

# Identificação de sementes de soja geneticamente modificadas utilizando a técnica de PCR convencional

---

HONNA, P.T.<sup>1</sup>; GIROTTO, L.<sup>2</sup>; SOLDERA, M.C.A.<sup>2</sup>; KANAMORI, N.<sup>3</sup>; MARCELINO-GUIMARAES, F. C.<sup>4</sup>; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.<sup>3</sup>; FARIAS, J.R.B.<sup>4</sup> | <sup>1</sup>Universidade Estadual do Norte do Paraná/Bolsista do CNPq – Brasil; <sup>2</sup>Japan International Cooperation Agency (JICA); <sup>3</sup>Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS); <sup>4</sup>Embrapa Soja  
patrihonna@hotmail.com

## Introdução

A reação em cadeia da polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) é uma técnica *in vitro* que permite a amplificação de seqüências específicas de ácido desoxirribonucléico (DNA). A PCR foi originalmente descrita por Saiki *et al.* (1985) e desde então tem sido utilizada em vários campos da ciência. É uma técnica com alta especificidade e aplicabilidade, com centenas de métodos descritos. A característica mais importante da PCR é a capacidade de amplificar exponencialmente cópias de DNA a partir de pouca quantidade de material.

O passo chave na análise genética de plantas, através de fragmentos de DNA, é o isolamento e a purificação de quantidades suficientes de DNA de boa qualidade, ou seja, o DNA obtido deve estar íntegro, livre de impurezas e ser passível de amplificação (Millach, 1998). Tecidos maduros de muitas espécies de plantas contêm compostos fenólicos envolvidos na defesa contra herbivoria, os quais podem interferir nos procedimentos de extração de DNA inibindo a amplificação através de PCR. Estes compostos, frequentemente, estão ausentes ou encontram-se em baixas concentrações, em folhas jovens e em sementes ou pólen (MITTON *et al.*, 1979).

A maioria dos métodos de isolamento de DNA emprega detergentes na elaboração do tampão de lise. Eles auxiliam desde a solubilização das

membranas celulares até a desnaturação de proteínas. Os mais utilizados são o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e o dodecil sulfato de sódio (SDS) com variações de acordo com a espécie estudada e o tecido a ser utilizado para a extração (ROMANO & BRASILEIRO, 1999).

O objetivo deste trabalho foi detectar a presença do transgene em amostras de sementes provenientes de plantas geneticamente modificadas via *Agrobacterium tumefaciens* através da técnica de PCR.

## Material e Métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Soja, durante os meses de fevereiro e março de 2012.

Sementes provenientes de plantas geneticamente modificadas, obtidas pelo método de transformação via *Agrobacterium tumefaciens* foram coletadas e armazenadas em câmara fria até o momento da extração. Para extração de DNA foi utilizado um protocolo adaptado para sementes que emprega o detergente SDS com algumas modificações.

Foram extraídas amostras de DNA de noventa e três sementes e a identificação das amostras positivas foi realizada através de PCR convencional com primers específicos para a construção utilizada.

Para a análise foram utilizadas placas novas de PCR, DNA extraído a ser analisado, mistura da reação (água destilada e autoclavada, Tampão para PCR 10X, MgCl<sub>2</sub>, dNTP, Primer Forward, Primer Reverse, Taq polimerase), termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler (*Applied Biosystems*, Foster, CA, USA), cuba e fonte para eletroforese, gel de agarose (1,2%; p/v) em tampão SB 1X e transiluminador (ultravioleta). Foram realizadas duas repetições de cada amostra de DNA, num total de cento e oitenta e seis reações. A mistura de reação foi preparada para as 186 amostras de DNA e para três controles, um controle positivo, um controle negativo e a última para o controle branco.

O volume final da reação de PCR foi de 25µl, sendo 22µl da mistura de reação e 3µl do DNA. Concluída a fase de amplificação, as amostras

foram aplicadas em gel de agarose 1,2% submetendo o DNA a uma tensão elétrica (eletroforese) de 120V por 1 hora. Esse gel foi corado com brometo de etídio para permitir sua visualização sobre luz ultravioleta e posterior análise do DNA amplificado.

**Tabela 1.** Volume de reagentes utilizados e sua concentração final na reação para identificação das amostras positivas.

Componentes	Volume ( $\mu\text{L}$ )	Concentração Final
Tampão de reação 10X	2,5	1X
MgCl <sub>2</sub> , 50mM	1,5	3 mM
dNTP, 2mM	2,0	0,16 mM
Primer Forward <sup>1</sup> 5 $\mu\text{M}$	1,0	0,2 $\mu\text{M}$
Primer Reverse <sup>2</sup> 5 $\mu\text{M}$	1,0	0,2 $\mu\text{M}$
Taq Polimerase, 5U/ $\mu\text{L}$	0,2	0,04 U/ $\mu\text{L}$
DNA (50-70ng/ $\mu\text{L}$ )	3,0	6 - 8,4 ng/ $\mu\text{L}$
Água destilada e autoclavada	13,8	

<sup>1</sup>Primer Forward: AAGAAGAAAATCTTCGCAACAT

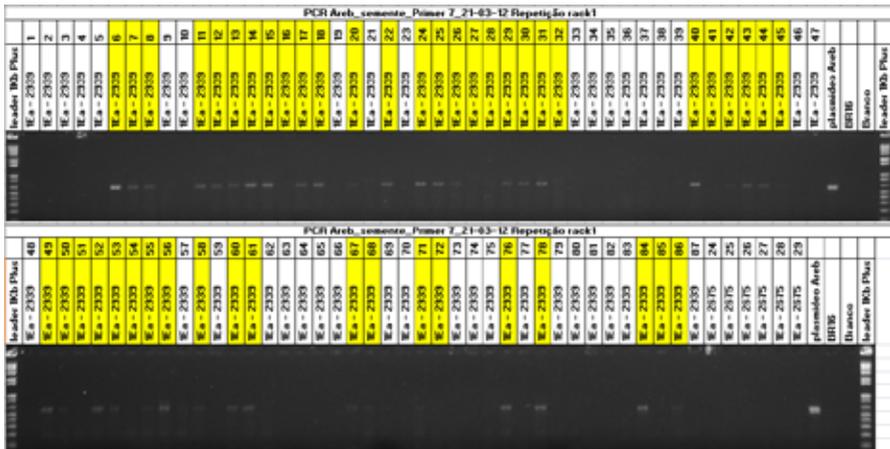
<sup>2</sup>Primer Reverse: AATGAACATGGATGAGTTGTTA

**Tabela 2.** Condições do programa utilizado no termociclador para amplificar as reações de PCR.

Etapa	Temperatura	Tempo
Pré-ciclo	95°C	5 minutos
	95°C	30 segundos
Ciclos (35X)	55°C	30 segundos
	72°C	30 segundos
Ciclo final	72°C	7 minutos
	4°C	$\infty$

## Resultados e Discussão

O protocolo executado permitiu a identificação de 48 sementes positivas, confirmadas nas duas repetições, que pode ser visualizado com a banda de 639 pb no gel de agarose.



**Figura 1.** Eletroforese em gel de agarose 1,2% identificando as sementes positivas. Controle positivo (plasmídeo ArahB), controle negativo (DNA não transformado BR16) e branco (água). Leader 1kb Plus.

## Conclusões

O protocolo de extração utilizado e a técnica de PCR foram eficientes na identificação de sementes geneticamente modificadas positivas.

## Referências

MILLACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: S.C.K. Millach, 1998. 141p.

MITTON, J.B.; LINHART, Y.B.; STURGEON, K.B.; HAMRICK, J.L. Allozyme polymorphism detected in mature needle tissue of Ponderosa pine. **Journal of Heredity**, v.70, n.2, p.86-89, 1979.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A.C.M. Extração de DNA de plantas. **Biotecnologia**, v.2, n.9, p.40-43, 1999.

SAIKI, R.K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K.R., HORN, G.T., ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, 230:1350-1354, 1985.