fase líquida. Os tubos foram secos em concentrador a vácuo a 30°C por 10 min. A ressuspensão dos precipitados foi feita com 60 μL de tampão TE pH 8,0, breve agitação em vortex e congelamento a -20°C para armazenamento.

Construção da tabela de reações – para o auxílio na programação das reações a serem realizadas, uma vez que o número inicial de combinações possíveis de *primers* seletivos era alta (total de 225 pares), foi formulada uma tabela para cruzamento de todos os pares de *primers* disponíveis. No decorrer da varredura, a tabela serviu para a marcação das reações que apresentaram bons índices de polimorfismo. Essa marcação acabou levando à identificação de alguns *primers* com maior potencial de formação de bandas polimórficas, que foram destacados para que fosse facilitada a sua visualização nas etapas de formulação de novas reações de amplificação seletiva.

Reamplificação das bandas – as bandas isoladas e recuperadas do gel foram reamplificadas com os mesmos *primers* da reação seletiva, em nova reação de PCR de 25 μL , contendo 2,5 μL de tampão de PCR 10X menos Mg (Invitrogen Brasil), 1,0 μL de cloreto de magnésio 50 mM, 0,5 μL de dNTPs 10 mM, 1,0 μL de primer E-NNN 50 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 1,0 μL de primer M-NNN 50 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 1,5 μL da solução de DNA da banda, 0,2 μL de Taq DNA-Polimerase 5 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ e 16,8 μL de ddH₂O. Os ciclos de amplificação seguiram os parâmetros indicados para a amplificação seletiva de AFLP. Os resultados foram conferidos por eletroforese em gel de agarose 1,0 %.

Purificação de produto de PCR - As bandas reamplificadas foram colocadas em solução de isopropanol com água, vortexadas e incubadas a -20°C por 2 h, depois cetrifugadas a 12.000 rpm por 25 min, descartando-se o sobrenadante. Adicionou-se etanol 70%, vórtex para homogeneizar e nova centrifugação a 14.000 rpm por 5 min. Descartou-se o sobrenadante e promoveu-se a secagem em concentrador a vácuo por 10 min, ressuspendendo-se os *pellets* em 50 µL de água ultra pura autoclavada.

Seqüenciamento direto - Esses fragmentos purificados foram utilizados para reações de seqüenciamento, colocando-se somente um dos *primers* em cada reação, com uso do kit de seqüenciamento ABI Prism BigDye Terminator Cycle, sendo, então, precipitadas e encaminhadas para seqüenciamento no ABI 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-USP).

Alinhamento das seqüências para verificação de homologia – as seqüências obtidas foram alinhadas no programa MEGA4 (TAMURA et al., 2007) e comparadas para verificarem-se dois aspectos principais: se as bandas de mesmo tamanho no gel de poliacrilamida correspondem a seqüências similares (ou a mais de uma seqüência) e, em caso positivo, se existem mutações ou regiões com diferenças significativas que permitam o agrupamento ou individualização de variedades.

5.3 Resultados e Discussão

As análises de varredura para definição das reações que apresentavam polimorfismo foram, então, conduzidas com os 2 pares de cultivares aparentados entre si, um par argentino e um par brasileiro, objetivando verificar-se a resolução da técnica para a análise de genomas de diferentes variedades de soja, geneticamente muito próximos entre si, além de observar a presença de diferenças significativas entre os materiais transgênicos e não-transgênicos, nacionais e argentinos.

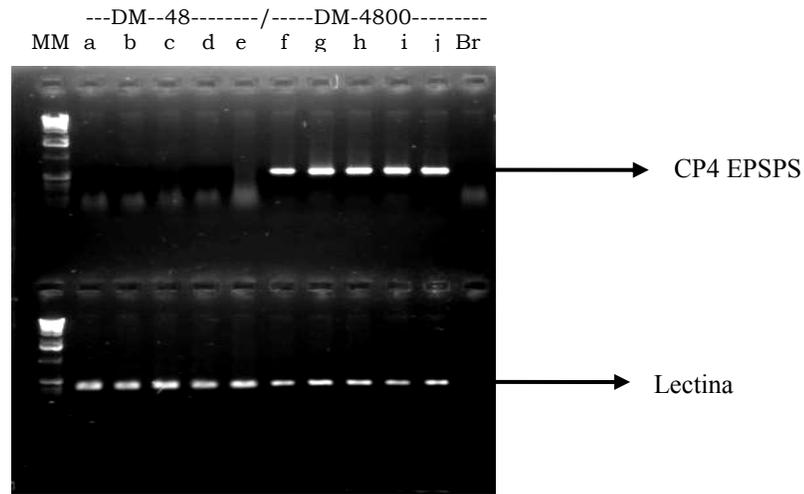


Figura 5.5. Gel de agarose 1% com produto de PCR para genes de EPSPS e Lectina com as cultivares DM 48 (replicatas a – d) e DM 4800 (f – i). MM = 1 kb; e = controle negativo, soja não-transgênica; j = controle positivo, soja RR; Br = Branco, sem DNA.

As reações de PCR qualitativas com *primers* para os genes da Lectina e de CP4 EPSPS para a verificação e confirmação da presença/ausência de transgenia em cada um dos materiais confirmaram a variedade DM 4800 como sendo transgênica e a variedade DM 48 como sendo não-transgênica pelas respectivas presença e ausência de bandas para a reação com *primers* para CP4 EPSPS (Figura 5.5). Da mesma forma as variedades MSoy 7501 e MSoy 7575 RR apresentaram resultados semelhantes.

Obtida a confirmação dos materiais transgênicos, quantificou-se o DNA por espectrofotômetro para uniformização das concentrações e adequação ao método. Para tanto, as alíquotas das suspensões de DNA com concentração próxima de $1 \mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$ foram diluídos em $9 \mu\text{L}$ de água para o uso na etapa inicial de digestão pelas enzimas de restrição *EcoRI* e *MseI* (total de cerca de $1 \mu\text{g}$ de DNA por reação de digestão). Após a ligação dos adaptadores e da reação de pré-amplificação com os *primers EcoRI+T* e *MseI+G*, foram realizadas as reações de amplificação seletiva com *primers* contendo três nucleotídeos de seleção cada um.

Na confecção da tabela de planejamento e acompanhamento, cada reação da etapa de varredura com pares de *primers* seletivos recebeu um número romano, a fim de que se pudessem identificar aquelas que apresentaram alguma banda que pudesse servir de marcador para a origem da variedade. Nesta etapa, as reações não foram feitas com replicatas, uma vez que o que se objetivava era a busca de conjuntos de *primers* que pudessem diferenciar o par argentino do brasileiro, para aplicação posterior sobre o conjunto de variedades com maior número de amostras, o que permitiu ganho significativo de tempo na definição dos pares de *primers* com potencial de polimorfismo que seriam utilizados sobre as amostras que ainda não se encontravam no laboratório. Esta etapa permitiu o ainda a otimização do uso do aparato para gel de poliacrilamida, originalmente utilizado para seqüenciamento, para a revelação dos produtos de AFLP, acertando-se parâmetros com tempo e voltagem ideais para a pré-corrída e corrída eletroforética e detalhes da preparação e coloração dos géis. A Figura 5.6 mostra um gel de poliacrilamida 6% da etapa de varredura, contendo um total de 6 reações de amplificação seletiva, com as 4 variedades cada uma, além dos resultados que servem de indicadores de que determinado par de *primers* seletivos pode determinar um possível marcador para a origem da soja. Outras imagens de géis desta etapa, com a mesma configuração, podem ser conferidas nos Apêndices C, D e E.

Foram realizadas ao todo 67 reações seletivas na etapa de varredura com as 4 amostras disponíveis. Cada reação proporcionou, em média, a formação de 10 a 20 bandas por amostra, grande parte delas monomórficas ou específicas para a variedade. Algumas reações geraram número muito pequeno de fragmentos, mesmo quando repetidas, e foram, portanto, descartadas. As bandas encontradas variaram entre os 100 e os 800 pb de tamanho, na sua grande maioria.

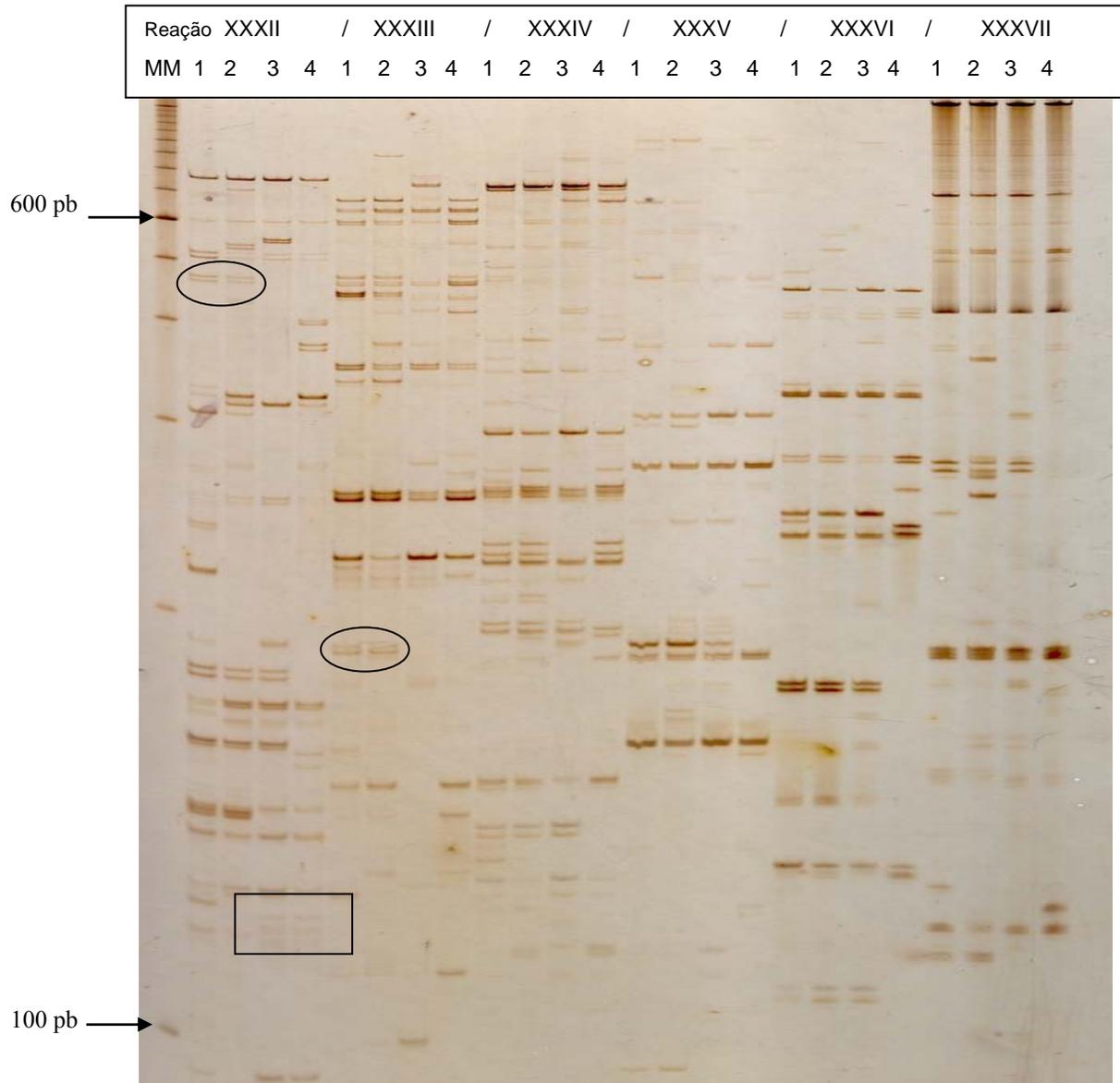


Figura 5.6. Gel de Poliacrilamida 6 % mostrando resultado de 6 reações de varredura com *primers* seletivos de AFLP sobre amostras de soja. 1 e 2 : soja brasileira; 3 e 4: soja argentina; MM = 100 pb. As elipses mostram possíveis marcadores para variedades de soja brasileiras. No retângulo, possível marcador para variedades argentinas. Reações: XXXII: $E_{TGG}M_{GGT}$; XXXIII: $E_{TCT}M_{GTA}$; XXXIV: $E_{TCA}M_{GGA}$; XXXV: $E_{TAA}M_{GAG}$; XXXVI: $E_{TGT}M_{GCC}$; XXXVII: $E_{TAG}M_{GGG}$ (todas as reações na Tabela 5.3, pág. 72).

Mienie, Smit e Pretorius (1995) na identificação de 37 variedades de soja sul-africanas por RAPD, optaram por uma fase de seleção de *primers*, como a varredura aqui apresentada, para otimização do experimento, selecionando 35 % (42) do total testado para aplicação nas suas análises. A exemplo deste trabalho, o resultado da varredura foi a escolha inicial de 22 reações, ou seja, 32,8 % do total realizado (67 reações), de pares de *primers* com três bases seletivas cada um, que apresentaram polimorfismo entre os grupos de diferente origem (Figura 5.7 e Figura 5.8), para serem aplicadas sobre as amostras da coleção de variedades comerciais argentinas e brasileiras, sendo elas:

Reação I: E _{TAC} M _{GAA}	Reação XXXIII: E _{TCT} M _{GTA}	Reação L: E _{TCA} M _{GTA}
Reação IV: E _{TCT} M _{GCC}	ReaçãoXXXVIII: E _{TCT} M _{GTT}	Reação LIII: E _{TGG} M _{GAG}
Reação XI: E _{TAG} M _{GGG}	Reação XXXIX: E _{TAA} M _{GAC}	Reação LV: E _{TAG} M _{GCC}
Reação XV: E _{TTG} M _{GCT}	Reação XL: E _{TTG} M _{GGA}	Reação LVI: E _{TCG} M _{GAT}
Reação XVI: E _{TGA} M _{GGT}	Reação XLII: E _{TAC} M _{GCT}	Reação LVII: E _{TAA} M _{GCC}
Reação XVII: E _{TTA} M _{GCA}	Reação XLIII: E _{TGG} M _{GAA}	Reação LXII: E _{TAG} M _{GCT}
Reação XVIII: E _{TCC} M _{GTA}	Reação XLIV: E _{TGT} M _{GCT}	
Reação XXXII: E _{TGG} M _{GGT}	Reação XLVI: E _{TCG} M _{GCC}	

Complementando o critério de seleção pela presença de bandas polimórficas por grupo de origem, a análise das imagens dos dendrogramas construídos pelo programa Bionumerics 4.0 permitiu identificar as reações que apresentaram a melhor divisão dos grupos de origem nas análises de varredura, bem como os maiores coeficientes de similaridade dentro dos grupos (Figura 5.9; Figura 5.10) (Apêndices F, G). Os parâmetros de tolerância para o reconhecimento de bandas como similares variaram entre 0,2 % e 1,3 %, dependendo da qualidade do gel e da imagem analisada. Esta ferramenta auxiliou na identificação de potenciais pares de *primers* seletivos a serem utilizados na etapa posterior de análise, como os seguintes:

Reação II: E _{TCA} M _{GAT}	Reação XXV: E _{TTT} M _{GAG}	Reação XXXIV: E _{TCA} M _{GGA}
Reação XXIII: E _{TGG} M _{GAT}	Reação XXVII: E _{TTT} M _{GCC}	Reação XLI: E _{TTA} M _{GCC}

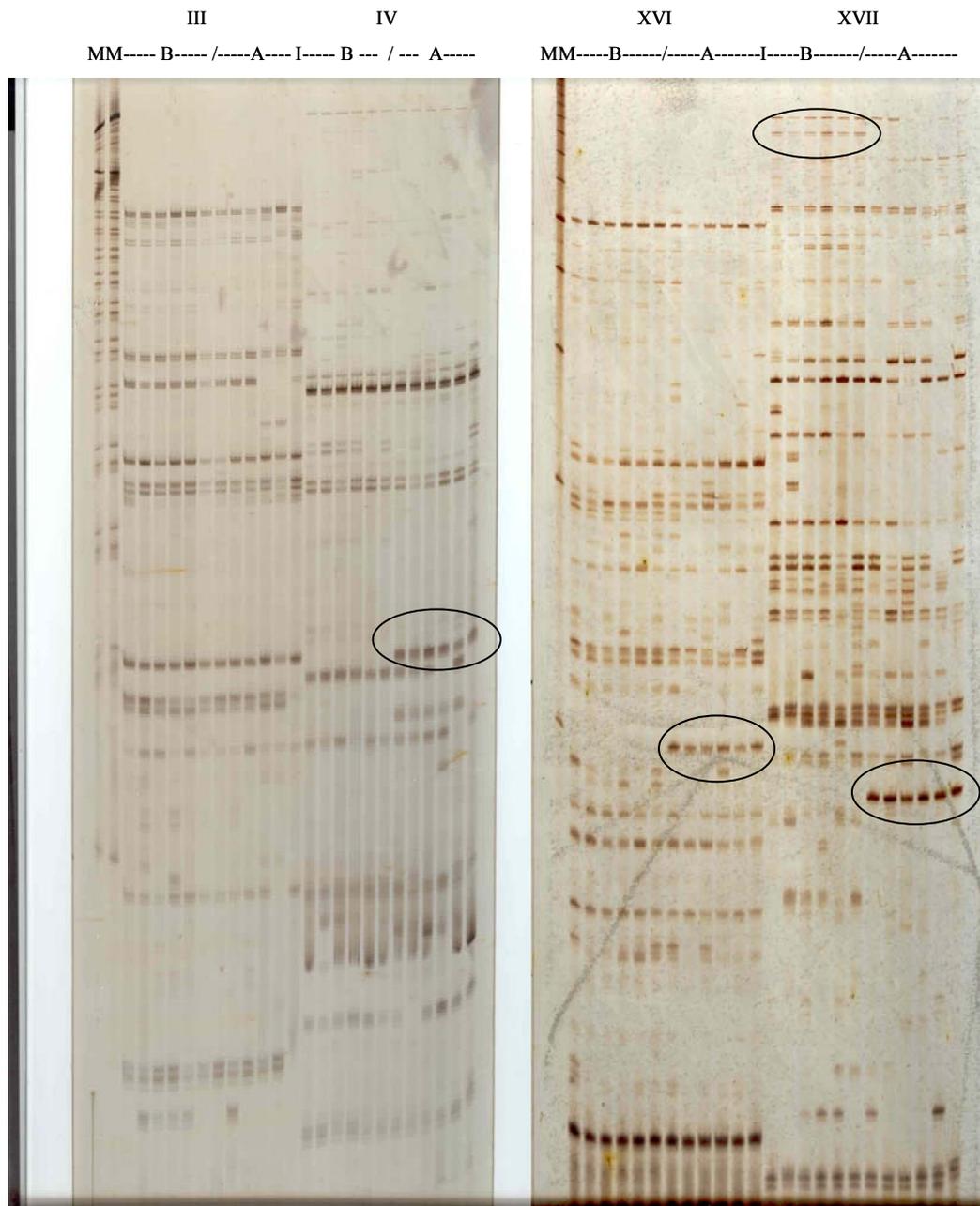


Figura 5.7. Géis de poliacrilamida a 6% da etapa de varredura, mostrando reações seletivas de AFLP n^{os} IV, XVI e XVII com polimorfismo (circundados) entre os grupos de origem e reações sem polimorfismo significativo (reação n^o III). MM=100 pb, B= variedades brasileiras. A= variedades argentinas.

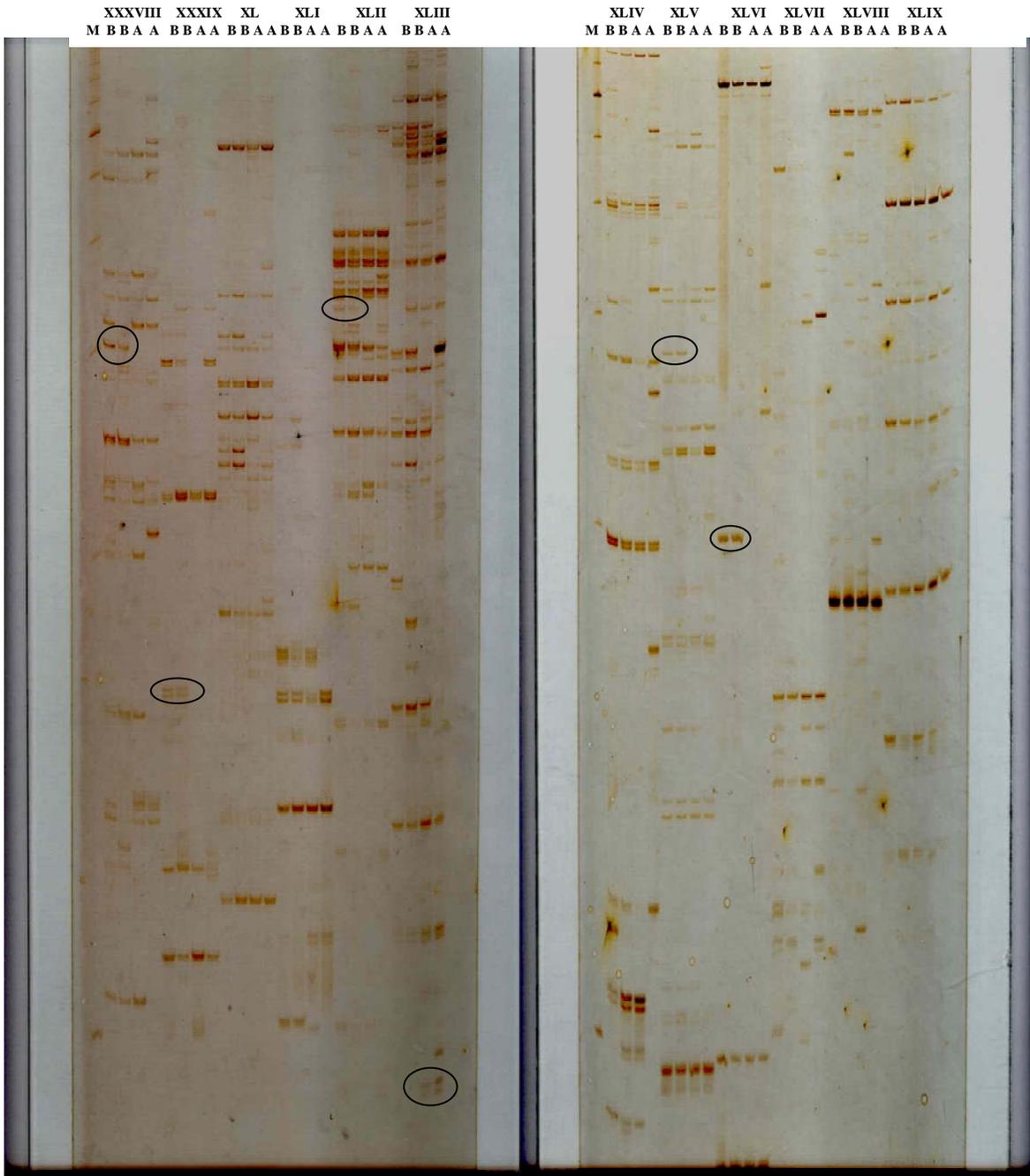


Figura 5.8. Géis de poliacrilamida a 6% da etapa de varredura, mostrando reações seletivas de AFLP n^{os} XXXVIII, XXXIX, XLII, XLIII, XLV e XLVI com polimorfismo (circundado) entre os grupos de origem e reações sem polimorfismo significativo. MM=100 pb, B=variedade brasileira. A=variedade argentina.

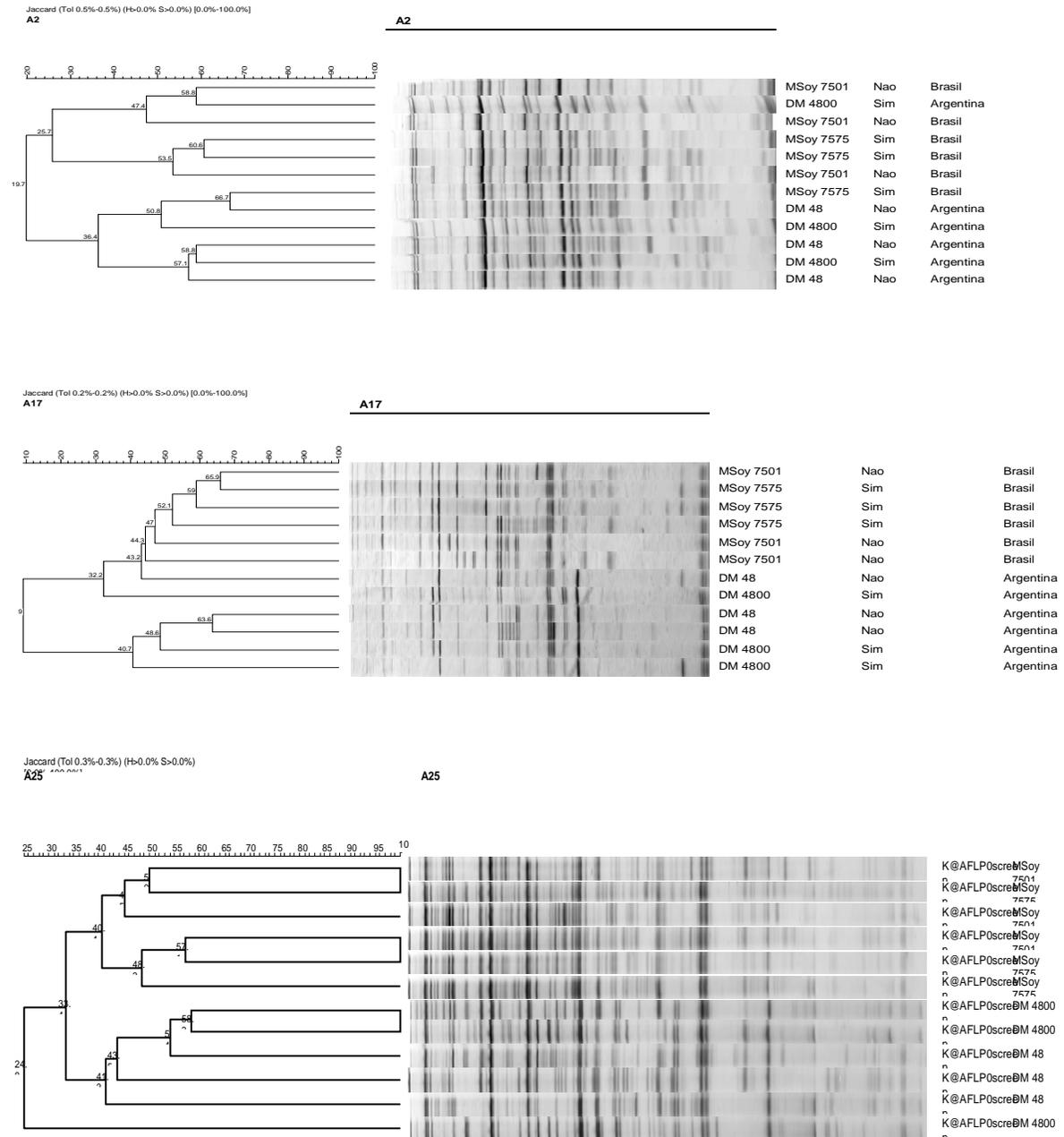


Figura 5.9. Dendrogramas gerados no programa Bionumerics 4.0 pela análise das imagens dos géis de poliácridamida das reações nº 2, 17 e 25, com os respectivos coeficientes de similaridade de Jaccard para cada grupo de origem.

Jaccard (Tol 0.3%-0.3%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
A27



Jaccard (Tol 1.3%-1.3%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
A39



Jaccard (Tol 0.5%-0.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
A62

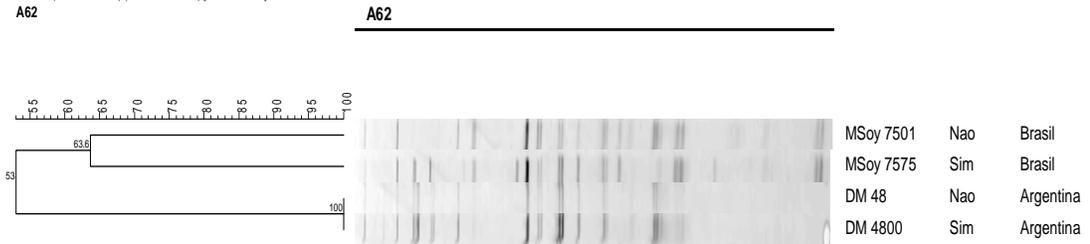


Figura 5.10. Dendrogramas gerados no programa Bionumerics 4.0 pela análise das imagens dos géis de poliacrilamida das reações 27, 39 e 62, com os respectivos coeficientes de similaridade de Jaccard para cada grupo de origem.

Finalizada a etapa de varredura, para a definição dos pares de *primers* que apresentaram algum polimorfismo entre as 4 variedades analisadas, teve início a nova etapa de análises de busca dos marcadores sobre o conjunto de variedades brasileiras e argentinas. Uma nova varredura foi iniciada, checando-se a presença de polimorfismos entre grupos de variedades brasileiras e argentinas, utilizando-se de 4 a 8 amostras por vez.

Além das análises com os 28 pares de *primers* previstas inicialmente, outras 6 novas reações foram realizadas na busca de um marcador único para a origem, onde se utilizaram, preferencialmente, *primers* que demonstraram bom potencial na amplificação de bandas diferenciais, ou polimórficas, seguindo as indicações esquematizadas na Tabela 5.3. A tabela formulada com o resultado dos pares de *primers* seletivos utilizados apresentou-se como ferramenta fundamental na clara visualização da distribuição das reações entre os *primers* disponíveis, na identificação de reações que apresentaram bandas polimórficas entre os grupos de cultivares (células em verde e amarelo) e, posteriormente, na identificação dos *primers* com maior potencial de formação de bandas polimórficas (células em laranja). Uma vez que se lida com grande número de informações nas análises por AFLP, o desenvolvimento desse tipo de ferramenta torna-se extremamente importante nas fases de planejamento e avaliação de resultados.

Não sendo possível a determinação de um único marcador exclusivo para cada grupo de origem, foram retomadas as imagens para verificação das reações que apresentaram bandas polimórficas de interesse, ainda que não exclusivas para os grupos. Desta forma, foram elaborados novos géis com as reações n^{os} 2 (E_{TTG}/M_{GGA}) (Figura 5.11), 34 (E_{TTG}/M_{GGA}) (Figura 5.12), 27 (E_{TTT}/M_{GCC}) (Figura 5.13) e 62 (E_{TAG}/M_{GCT}), desta vez com a coleção completa, para a excisão, purificação e reamplificação das bandas, a fim de se realizar o seqüenciamento para verificação da identidade dos possíveis marcadores. Nos Apêndices J, K e L podem ser visualizados géis de reações seletivas sobre o conjunto de variedades argentinas e brasileiras.

Tabela 5.3 - Combinações de *primers* seletivos utilizados para varredura (romano) e análise (arábico) das variedades argentinas e brasileiras.

Msc	GAG	GTG	GGG	GAA	GCA	GTA	GGA	GAC	GCC	GTC	GGC	GAT	GCT	GTT	GGT
Eco															
TAT				LIX			XLVIII			XIX		XXIX			
TAG	38		XI/XXXVII	32		25	37		LV 15			41	LXII 19/10		26
TAA	XIII/XXXV					XLVII		XXXIX 12			LVII 14			VII	
TAC	39			I 4		33	36	LI	34			42	XLII 16		XXXI
TCT				31		XXXIII 21/13	XXI		IV 3			X	24	XXXVIII 8	LXV
TCG	VI			LXIII		40	XXIV		XLVI 5		VIII	LVI 6	35		43
TCA				XXII		L 20	XXXIV			LXI		II	49		
TCC						XVIII									
TTT	XXV								XXVII						IX
TIG	LX			XXVI		27	XL 2		29		XLV	LXIV	XV 17		30
TTA					XVII	47			48		XLI		XXX		LVIII
TTC			XLIX					XIV							
TGT		XII		44		45	46		XX		XXXVI		XLIV/LIV 18		V
TGG	LIII 1			XLIII 9		22	III	LXVII	28			XXIII	23		XXXII 7
TGA									LXVI	XXVIII				LII	XVI 11

Legenda:

- Reações que apresentaram claras bandas polimórficas
- Reações que apresentaram potenciais polimorfismos
- Primers que apresentaram bons perfis de amplificação, com duas ou mais combinações com bandas polimórficas

Nº Romanos = reações da etapa de varredura (*screening*)

Nº Arábicos = reações de análise sobre conjunto de variedades argentinas e brasileiras



Figura 5.11. Gel de poliacrilamida de amplificação seletiva de AFLP da reação nº 2 (E_{TTG}M_{GGA}) apresentando na área circundada bandas presentes em todas as variedades brasileiras e nas setas bandas correspondentes presentes em parte das variedades argentinas. MM= 100 pb, amostras 1-17= variedades argentinas, amostras 22-29 = variedades brasileiras.

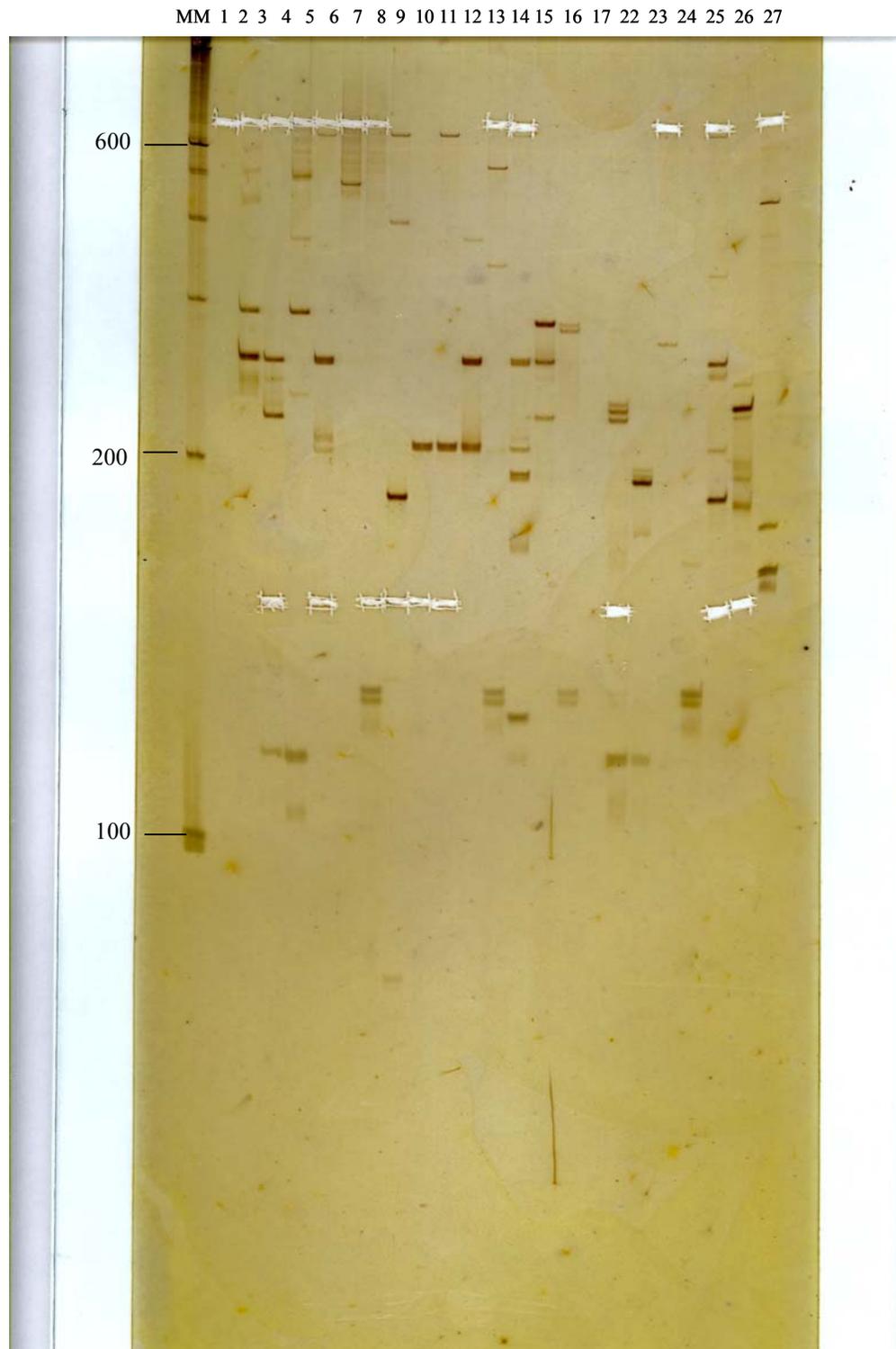


Figura 5.12. Gel de poliacrilamida de amplificação seletiva de AFLP da reação nº 34 (ETTG_MGGA) apresentando as bandas diferenciais recortadas. MM= 100 pb, amostras 1-19= variedades argentinas, amostras 22-29 = variedades brasileiras.

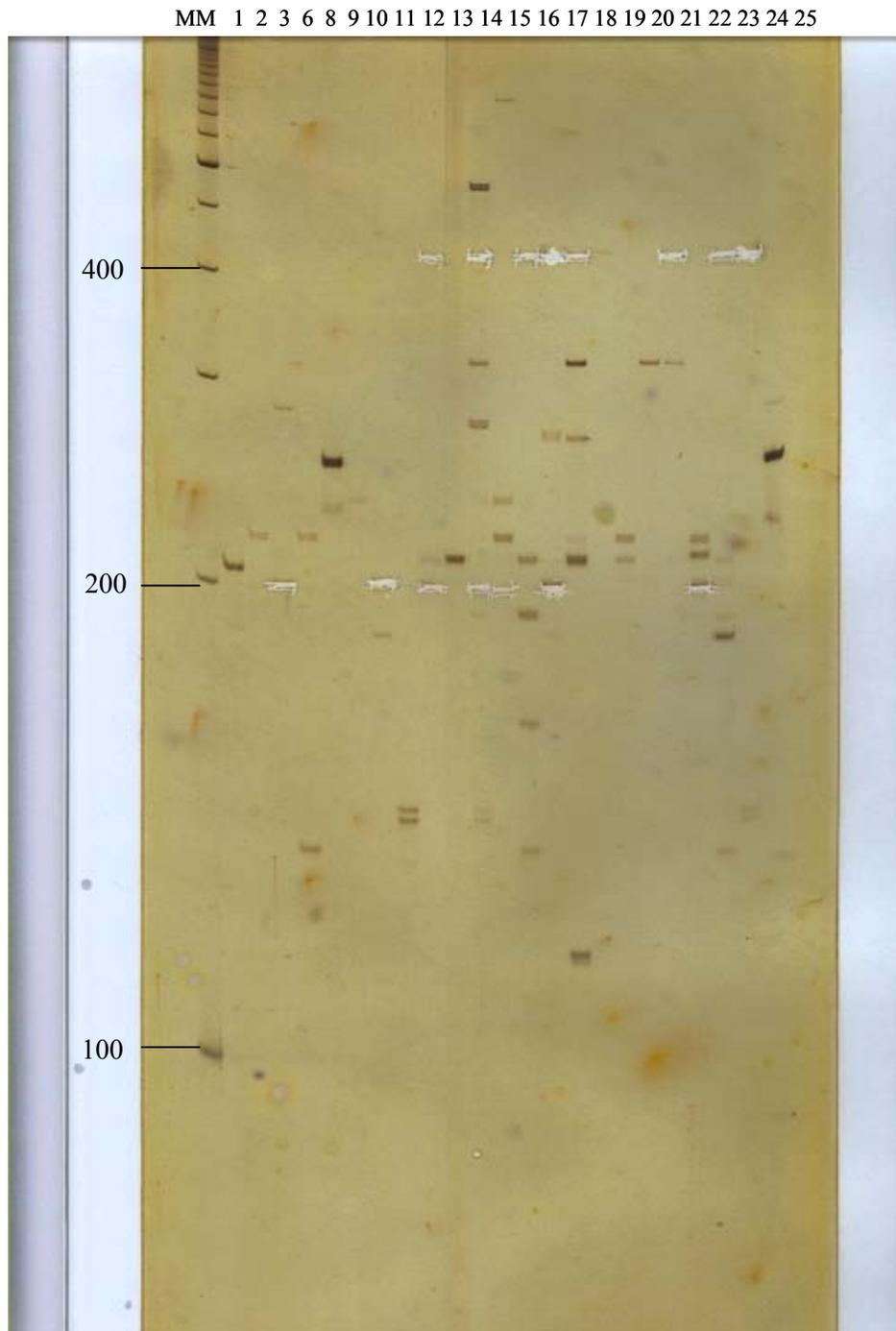


Figura 5.13. Gel de poliacrilamida de amplificação seletiva de AFLP da reação nº 27 (E_{TTT}M_{GCC}) apresentando as bandas diferenciais recortadas. MM= 100 pb, amostras 1-17= variedades argentinas, amostras 18-25 = variedades brasileiras.

5.3.1 Análise de imagens dos géis

A elaboração dos dendrogramas a partir da análise de similaridade utilizando-se o coeficiente de Jaccard, com aplicação do método UPGMA pelo programa Bionumerics 4.0, sobre o perfil de bandas obtido em 49 amplificações seletivas de AFLP em amostras das variedades argentinas e brasileiras não permitiu a formação de grupos (*clusters*) que pudessem ser indicadores da associação por origem comum (Figura 5.14) (Apêndices H, I).

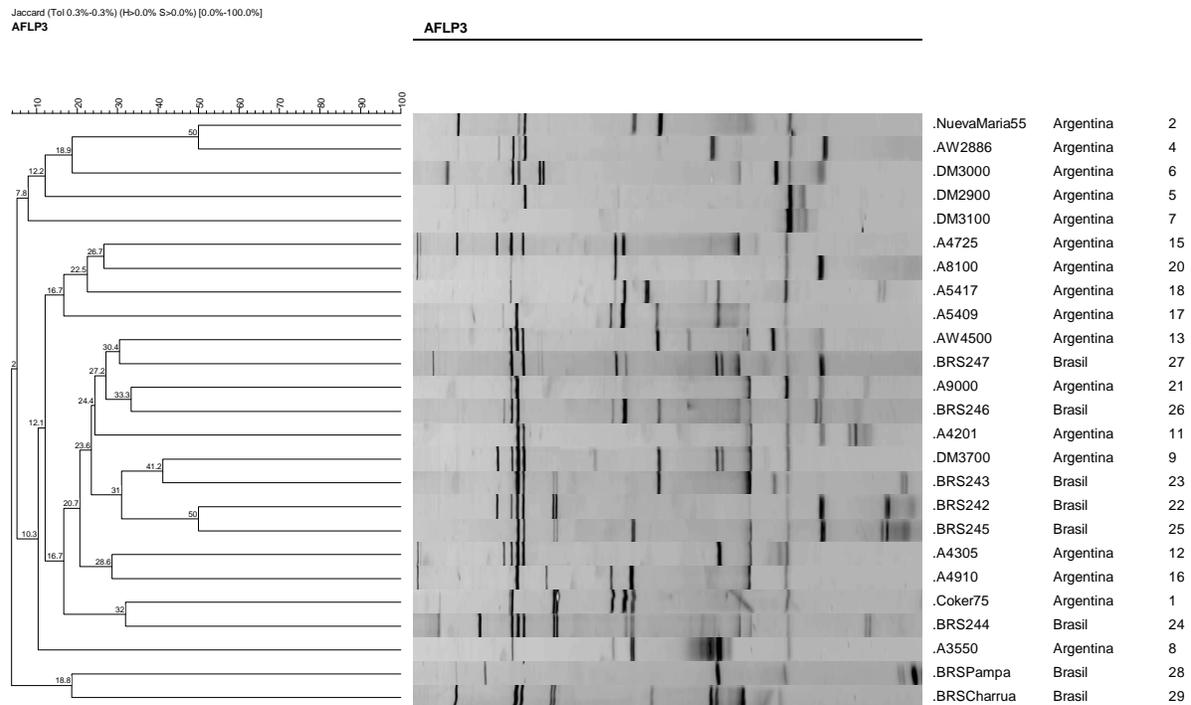


Figura 5.14. Dendrograma obtido no programa Bionumerics 4.0 pelo método UPGMA com os respectivos coeficientes de similaridade de Jaccard para a reação n° 3 ($E_{TCT}M_{GCC}$).

Uma vez que não foi possível a determinação de um marcador específico para cada grupo de origem, a solução foi a composição de uma matriz para análises do tipo multiplex, que acabou por permitir a identificação isolada de grande parte das variedades analisadas. Uma representação gráfica da matriz pode ser conferida na Figura 5.15.

Embora as reações nº 2 ($E_{TTG}M_{GGA}$), originalmente a reação nº XL na etapa de varredura, e nº 34 ($E_{TCA}M_{GGA}$) tenham apresentado significativa concentração de bandas polimórficas entre cada um dos grupos, brasileiro e argentino, respectivamente, estas não foram de caráter exclusivo de cada grupo, o que gerou a necessidade da busca de informações em outras reações para a composição da matriz multiplex para a caracterização das variedades. Para tanto, foram selecionadas, ainda, as informações referentes à formação de bandas de cerca de 250 pb na reação nº 62 ($E_{TAG}M_{GCT}$), e as bandas de 430 e 200 pb da reação nº 27 ($E_{TTT}M_{GCC}$).

Desta forma, as variedades argentinas Coker 75 RR e Nueva Maria 55 RR e A3550 RR, apresentaram apenas o fragmento de cerca de 700 pb da reação nº 34 ($E_{TCA}M_{GGA}$). A variedade DM 2000 RG, amostra nº 3, apresenta os fragmentos de cerca 270 pb da reação nº 2 ($E_{TTG}M_{GGA}$), de 700 e 170 pb da reação nº 34 ($E_{TCA}M_{GGA}$) e assim por diante para cada variedade analisada. As amostras correspondentes às variedades argentinas DM 2900 RR, DM 3100 RR, A 5409 RG, A 5417 RG, A 8100 RG e A 9000 RG não apresentaram informações que permitissem sua caracterização.

Todas as amostras correspondentes às variedades brasileiras apresentam o fragmento de 270 pb da reação nº 2 ($E_{TTG}M_{GGA}$), e sua caracterização é complementada com as informações das reações seguintes, conforme o descrito para as variedades argentinas acima. Da mesma forma, os fragmentos de 700 pb e de 170 pb obtidos na reação nº 34 ($E_{TCA}M_{GGA}$) apareceram preferencialmente nas variedades argentinas. Os marcadores das reações nº 27 ($E_{TTT}M_{GCC}$), bandas com 200 e 430 pb, e 250 pb da nº 62 ($E_{TAG}M_{GCT}$) permitem, pela combinação com os marcadores predominantes dos grupos de origem, a discriminação das variedades.

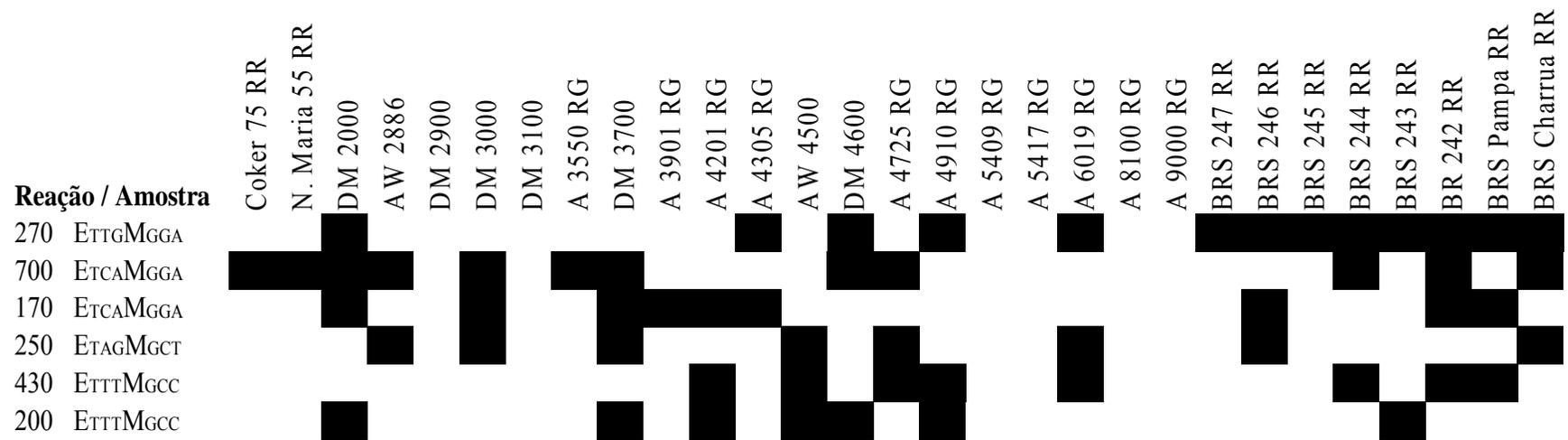


Figura 5.15. Representação gráfica das bandas presentes em cada uma das amostras nas respectivas reações de amplificação seletiva de AFLP que apresentaram polimorfismo significativo por grupo de origem.

5.3.2. Seqüenciamento das bandas

Bandas excisadas do gel de poliacrilamida, reamplificadas e purificadas de cerca de 270 pb na reação nº 2 (E_{TTG}/M_{GGA}) (Apêndice L) e de cerca de 700 pb na reação nº 34 (E_{TCA}/M_{GGA}) (Figura 5.12) foram seqüenciadas a partir das duas extremidades com seus respectivos primers seletivos e tiveram seus *contigs* montados. A submissão das seqüências ao banco de dados não retornou resultado de homologia com qualquer seqüência depositada até então para as seqüências da reação nº 2. A reação nº 34 obteve resultados de identidade entre 91 e 92 % com o acesso AC166742.25, referente à seqüência completa do clone gmw1-45m6 de soja no Genbank.

As seqüências foram, então, alinhadas pelo programa MEGA4 (TAMURA et al., 2007) para verificação da identidade, demonstrando elevada similaridade entre elas. Santos e Simon (2002) obtiveram resultados semelhantes de homologia em fragmentos de AFLP em cenoura, onde, de 31 fragmentos pareados na eletroforese em gel de poliacrilamida, 26 apresentaram identidade maior que 91 %. Já Meksem et al. (2001), em estudo de bandas de AFLP em soja, encontraram uma média de seis diferentes seqüências para cada banda de mesmo tamanho (numa variação entre 1 a 15 seqüências por banda), uma vez que todas compartilhavam, além do mesmo tamanho, as mesmas bases seletivas dos *primers* além de 6 a 15 pb comuns para cada lado do fragmento. Na reação nº 2, por exemplo, das 13 bandas seqüenciadas, somente a seqüência da amostra nº 19, correspondente à variedade argentina DM 4600, apresentou diferenças em 49 (18%) dos cerca de 250 nucleotídeos seqüenciados (Figura 5.17). O seqüenciamento de 3 bandas da reação nº 34 apresentou resultados semelhantes de identidade entre os resultados.

Esta etapa verificou a possibilidade das seqüências diferirem uniformemente entre os grupos, o que permitiria a construção de *primers* específicos para cada seqüência de cada grupo, argentino e brasileiro. Uma vez que o resultado demonstrou grande grau de homologia entre todas as seqüências, promoveu-se a clonagem dessas seqüências pela ligação em um vetor e posterior transformação de células competentes para sua multiplicação. O seqüenciamento a partir de regiões do vetor, que flanqueiam o inserto em ambos os lados, permite a obtenção da seqüência completa de cada um deles, incluindo aí os sítios de restrição de origem do fragmento.

Considerando as perspectivas de continuidade do presente trabalho, o seqüenciamento completo dos clones com os fragmentos obtidos, incluindo as regiões de restrição das enzimas utilizadas no método AFLP, abre a possibilidade de definição de marcadores do tipo SCAR (Sequence Characterized Amplified Region), com a posterior elaboração de *primers* para sua detecção em análises sobre grãos e alimentos transgênicos, o que pode permitir identificar, desta forma, a variedade e origem da soja presente em determinada amostra de grãos ou alimentos, para fins de rastreabilidade da cadeia produtiva ou alimentar.

5.3.3 Análise por eletroforese capilar em *microchip*

Vinte e uma reações com as amostras da etapa de varredura foram ressubmetidas a ampliações seletivas nas quais foram detectados diferentes polimorfismos entre os grupos argentinos e brasileiros ou entre variedades transgênicas e não-transgênicas no sistema de gel de poliacrilamida. Estes produtos de AFLP foram, agora, analisados por eletroforese capilar em *microchip* com detecção por fluorescência induzida a laser no equipamento Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) para que os resultados pudessem ser comparados àqueles obtidos em eletroforese em gel de poliacrilamida. As reações com seus respectivos pares de *primers* foram as seguintes:

1(E _{TTT} M _{GCC})	8(E _{TGG} M _{GAA})	15(E _{TCT} M _{GCC})
2 (E _{TTT} M _{GAG})	9(E _{TTA} M _{GCT})	16(E _{TCG} M _{GCC})
3(E _{TGG} M _{GAG})	10(E _{TCT} M _{GTA})	17(E _{TCG} M _{GAT})
4(E _{TGT} M _{GGC})	11(E _{TCA} M _{GTA})	18(E _{TAG} M _{GCT})
5(E _{TAC} M _{GAA})	12(E _{TAA} M _{GTA})	19(E _{TTG} M _{GCT})
6(E _{TCT} M _{GGT})	13(E _{TTG} M _{GGA})	20(E _{TCT} M _{GTT})
7(E _{TAG} M _{GGG})	14(E _{TAA} M _{GTT})	21(E _{TGG} M _{GGT})

Após a amplificação seletiva, uma alíquota foi separada para eletroforese em gel de agarose 1,5 % para confirmação da amplificação, sendo então encaminhadas para análise em *microchip*, conforme protocolo do fabricante.

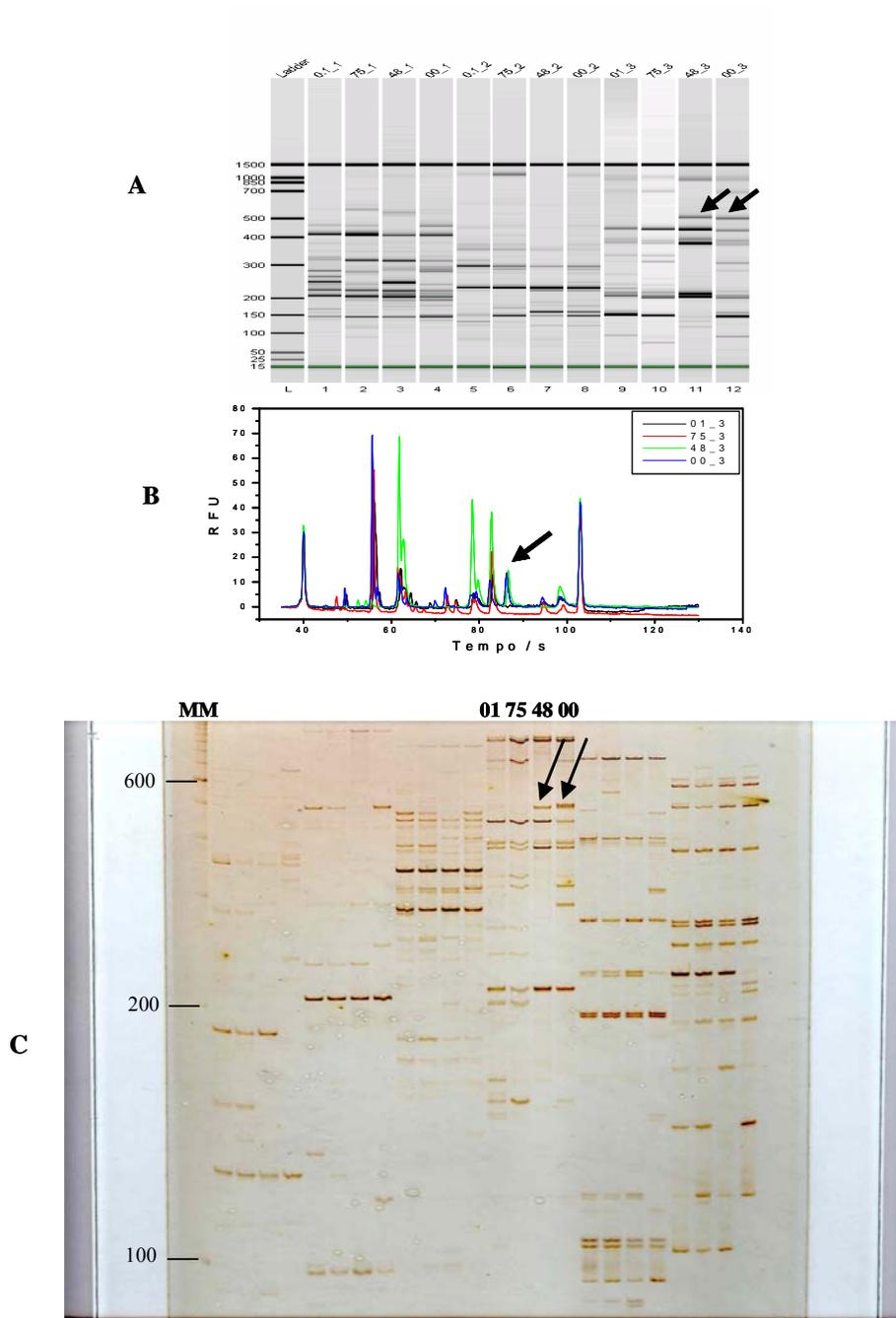


Figura 5.17. Amplificação seletiva de AFLP, reação n° 3 (E_{TGG}/M_{GAG}) da etapa de varredura: gel virtual (A) e eletroferograma (B) obtidos na no Bioanalyzer 2100 e gel de poliacrilamida 6% (C). Variedades de soja brasileiras (01 e 75) e argentinas (48 e 00). As setas indicam bandas polimórficas com cerca de 500 pb presentes em variedades argentinas.

000_00129_2007		Ladder					
Peak	Mig. Time (secs)	Corr. Area	Size (bp)	Conc. (ng/ul)	Molarity (nmol/l)	Marker	
1	42.6	30.5	15	4.2	424.24	Lower	
2	44.9	31	25	2	121.21		
3	47.15	32	50	2	60.61		
4	53.7	35	100	2	30.3		
5	60	37.5	150	2	20.2		
6	65.75	40	200	2	15.15		
7	77.15	41.5	300	2	10.1		
8	86.7	42	400	2	7.58		
9	93.2	42	500	2	6.06		
10	103	42	700	2	4.33		
11	106.2	42	850	2	3.57		
12	107.8	41.5	1000	2	3.03		
13	112.15	37	1500	2.1	2.12		Upper

000_00129_2007		07-01					
Peak	Mig. Time (secs)	Corr. Area	Size (bp)	Conc. (ng/ul)	Molarity (nmol/l)	Marker	
1	42.6	41.73	15	4.2	424.24	Lower	
2	56.5	3.92	122	0.39	4.8		
3	65.45	12.9	197	1.2	8.86		
4	72.8	10.59	262	0.92	5.35		
5	74.6	2.16	278	0.19	1.02		
6	112.15	20.73	1500	2.1	2.12		Upper

000_00129_2007		07-75					
Peak	Mig. Time (secs)	Corr. Area	Size (bp)	Conc. (ng/ul)	Molarity (nmol/l)	Marker	
1	42.6	48.56	15	4.2	424.24	Lower	
2	55.75	2.78	116	0.19	2.42		
3	56.45	3.66	122	0.24	3.01		
4	65.3	20.71	196	1.2	9.62		
5	72.8	3.57	259	0.21	1.22		
6	74.45	3.07	276	0.18	0.98		
7	112.15	30.94	1500	2.1	2.12		Upper

000_00129_2007		07-48					
Peak	Mig. Time (secs)	Corr. Area	Size (bp)	Conc. (ng/ul)	Molarity (nmol/l)	Marker	
1	42.6	47.82	15	4.2	424.24	Lower	
2	56.4	8.07	121	0.66	8.27		
3	65.15	24.25	195	1.8	14.05		
4	112.15	25	1500	2.1	2.12		Upper

000_00129_2007		7-00					
Peak	Mig. Time (secs)	Corr. Area	Size (bp)	Conc. (ng/ul)	Molarity (nmol/l)	Marker	
1	42.6	51.46	15	4.2	424.24	Lower	
2	43.75	4.38	20	0.44	32.96		
3	56.4	10.94	121	0.69	8.56		
4	65.05	24.33	194	1.4	10.84		
5	112.15	32.7	1500	2.1	2.12		Upper

Figura 5.18. Exemplo de tabela gerada pelo programa do BioAnalyzer 2100, contendo o número de picos encontrados em cada amostra, o tempo de migração de cada um, a área correlacionada a cada pico, o tamanho do fragmento correspondente e respectivas concentrações. Reação nº 7 ($E_{TAG}M_{GGG}$) para eletroforese capilar. Amostras de variedades brasileiras: 01 (MonSoy 7501), 75 (MonSoy 7575 RR); de variedades argentinas: 48 (DM 48), 00 (DM 4800).

Os recursos do programa associado ao equipamento, Agilent Biosizing versão A.02.12 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha), permitem o desenho de um gel virtual (Figura 5.14), que mostra as bandas no tamanho e concentração esperados numa eletroforese em gel de poliacrilamida a 6 % (Figura 5.15) (Apêndices M e N). O eletroferograma gerado permite, ainda, a clara identificação dos picos relativos às mesmas bandas e dá origem a tabelas (Figura 5.16) contendo os principais picos e

respectivas concentrações, inclusive dos marcadores externos (*ladder*) e internos de cada amostra, para utilização em programas desenvolvidos para análise de similaridade e agrupamento. Os resultados gerados eliminam a dúvida na interpretação da presença/ausência de bandas, que é fato freqüente na análise de imagens de géis, além de eliminar a etapa de produção de gel que requer cuidados técnicos, sujeita a riscos de acidentes, como manchas e cortes no gel, que dificultam sua interpretação.

As análises realizadas para verificação da reprodutibilidade dos resultados, rendimento e custo em comparação com o método de visualização de produtos de amplificação seletiva de AFLP em gel de poliacrilamida apresentaram cinco pontos de destaque em favor do *microchip*:

- A velocidade de análise, uma vez que com o uso do *chip* podem ser analisadas até 12 amostras num período de 30 min, enquanto o tempo gasto entre a elaboração, corrida, revelação e documentação de um gel pode chegar facilmente a 8 h para, no presente caso, 25 amostras analisadas;
- A quantidade de amostra utilizada para a corrida eletroforética no *chip* é 5 vezes menor do que a utilizada no gel;
- Apresenta-se como método extremamente limpo de análise, sem geração de resíduos de tampões de corrida, soluções de coloração e revelação ou polímeros;
- Diminui-se o risco de problemas de interpretação pela ausência de manchas ou cortes, freqüentes na análise em gel de poliacrilamida;
- As curvas geradas no eletroferograma podem ser utilizadas, com a sua integração e referenciação no marcador interno, como valores de concentração de cada um dos fragmentos detectados.

Como desvantagens podem ser indicadas a impossibilidade de se recuperar os fragmentos de interesse da amostra carregada no *chip* para uso em reamplificação e/ou

seqüenciamento, e o custo do equipamento e do kit, ambos importados e fornecidos por uma única empresa, sem possibilidade de uso de material alternativo.

Em levantamento rápido do custo dos principais materiais de consumo envolvidos em ambos os procedimentos, sem considerar o custo dos equipamentos para análise, que têm diferença na ordem de 4 vezes menos para o aparato de eletroforese em gel de poliacrilamida, tem-se um custo de análise de reação de cerca R\$ 3,92 para cada amostra aplicada em *microchip*, contra um custo aproximado de R\$ 1,05 para cada amostra analisada em gel de poliacrilamida 6 % corado com nitrato de prata. Embora o custo final por amostra seja consideravelmente menor no sistema de eletroforese em gel de poliacrilamida, vale destacar que é necessário que se adquira grande número de reagentes e materiais, para início das análises, o que acarreta um maior custo inicial na sua implantação.

Outro fator de importância a ser levado em consideração no presente cálculo diz respeito ao tempo gasto para o preparo e a operação com o gel, preparo e descarte de reagentes e soluções para estoque, limpeza de equipamentos, vidrarias, bandejas e bancada.

Havendo disponibilidade do equipamento e de recursos para a aquisição dos kits de *chips*, seu uso é recomendável pela velocidade de obtenção dos resultados e ausência de resíduos, que resultam em mais economia de tempo e em benefícios ao ambiente. A aplicação do método é possível até a etapa de análise de agrupamento, no presente caso, só sendo dispensada na fase de isolamento e excisão das bandas do gel, uma vez que é impossível a recuperação do material aplicado no *chip*.

5.4 Conclusões

O método de marcadores AFLP aplicado sobre 21 variedades comerciais de soja transgênica Roundup Ready[®] argentinas e 8 variedades de soja RR desenvolvidas para plantio no Brasil não possibilitou a identificação de marcadores exclusivos para caracterização da origem das variedades. Foi possível, entretanto, a caracterização em caráter *multiplex* de 15 das variedades argentinas e das 8 variedades brasileiras estudadas, com identificação de 6 bandas originadas de 4 pares de *primers* seletivos com 3 nucleotídeos cada um. São elas:

270 pb (E_{TTG}/M_{GGA})

170pb e 700pb (E_{TCA}/M_{GGA})

250 pb (E_{TAG}/M_{GCT})

200 pb e 430 pb (E_{TTT}/M_{GCC})

A excisão, reamplificação e seqüenciamento de 13 bandas monomórficas obtidas na reação seletiva nº 2 (E_{TTG}/M_{GGA}) de AFLP com revelação por eletroforese em gel de poliacrilamida 6 %, apresentou seqüências com alto grau de identidade (próximo de 100 %) para 12 das bandas seqüenciadas. A banda correspondente à amostra nº 19, variedade argentina A 6019 RG, apresentou 82 % de identidade em relação às outras amostras.

A elaboração de tabela para formação da matriz de combinações possíveis de *primers* de seleção, destacando as reações e *primers* que apresentam polimorfismo para o conjunto estudado, apresentou-se como ferramenta útil no planejamento e avaliação dos pares de *primers* seletivos para o método AFLP.

A utilização do método de eletroforese capilar na análise dos resultados das ampliações seletivas de AFLP possibilita o levantamento de informações em tempo aproximadamente 8 vezes menor do que o gasto na confecção e revelação de gel de poliacrilamida a 6 %, com um custo cerca de 3,73 vezes maior por amostra analisada. Deve-se, entretanto, levar em consideração a qualidade e precisão dos resultados analíticos, bem como a menor quantidade de resíduos gerada.

6. CONSTRUÇÃO E VALIDAÇÃO DE *PRIMERS* PARA DETECÇÃO DE SOJA RR EM ALIMENTOS PROCESSADOS

6.1 Introdução

A qualidade do DNA pode ser definida pelo grau de degradação das moléculas de DNA (tamanho dos fragmentos obtidos na extração) e pela presença de componentes que possam interferir na sua manipulação, digestão ou amplificação (polissacarídeos, proteínas, lipídios, tanino e outros compostos polifenólicos). Dentre os fatores que levam à degradação do DNA estão a hidrólise devida a longos tratamentos térmicos, por variações de pH e a atividade de nucleases (MEYER, 1999). Esses fenômenos são freqüentes no preparo de alimentos que exigem alto processamento ou em ingredientes específicos como a lecitina da soja, amidos e seus derivados e óleos. Bauer et al. (2003) confirmam o efeito da temperatura e da alteração do pH sobre a degradação do DNA em estudo com plasmídeos e DNA de soja, destacando o segundo fator como o mais determinante na diminuição do tamanho de fragmentos detectados por PCR após tratamentos. Para produtos processados de soja, como tofu ou proteína isolada, obtiveram fragmentos máximos com cerca de 714 pb. No entanto, este DNA, ainda que altamente degradado, pode ser eficientemente amplificado desde que sejam utilizados pares de *primers* que gerem fragmentos com tamanhos próximos ao comprimento médio das fitas de DNA presentes na amostra (MEYER; CANDRIAN, 1996). Cardarelli et al. (2004) analisaram 89 amostras de alimentos e encontraram rastros de DNA em produtos altamente processados, encontrando dificuldades na reamplificação em bebidas de soja com frutas, em salsichas em lata e com sopas desidratadas devido à alta degradação do DNA.

Corbisier et al. (2005), trabalhando com material de referência certificado (CRM) submetido a diferentes tratamentos térmicos e mecânicos, concluíram que a quantificação de soja GM em produtos altamente processados apresenta, muitas vezes, desvios que podem ser causados por uma taxa diferencial de degradação do DNA, por diferenças na taxa de extração dos fragmentos-alvo transgênicos e constitutivos ou pela diferente taxa de amplificação apresentada pelo DNA altamente degradado.

Hupfer et al. (1998) desenvolveram trabalho de detecção de fragmentos de DNA de milho *Bt*, tolerante a insetos, em amostras submetidas a diferentes tratamentos químicos e térmicos, confirmando a importância do comprimento do fragmento amplificado (*amplicon*) na detecção de modificações genéticas em produtos processados.

O presente estudo utiliza programas de acesso livre para a produção de jogos de *primers* que permitem a detecção de fragmentos curtos do gene espécie-específico da Lectina da soja e o transgene CP4 EPSPS em produtos com alto grau de processamento, em que o DNA se encontra bastante degradado. Os jogos de *primers* foram submetidos a testes *in silico* para verificar sua robustez e eficiência e depois aplicados em análises de PCR de grãos de soja de variedades transgênicas argentinas e brasileiras, bem como sobre DNA de alimentos processados. Os produtos das PCRs foram submetidos à validação dos resultados por digestão com enzimas de restrição além de reações de seqüenciamento, para posterior comparação com os bancos de dados genéticos.

O exemplo com a utilização da soja transgênica Roundup Ready[®], mais do que propor novos conjuntos de *primers* para sua detecção, permite a verificação da aplicabilidade e confiabilidade de métodos de fácil acesso para o desenvolvimento de materiais para análise de novos eventos transgênicos, desde que sejam conhecidas suas respectivas seqüências. Uma vez que se observa a tendência do surgimento cada vez maior de novas espécies e construções transgênicas, este tipo de ferramenta poderá ser útil para que se desenvolva rapidamente a capacidade de análise e controle sobre os novos eventos, que deverão passar pelo mesmo tipo de processo por que passam a soja RR e o milho *Bt*, principais culturas geneticamente modificadas plantadas em larga escala na atualidade.

6.2 Material e Métodos

Amostras de soja – grãos de cultivares de soja geneticamente modificada Roundup Ready® obtidas junto ao Instituto Argentino de Tecnologia Agrícola - INTA e Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. Amostras de produtos comerciais contendo soja ou ingredientes de soja (bebida de soja em pó, proteína de soja texturizada, fórmula infantil à base de soja) foram adquiridas no mercado local.

Extração de DNA - a partir de 50 mg de alimentos contendo soja (pó para preparo de bebidas, proteína texturizada de soja) com o kit Wizard Magnetic DNA Purification System for Food (Promega, Madison, WI, USA) e dos grãos de soja, inicialmente moídos em nitrogênio líquido, pelo método de extração por CTAB (DOYLE & DOYLE, 1990).

Obtenção das seqüências dos genes da soja Roundup Ready® - junto ao GenBank do National Center for Biotechnology Information – NCBI (BENSON et al., 2003):

- Soybean lectin (*Le1*) gene, complete cds (ACCESSION K00821 M30884, VERSION K00821.1 GI:170005).
- Glycine max transgenic chloroplast CP4-EPSPS fusion protein precursor, gene, promoter region and partial cds; nuclear gene for chloroplast product (ACCESSION AY592954 VERSION AY592954.1 GI:48995006).

Construção dos *primers* - as seqüências foram submetidas ao programa Primer3 (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/>), com os seguintes parâmetros ajustados:

- Tamanho do Produto: 80-150 pb
- Ótimo GC% do primer: 50%
- Máx. Auto-complementaridade: 3,00 b
- Máx. 3' Auto-complementaridade: 1,00 b

Análise *in silico* dos primers - os resultados do Primer3 foram analisados no programa NetPrimer (Premier Biosoft International, acesso por <http://www.premierbiosoft.com>)

para verificar possíveis formações de dímeros, próprios ou cruzados, assim como qualquer outro tipo de formação (dímero, grampo) que cause problemas na amplificação por PCR. Pares de *primers* com os produtos mais curtos, temperaturas de anelamento próximas e com avaliação final (*rating*) maior que 90 foram escolhidos para o desenvolvimento do presente trabalho.

Diluição dos *primers* – oligos adquiridos comercialmente foram ressuspendidos em tampão TE pH 8,0, formando solução estoque na concentração de 500 ng.μL⁻¹ para posterior diluição em água para a concentração de uso de 50 ng.μL⁻¹.

Otimização da PCR - parâmetros como temperatura de anelamento, concentração de MgCl₂, quantidades de *primers* e DNA iniciais foram ajustadas de forma a obter os sinais mais fortes em eletroforese com géis de agarose. As reações que obtiveram os melhores resultados foram as seguintes, para cada um dos genes-alvo (reação de 50 uL):

- Lectina: 5,0 μL de Tampão 10 X; 2,0 μL de MgCl₂ a 50 mM; 0,5 μL de dNTPs a 10 mM; 2,0 μL de primer senso + anti-senso a 5,0 pmoles; 0,4 μL de *Taq* DNA Polymerase 5U.μL⁻¹; 38,1 μL de ddH₂O e 2,0 μL da solução de DNA da extração.
- CP4 EPSPS: 5,0 μL de Tampão 10 X; 2,2 μL de MgCl₂ a 50 mM; 0,5 μL de dNTPs a 10 mM; 3,0 μL de primer senso + anti-senso a 5 pmoles; 0,4 μL de *Taq* DNA polimerase 5U.μL⁻¹; 36,9 μL de ddH₂O e 2,0 μL da solução de DNA da extração.

Os parâmetros de tempo e temperatura para o ajuste do termociclador ficaram da seguinte forma: 94°C por 3 min; 2 ciclos de 94°C – 1 min, 69°C – 45 seg., 72°C – 45 seg.; 2 ciclos de 94°C – 1 min, 68°C – 45 seg., 72°C – 45 seg.; 2 ciclos de 94°C – 1 min, 67°C – 45 seg., 72°C – 45 seg.; 2 ciclos de 94°C – 1 min, 66°C – 45 seg., 72°C – 45 seg.; 2 ciclos de 94°C – 1 min, 65°C – 45 seg., 72°C – 45 seg.; 25 ciclos de 94°C – 1 min, 64°C – 45 seg., 72°C – 45 seg.; 1 ciclo de 72°C por 7 min e 4°C ∞.

Vale salientar que a temperatura teórica de *melting* dos *primers* era de cerca de 58°C. As reações iniciais foram conduzidas com temperaturas de anelamento próximas

deste valor, provocando o aparecimento de inúmeras bandas inespecíficas. A elevação paulatina da temperatura de anelamento até 64°C, concomitante à variação na quantidade de magnésio, promoveu melhoria significativa dos resultados.

PCR com variedades transgênicas e alimentos processados – os *primers* foram aplicados em PCRs com DNAs de variedades reconhecidamente transgênicas argentinas e brasileiras, para verificação da sua confiabilidade sobre os diferentes eventos cultivados, além dos testes com o DNA degradado de alimentos processados.

Purificação das bandas – os produtos da PCR verificados em gel de agarose 1 % foram, então, purificados para que se procedessem as etapas seguintes utilizando-se precipitação com isopropanol (3 volumes de isopropanol : 1 volume de solução-produto de PCR), água (1 volume de água : 1 volume da solução-produto), resfriamento a -20°C em freezer por, no mínimo, 2 h; centrifugação a 12.000 rpm por 25 min.; lavagem com etanol 70%, secagem em concentrador Eppendorf e ressuspensão em 22 µl de água.

Clonagem e seqüenciamento - fragmentos purificados foram ligados ao pGemT Easy Vector Promega (Madison, WI, USA) e procedeu-se a reação de seqüenciamento utilizando-se os *primers* T7 e U3, que se anelam a sítios do vetor para seqüenciamento a partir de ambas as extremidades do inserto. Os resultados foram alinhados para formação dos respectivos *contigs* e as seqüências obtidas foram submetidas a análise de BLASTN para verificar a similaridade com as seqüências originais.

Digestão dos fragmentos por endonucleases – usando-se informações de digestões virtuais do REBsites, do endereço na internet Rebase (<http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>), foi gerado um mapa de restrição (Figura 6.1). Duas enzimas de restrição foram escolhidas para clivagem de cada um dos fragmentos gerados: *TaqI* (Invitrogen, USA) e *AccI* (Invitrogen, USA) para o fragmento da Lectina e *MboI* (Invitrogen, USA) e *MseI* (Invitrogen, USA) para o fragmento da C4-EPSPS. As reações de digestão foram realizadas da seguinte forma, para volume final de 15,0 µL:

- Lectina – 1,5 μL de tampão React I (Invitrogen, USA); 0,5 μL de enzima *TaqI* (10 U/ μL); 0,8 μL de enzima *AccI* (2-8 U/ μL); 0,15 μL de BSA; 10,0 μL do produto de PCR purificado; 2,05 μL de ddH₂O. A reação é então levada ao termociclador para um ciclo de 1,5 hora a 37°C, com mais 1,5 hora a 65°C.
- CP4 EPSPS - 1,5 μL de tampão React I (Invitrogen, USA); 0,5 μL de enzima *MboI* (10 U/ μL); 0,8 μL de enzima *MseI* (5 U/ μL); 0,15 μL de BSA; 10,0 μL do produto de PCR purificado; 2,05 μL de ddH₂O. A reação é então levada ao termociclador para um ciclo de 1,5 h a 37°C e então inativada a 65°C por 15 min.

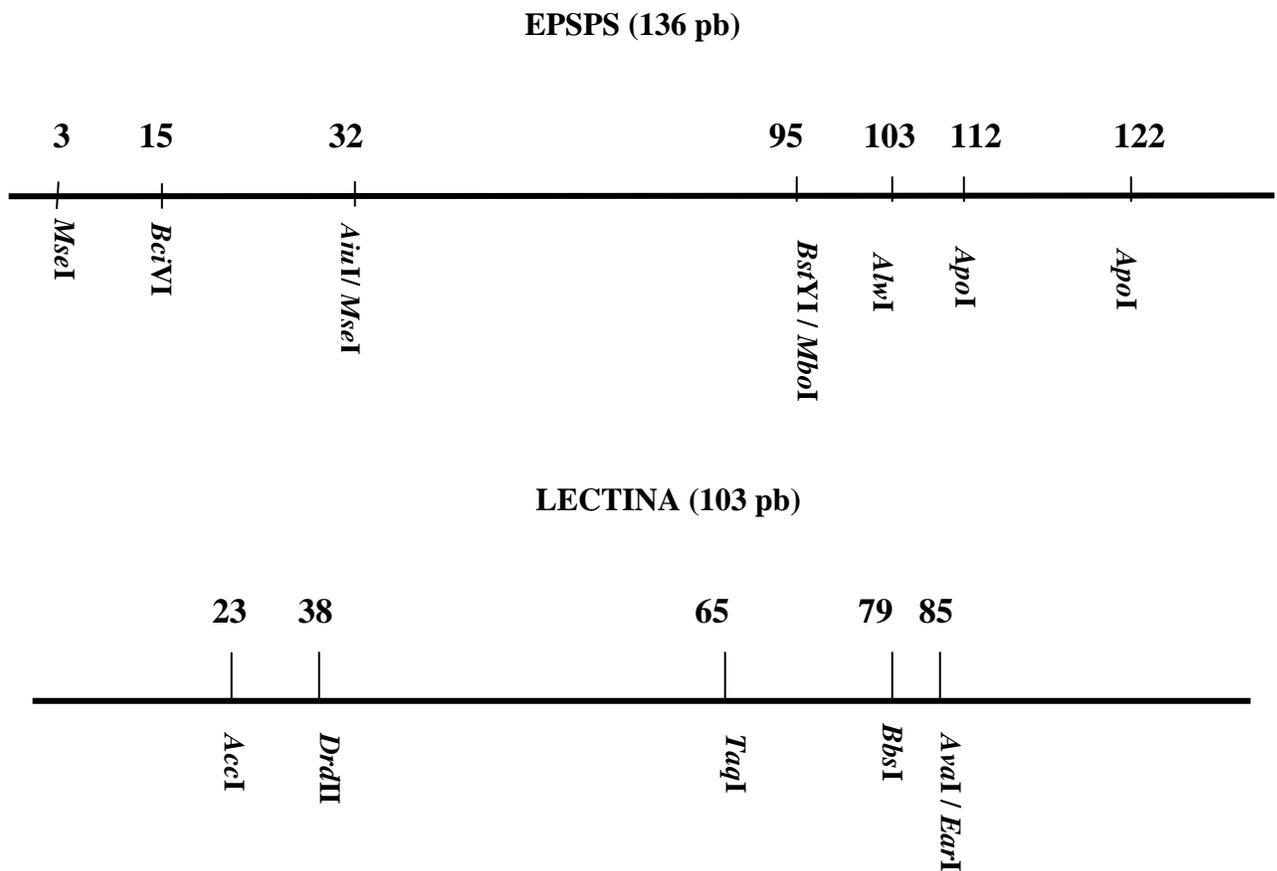


Figura 6.1. Mapa de digestão dos fragmentos curtos.

Teste com 20 cultivares transgênicas – os conjuntos de *primers* foram testados para verificar os resultados sobre DNA de diferentes grãos sabidamente transgênicos, assim como sobre materiais de referência certificados.

6.3 Resultados e Discussão

Determinação das seqüências dos *primers* – o programa Primer3 apresentou como resultado 5 diferentes pares de *primers* que se anelam a cada seqüência dada. Cada par foi analisado no programa NetPrimer e, ainda, diferentes combinações com os pares indicados, a fim de que se encontrasse um par com a maior nota (*rating* acima de 90), desde que apresentassem temperaturas de anelamento próximas, além de menor índice de acidentes, como formação de dímeros, próprios ou cruzados, ou grampos (*hairpins*).

Desta forma foram selecionados os seguintes pares, com os respectivos conceitos obtidos pela análise no programa NetPrimer:

Para o gene da Lectina, produto com 103 pb:

Senso	TCTTGGTTGCTTCTTTGGTC	<i>Rating</i> = 100
Anti-senso	AACCCTATCCTCACCCACTC	<i>Rating</i> = 100

Para o gene da CP4 EPSPS, produto com 137 pb:

Senso	AATTAACAACATGGCACAAGG	<i>Rating</i> = 90
Anti-senso	AAACCAACATAGAATTTGCTGAA	<i>Rating</i> = 90

Extração do DNA de alimentos e grãos – alíquotas de 5 µL da solução de DNA extraído dos grãos e dos alimentos foram carregados em gel de agarose 1,5% (Figura 6.2), ficando claro o rastro de DNA degradado abaixo da banda de 564 pb do marcador molecular, em contraste com banda nítida do DNA extraído dos grãos íntegros de soja.

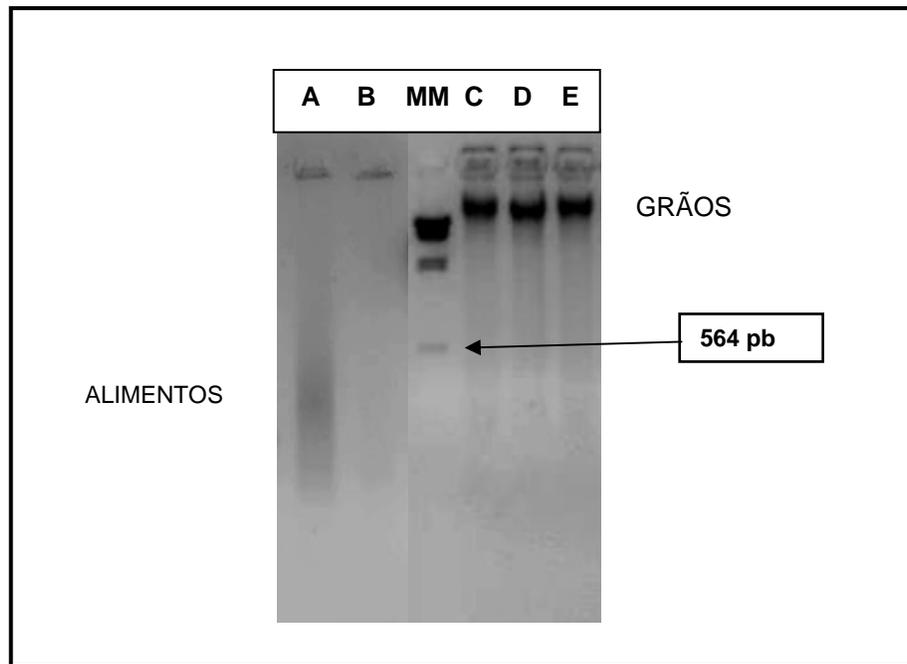


Figura 6.2. Eletroforese em gel de agarose 1,5% do DNA total extraído de alimentos processados de soja (A, B) e grãos (C, D, E). MM= λ /HindIII.

PCR com DNA extraído de alimentos processados – As PCRs foram conduzidas tanto com *primers* convencionais, para produtos com fragmentos acima de 400 pb, como com os novos pares de *primers* para fragmentos curtos, de cerca de 100 pb. Os resultados obtidos em ambas as reações foram significativamente distintos (Figura 6.3). Na reação com os *primers* com produtos de fragmentos maiores o resultado é a não formação de bandas, ou seja, a não-detecção de transgenia no produto. Quando são utilizados os *primers* para produtos com fragmentos próximos de 100 pb, o resultado da detecção passa a ser diferente: os alimentos processados demonstram claramente as bandas referentes à lectina e, ainda, apresentam as bandas referentes à junção CP4 EPSPS, que indica presença de transgenia.

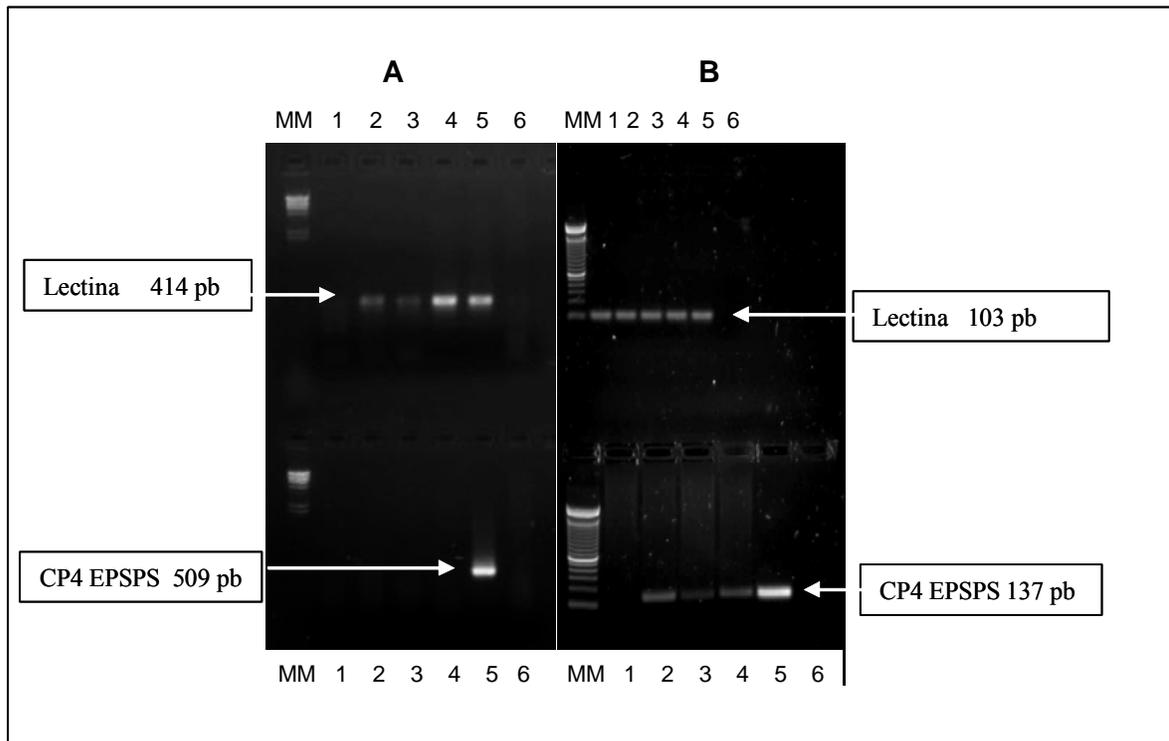


Figura. 6.3. **A.** Produtos de PCR obtidos com *primers* convencionais – fragmentos de Lectina (414 pb) e CP4 EPSPS (509 pb). 1. Bebida de soja, 2. Fórmula infantil, 3. Bebida de soja em pó, 4. Controle negativo (soja não-transgênica), 5. Controle positivo (soja transgênica), 6. Branco. MM= λ Hind III **B.** Produtos de PCR obtidos com os novos *primers* para fragmentos curtos – Lectina - 103 pb e CP4 EPSPS - 137 pb. 1. Controle negativo (soja não-transgênica), 2. Fórmula infantil, 3. Bebida de soja em pó, 4. Bebida de soja, 5. Controle positivo (soja transgênica), 6. Branco; MM(B) = 100 pb.

PCR com DNA de variedades de soja transgênica – variedades argentinas e brasileiras de soja transgênica Roundup Ready apresentaram amplificação dos genes da Lectina e CP4 EPSPS, demonstrando que os *primers* conseguem reconhecer uma grande gama de variedades transgênicas cultivadas (Figura 6.4).

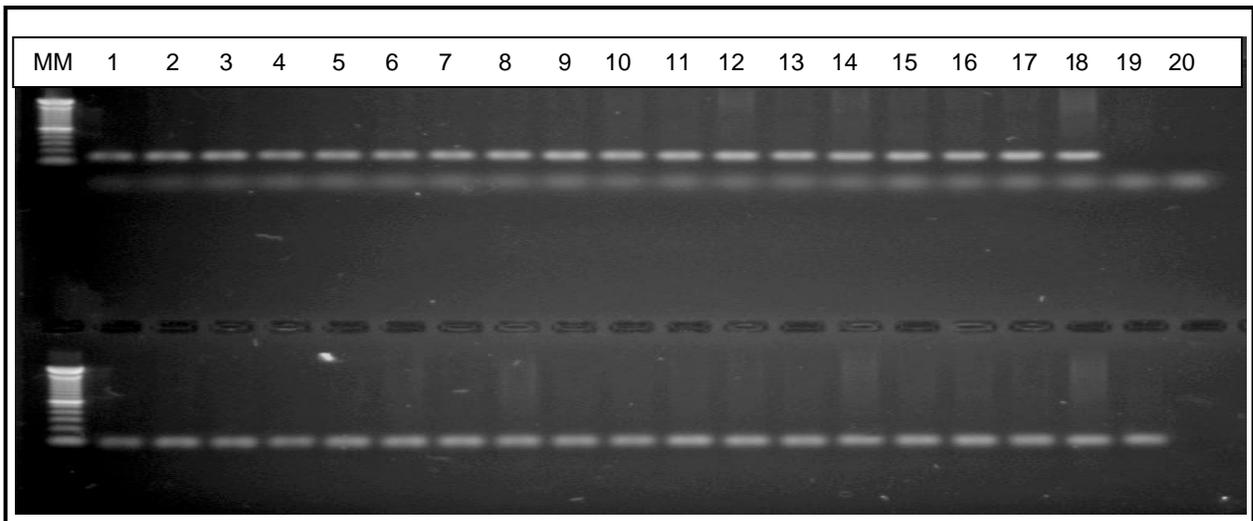


Figura 6.4. Produtos de PCR obtidos com os *primers* de fragmentos curtos de Lectina -103 pb (inferior) e CP4 EPSPS – 137 pb (superior) em amostras de variedades de soja transgênica argentinas (1-11) e brasileiras (12-18), Controle Negativo (19), Branco (20), MM= 100 pb.

Validação da amplificação

Digestão das bandas por enzimas de restrição – a partir da digestão dos produtos da PCR com os *primers* construídos pode-se constatar que os fragmentos gerados (Figura 6.5) correspondem àqueles indicados no mapa de restrição, ou seja:

a) para o fragmento de 103 pb do gene da Lectina digerido com as enzimas de restrição *TaqI* e *AccI*, obtém-se um fragmento de 38 pb, um fragmento de 42 pb e um fragmento menor de 23 pb. As bandas correspondentes aos fragmentos de tamanho semelhantes acabam se fundindo numa banda mais larga devido ao baixo poder de resolução do gel de agarose ainda que na concentração de 3%;

b) para o fragmento de 136 pb da CP4 EPSPS digerido com as enzimas *MboI* e *MseI*, obtém-se um fragmento de 63 pb, um de 41 pb, um de 29 pb e um de 3 pb.

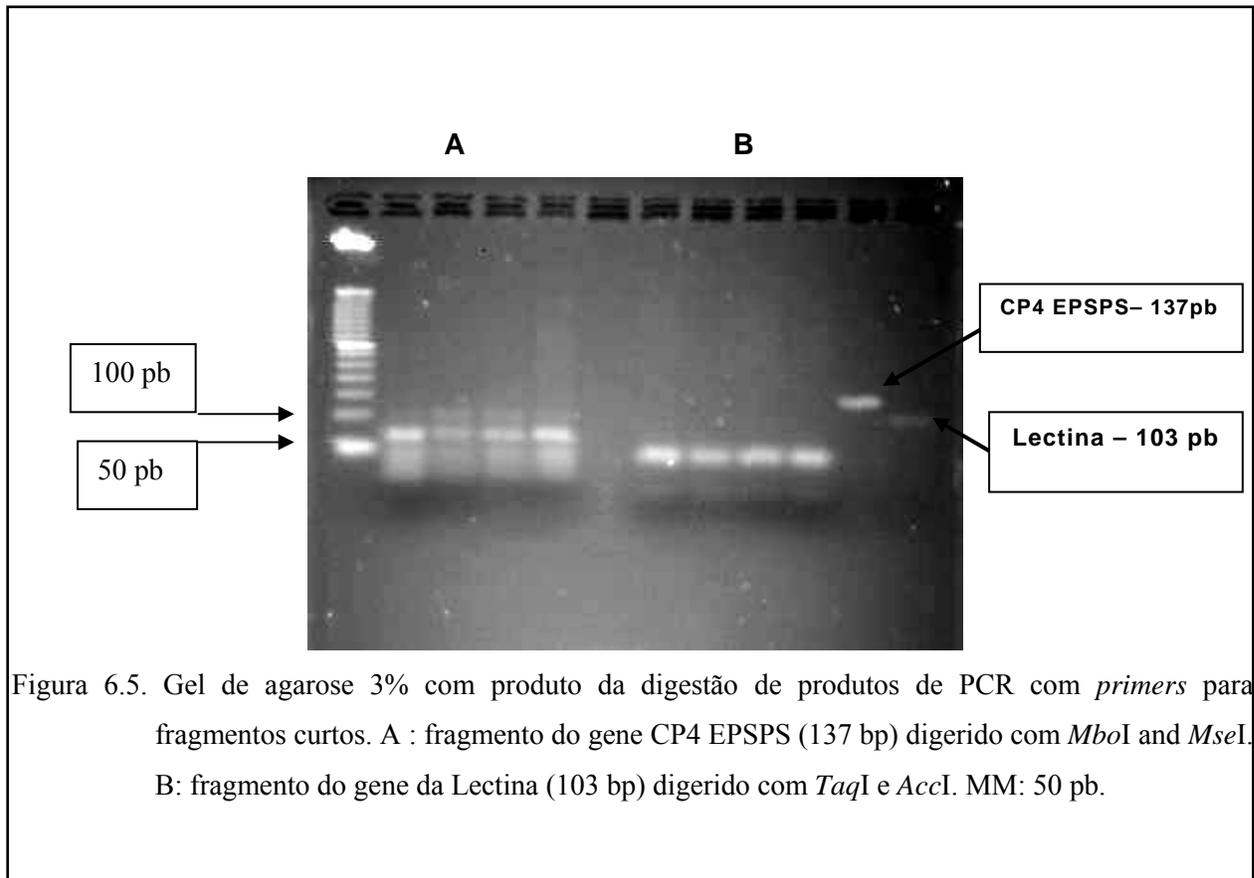


Figura 6.5. Gel de agarose 3% com produto da digestão de produtos de PCR com *primers* para fragmentos curtos. A : fragmento do gene CP4 EPSPS (137 bp) digerido com *MboI* and *MseI*. B: fragmento do gene da Lectina (103 bp) digerido com *TaqI* e *AccI*. MM: 50 pb.

Seqüenciamento - Os fragmentos das amplificações foram seqüenciados e tiveram seus *contigs* montados, sendo submetidas a consulta ao Genbank pelo programa BLASTN, sendo que o resultado obtido confirmou, exatamente, as seqüências de origem (Figura 6.6). Meyer (1999) cita quatro métodos que podem ser utilizados para verificação de resultados de uma PCR, com diferentes graus de confiabilidade, precisão e custos: digestão por enzimas de restrição, hibridização por sondas específicas (Southern Blot), seqüenciamento e *nested-PCR*. Ainda que ressalte as vantagens do *nested-PCR* pela sensibilidade e especificidade, indica o seqüenciamento como sendo o que representa a prova mais acurada do resultado da amplificação por PCR.

- ☐ gi|170005|gb|K00821.1|SOYLEA Soybean lectin (Le1) gene, complete cds
Length=2152

Score = 204 bits (103), Expect = 8e-50
Identities = 103/103 (100%), Gaps = 0/103 (0%)

- ☐ gi|48995006|gb|AY592954.1| Glycine max transgenic chloroplast CP4-EPSPS fusion protein precursor, gene, promoter region and partial cds; nuclear gene for chloroplast product
Length=707

Score = 272 bits (137), Expect = 5e-70
Identities = 137/137 (100%), Gaps = 0/137 (0%)

Figura 6.6. Resultado do programa BLASTN na busca ao Genbank das seqüências obtidas a partir dos fragmentos amplificados com os novos *primers* sintetizados.

6.4 Conclusões

Foi possível concluir a partir dos resultados encontrados no presente trabalho que é viável, com informações das seqüências de transgênicos depositadas em bancos de dados públicos e utilizando-se ferramentas e programas de livre acesso da Internet - Primer3 para desenho de primers, NetPrimer para avaliação de primers e pares de primers, Rebase para digestão virtual dos produtos gerados na amplificação por PCR - desenvolver *primers* confiáveis para uso em análises de detecção por PCR. Esse tipo de recurso, ágil e preciso, passa a ser importante em função do rápido aumento de novas espécies e eventos transgênicos que surgem para plantio e comercialização e que estarão sujeitos aos mesmos controles impostos à soja resistente ao glifosato.

Para a análise de alimentos altamente processados, onde ocorre a degradação parcial do DNA, o desenho de *primers* para amplificação de fragmentos curtos (de cerca de 100 pb) mostrou ser uma estratégia adequada na análise de detecção e controle de organismos geneticamente modificados, assegurando a necessária confiabilidade dos resultados.

Os pares de *primers* desenvolvidos no presente estudo permitiram a detecção do gene da Lectina e da construção do transgene CP4 EPSPS em grãos de 29 diferentes variedades de soja Roundup Ready® brasileiras e argentinas, bem como em DNA extraído de três diferentes matrizes de alimentos altamente processados.

7. CONCLUSÕES FINAIS

O método de extração pelo detergente brometo de hexadecyltrimethylammonium – CTAB – (DOYLE; DOYLE, 1990) mostrou variação menor na quantidade de DNA extraído de soja transgênica e não-transgênica quando comparado com o DNeasy[®] Plant Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), além de apresentar um custo inferior, demonstrando ser um método adequado para extrações uniformes de DNA, embora exija um tempo maior para sua condução se comparado ao tempo gasto na extração com o kit. Para as variedades utilizadas no presente trabalho, a quantidade total de DNA extraído da soja transgênica (115,74 $\mu\text{g} \cdot 100 \text{ mg MS}^{-1}$) é significativamente maior que aquela obtida na soja não-transgênica (112,22 $\mu\text{g} \cdot 100 \text{ mg MS}^{-1}$), confirmando resultados publicados na literatura.

O método de produção de materiais de referência com o uso de moinho criogênico para a desintegração, mistura e homogeneização do material geneticamente modificado com matriz não-transgênica, usando a verificação por PCR em tempo real com SYBR[®] Green, permitiu a obtenção de materiais com valores significativamente iguais aos materiais certificados nos níveis de 0%, 0,5 %, 1,0 %, 2,0 % e 5,0 % de soja transgênica Roundup Ready[®]. O material candidato 0,1 % de soja RR, utilizando os mesmos métodos de produção e avaliação, não atingiu valor de concentração significativamente igual ao esperado.

O método de marcadores AFLP aplicado sobre 21 variedades comerciais de soja transgênica Roundup Ready[®] argentinas e 8 variedades de soja RR desenvolvidas para plantio no Brasil não possibilitou a identificação de marcadores exclusivos para caracterização da origem das variedades. Foi possível, entretanto, a caracterização em caráter *multiplex* de 15 das variedades argentinas e das 8 variedades brasileiras estudadas, com identificação de 6 bandas originadas de 4 pares de *primers* seletivos com 3 nucleotídeos cada um. São elas:

270 pb (E_{TTG}/M_{GGA})

170pb e 700pb (E_{TCA}/M_{GGA})

250 pb (E_{TAG}/M_{GCT})

200 pb e 430 pb (E_{TTT}/M_{GCC})

A excisão, reamplificação e seqüenciamento de 13 bandas monomórficas obtidas na reação seletiva nº 2 (E_{TTG}/M_{GGA}) de AFLP com revelação por eletroforese em gel de poliacrilamida 6 %, apresentou seqüências com alto grau de identidade (próximo de 100 %) para 12 das bandas seqüenciadas. A banda correspondente à amostra nº 19, variedade argentina A 6019 RG, apresentou 82 % de identidade em relação às outras amostras.

A elaboração de tabela para formação da matriz de combinações possíveis de *primers* de seleção, destacando as reações e *primers* que apresentam polimorfismo para o conjunto estudado, apresentou-se como ferramenta útil no planejamento e avaliação dos pares de *primers* seletivos para o método AFLP.

A utilização do método de eletroforese capilar na análise dos resultados das ampliações seletivas de AFLP possibilita o levantamento de informações em tempo aproximadamente 8 vezes menor do que o gasto na confecção e revelação de gel de poliacrilamida a 6 %, com um custo cerca de 3,73 vezes maior por amostra analisada. Porém, deve-se levar em consideração a qualidade e precisão dos resultados analíticos.

Foi possível concluir, a partir dos resultados encontrados no presente trabalho, que é viável, com informações das seqüências de transgênicos depositadas em bancos de dados públicos e utilizando-se ferramentas computacionais e programas de livre acesso da Internet, desenvolver *primers* confiáveis para uso em análises de detecção por PCR. Esse tipo de recurso passa a ser importante em função do rápido aumento de novas espécies e eventos transgênicos que surgem para plantio e comercialização e que estarão sujeitos aos mesmos controles impostos à soja resistente ao glifosato.

Para a análise de alimentos altamente processados, onde ocorre a degradação parcial do DNA, o desenho de *primers* para amplificação de fragmentos curtos (de cerca de 100 pb) mostrou ser uma estratégia adequada na análise de detecção e controle de organismos geneticamente modificados, assegurando a necessária confiabilidade dos resultados. Os pares de *primers* desenvolvidos no presente estudo permitiram detectar a presença do gene da lectina e da construção do transgene CP4 EPSPS em grãos de 29 variedades de soja Roundup Ready® brasileiras e argentinas, bem como em DNA extraído de três diferentes matrizes de alimentos altamente processados.

REFERÊNCIAS

AHMED, F. E. Detection of genetically modified organisms in foods **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 20, n.5, p. 215-223, 2002.

ANGIOLILLO, A.; MENUCCINI, M.; BALDONI, L. Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v.98, p. 411-421, 1999.

BAUER, T.; WELLER, P.; HAMMES, W. P.; HERTEL, C. The effect of processing parameters on DNA degradation in food. **European Food Research and Technology**, Heidelberg, v. 217, p. 338–343, 2003.

BENSON D. A.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN D. J.; OSTELL J.; WHEELER D. L. GenBank. **Nucleic Acids Research**, London, v. 31, n. 1, p. 23-27, 2003.

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

BONATO, A. L. V. **Avaliação da diversidade genética entre cultivares brasileiras de soja através de marcadores AFLP**. 2000. 89 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

BRASIL. Decreto nº 4.680, de 24 de abril de 2003. Regulamenta o direito à informação, assegurado pela Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990, quanto aos alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal que contenham ou sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados, sem prejuízo do cumprimento das demais normas aplicáveis. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 abr 2003, Seção 1, p. 2.

_____. Lei nº 10.688, de 13 de junho de 2003. Estabelece normas para a comercialização da produção de soja da safra de 2003 e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 jun 2003, Seção 1, p. 1.

_____. Lei nº 10.814, de 15 de dezembro de 2003. Estabelece normas para a comercialização da produção de soja da safra de 2003 e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 dez 2003, Seção 1, p. 1.

_____. Lei nº 11.092, de 12 de janeiro de 2005. Estabelece normas para o plantio e comercialização da produção de soja geneticamente modificada da safra de 2005, altera a Lei nº 10.814, de 15 de dezembro de 2003, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 13 jan 2005, Seção 1, p. 10.

_____. Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005. Regulamenta os incisos II, IV e V do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados – OGM e seus derivados, cria o Conselho Nacional de Biossegurança – CNBS, reestrutura a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio, dispõe sobre a Política Nacional de Biossegurança – PNB, revoga a Lei nº 8.974, de 5 de janeiro de 1995, e a Medida Provisória nº 2.191-9, de 23 de agosto de 2001, e os arts. 5º, 6º, 7º, 8º, 9º, 10 e 16 da Lei nº 10.814, de 15 de dezembro de 2003, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 28 mar 2005, Seção 1, p. 1.

_____. Ministério da Justiça. Definir o símbolo de que trata o art. 2º, § 1º, do Decreto 4.680, de 24 de abril de 2003, na forma do anexo à presente portaria. Portaria nº 2658, de 22 de dezembro de 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 dez 2003, Seção 1, p. 13.

CARDARELLI, P.; BRANQUINHO, M.R.; FERREIRA, R.T.B.; CRUZ, F.P.; GEMAL, A.L. Detection of GMO in food products in Brazil: the INCQS experience. **Food Control**, Guildford, v. 16, n. 10, p. 859-866, 2005.

CARVALHO, V. F. Mercado mundial de plantas transgênicas e a soja RR[®] no Brasil. In: PATERNIANI, M. L. S. (Org.). **Biossegurança e plantas transgênicas**. Jaboticabal: FUNEP, 2005. p. 102-116.

CERVERA, M. T.; CABEZAS, J. A.; SANCHA, S. J.; MARTINEZ de TODA, F.; MARTINEZ ZAPATER, J. M. Application of AFLPs to the characterization of grapevine *Vitis vinifera* L. genetic resources. A case study with accessions from Rioja (Spain). **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 97, p. 51-59, 1998.

CONCEIÇÃO, F. R.; MOREIRA, A. N.; BINSFELD, P. C. Detecção e quantificação de organismos geneticamente modificados em alimentos e ingredientes alimentares. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 1, p. 315-324, 2006.

Convenção sobre Diversidade Biológica - CDB. Cartagena Protocol on Biosafety to the Convention on Biological Diversity: text and annexes. Secretariat of the Convention on Biological Diversity, Montreal, 2000. Disponível em : <http://www.cbd.int/doc/legal/cartagena-protocol-en.pdf> Acesso em: 02 fev. 2008.

CORBISIER, P.; TRAPMANN, S.; GANCSBERG, D.; HANNES, L.; VAN IWAARDEN, P.; BERBEN, G.; SCHIMMEL, H.; EMONS, H. Quantitative determination of Roundup Ready soybean (*Glycine max*) extracted from highly processed flour. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 383, n. 2, p. 282-290, 2005.

CRESTE, S.; TULMANN-NETO, A.; SILVA, S. O.; FIGUEIRA, A. V. O. Genetic characterization of banana cultivars (*Musa* spp) from Brazil using microsatellite markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 132, p. 259-268, 2003.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Ottawa, v. 19, p. 299-306, 2001.

DEISINGH, A. K.; BADRIE, N. Detection approaches for genetically modified organisms in foods. **Food Research International**, Essex, v. 38, n. 6, p. 639-649, 2005.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rochester, v. 12, p. 13-15, 1990.

ELISIÁRIO, P.; JUSTO, E.; LEITÃO, J. Identification of mandarin hybrids by isozyme and RAPD analysis. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 81, p. 287-299, 1999.

FACCIOLI, P.; PECCHIONI, N.; STANCA, A. M.; TERZI, V. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) markers for barley malt fingerprinting. **Journal of Cereal Science**, London, v. 29, p. 257-260, 1999.

FIGUEIRA, A. V. O. Transgênicos: Aspectos Ambientais e Econômicos. In: ABREU, A.A. **Seminário Internacional Transgênicos no Brasil**. São Paulo: Pró-Reitoria de Cultura e Extensão Universitária da Universidade de São Paulo, 2005. p. 100-108.

FLANNERY, M. L.; THORNE, F. S.; KELLY, P. W.; MULLINS, E. An Economic Cost-Benefit Analysis of GM Crop Cultivation: An Irish Case Study. **AgBioForum**, Columbia, v. 7, n. 4, p. 149-157, 2004. Disponível em: <http://www.agbioforum.missouri.edu/v7n4/v7n4a01-mullins.htm>. Acesso em: 09 jan. 2008.

HARRISON, R. E.; LUBY, J. J.; FURNIER, G. R.; HANCOCK, J. F. Morphological and molecular variation among populations of octoploid *Fragaria virginiana* and *F. choliensis* (Rosaceae) from North America. **American Journal of Botany**, New York, v. 84, p. 612-620, 1997.

HUACCA, M. E. F. **Bioanalítica de *Alicyclobacillus acidoterrestris* – detecção em frutas cítricas, isolamento microbiológico e classificação filogenética por técnicas biomoleculares e eletroforese em *microchips***. 2007. 130 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

HUPFER, C.; HOTZEL, H.; SACHSE, K.; ENGEL, K. H. Detection of the genetic modification in heat-treated products of *Bt* maize by polymerase chain reaction. **Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A**, Heidelberg, v. 206, p. 203-207, 1998.

KARP, A.; SEBERG, O.; BUIATTI, M. Molecular Techniques in the Assessment of Botanical Diversity. **Annals of Botany**, Oxford, v. 78, p. 143-149, 1996.

LAJOLO, F. M.; NUTTI, M. R. **Transgênicos**: bases científicas da sua segurança. São Paulo: SBAN, 2003. 112 p.

LOPES, R.; LOPES, M. T. G.; FIGUEIRA, A. V. O.; CAMARGO, L. E. A.; FUNGARO, M. H. P.; CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. L. C. Marcadores Moleculares Dominantes (RAPD e AFLP). **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 29, p. 56-60, 2002.

MACHADO, R. T. M. **Rastreabilidade, tecnologia da informação e coordenação de sistemas agroindustriais**. São Paulo, 2000. 220 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade, Universidade de São Paulo.

MALDINI, M.; MARZANO, F. N.; FORTES, G. G.; PAPA, R.; GANDOLFI, G. Fish and seafood traceability based on AFLP markers: Elaboration of a species database. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 261, p. 487–494, 2006.

McGREGOR, C. E.; LAMBERT, C. A.; GREYLING, M. M.; LOUW, J. H.; WARNICH, L. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. **Euphytica**, Wageningen, v. 113, p. 135–144, 2000.

MEKSEM, K.; RUBEN, E.; HYTEN, D.; TRIWITAYAKORN, K.; LIGHTFOOT, D. A. Conversion of AFLP bands into high-throughput DNA markers. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlim, v. 265, n. 2, p. 207-214, 2001.

MEYER, R.; CANDRIAN, U. PCR-based DNA analysis for the identification and characterization of food components. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, London, v. 29, p. 1–9, 1996.

MEYER, R. Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food. **Food Control**, Guildford, v. 10, p. 391-399, 1999.

MIENIE, C. M. S.; SMIT, M. A.; PRETORIUS, P. J. Use of random amplified polymorphic DNA for identification of South African soybean cultivars. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 43, p. 43-49, 1995.

MIGNOUNA, H. D.; ABANG, M. M.; FAGBEMI, S. A. A comparative assessment of molecular marker assays (AFLP, RAPD and SSR) for white yam (*Dioscorea rotundata*) germplasm characterization. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v. 142, p. 269-276, 2003.

MUELLER, U. G.; WOLFENBARGER, L. L. R. AFLP genotyping and fingerprinting. **Trends in Ecology & Evolution**, Cambridge, v. 14, n. 10, p. 389-394, 1999.

NICESE, F. P.; HORMAZA, J. I.; McGRANAHAN, G. H. Molecular characterization and genetic relatedness among walnut (*Juglans regia* L.) genotypes based on RAPD markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 101, p. 199-206, 1998.

PADGETTE, S. R., TAYLOR, N. B.; NIDA, D. L.; BAILEY, M. R.; MacDONALD, J.; HOLDEN, L. R.; FUCHS, R. L. The composition of glyphosate-tolerant soybean seeds is equivalent to that of conventional soybeans. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 126, p. 702-716, 1996.

PARAN, I.; MICHELMORE, R. W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 85, n. 8, p. 985-993, 2004.

PARK, Y. H., WEST, M. A. L.; St. CLAIR, D. A. Evaluation of AFLPs for germplasm fingerprinting and assessment of genetic diversity in cultivars of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). **Genome**, Ottawa, v. 47, p. 510-518, 2004.

PATERNIANI, E. Biotecnologia: Evolução, Riscos e Benefícios. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL TRANSGÊNICOS NO BRASIL, São Paulo, 2005. São Paulo: USP/Pró-Reitoria de Cultura e Extensão, 2005. p. 20-27.

PELAEZ, V.; ALBERGONI, L.; GUERRA, M. P. Soja transgênica versus soja convencional: uma análise comparativa de custos e benefícios. *Cadernos de Ciências e Tecnologia*, Brasília, DF, v. 21, n. 2, p. 279-309, 2004.

PESSANHA, L. D. R. Transgênicos, recursos genéticos e segurança alimentar: uma análise da judicialização do conflito sobre a liberação da soja *rr* no Brasil. In: **XIV Encontro Nacional de Estudos Populacionais da Associação Brasileira de Estudos Populacionais**, 2004, Caxambú. Anais. Disponível em: http://www.abep.nepo.unicamp.br/site_eventos_abep/PDF/ABEP2004_499.pdf. Acesso em 21 jan 2008.

QUERCI, M., JERMINI, M., VAN DEN EEDE, G. **Training course on the analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms – user manual**. European Communities, 2004, Special Publication N° I.03.114. Disponível em: <http://gmotraining.jrc.it/>.

RIDOUT, C. J.; DONINI, P. Use of AFLP in cereals research. **Trends in Plant Science**, Killington, v. 4, n. 2, p. 76-79, 1999.

ROBERTS, R. J.; VINCZE, T.; POSFAI, J.; MACELIS, D. REBASE—enzymes and genes for DNA restriction and modification. **Nucleic Acids Research**, London, v. 35, p. D269-D270, 2007. Disponível em: <http://rebase.neb.com/rebase/rebase.ftp.html>. Acesso em: 26 dez. 2007.

SANTOS, C. A. F.; SIMON P. W. Some AFLP amplicons are highly conserved DNA sequences mapping to the same linkage groups in two F2 populations of carrot. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 2, p. 195-201, 2002.

SASAZAKI, S.; MUTOH, H.; TSURIFUNE, K.; MANNEN, H. Development of DNA markers for discrimination between domestic and imported beef. **Meat Science**, Barking, v. 77, p. 161–166, 2007.

SAVELKOUL, P. H. M.; AARTS, H. J. M.; HAAS, J. de; DIJKSHOORN, L.; DUIM, B.; OTSEN, M.; RADEMAKER, J. L. W.; SCHOULS, L.; LENSTRA, J. A. Amplified-

Fragment Length Polymorphism Analysis: the State of an Art. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 10, p. 3083-3091, 1999.

SENSI, E.; VIGNANI, R.; SCALI, M.; MASI, E.; CRESTI, M. DNA fingerprinting and genetic relatedness among cultivated varieties of *Olea europaea* L. estimated by AFLP analysis. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 97, p. 379-388, 2003.

SHAN, X.; BLAKE, T. K.; TALBERT, L. E. Conversion of AFLP markers to sequence-specific PCR markers in barley and wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 98, p. 1072-1078, 1999.

SHELTON, A. M. Risks and benefits of agricultural biotechnology. In: AHMED, F.E. (Editor) **Testing of Genetically Modified Organisms in Foods**. Binghamton: Food Products Press, 2004. p. 1-55.

SINGH, A.; CHAUDHURY, A.; SRIVASTAVA, P. S.; LAKSHMIKUMARAN, M. Comparison of AFLP and SAMPL markers for assessment of intra-population genetic variation in *Azadirachta indica* A. Juss. **Plant Science**, Amsterdam, v. 162, p. 17-25, 2002.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, 2007.

TRAPMANN, S.; SCHIMMEL, H.; KRAMER, G. N.; VAN DEN EEDE, G.; PAUWELS, J. Production of certified reference materials for the detection of genetically modified organisms. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 85, n. 3, p. 775-779, 2002.

TRAPMANN, S.; CATALANI, P.; CONNEELY, P.; CORBISIER, P.; GANCSBERG, D.; HANNES, E.; LE GUERN, L.; KRAMER, G. N.; PROKISCH, J.; ROBOUCH, P.; SCHIMMEL, H.; ZELENY, R.; PAUWELS, J.; VAN DEN EEDE, G.; WEIGHARDT, F.; MAZZARA, M.; ANKLAM, E. **The Certification of Reference Materials of Dry-Mixed Soya Powder with different Mass Fractions of Roundup Ready™ Soya**. Luxembourg: European Communities,

2002. (Certified Reference Materials IRMM-410S - IRMM-410S-0/IRMM-410S-1/IRMM-410S-2/IRMM-410S-3/IRMM-410S-4/IRMM-410S-5).

TRAVIS, S.; MASCHINSKI, J.; KEIM, P. An analysis of genetic variation in *Astragalus cremnophylax* var. *cremnophylax*, a critically endangered plant, using AFLP markers. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 5, p. 735-745, 1996.

VIGNANI, R.; SCALI, M.; MASI, E.; CRESTI, M. Genomic variability in *Vitis vinifera* “Sangiovese” assessed by microsatellite and non-radioactive AFLP test. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 5, n. 1, p. 1-11, 2002. Disponível em: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-34582002000100007&script=sci_arttext&tlng=en. Acesso em: 24 jul. 2003.

VILARINHOS, A. D. **Utilização de marcadores moleculares (RAPD) na caracterização de genótipos de soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. 1994. 40 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1994.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, London, v. 23, p. 4407-4414, 1995.

WEIGHARDT, F. European GMO labeling thresholds impractical and unscientific **Nature Biotechnology**, New York, v. 24, n. 1, p. 23-25, 2006.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, London, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

WINDELS, P.; TAVERNIERS, I.; DEPICKER, A.; VAN BOCKSTAELE, E.; DE LOOSE, M. Characterization of the Roundup Ready soybean insert. **European Food Research and Technology**, Heidelberg, v. 213, p. 107–112, 2001.

WINFIELD, M. O.; ARNOLD, G. M.; COOPER, F.; LERAY, M.; WHITE, J.; KARP, A.; EDWARDS, K. J. A study of genetic diversity in *Populus nigra* subsp. *betulifolia* in the Upper Severn area of the UK using AFLP markers. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 7, n. 1, p. 3-10, 1998.

WONG, C.; KIEW, R.; LOH, J. P.; GAN, L. H.; SET, O.; LEE, S. K.; LUM, S.; GAN, Y. Y. Genetic Diversity of the Wild Banana *Musa acuminata* Colla in Malaysia as Evidenced by AFLP. **Annals of Botany**, Oxford, v. 88, p. 1017-1025, 2001.

WURZ, A.; BLUTH, A.; ZELTZ, P.; PFEIFER, C.; WILLMUND, R. Quantitative analysis of genetically modified organisms (GMO) in processed food by PCR-based methods. **Food Control**, Guildford, v. 10, p. 385-389, 1999.

YAMADA, T.; CASTRO, P. R. C. Efeitos do glifosato nas plantas: Implicações fisiológicas e agronômicas. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, n. 119, p. 1-32, 2007. Encarte Técnico. Disponível em: [http://www.ipni.org.br/ppiweb/brazil.nsf/87cb8a98bf72572b8525693e0053ea70/d20fb44d85259bf7032572530062870e/\\$FILE/Encarte-119.pdf](http://www.ipni.org.br/ppiweb/brazil.nsf/87cb8a98bf72572b8525693e0053ea70/d20fb44d85259bf7032572530062870e/$FILE/Encarte-119.pdf). Acesso em: 05 dez. 2007.

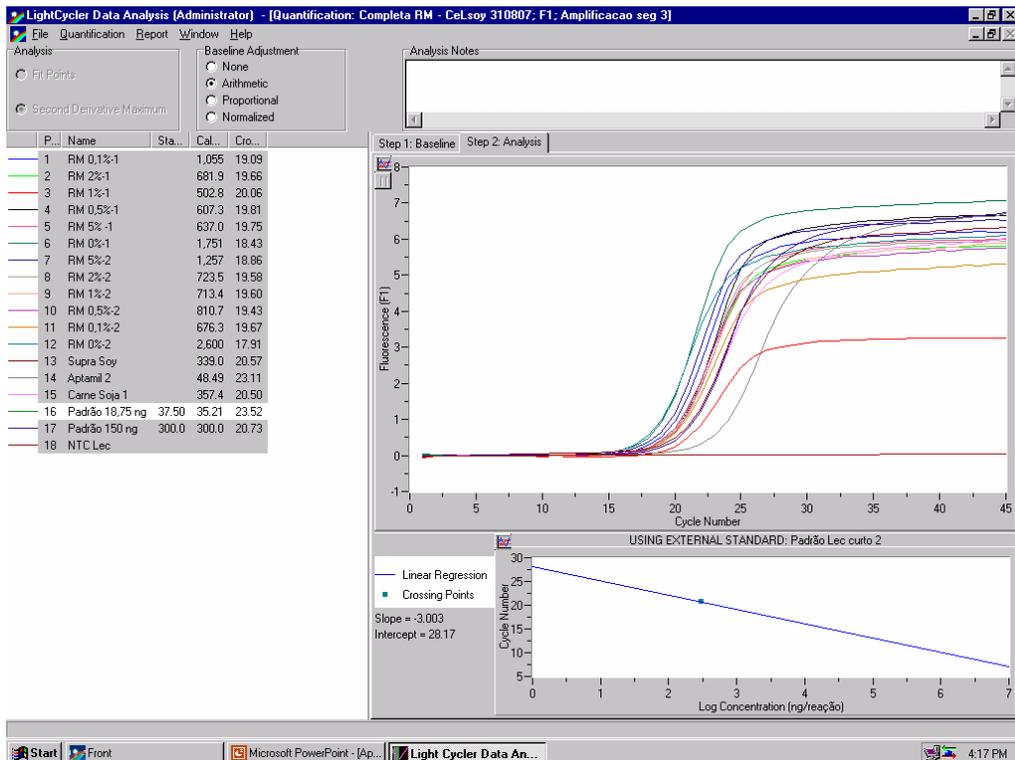
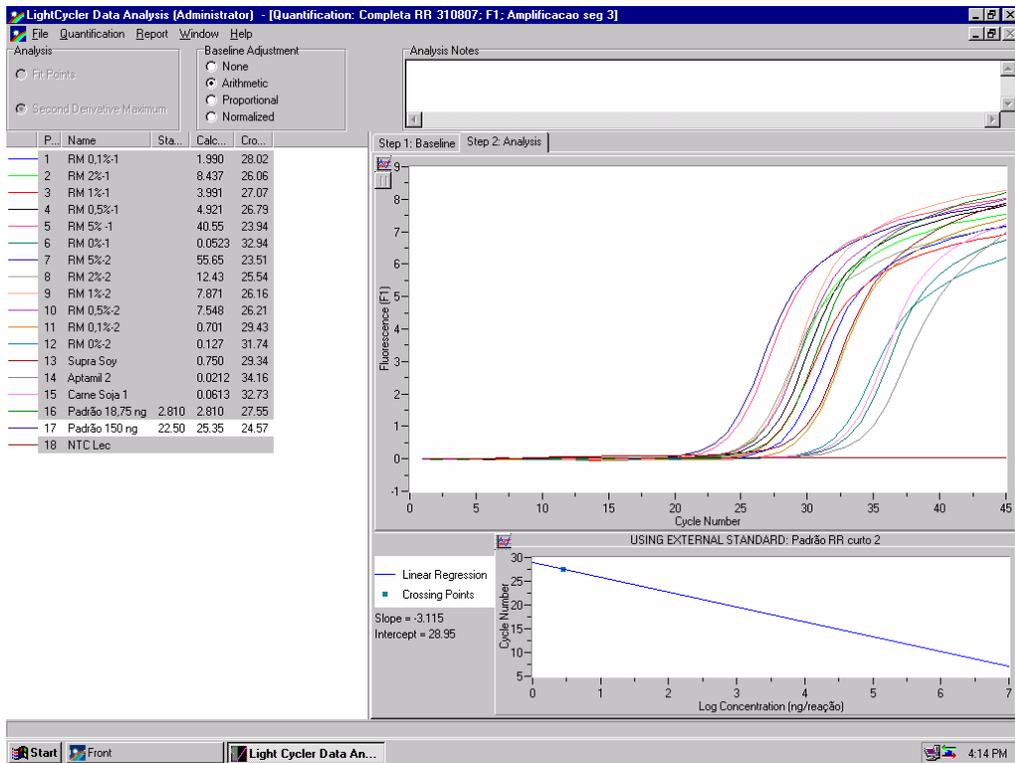
YANG, X.; QUIROS, C. Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 86, p. 205-212, 1993.

YOKE-KQUEEN, C.; RADUB, S. Random amplified polymorphic DNA analysis of genetically modified organisms. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 127, p. 161-166, 2006.

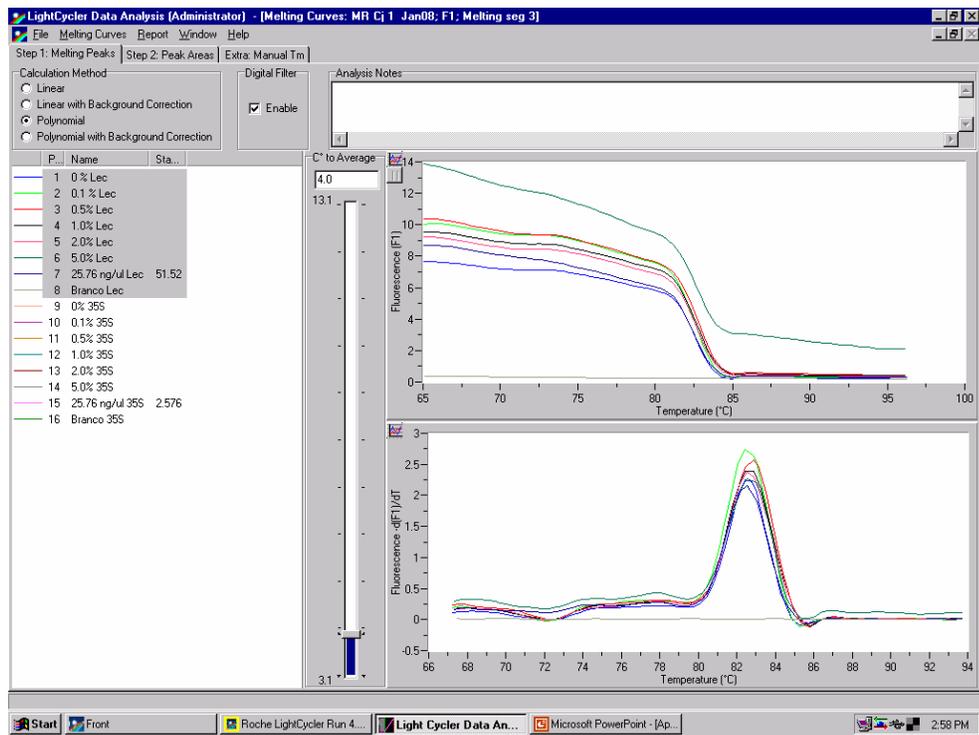
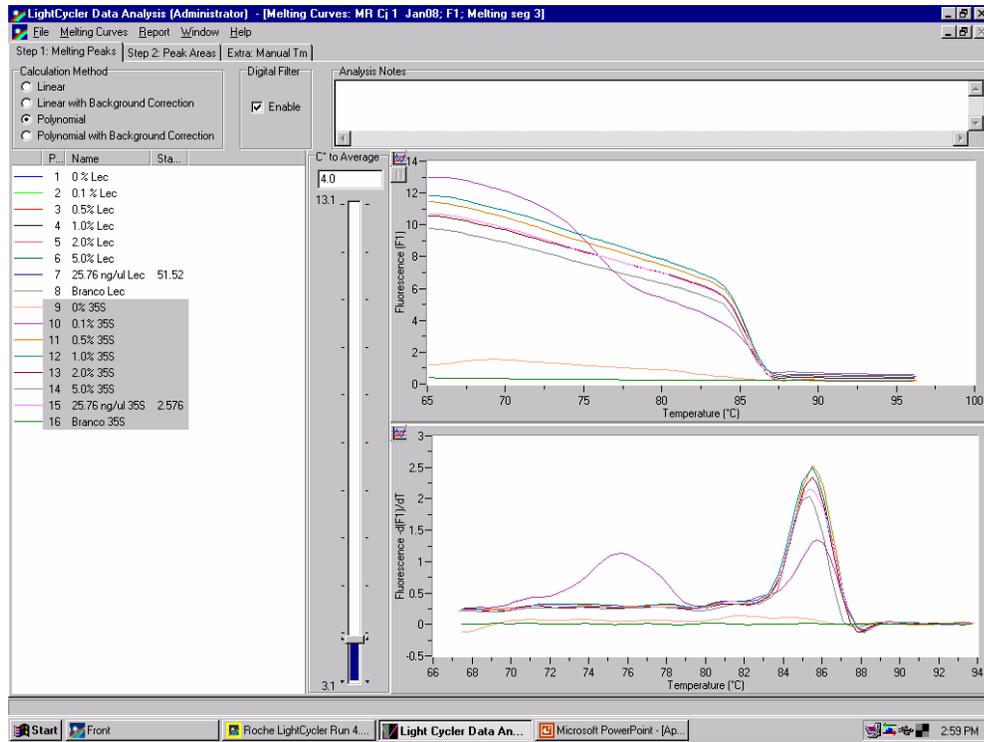
ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, p. 1-16, 2002.

ZHU, J.; GALE, M. D.; QUARRIE, S.; JACKSON, M. T.; BRYAN, G. J. AFLP markers for the study of rice biodiversity. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 96, p. 602-611, 1998.

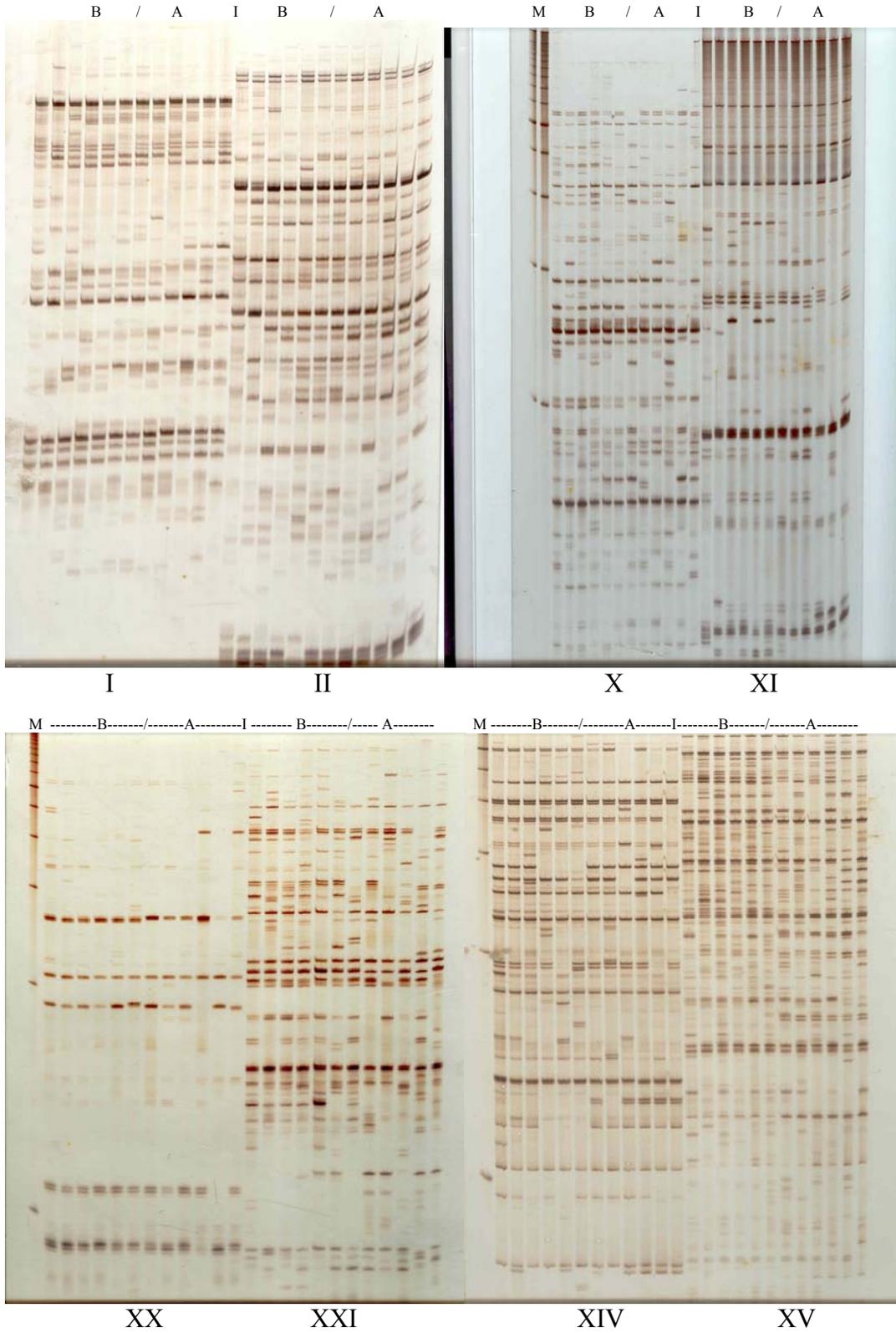
APÊNDICE A – Curvas de amplificação dos genes 35S e Lectina por PCR em tempo real no LightCycler (Roche Diagnostics).



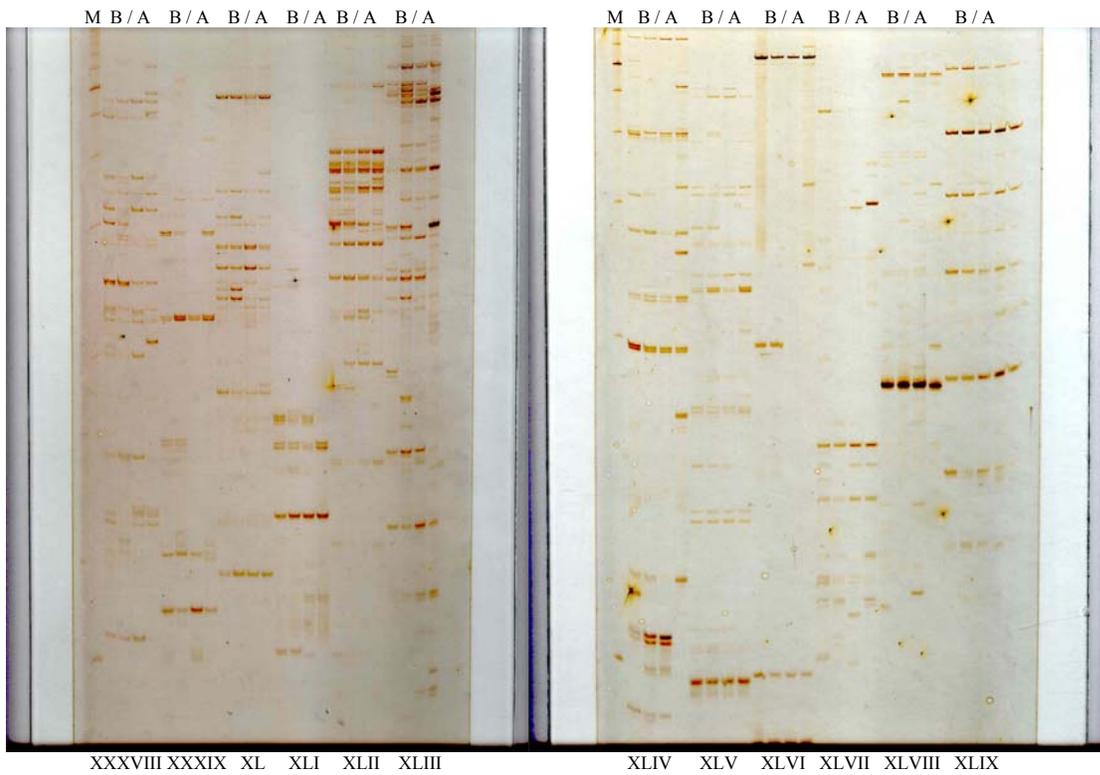
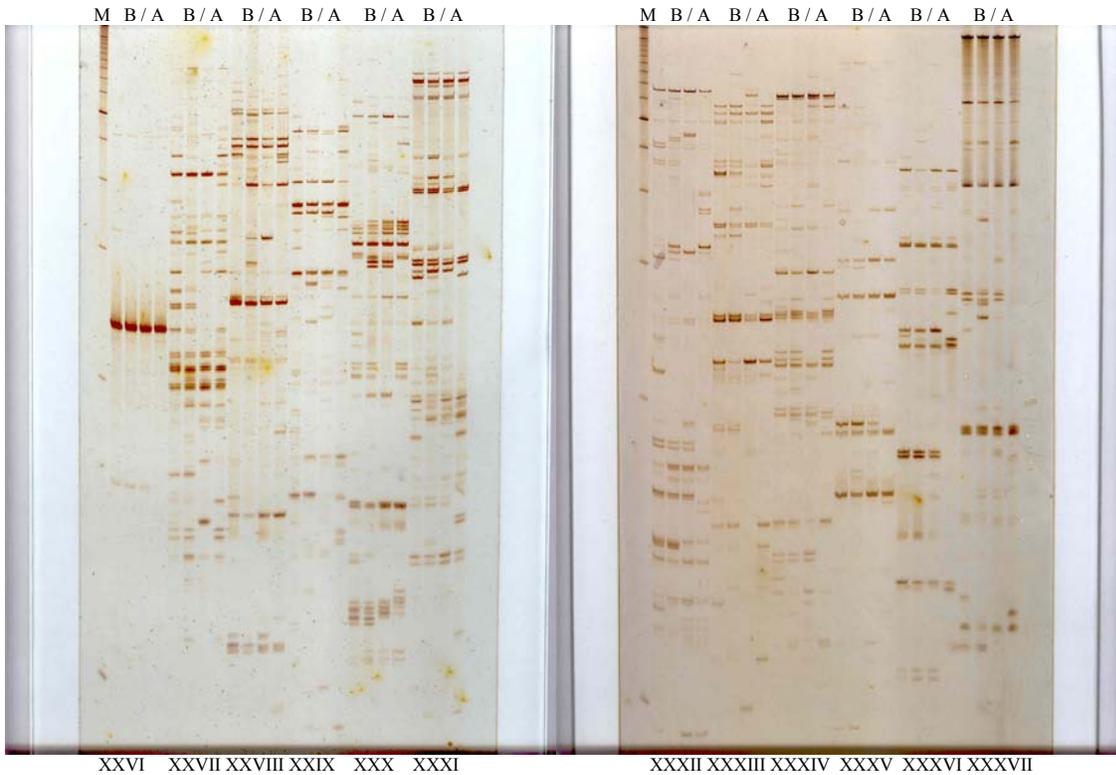
APÊNDICE B – Curvas de desnaturação dos produtos amplificados dos genes 35S e Lectina por PCR em tempo real no LightCycler (Roche Diagnostics).



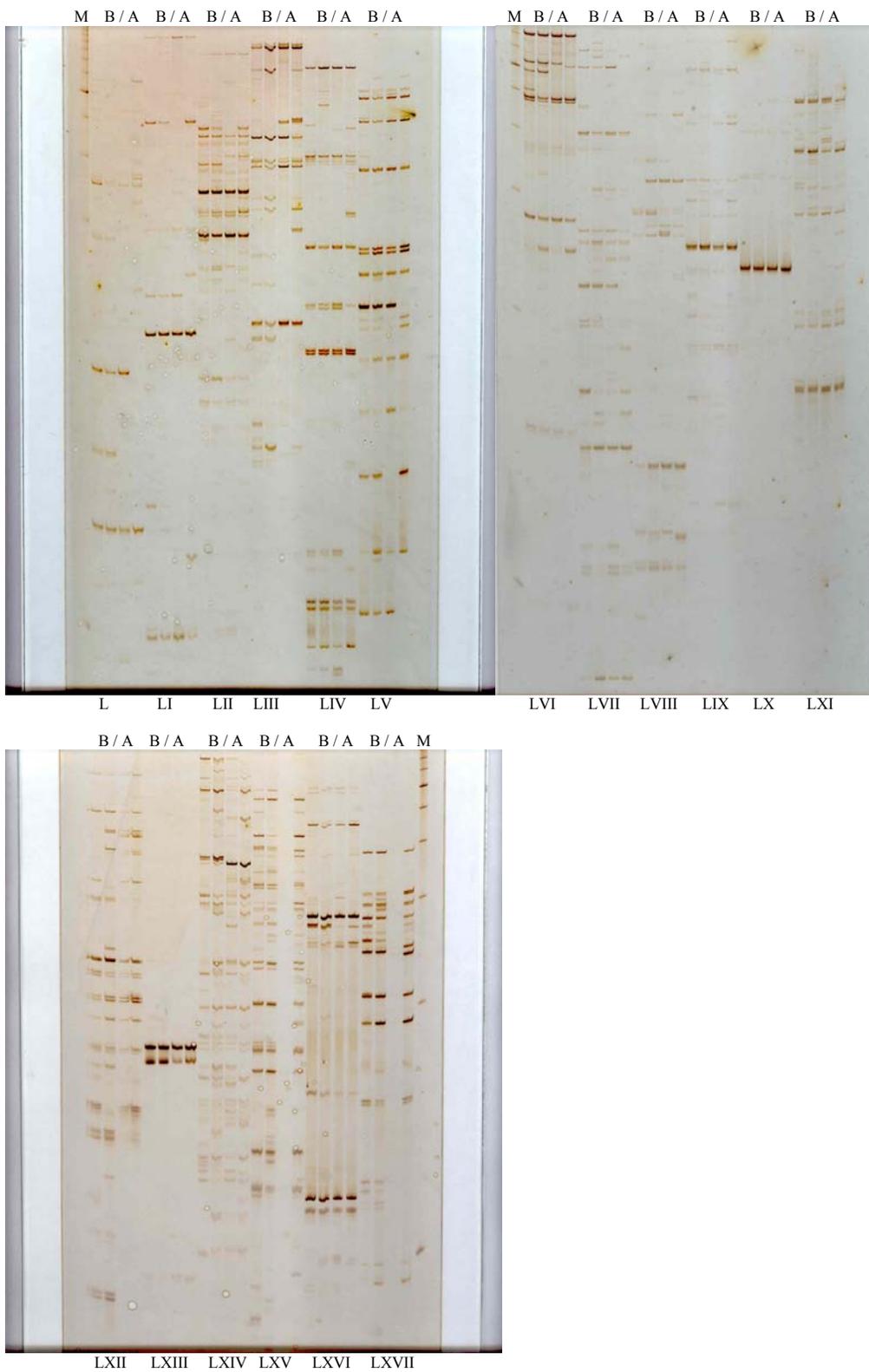
APÊNDICE C – Géis de poliacrilamida com reações da etapa de varredura dos primers seletivos AFLP. A= variedades argentinas, B= variedades brasileiras.



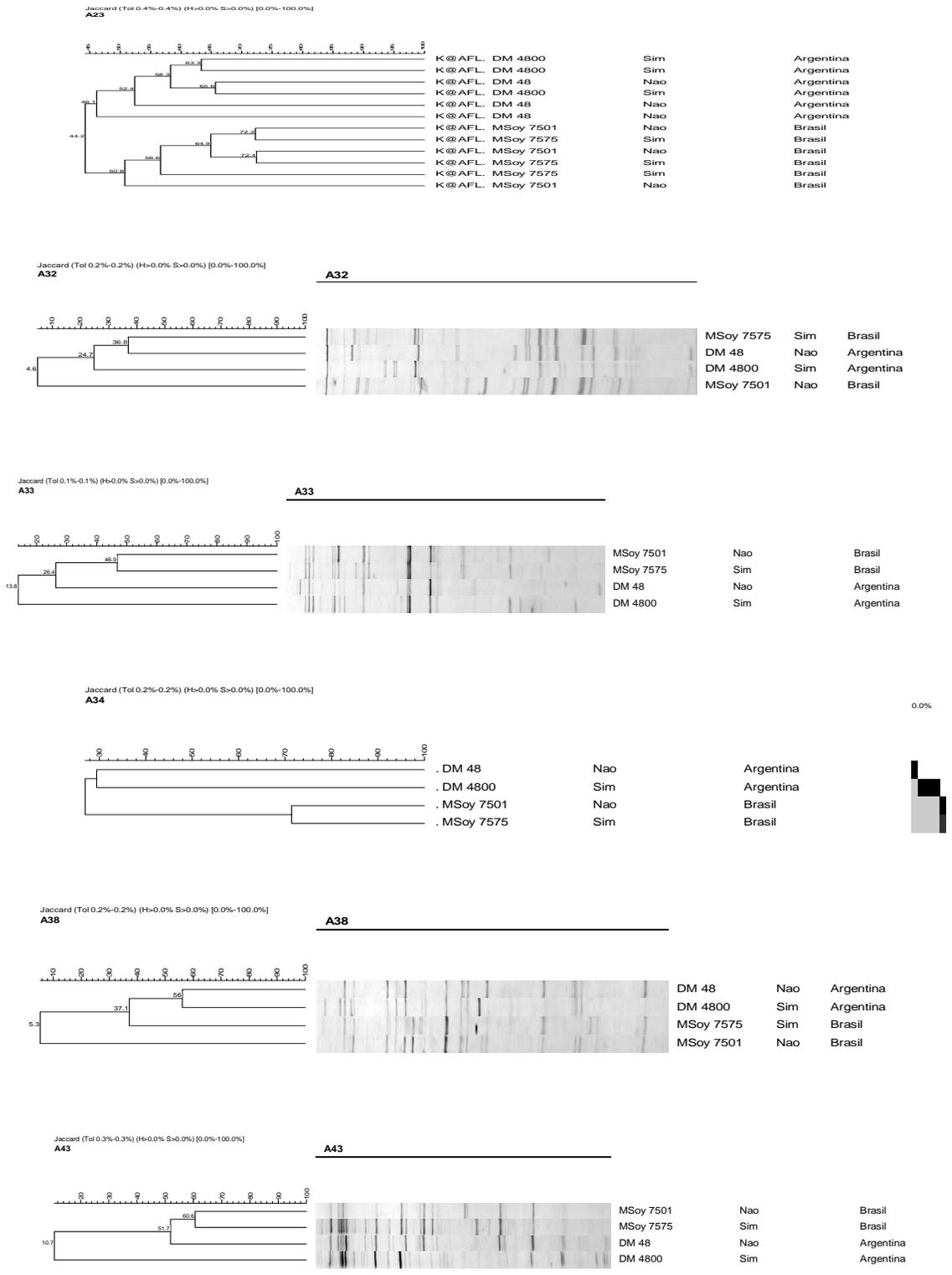
APÊNDICE D – Géis de poliacrilamida com reações da etapa de varredura dos primers seletivos AFLP. A= variedades argentinas, B= variedades brasileiras.



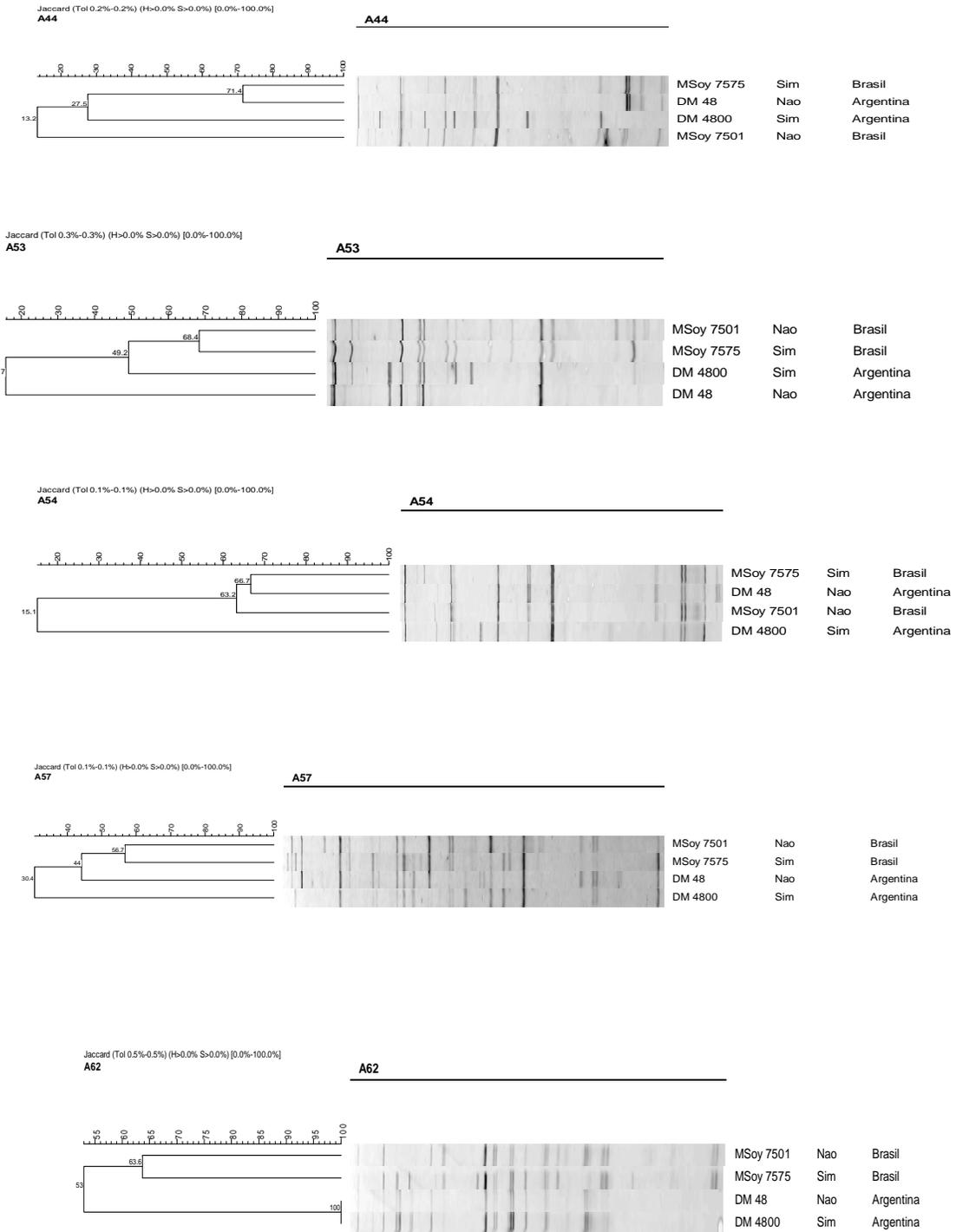
APÊNDICE E – Géis de poliacrilamida com reações da etapa de varredura dos primers seletivos AFLP. A= variedades argentinas, B= variedades brasileiras.



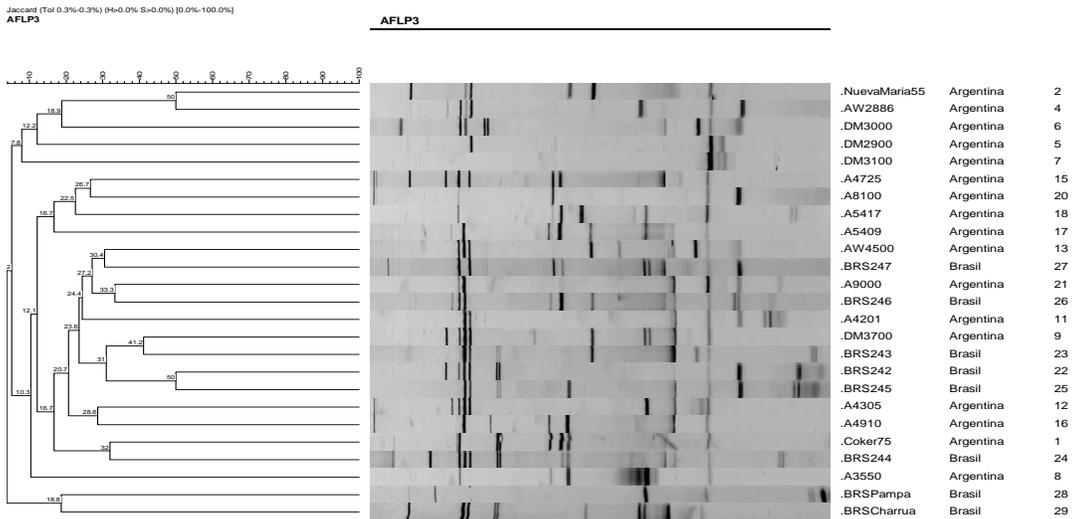
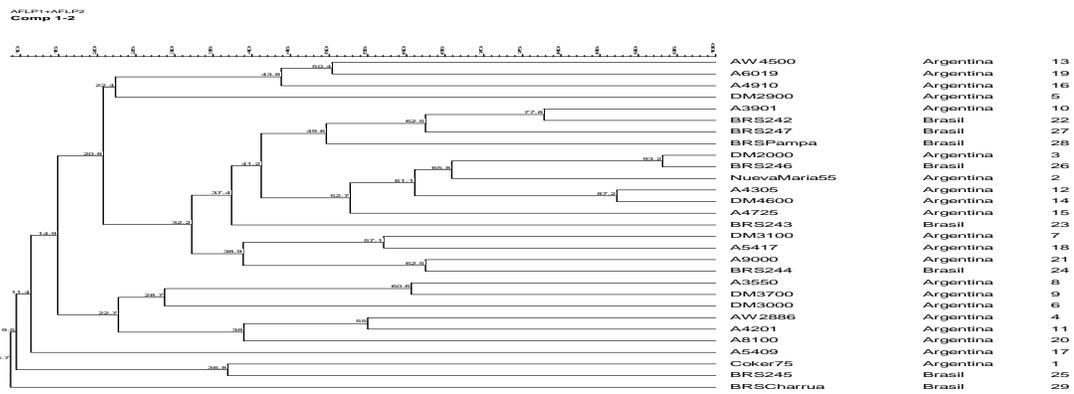
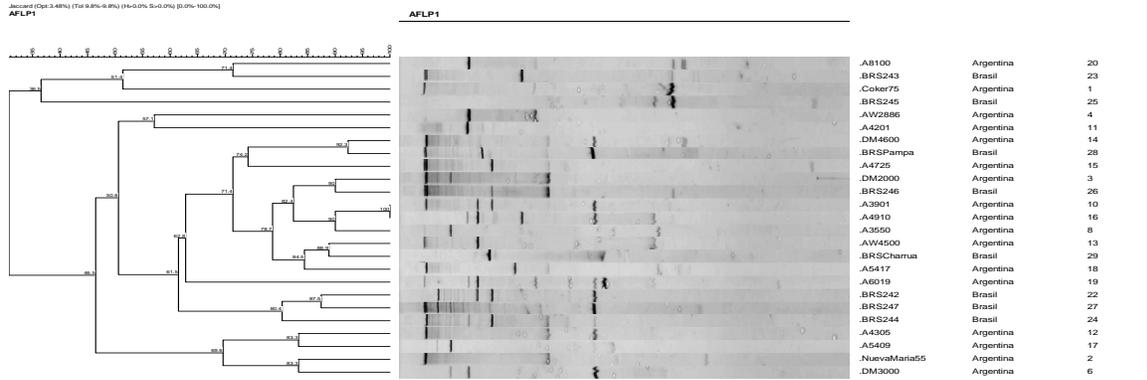
APÊNDICE F – Dendrogramas obtidos pela análise dos géis de AFLP da etapa de varredura por programa Bionumerics 4.0.



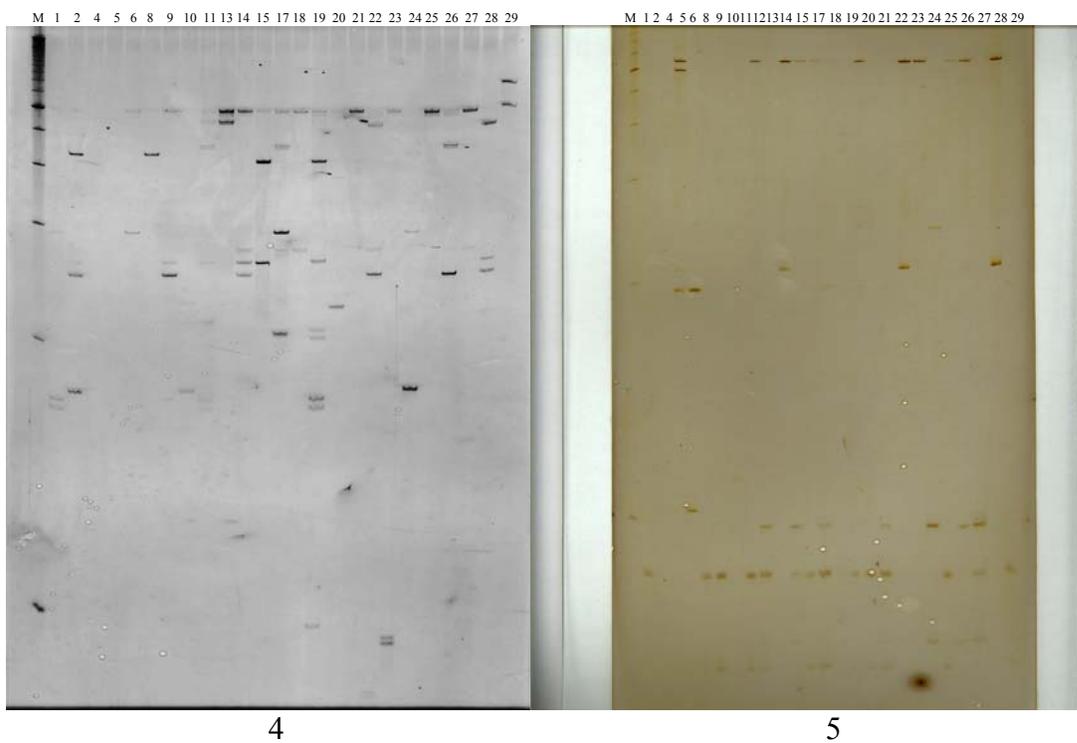
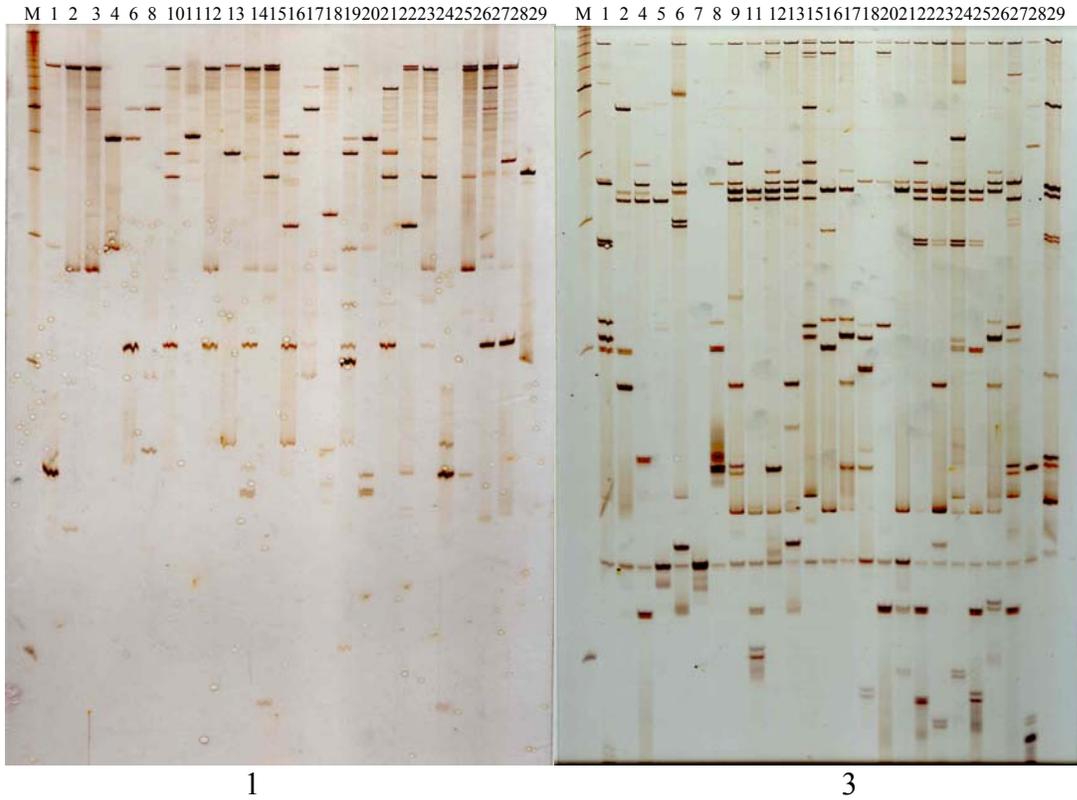
APÊNDICE G – Dendrogramas obtidos pela análise dos géis de AFLP da etapa de varredura por programa Bionumerics 4.0.



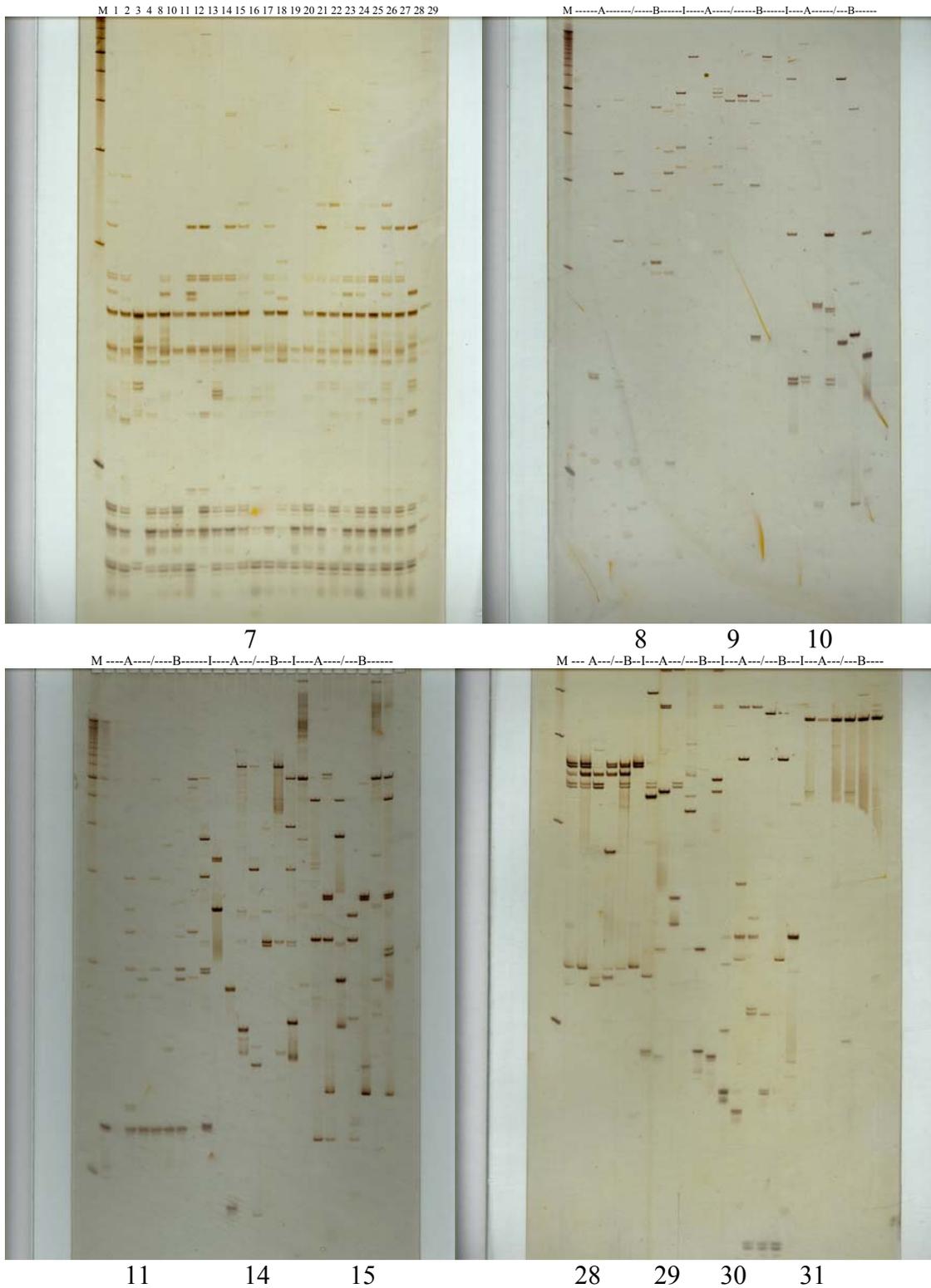
APÊNDICE H – Dendrograma de géis de AFLP obtido na etapa de análise do conjunto de variedades brasileiras e argentinas pelo programa Bionumerics 4.0.



APÊNDICE J – Géis de poliacrilamida com reações seletivas de AFLP da etapa de busca dos marcadores sobre conjunto de variedades brasileiras (22-29) e argentinas (1-21).



APÊNDICE K – Géis de poliacrilamida com reações seletivas de AFLP da etapa de busca dos marcadores sobre conjunto de variedades brasileiras (B; 22-29) e argentinas (A; 1-21).



APÊNDICE L – Gel de poliacrilamida 6% com reação seletiva de AFLP n° 2(E_{TTG}/M_{GGA}) com bandas recortadas para purificação, reamplificação e seqüenciamento. Variedades argentinas (1-19) e variedades brasileiras (22-29).



APÊNDICE N – Eletroferogramas e gel virtual obtidos no BioAnalyzer 2100 com indicação de bandas de interesse (setas).

Reações: 10 ($E_{TCT}M_{GTA}$); 11 ($E_{TCA}M_{GTA}$); 12 ($E_{TAA}M_{GTA}$)

- ▶ banda polimórfica para variedades brasileiras (B)
- - - -▶ banda polimórfica para variedades argentinas (A)

