

# Caracterização Genética de Cultivares de Soja Transgênicas e Convencionais quanto aos Teores de Óleo e de Proteína no Grão

Ana Letycia Basso Garcia<sup>1</sup>; João Batista Duarte<sup>2</sup>; Keyla de Oliveira Ribeiro<sup>3</sup>;  
Luiz Antônio Cardoso Júnior<sup>4</sup>

PALAVRAS-CHAVE: Soja, DNA, PCR, óleo, proteína.

## 1 INTRODUÇÃO

A população mundial vem crescendo significativamente a cada ano e, junto com ela a demanda por alimentos. De acordo com o International Model for Policy Analysis of Commodities and Trade (IMPACT), citado em PANDYA-LORCH (2002), a demanda mundial por soja aumentará em 55%, atingindo 227 milhões de toneladas, no período de 1997 a 2020. E, conforme Cheftel et al. (1989), citado por Ribeiro (2006), o grão de soja apresenta, em sua composição, entre 30% e 45% de proteínas e entre 15% e 45% de lipídeos, o que confere a esse grão alto valor nutricional e, conseqüentemente, grande importância econômica.

Por conta disso, no início da década de 1990 foi desenvolvida a soja RR, resistente à molécula glifosato de herbicida comercial utilizado para o controle de plantas daninhas na cultura (BORÉM, 2002). Isto, a partir da introgressão do gene CP4EPSPS em linhagens comerciais. O gene sintetiza a enzima EPSPS, responsável pela catálise na condensação dos ácidos chimoquímico e fosfenolpiruvato, que são precursores de aminoácidos aromáticos. A presença da molécula de glifosato inativa esta enzima, inviabilizando a produção desses aminoácidos (BÖHM; ROMBALDI, 2010).

As práticas de retrocruzamentos são bastante comuns para a introgressão de genes de interesse. Como essa técnica se baseia no cruzamento do genitor recorrente com indivíduos de gerações seguintes (F<sub>1</sub>, RC<sub>1</sub>, RC<sub>2</sub> etc.),

---

<sup>1</sup> Bolsista de iniciação científica (PIBIC-UFG/CNPq). Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás (UFG). E-mail: letyciabasso@gmail.com

<sup>2</sup> Professor orientador. Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos / UFG.  
E-mail: jbduarte@agro.ufg.br

<sup>3</sup> Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Agronomia /UFG.

<sup>4</sup> Acadêmico do Curso de Agronomia, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos / UFG.

verifica-se que no primeiro cruzamento obtêm-se 50% da composição genética do gerador recorrente. No cruzamento do genitor recorrente com indivíduos de F<sub>1</sub>, 75% dos genes resultantes são provenientes daquele genitor. Os cruzamentos seguem por quantas vezes for possível e, conforme mencionado por Borém (1998), a partir da oitava geração, as características herdadas do genitor recorrente vão de 99,2188%, até 99,9999% na vigésima geração.

Nesse sentido, pode-se dizer que os produtos desse cruzamento nunca atingem genótipo idêntico ao genitor recorrente, o que sugere a possibilidade de alguma divergência genética entre materiais transgênicos e convencionais. Uma metodologia bastante comum para identificar possíveis diferenças no nível de DNA, entre grupos de indivíduos, é a partir de marcadores moleculares microssatélites (SSR), bastante utilizado também em soja. Estes marcadores vem sendo utilizados para avaliação de distância genética entre indivíduos e também para a identificação de cultivares, como mostram Priolli et al. (2002).

Sendo assim, este estudo teve como objetivo avaliar a identidade entre cultivares de soja convencionais e respectivas versões transgênicas. Com base nisso, pretendeu-se também avaliar os teores de óleo e de proteína no grão dessas cultivares, e estabelecer relação entre a identidade genética e as variações nesses atributos do grão; ou seja, determinar se possíveis variações físico-químicas seriam dependentes de variações genéticas ou se estariam estritamente relacionadas a fatores de natureza ambiental.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi conduzido na Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da UFG (EA/UFG), sob condições de telado. Foram avaliados nove tratamentos, cultivares de soja, sendo quatro convencionais e suas correspondentes versões transgênicas, além de uma cultivar testemunha (Tabela 1). Todas as cultivares são recomendadas para cultivo na região central do Brasil.

O experimento foi implantado com atraso (janeiro de 2011), em decorrência da indisponibilidade de casas de vegetação na EA-UFG, seguindo-se um período intermitente de chuvas (novembro/dezembro), o que dificultou o preparo do solo. Dessa maneira, 45 parcelas foram plantadas em vasos, no início do mês de janeiro/2011. Cada tratamento foi avaliado em cinco repetições (vasos), no

delineamento inteiramente casualizado. A disponibilidade de nutrientes para as plantas foi aquela disponível no solo, ou seja, não foi fornecida qualquer fonte de nutrientes às plantas. Também não foi realizado qualquer tipo de controle fitossanitário. A irrigação foi feita de forma regular, conforme exigida pelas plantas.

Tabela 1. Relação das cultivares de soja avaliadas (Goiânia 2010/2011).

Cultivar convencional	Cultivar transgênica
Monsoy 8661	Monsoy 8661 RR
Emgopa 316	Emgopa 316 RR
Conquista	Conquista RR
Emgopa 315	Emgopa 315 RR
-	Emgopa 313 RR (testemunha)

Para extração de DNA, foram colhidas aleatoriamente quatro folhas jovens de cada cultivar. Essas folhas foram levadas ao dessecador na presença de sílica, para que toda a umidade fosse retirada. Grande parte das sementes da cultivar 316 RR não germinou, inviabilizando a sua genotipagem. Também não foi incluída na genotipagem a cultivar testemunha (313 RR), haja vista a ausência de sua correspondente versão convencional.

A partir das folhas desidratadas, seguiu-se à extração do DNA, segundo o protocolo estabelecido por Aljanabi (1999). Para isso, foi preparada uma mistura (*mix*) com 300  $\mu$ L de tampão de extração, 150  $\mu$ L de PVP (10%), 150  $\mu$ L de sarcosil (5%) e CTAB (20%). As folhas foram maceradas em equipamento TissueLyser, com *beads* de tungstênio, na frequência máxima, por trinta segundos. Ao obter os *pellets*, estes foram ressuspendidos em solução de TE+RNAse e colocados no congelador.

A quantificação de DNA foi feita em gel de agarose (1%), com o mix contendo 4  $\mu$ L de água mili-q, 2  $\mu$ L de tampão de carregamento e 4  $\mu$ L do DNA extraído. Após essa quantificação, procedeu-se a diluição do DNA, em TE+RNAse, para alcançar concentração de 2,5 ng/ $\mu$ L. Realizou-se, então, a quantificação do material diluído, com 10  $\mu$ L da amostra e 2 $\mu$ L de tampão de carregamento, para que fosse possível processar as análises.

As seis amostras de DNA diluídas foram, então, submetidas à amplificação, com doze marcadores microssatélites (Tabela 2), via reação em cadeia de polimerase (PCR), em termociclador. A PCR foi realizada em volume total

de 12  $\mu$ L, contendo 4  $\mu$ L de DNA diluído, 1,2  $\mu$ L de tampão 1x, 0,36  $\mu$ L de  $MgCl_2$ , 0,96  $\mu$ L de dNTP, 0,2  $\mu$ L de taq, 4,03  $\mu$  de água mili-q e 1,25  $\mu$ L de primer F/R. Como condições para amplificação, foram programados no termociclador um ciclo de 94°C por 3 min; 35 ciclos de 94°C por 1 min; 58°C por 1 min; 72°C por 1,5 min; e 72° por 10 min.

Tabela 2. Relação de locos de SSR utilizados para a caracterização dos genótipos de soja e, suas respectivas sequênci*a forward* (F) e *reverse* (R).

Primer	Sequência de bases nitrogenadas
SATT 009	F- CCAACTTGAAATTAAGAGAAA
	R- CTTACTAGCGTATTAACCCTT
SATT 063	F- AAATGATTAACAATGTTTATGAT
	R- ACTTGCATCAGTTAATAACAA
SATT 077	F- GATCTAAAGTCTGATATTTTAACTA
	R- AAAAGGAGAAGGAATGC
SATT 148	F - AATCCGGGACGCAAATTATTATTAA
	R -TGCAAATTCCTAATTAACACCCTTTATAC
SATT 152	F - GCGCTATTCCTATCACAACACA
	R - TAGGGTTGTCAGTGTGTTTCTTA
SATT 154	F - AGATACTAACAAGAGGCATAAAACT
	R - AAAGAAACGGAATAACTACATT
SATT 160	F - TCCCACACAGTTTTCATATAATATA
	R - CATCAAAAAGTTTATAACGTGTAGAT
SATT 161	F - GGGTATATCAACATATCTTCACCTTTTT
	R - GGGCTGCTTGTTAATGTTTGTAGA
SATT 168	F - CGCTTGCCCAAAAATTAATAGTA
	R - CCATTCTCCAACCTCAATCTTATAT
SATT 170	F - GGGAAATCTAAATAAAATGATGGATAT
	R - GGGGTAGTTAAAATTCATCCTTAAAA
SATT 173	F - TGCGCCATTTATTCTTCA
	R - AAGCGAAATCACCTCCTCT
SATT 175	F - GACCTCGCTCTCTGTTTCTCAT
	R - GGTGACCACCCTATTCTTAT

Os segmentos amplificados foram separados em gel de agarose 4,5%, em cuba horizontal, com 5  $\mu$ L do produto da PCR, 5  $\mu$ L de água mili-q e 2  $\mu$ L de tampão de carregamento.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores de óleo e proteína neste estudo não foram determinados em razão da baixa produtividade das plantas, dadas as condições de implantação do experimento (semeadura tardia, em janeiro de 2011) e possivelmente, também, pela não adubação dos vasos. Esses dados, entretanto, poderiam ser aproveitados do experimento conduzido no ano anterior, por Garcia et al. (2010), que incluíam, entre outras, as cultivares avaliadas no presente estudo. Naquela pesquisa, os pares de cultivares Emgopa 316/316RR e Emgopa 315/315RR mostraram resultados relevantes no contexto deste trabalho (Tabela 3).

Tabela 3. Médias dos teores de óleo e de proteína no grão (%) de cultivares de soja convencionais (CV) e transgênicas (RR).

Cultivar original	Tipo	Óleo (%)	Proteína (%)
Emgopa 315 (GO_05_5704)	CV	17,57	39,31
Emgopa 315	RR	15,30	38,81
Emgopa 316(GO_05_5539)	CV	16,70	38,01
Emgopa 316	RR	19,61	37,38

Neste sentido, foram comparados, a partir da análise de variância, os tipos convencional e transgênico, dentro de cada cultivar. Quanto ao teor de óleo, as cultivares EMGOPA 315 e EMGOPA 316 mostraram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre suas versões convencional e transgênica (Tabela 4). Na primeira, a versão convencional apresentou 2,3% a mais do que a transgênica; já na outra, a versão transgênica teve 2,9% a mais do que a convencional.

Tabela 4. Análise de variância para teores de óleo e de proteína no grão, em cultivares de soja dos tipos convencional e transgênica.

Fontes de variação	GL	Óleo (%)		Proteína (%)	
		QM	P > F	QM	P > F
Tipo / cultivar. EMGOPA 315	1	7,6870*	0,0165	0,3706ns	0,3647
Tipo / cultivar. EMGOPA 316	1	10,1317**	0,0068	0,5917ns	0,2544

\*\* ou \* valores significativos a 1% de probabilidade ou a 5% de probabilidade, respectivamente; ns: valores não significativos a 5% de probabilidade.

As análises genéticas neste experimento não foram bem sucedidas até o presente momento. O diagnóstico inicial é o de que a amplificação do DNA, em PCR, não aconteceu de maneira adequada. Isso porque as fases anteriores, relacionadas à extração e quantificação de DNA, produziram os resultados esperados. A quantificação de DNA revelou que o resultado da extração foi de boa qualidade (Figura 1). A presença de DNA, nessas condições, motivou a continuidade das análises, via PCR. A diluição do DNA, a princípio, também foi realizada nas proporções adequadas dos reagentes, embora isto não pôde ser evidenciado visualmente, por falta de ajustes no *software* de digitalização da imagem de quantificação. É possível, porém, que a solução tampão de carregamento tenha sido forte o bastante para inibir a visualização de DNA.

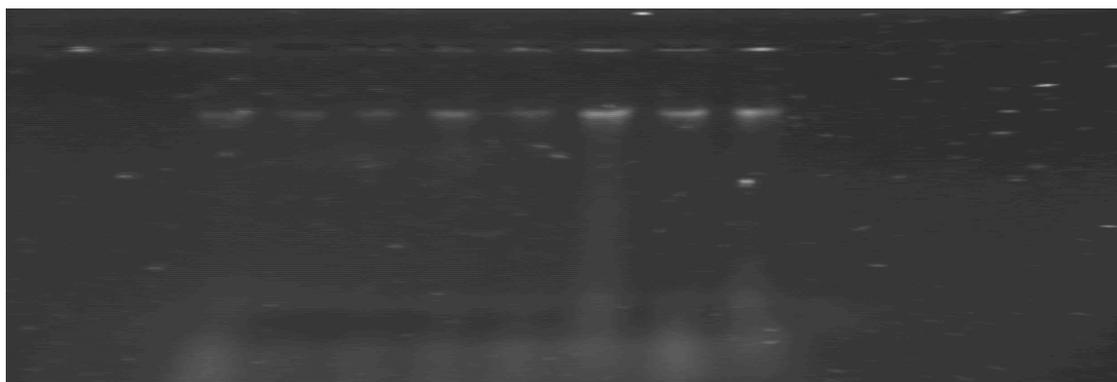


Figura 1. Quantificação de DNA realizada após a diluição TE + RNase para alcançar concentração de 2,5ng/ $\mu$ L.

Seguindo-se para a amplificação do DNA em PCR, surgiram dificuldades que ainda não foram superadas, merecendo testes adicionais para o ajustamento das condições de temperatura e de concentração dos reagentes no *mix*. Isso demandará tempo adicional que, diante da antecipação do prazo para entrega deste relatório, impôs a apresentação apenas destes resultados parciais, os quais evidentemente não respondem por completo aos objetivos programados. Apesar disso, as análises laboratoriais serão continuadas até o final do período da bolsa, a fim de se concluir a avaliação sobre a variabilidade genética entre as cultivares em estudo, bem como a influência desta variabilidade nos respectivos fenótipos, em termos dos conteúdos de óleo e proteína no grão.

## 4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos até o presente momento não permitem, ainda, conclusões acerca dos objetivos específicos delineados para a presente pesquisa. Parte disso, em virtude do não ajustamento metodológico das análises laboratoriais, que não foram bem sucedidas. Entretanto, em virtude do trabalho apresentado por Garcia et al. (2010), é pertinente concluir que existe relação entre variabilidade genotípica e, principalmente, conteúdo de óleo no grão. Assim, é fundamental dar continuidade aos testes laboratoriais, para se obter uma condição adequada para a amplificação do DNA das amostras. Só assim será possível, efetivamente, comparar os genótipos e verificar as possíveis variações entre cultivares convencionais e suas versões transgênicas, com avaliação de seus efeitos sobre os teores de óleo e proteína no grão de soja. Apesar dessas dificuldades, deve-se ressaltar a importância dessa experiência para a formação profissional e científica da aluna bolsista, a qual, efetivamente, teve a sua iniciação e treinamento em técnicas avançadas de extração, quantificação e amplificação de DNA em plantas.

## 5 REFERÊNCIAS

ALJANABI, S. M.; FORGET, L.; DOOKUN, O. An improved and rapid protocol for the isolation of polysaccharide - and polyphenol - free sugarcane DNA. **Plant Molecular Biology Report**, Netherlands, v. 17, n. 1, p. 1-8, mar. 1999.

BÖHM, G. M. B.; ROMBALDI, C. V. Transformação genética e aplicação de glifosato na microbiota do solo, fixação biológica do nitrogênio, qualidade e segurança de grãos de soja geneticamente modificada. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 1, p. 213-221, jan. 2010.

BORÉM, A.; GIÚDICE, M. P. del; COSTA, N. M. B. (Ed.). **Alimentos geneticamente modificados**. Viçosa, MG: Folha de Viçosa, 2002. 305 p.

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. 2 ed. Viçosa: Ed. UFV, 1998.

GARCIA, A. L. B.; DUARTE, J. B.; RIBEIRO, K. O.; CARDOSO JÚNIOR, L. A.; FUNGARO, P. Teor e Qualidade de Óleo e Proteína em Germoplasma de Soja Cultivado na Região Central do Brasil. In: CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO DA UFG - CONPEEX, 2010, Goiânia. **Anais eletrônicos...** [CD-ROM], Goiânia: UFG, 2010.

PANDYA-LORCH, R. Global food projections to 2020: The role of soybeans. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA E MERCOSOJA 2002, 2. **Anais eletrônicos...** Foz do Iguaçu: 2002. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/memoratecnica/doc/doc180.pdf>>. Acesso em: 2 jun. 2011.

PRIOLLI, R. H. G.; MENDES-JUNIOR, C. T.; ARANTES, C. E.; CONTEL, E. P. B. Characterization of Brazilian soybean cultivars using microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n. 2, fev. 2002.

RIBEIRO, K. O. **Heterose entre linhagens de soja quanto aos teores de proteína e de óleo no grão. Goiânia.** 2006. (Mestrado em Agronomia) - Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2006.