



DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE EVENTOS TRANSGÊNICOS EM SEMENTES E PRODUTOS COMERCIAIS A BASE DE SOJA.

Rafael Müller^{1,2}, Vagner Lunge², Nilo Ikuta^{2,3}
¹Acadêmico do curso de Agronomia/ ULBRA
²LDM – Laboratório de Diagnóstico Molecular
³Orientador

RESUMO

A soja (*Glycine max* L.) é a principal cultura agrícola brasileira, passando dos 33 milhões de hectares na safra 2015/16. Os cultivares transgênicos de *Roundup Ready* (RR) e *Intacta RR2 PRO* (RR2) detêm 93% da área cultivada no Brasil. O evento GTS-40-3-2 (RR) agrega tolerância ao herbicida Glifosato, já o evento BTRR2Y (MON 87701 X MON 89788) combina característica de resistência a lepidópteros (MON 87701) e tolerância à glifosato (MON 89788). A construção dos eventos tolerantes ao glifosato é distinta, necessitando de primers específicos para a detecção.

O uso de cultivares transgênicos é expressamente proibido na agricultura orgânica, sendo recomendado aos produtores o isolamento da área com barreiras naturais para evitar uma possível contaminação (SANTOS, 2013). Por se tratar de um produto com valor agregado e possuir uma boa demanda, seu preço tem se mantido em uma média 50% maior que os produtos convencionais, o que gera bons resultados aos produtores, apesar do custo de produção ser cerca de 10% maior quando comparado ao cultivo tradicional. O controle da produção orgânica é mais difícil na soja e milho devido à disseminação do uso de cultivares OGMs. Os principais estados brasileiros produtores de soja orgânica são Paraná, Rio Grande do Sul, São Paulo e Goiás. (ANTONIALI et. al., 2012; MDA, 2015).

No Brasil, o Decreto nº 4680/03 determina que qualquer produto que contenha acima de 1% de OGM em sua composição final deve ser rotulado como transgênico. A necessidade de rotulação para produtos alimentícios, assim como a restrição para o uso cultivares transgênicos na cadeia produtiva de soja orgânica tornam necessárias técnicas que possibilitem o rastreamento e a quantificação rápida dos grãos que contenham os eventos transgênicos liberados para plantio no Brasil. A detecção e o rastreamento específico de OGMs podem ser realizados através de técnicas de biologia molecular (como PCR real time). A técnica é baseada na multiplicação *in vitro* do DNA, utilizando oligonucleotídeos para amplificar regiões genômicas específicas, neste caso, com a transgenia específica dos cultivares comercializados em território nacional, tornando possível quantificar o DNA, e estimar a quantidade do grão que existe em cada amostra testada.

O banco de amostras do projeto é constituído por 43 cultivares RR, 12 cultivares RR2, duas cultivares convencionais, 3 amostras orgânicas, 3 sem descrição de origem, 16 de produtos comerciais e 15 de farinhas controle. Nessa amostragem são considerados produtos como soja *in natura*, proteína de soja, farinhas, rações humana e animal, biscoitos e salgados. O número amostral dos produtos esta disposto na Tabela 1. As amostras foram adquiridas em locais diversos como supermercados, fruteiras e agropecuárias, de distintas marcas e lotes para cada amostra e a coleta em diferentes cidades do estado do Rio Grande do Sul já as farinhas controle foram confeccionadas de cultivares transgênicos RR e RR2 contendo 100%, 30%, 10%, 3%, 1%, 0,3%, 0,1% e 0%. As farinhas foram confeccionadas a fim de estabelecer os parâmetros de quantificação para as amostras comerciais com valores desconhecidos.

Tabela 1. Banco de amostras

Produtos à Base de Soja	Nº Amostral
Leite de Soja	1
Proteína de Soja	3
Ração Animal	5
Soja <i>in natura</i>	6
Cultivar RR	43
Cultivar RR2	12
Cultivar Convencional	2
Bolacha	2
Farinhas Controle	15

Tabela 2. Primers e Sondas TaqMan PCR real time utilizados neste estudo.

Gene	Primers	Sequência (orientação 5' - 3')	Tamanho Amplicon	Referência
Lectina	LE1- F	GCC CTC TAC TCC ACC CCC A	120 bp	Cobaiashi 2012
	LE1- R	GCC CAT CTG CAA GCC TTT TT		
	LE1 - P	FAM- AGC TTC GCC GCT TCC TTC AAC TTC AC-MGB		
CP4-epsps (RR)	RRS- F	CCT TTA GGA TTT CAG CAT CAG TGG	117 bp	Cobaiashi 2012
	RRS- R	GAC TTG TCG CCG GGA ATG		
	RRS -P	FAM-CGC AAC CGC CCG CAA ATC C- MGB		
CP4-epsps (RR2)	M-3F	CGT TAC TGC TGC CCC ACA AA	145 bp	Liu et al., 2009
	M-4R	TTG TCG TTT CCC GCC TTC AG		
	M-P	FAM- CCT CGA AAC TTG TTC CTG CTC CAC TCT TCC T - ZEN-IOWA BLACK FQ		

F- Primer Forward /R- Primer Reverse / FAM- marcador reporters TaqMan / ZEN-IOWA BLACK FQ fluorescência TaqMan. LE1 – gene endógeno soja / RRS – gene principal soja do evento GTS 40-3-2 / M – gene principal soja do evento MON89788.

O procedimento de análise consistiu primeiramente na extração do DNA pelo método de sílica das amostras de sementes de cultivares registradas e produtos comerciais. Após foi realizada a detecção de RR e RR2 e Lectina (gene endógeno, LE) pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real para experimentos qualitativos em primeiro momento. Os ensaios quantitativos foram realizados com farinhas confeccionadas a partir de sementes transgênicas de cultivares registrados dos dois eventos aqui abordados e também a partir de sementes orgânica onde foram diluídas as farinhas GM com concentrações de 100%, 30%, 10%, 3%, 1%, 0,3% e 0,1%. As amostras de farinha controle foram extraídas e amplificadas em triplicata.

Resultados

Foram realizados testes qualitativos para o conjunto de primers empregados no estudo, os quais demonstraram 100% de especificidade.

Os dados quantitativos foram processados estatisticamente, para relativizar as curvas de amplificação de Lectina representando o DNA total de soja presente na amostra com as curvas de amplificação entre o gene de LE e os genes exógenos de ambos os eventos abordados no projeto. Os resultados demonstram confiabilidade na detecção e na quantificação de amostras demonstrando R² próximos de 0,98. Permitindo estruturar a metodologia para a quantificação de DNA transgênico em amostras de teores desconhecidos, foco das próximas etapas deste estudo.

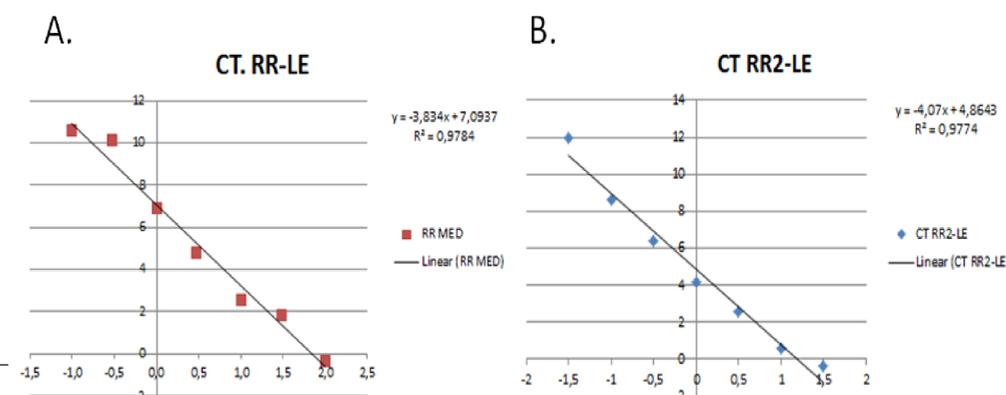


Imagem 1: Os gráficos representam a média de Ct. das triplicatas de RR e RR2 das diluições de material OGM em comparativo com as médias de Ct. de lectina, A. para o evento GTS 40-3-2 e B. para o evento MON89788.