

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**DETECÇÃO DO GENE DE PEROXIDASE EM SEMENTES DE SOJA
PELA REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA (PCR)**

BÁRBARA PANOFF

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Agricultura).

BOTUCATU - SP

Fevereiro - 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**DETECÇÃO DO GENE DE PEROXIDASE EM SEMENTES DE SOJA
PELA REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA (PCR)**

BÁRBARA PANOFF

Orientador: Edvaldo Aparecido Amaral da Silva

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Agricultura).

BOTUCATU - SP

Fevereiro - 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

P194d Panoff, Bárbara, 1988-
Detecção do gene de peroxidase em sementes de soja pela reação da polimerase em cadeia(PCR) / Bárbara Panoff. - Botucatu : [s.n.], 2013
xiv, 59 f. : il., color., grafs., tabs.

Dissertação(Mestrado)- Universidade Estadual Paulista Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2013
Orientador: Edvaldo Aparecido Amaral da Silva
Inclui bibliografia

1. Soja - Sementes. 2. Peroxidase. 3. Reação em cadeia de polimerase. I. Silva, Edvaldo Aparecido Amaral da. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: DETECÇÃO DO GENE DE PEROXIDASE EM SEMENTES DE SOJA PELA
REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA (PCR)

ALUNA: BÁRBARA PANOFF

ORIENTADOR: PROF. DR. EDVALDO APARECIDO AMARAL DA SILVA

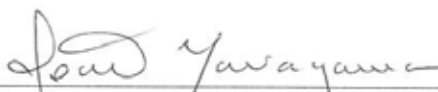
APROVADO PELA COMISSÃO EXAMINADORA:



PROF. DR. EDVALDO APARECIDO AMARAL DA SILVA



Prof. Dr. CLAUDIO CAVARIANI



Prof. Dr. JOAO NAKAGAWA

Data da Realização: 22 de fevereiro de 2013.

“Eu tentei 99 vezes e falhei, mas na centésima tentativa eu consegui, nunca desista de seus objetivos mesmo que esses pareçam impossíveis, a próxima tentativa pode ser a vitoriosa.”

Albert Einstein

*Aos meus pais Ciro e Terezinha por todo amor,
ensinamentos e esforços para que chegasse até aqui.
Sem eles nada seria.*

DEDICO

Ao meu marido Anderson e meu amigos.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus por me abençoar e me guiar em todos os momentos, principalmente nos que necessitei de sabedoria e paciência.

Aos meus pais, Terezinha e Ciro, por todo o carinho e esforços feitos para que pudesse realizar mais este sonho mesmo sendo tão dolorosa à distância. Amo mais que tudo!

Ao meu marido Anderson pela paciência e compreensão em todos os momentos de correria e estresse. Por toda a ajuda na execução do trabalho e carinho dedicado.

À minha tia Magaly, que desde pequena foi como uma avó para mim e dedicou seu tempo e empenho em minha educação. Sem sua ajuda em todos os momentos hoje não estaria aqui. Obrigada pelo seu carinho, atenção e amor!

À Universidade Estadual Paulista – UNESP (Faculdade de Ciências Agrônomicas), pela oportunidade de crescimento profissional com a realização do mestrado tão sonhado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pela concessão da bolsa para que pudesse realizar meus estudos.

Ao Prof. Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva, agradeço toda a dedicação e esforço para montar toda a estrutura laboratorial para a realização dos experimentos, orientação, apoio e paciência para que tudo desse certo.

Ao Prof. Dr. Cláudio Cavariani, pelas colaborações e ideias valiosas para que o trabalho fosse realizado.

Ao Prof. Dr. João Nakagawa, pela atenção e ajuda em todos os momentos.

Ao Dr. José de Barros França Neto, da Embrapa Soja pela concessão das sementes para o

estudo e acima de tudo por ter sido um verdadeiro conselheiro e amigo nesta caminhada.

Ao Prof. Dr. Claudemir Zucareli, que mesmo longe foi fundamental para que estivesse realizando este trabalho hoje.

Ao Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia por ceder o laboratório de Genética do Instituto de Biociências da UNESP para que pudesse concluir meus experimentos.

A todos os professores do Departamento de Agricultura e Melhoramento Vegetal da Faculdade de Ciências Agrônômicas – UNESP/ Botucatu pelos ensinamentos.

Aos funcionários do Departamento de Agricultura, em especial Valéria, Dorival, Amanda e Vera, por toda ajuda em todos os momentos que precisei.

A todos os amigos do Laboratório de Análise de Sementes pelo apoio e conversas divertidas em todos os momentos.

Às minhas amigas do laboratório de genética do Instituto de Biociências, em especial Juliana Bravo, Marcela Rodrigues e Alessandra Tenório pela paciência em esclarecer todas as minhas dúvidas neste assunto tão novo para mim e por toda a ajuda e tempo dedicados.

Aos amigos Patrícia Silveira, Euménes Farias e Viviane Sene por todo apoio, companheirismo, amizade em todos os momentos desde que nos conhecemos. Agradeço pelo carinho, risadas, tempo dedicado à nossa amizade tão especial. Levarei todos para sempre.

Ao Prof. Dr. Marcelo de Almeida pela colaboração e participação da minha banca de qualificação.

A todos que estiveram presentes na minha vida e puderam contribuir de alguma forma em minha formação.

Meus Sinceros Agradecimentos!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	XI
LISTA DE FIGURAS.....	XII
RESUMO.....	15
ABSTRACT	16
1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 SOJA E PUREZA VARIETAL	19
2.2 ENZIMA PEROXIDASE E IDENTIFICAÇÃO VARIETAL	21
2.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	25
3. OBJETIVOS	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 TESTE COLORIMÉTRICO	30
4.2 TESTE DOS <i>PRIMERS</i>	31
4.3 EXTRAÇÃO DE DNA DA SEMENTE	31
4.3.1 EXTRAÇÃO PELO MÉTODO MC DONALD ET AL. (1994)	32
4.3.2 EXTRAÇÃO PELO KIT.....	33
4.4 REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA (PCR)	34
4.5 ELETROFORESE	35
4.6 CONTAMINAÇÃO VARIETAL	35
4.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 TESTE COLORIMÉTRICO	37

5.2	TESTE DOS <i>PRIMERS</i>	43
5.3	TESTE DAS METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO DE DNA	44
5.4	REAÇÃO DE PCR CONVENCIONAL	46
5.5	REAÇÃO DE PCR APÓS A CONTAMINAÇÃO DOS LOTES	50
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
7.	CONCLUSÕES.....	55
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Cultivares de soja com suas respectivas reações à peroxidase.....	29
Tabela 2. Protocolo para montagem do tampão de extração de DNA por McDonald et al. (1994).....	33
Tabela 3. Protocolo da reação de PCR utilizada para detectar peroxidase em sementes de soja.....	34
Tabela 4. Combinação de <i>primers</i> utilizados e suas respectivas sequências.....	35
Tabela 5. Proporção de sementes com reação positivas em <i>bulks</i> de sementes com reação negativas para e suas respectivas porcentagens de contaminação.....	36
Tabela 6. Quantificação das amostras de DNA extraídas pelo método McDonald et al. (1994) e pelo kit em ng/ μ L.....	47
Tabela 7. Quantificação das amostras contaminadas em ng/ μ L.....	50

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Reação positiva e negativa da peroxidase pelo método das sementes inteiras de soja (a) e resultados positivos e negativos pelo método das sementes inteiras, após a reação (b). Santa Maria/RS, 2008 (Fotos: M.D. Vidal, 2008).....24
- Figura 2.** (a) Sementes da cultivar BRS 8160 e (b) 100% das sementes com reação negativa à peroxidase como mostra a seta. Botucatu/SP, 2013 (Fotos: B. Panoff, 2013).....37
- Figura 3.** (a) Sementes da cultivar Nutrisoy e (b) 100% das sementes com reação negativa à peroxidase como marca a seta. Botucatu/SP, 2013 (Fotos: B. Panoff, 2013).....38
- Figura 4.** (a) Sementes da cultivar BRS 326 e (b) os 2% de sementes positivas marcadas pelo círculo em meio as com reação negativa à peroxidase destacada pela seta. Botucatu/SP, 2013 (Fotos: B. Panoff, 2013).....38
- Figura 5.** (a) Sementes da cultivar BRS Valiosa e (b) 1% de sementes positivas em meio as com reação negativa à peroxidase destacada pela seta. Botucatu/SP, 2013 (Fotos: B. Panoff, 2013).....38
- Figura 6.** (a) Sementes da cultivar BRS 320 e (b) 100% das sementes com reação positiva à peroxidase como mostra a seta. Botucatu/SP, 2013 (Fotos: B. Panoff, 2013).....39
- Figura 7.** (a) Sementes da cultivar BRSMG 760SRR e (b) 100% das sementes com reação positiva à peroxidase. Botucatu/SP, 2013 (Fotos: B. Panoff, 2013).....39
- Figura 8.** (a) Sementes da Cultivar BRS 295RR e (b) 100% das sementes com reação positiva à peroxidase. Botucatu/SP, 2013 (Fotos: B. Panoff, 2013).....40

- Figura 9.** (a) Sementes da cultivar BRS 284 e (b) 100% das sementes com reação positiva à peroxidase. Botucatu/SP, 2013 (Fotos: B. Panoff, 2013).....40
- Figura 10.** (a) Sementes da cultivar BRS 7860RR e (b) 2% de contaminação negativa nas sementes com reação positiva à peroxidase. Botucatu/SP, 2013 (Fotos: B. Panoff, 2013).....40
- Figura 11.** (a) Sementes da cultivar BRS 232 e (b) 2% de contaminação negativa nas sementes com reação positiva à peroxidase. Botucatu/SP, 2013 (Fotos: B. Panoff, 2013).....41
- Figura 12.** (a) Sementes da Cultivar BRSGO 8060 e (b) 100% das sementes com reação negativa à peroxidase como mostra a seta. Botucatu/SP, 2013 (Fotos: B. Panoff, 2013).....41
- Figura 13.** (a) Sementes da Cultivar BRS 270RR e (b) sua dupla reação à peroxidase. Botucatu/SP, 2013 (Fotos: B. Panoff, 2013).....42
- Figura 14.** (a) Sementes da Cultivar BRS 239 e (b) sua dupla reação à peroxidase. Botucatu/SP, 2013 (Fotos: B. Panoff, 2013).....42
- Figura 15.** (a) Sementes da Cultivar FTS Campo Mourão RR e (b) sua dupla reação à peroxidase. Botucatu/SP, 2013 (Fotos: B. Panoff, 2013).....42
- Figura 16.** Gel de eletroforese com as duas metodologias de extração de DNA da semente inteira e teste de *primers* em duas cultivares, uma com reação positiva e outra com reação negativa à peroxidase. Botucatu/SP, 2013 (Fotos: B. Panoff, 2013).....45
- Figura 17.** Gel de integridade das 14 amostras extraídas pelo método de McDonald et al. (1994). Botucatu/SP, 2013 (Fotos: B. Panoff, 2013).....47

Figura 18. Gel de integridade das 14 amostras extraídas pelo método do kit. Botucatu/SP, 2013 (Fotos: B. Panoff, 2013).....48

Figura 19. Gel de eletroforese com o produto da PCR proveniente do DNA extraído pela metodologia de McDonald et al. (1994). Botucatu/SP, 2013 (Fotos: B. Panoff, 2013).....48

Figura 20. Gel de eletroforese com o produto da PCR proveniente do DNA extraído pela metodologia do kit comercial. Destacado em destaque está o padrão de bandas com o tamanho do fragmento de interesse Botucatu/SP, 2013 (Fotos: B. Panoff, 2013).....49

Figura 21. Gel de eletroforese com o produto da PCR proveniente do DNA extraído pela metodologia do kit. Botucatu/SP, 2013 (Fotos: B. Panoff, 2013).....50

DETECÇÃO DO GENE DE PEROXIDASE EM SEMENTES DE SOJA PELA REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA (PCR). Botucatu, 2013. **59p.** Dissertação (Mestrado em Agronomia/Agricultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Autor: BARBARA PANOFF

Orientador: EDVALDO APARECIDO AMARAL DA SILVA

RESUMO

Devido ao aumento do número de cultivares de soja e com pouca diferença genética entre elas, fica cada vez mais difícil a verificação de contaminação varietal pelo método de peroxidase. As cultivares de soja são separadas em dois grupos com base na atividade, alta ou baixa, da peroxidase no tegumento. A alta atividade é resultado da presença de, pelo menos, um alelo dominante (EpEp ou Epep), enquanto que baixa atividade resulta da presença do par recessivo (epep). O auxílio de técnicas moleculares na identificação de contaminação varietal de soja utilizando a peroxidase é de grande importância, pois a tecnologia baseada na análise do DNA não sofre a ação de fatores externos (ambientais). Neste contexto, o objetivo geral do trabalho foi o de viabilizar a técnica de PCR convencional para verificar a presença de contaminação varietal em auxílio ao método colorimétrico da peroxidase. O estudo foi conduzido no Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrônômicas/UNESP, Campus de Botucatu-SP. Foi realizado o teste colorimétrico tradicional e comparado com os resultados encontrados no PCR. Foram usadas 14 cultivares de importância, dessas, foram pré-selecionadas seis cultivares com reação positiva à peroxidase: BRS 320, BRS 284, BRS 232, BRS 7860RR, BRSMG 760SRR, BRS295RR, quatro cultivares negativas à peroxidase: BRS 326, BRS 8160RR, Nutrisoy, BRS Valiosa RR e quatro cultivares com reação positiva e negativa: BRSGO 8060, BRS 270RR, FTS Campo Mourão e BRS 239. Em paralelo ao teste colorimétrico, o DNA foi extraído das sementes inteiras, *primers* foram desenhados, seguido da reação de PCR e eletroforese em gel de agarose. A utilização de kit comercial de extração de DNA, juntamente com a utilização da técnica de PCR foi eficiente na detecção de amostras de sementes com reação negativa e positiva. No entanto, quando os lotes de sementes com reação positiva foi propositalmente contaminado lotes de sementes com reação negativa na proporção de 1, 2, 3, 4 e 5%, a técnica de PCR não foi suficientemente sensível para detectar a contaminação.

Palavras-chave: *Glycine max*, contaminação varietal, identificação, DNA, método colorimétrico.

DETECTION OF PEROXIDASE GENE IN SOYBEAN SEEDS BY POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR). Botucatu, 2013. **59p.** Dissertação (Mestrado em Agronomia/Agricultura) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: BARBARA PANOFF

Adviser: EDVALDO APARECIDO AMARAL DA SILVA

ABSTRACT

The increasing number of soybean cultivars and the small genetic difference between makes difficult to verify varietal contamination using the conventional peroxidase method. The soybean cultivars are separated into groups with high or low activity, based on the peroxidase activity in the tegument,. The high activity is a result of the presence of at least one dominant allele (or EpEp Epep), while low activity results from the presence of the pair recessive (epep). The use of molecular techniques to identify soybean cultivars is a powerful tool since it is not influenced by external factors (environmental) or genetic. In this context, the general objective of this work was to enable the use of molecular biology technique to facilitate identification of soybean cultivars. The study was performed at the Department of Plant Production, Faculty of Agricultural Sciences / UNESP, Botucatu-SP. Traditional biochemical colorimetric test was performed and compared with the results of obtained by conventional PCR. Fourteen commercial soybean cultivars were used, where we selected six cultivars with positive reaction to peroxidase: BRS 320, BRS 284, BRS 232, BRS 7860RR, BRSMG 760SRR, BRS295RR, four cultivars with negative reaction to peroxidase: BRS 326, BRS 8160RR, NutriSoy, BRS Valiosa RR and four cultivars with positive and negative reaction: BRSGO 8060, BRS 270RR, FTS Campo Mourão and BRS 239. In parallel with the traditional colorimetric assay for peroxidase, DNA was extracted from whole seeds and *primers* were designed, followed by conventional PCR reactions and visualization in agarose gel. The use of commercial kit for DNA extraction along with the use of the PCR technique was efficient in detecting negative and positive samples. However, when seed lots with positive reaction was purposely contaminated seed lots with negative reaction at the proportion of 1, 2, 3, 4 and 5%, the PCR technique was not sensible enough to detect the contamination.

Keywords: *Glycine max*, varietal contamination, identification, DNA, colorimetric method.

1. INTRODUÇÃO

A cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merr.) pode ser considerada a de maior importância para o agronegócio brasileiro. E por essa razão, são lançadas anualmente novas cultivares para melhor atender as exigências do consumidor.

Entre as exigências, a principal é a qualidade das sementes produzidas, pois nelas se encontram todos os genes que caracterizam a espécie e a cultivar. Para se obter sementes de qualidade, a produção deve ser realizada com controle rigoroso sobre todos os fatores que possam reduzir a qualidade. Este controle se estende até a comercialização, de forma a garantir a qualidade genética, fisiológica, sanitária e a pureza física.

Com o aumento do número de cultivares e com a pouca diferença genética entre elas, fica cada vez mais difícil a verificação de contaminação varietal. Há então a necessidade de se recorrer a técnicas mais modernas e eficientes nessa diferenciação. Cada cultivar se diferem através de características específicas que podem ser fisiológicas, morfológicas ou bioquímicas. São testes em laboratório, entre outras técnicas mais modernas, que podem detectar essas diferenças entre as cultivares.

O teste da peroxidase é um método de identificação varietal em soja. Essa enzima ocorre na maioria dos tecidos vivos dos vegetais, como em sementes de soja, e sua atividade pode variar de acordo com a cultivar e, desta maneira, o teste permite detectar misturas entre sementes de outras cultivares. Apesar do teste bioquímico de reação à peroxidase ser bastante simples e de baixo custo, sua interpretação envolve certa subjetividade. Além disso, sementes com umidade acima do ponto de colheita (12%) e presença de cotilédono junto ao tegumento, levam a interpretação errônea do teste. Nestes casos, e em casos em que há dupla reação à peroxidase na mesma cultivar de soja, é pertinente o uso de marcador, pois é o genótipo das cultivares que sofre avaliação, o que aumenta a confiabilidade

dos resultados.

Neste contexto o objetivo do trabalho foi testar duas metodologias de extração de DNA de sementes de soja, testar *primers* e confrontar os resultados obtidos com o teste rápido colorimétrico. Além disso, trabalho teve ainda o objetivo de testar o poder de detecção dos *primers* em lotes de sementes com contaminação varietal de 1%; 2%; 3%, 4% e 5%.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SOJA E PUREZA VARIETAL

A agricultura brasileira tem experimentado avanços tecnológicos significativos nas últimas décadas e, em consequência, alcançado seguidos recordes de produção de grãos. A soja é uma das culturas na qual são empregadas modernas tecnologias de produção que, por conta disso, atinge elevados índices de produtividade no país. A profissionalização da produção de soja tem exigido constantes melhorias na tecnologia de produção (ZORATO; SCHUSTER, 2011).

A safra de soja do Brasil no ano agrícola 2012/13 foi estimada em 82,68 milhões de toneladas, produção recorde de acordo com levantamento da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab). Em dezembro 2012 havia sido estimada produção de 82,63 milhões de toneladas. A área total com soja, cujo plantio foi encerrado em dezembro, atingiu 27,35 milhões de hectares, crescimento de 9,2 por cento sobre o ciclo anterior e configura a maior área já cultivada com a oleaginosa no país (CONAB, 2013).

A soja é a principal *commodity* agrícola do Brasil e seu cultivo estimado em aproximadamente 24 milhões de hectares por ano demanda cerca de 30 milhões de sacas de sementes. Em virtude da extensão da área e das grandes diferenças entre as regiões produtoras o número de cultivares recomendado para a semeadura é da ordem de várias dezenas. Assim, os programas de melhoramento vegetal disponibilizam anualmente, um número crescente de cultivares que, paralelamente, tem dificultado a distinção entre elas (ZORATO; SCHUSTER, 2011).

Muitas cultivares recomendadas para as diferentes regiões do Brasil tem uma base genética bastante estreita e são, portanto, aparentadas e fenotipicamente

semelhantes (ROSSINI et al., 1995). Por definição, cada cultivar difere de outras em uma, ou mais, características específicas que podem ser de natureza fisiológica, morfológica ou bioquímica e são passíveis, através de testes ou técnicas desenvolvidas e aperfeiçoadas em laboratório, de detecção e caracterização (MCKEE, 1973).

Entre os aspectos observados durante a certificação de sementes de soja no que concerne à análises laboratoriais, talvez o de mais difícil determinação seja a verificação de outras cultivares, realizada com o auxílio de descritores morfológicos associados à semente tais como o tamanho médio, o formato, a coloração e o aspecto do tegumento, a cor e o formato do hilo que podem, inclusive, sofrer influência ambiental (MOREIRA et al., 1999).

A caracterização de plantas e sementes das cultivares reveste-se de importância pois, a descrição de uma série de características possibilita o reconhecimento e aproveitamento com eficiência, do germoplasma disponível e constitui ferramenta imprescindível à realização das vistorias de campo, bem como à avaliação da pureza varietal em laboratório dos lotes produzidos (MENEZES et al., 1997).

No processo de produção de sementes a análise é uma etapa de maior relevância para a verificação da qualidade para posterior comercialização do produto. Alguns testes e determinações padronizados são realizados de acordo com espécie, para a emissão do boletim de análise de sementes (BAS), documento que reúne uma série de informações inerentes ao lote, a partir do qual é emitido o CS ou o TC.

A pureza física e a pureza varietal são, entre outras, características qualitativas avaliadas quando da análise de sementes, mediante análise de pureza e verificação de outras cultivares (VOC), respectivamente como ocorre com soja. Este é um dos testes que mais desperta preocupações, pelo grau de complexidade em função de similaridades genéticas às vezes existentes entre as cultivares (ZORATO; SCHUSTER, 2011).

A verificação de sementes de outras cultivares em amostras de sementes de soja pode tornar-se imprecisa em decorrência de variações sutis de coloração e formato do hilo e na tonalidade e brilho do tegumento. Assim, essas características podem ser insuficientes à identificação segura de cultivares e, portanto, seria necessária a adoção de métodos complementares que facilitassem a distinção de possíveis misturas varietais (COSTA et al., 1979).

As caracterizações completas devem descrever de, modo claro, vagens e sementes maduras, assim como as reações bioquímicas e fisiológicas destas últimas, para que tenha segurança na determinação da qualidade das sementes (MENEZES et al, 1997).

Portanto, a caracterização de cultivares de, soja baseada apenas nos aspectos externos da planta e, sobretudo das sementes é insuficiente, havendo necessidade da utilização de procedimentos complementares, os quais permitem a pronta separação dos cultivares (OLIVEIRA et al., 1996).

2.2 ENZIMA PEROXIDASE E IDENTIFICAÇÃO VARIETAL

As peroxidases (E.C. 1.11.1.7) são do grupo das POD encontradas na forma solúvel e iônica ligadas à parede das células (CLEMENTE,1998). Presente em tecidos de vegetais, de animais e de microrganismos, fato que é de sua essencialidade à todos os seres vivos (BRUNETTI; FARIA-OLIVEIRA, 1996). São do grupo das oxiredutases, encontradas em múltiplas formas moleculares e estão presentes na maioria das frutas e legumes na forma solúvel e acoplada (forma iônica e covalente) com propriedades catalíticas influenciadas pela cultivar, crescimento e fases fisiológicas (NEVES, 2002). As primeiras observações de reações catalisadas por peroxidase datam de 1855, quando um pedaço da raiz fresca de raiz forte (rábano, *Armoracia rusticana*, *horseradish*) foi colocado em uma tintura de resina de *Guaiacum*, desenvolvendo uma coloração fortemente azulada, decorrente da oxidação do 2,5-di-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3,4-dimetilfurano presente na tintura. Em 1898, Linossier isolou esta enzima e a chamou de peroxidase (CAMPA, 1991).

Enzimas catalisadoras de reações oxidativas que usam H_2O_2 como acceptor de elétrons, são amplamente dispersas e ocorrem em plantas como isoenzimas que podem ser distinguidas por serem pontos isoelétricos. A peroxidase na planta contribui para a integridade estrutural das paredes celulares agindo na biossíntese de lignina, na suberização e na formação de ligações covalentes cruzadas entre a celulose, pectina e outros constituintes da parede celular (GIJSEN, 1997).

Além das fitoalexinas, também as peroxidases podem atuar na resistência das plantas aos patógenos. As peroxidases participam de vários processos fisiológicos, catalisando a oxidação e a eventual polimerização de álcool hidroxicinâmico em

presença de peróxido de hidrogênio, originando lignina, um importante mecanismo físico de defesa vegetal (GASPAR et al., 1982), mediante o fortalecimento das paredes celulares do hospedeiro.

Nos vegetais as peroxidases podem participar de um grande número de reações oxidativas e de biodegradação, tais como mudança de cor, degradação da clorofila ou auxinas, oxidação de fenóis, oxidação do ácido indol acético, biossíntese da lignina; muitas das reações podem estar associadas com cor, textura e qualidade nutricional dos alimentos (VAMOS-VIGYAZO, 1981).

As peroxidases (POD) estão envolvidas com inúmeros processos fisiológicos na planta, principalmente, no que concerne ao desenvolvimento e amadurecimento. Conforme Menezes et al (2004), as peroxidases exercem várias funções importantes como: em seu crescimento, no processo de diferenciação e desenvolvimento celular nos vegetais e de acordo com Passardi et al (2005), essa enzima tem a atividade catalítica na redução do H_2O_2 e doação de elétrons a várias moléculas como compostos fenólicos, precursores de lignina, auxina e outros compostos do metabolismo secundário e na prevenção biológica a ataques de patógenos e a herbivoria.

Em condições de estresse, as plantas tendem a aumentar a atividade da peroxidase e às vezes, é a primeira enzima a ter atividade alterada, independentemente do substrato utilizado ou do estresse aplicado (SIEGEL, 1993). Assim, a peroxidase pode ser tomada como um marcador bioquímico de estresse resultante tanto de fatores bióticos como de abióticos (LIMA et al., 1999).

Gaspar (1986) afirmou que a peroxidase parece ser a molécula chave de adaptação das plantas, ou de algum de seus órgãos separadamente, às mudanças do meio ambiente. A indução da atividade da peroxidase pode ser um mecanismo utilizado pelos vegetais para reduzir os níveis de H_2O_2 e peróxidos orgânicos formados sob diferentes condições de estresse.

Esta enzima tem sido amplamente estudada em plantas e empregada em uma variedade de processos fisiológicos incluindo a biossíntese da lignina, polimerização e cicatrização de ferimentos (CHEN; VIERLING, 2000).

A considerável atenção biotecnológica para peroxidase de soja deve-se a sua alta estabilidade e atividade. SBP (*Soybean Seed Coat Peroxidase*) está presente em altas

concentrações no tegumento do grão de soja (GIJZEN, 1997).

Buttery; Buzzell (1968) separaram diversos cultivares de soja em dois grupos, com base na atividade alta ou baixa da peroxidase no tegumento da semente. Para isso, utilizaram dois métodos: um teste rápido baseado na utilização do reagente guaiacol e um teste envolvendo eletroforese em gel de poliacrilamida. Posteriormente, Buzzell; Buttery (1969) demonstraram, por meio de análises genéticas, que as atividades alta e baixa da peroxidase no tegumento da semente de soja são controladas por um gene maior, *Ep*. Este, com dominância completa, produz a atividade alta, e o seu alelo recessivo, *ep*, a atividade baixa. Os autores constataram, ainda, que o controle da atividade está no tecido maternal e não no endosperma ou no embrião (OLIVEIRA et al., 1996).

De acordo com Costa et al. (1979) e Larsen; Benson (1970), com base em testes de eletroforese, a atividade da peroxidase no tegumento da soja decresce com o aumento do período de armazenamento da semente. Entretanto, Payne (1976) ressaltou que a atividade da peroxidase quando determinada pelo método rápido, não é afetada pela qualidade da semente ou pelas condições de armazenamento.

Segundo Oliveira et al. (1996) e Costa et al. (1979), a atividade da peroxidase do tegumento da semente é passível de utilização para separar cultivares comerciais de soja cultivadas no Brasil. Entre os 47 cultivares analisados pelos autores foi constatada a existência de dois grupos: um de 33 cultivares, com reações positivas, e outro de 13, negativas. Apenas uma cultivar teve reação positiva e negativa, provavelmente em consequência de mistura varietal.

Sahota e Desormeaux (1997) propuseram o uso do teste de reação da peroxidase utilizando outros agentes químicos que não necessitem a retirada do tegumento da semente, facilitando a execução dos testes e agilizando de forma considerável a análise.

As variações na coloração das reações de peroxidase não podem ser explicadas pela presença de resíduos dos cotilédones da semente, haja vista que a reação seria positiva, no entanto, a presença de sementes de outras cultivares (mistura varietal) no lote analisados poderiam tornar a reação negativa (SAHOTA; DESORMEAUX, 1997). Outra hipótese, porém menos provável é de que as cultivares transgênicas utilizadas são relativamente recentes no mercado, podendo ainda haver algum tipo de segregação genotípica para os genes envolvidos na expressão para alta ou baixa atividade da peroxidase, formando

um terceiro grupo, embora menos expressivo composto por cultivares que apresentam reação positiva e negativa, conforme Buttery e Buzzell (1968).

Existem três possibilidades para as variações positivas em sementes que apresentam reação negativa da peroxidase, quais sejam mistura varietal, material vegetal utilizado de forma inadequada (tegumento com vestígios dos cotilédones) ou mesmo cultivares com reação positiva/negativa da peroxidase.

Na tese de Zabot (2009), na figura 1 pode ser observado o aspecto das sementes quando submetidas ao teste de reação da peroxidase, no momento da execução e após a realização do teste, para cultivares com resultado positivo e negativo. Na figura 1 o aspecto da resposta para cultivares que reagem de maneira mais acentuada à reação positiva, assim como cultivares onde não há reação.



Figura 1. Reação positiva e negativa da peroxidase pelo método das sementes inteiras de soja (a) e resultados positivos e negativos pelo método das sementes inteiras, após a reação (b). Santa Maria/RS, 2008 (Fotos: M.D. Vidal, 2008).

Segundo Zabot (2009) o uso da semente inteira no teste de reação da peroxidase é tão eficiente quanto o uso apenas do tegumento da semente.

2.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A tecnologia da reação da polimerase em cadeia (PCR – Polymerase Chain Reaction) foi concebida por Kary Mullis em meados da década de 80 (MULLIS; FALOONA, 1987; SAIKI et al, 1985) e causou desde então causou uma verdadeira revolução na biologia tanto na investigação voltada para a compreensão de processos biológicos fundamentais, como nas áreas aplicadas incluindo diagnóstico e melhoramento genético de

plantas e animais domésticos. O impacto da PCR e dos métodos que se derivam dela, dedicaram a Kary Mullis o prêmio Nobel de Medicina no início da década de 90 (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Para Ferreira & Grattapaglia (1998), a facilidade, a rapidez, a versatilidade e a sensibilidade da PCR a torna particularmente poderosa para estudos genético-moleculares que incluem grande número de indivíduos de qualquer organismo vivo. Muitos métodos tradicionais de clonagem, de sequenciamento e de análise de polimorfismo de DNA foram acelerados e substituídos pelo uso das inúmeras derivações da técnica de PCR. Uma destas derivações é a tecnologia do RAPD que compreende a amplificação simultânea de vários *loci* anônimos do genoma utilizando *primers* (iniciadores) da sequência arbitrária.

A reação da polimerase em cadeia (EHLICH, 1989) é uma técnica poderosa que teve alto potencial de tornar-se rapidamente uma das mais amplamente utilizadas em biologia molecular, porque é rápida, barata e simples. A técnica amplifica a partir de fragmentos de DNA específicos quantidades diminutas de material de DNA de origem, mesmo quando o DNA de origem é relativamente de má qualidade.

A análise de DNA consiste essencialmente na sua amplificação através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Esta técnica permite a amplificação, em milhões de vezes, de um fragmento específico de DNA moldado por dois oligonucleótidos iniciadores (*primers*) desenhados para hibridizarem em zonas opostas de cada uma das cadeias da sequência alvo, em apenas poucas horas. A técnica de PCR baseia-se numa sequência de ciclos iguais com três temperaturas diferentes, nos quais o número de sequências alvo cresce de forma exponencial, atendendo ao número de ciclos predefinidos. Cada ciclo divide-se em três passos distintos (MAFRA et al., 2005):

- Desnaturação – passo que permite a separação das cadeias das sequências alvo por aquecimento a cerca de 95°C;
- Anelamento – corresponde à ligação dos *primers* às cadeias simples (desnaturadas) a uma temperatura que varia entre 35-65°C;
- Extensão – neste passo ocorre a síntese das cadeias complementares a partir dos *primers* hibridados por meio de uma polimerase da *Taq* que incorpora os nucleotídeos na cadeia molde.

Segundo Mullis; Faloona (1987) adicionava-se ao tubo de ensaio o DNA contendo o trecho alvo, os dNTPs, a DNA polimerase, tampão contendo magnésio e dois *primers* de DNA, um sentido 5'-3' e o outro no sentido reverso (um *primer* “*foward*” e outro “*reverse*”). A distância entre os sítios de pareamento dos dois *primers* não poderiam ser maiores que 1000 pb. O tamanho ideal dos *primers* são sequencias de 20-24 bases.

A função do tampão é manter o pH ótimo para a enzima e seus sais promoverem uma condição ideal para funcionamento das enzimas e influencia na hibridização e na temperatura de melting dos *primers*, os íons de magnésio são fundamentais ao bom funcionamento da *Taq* DNA polimerase.

É aconselhável que o tubo com os reagentes permaneça por 5 a 10 minutos a 94 °C do início do ciclo para assegurar que todo o DNA alvo esteja desnaturado. Em geral 1 minuto a cada temperatura é suficiente para as etapas do ciclo, que é repetido de 35 a 40 vezes. Por fim, ao terminar a última extensão, os protocolos experimentais sugerem a manutenção da temperatura de 72 °C por mais 5 a 10 minutos para que todas as fitas tenham o mesmo comprimento pois pode acontecer de algumas fitas copiadas não atingirem o fim do molde.

Uma vez que a quantidade de DNA da sequencia alvo se duplica em cada ciclo, a amplificação segue uma progressão geométrica de maneira que depois de 20 ciclos é produzida mais de um milhão de vezes a quantidade inicial da sequência alvo. Esta escala de amplificação permite o início com quantidades mínimas de DNA (na ordem de alguns picogramas ou nanogramas) e terminar a reação com grandes quantidades de DNA da sequência específica de interesse.

A reação de PCR possui três fases:

- Fase de “*screening*” (ciclos iniciais): Os “*primers*” procuram o “*template*” de DNA com as seqüências que lhes são complementares, em ação semelhante às das sondas nos experimentos de hibridização; o encontro da sequencia complementar é mais rápida, devido ao excesso dos *primers* em relação ao *template*.
- Fase intermediária: O processo de amplificação ocorre, com consequente acúmulo exponencial do fragmento de DNA; o pareamento do *primer* com a sequencia que lhe é complementar é facilitada pela existência, nesse momento, de várias cópias das sequencias alvo.

- Fase tardia ou fase de *platô*: A amplificação torna-se sub-ótima devido à limitação dos reagentes e à competição dos produtos gerados com os *primers* disponíveis.

As causas do *platô* são várias como perda da atividade da enzima, ocupação das enzimas disponíveis com a síntese de DNA e acúmulo de produtos amplificados que tendem a parear entre si, em detrimento do pareamento com os *primers*. É aumentada a possibilidade de amplificação de produtos inespecíficos assim como a competição com outros produtos que vinham sendo amplificados com eficiência menor mas também foram se acumulando, entre outros fatores.

A ocorrência de contaminantes da amostra de DNA podem inibir fortemente a reação de PCR, como fenol, proteinase K, agentes quelantes em excesso (EDTA), SDS (Sodium DodecylSulphate) e elevadas concentrações de sal.

Nos experimentos iniciais de PCR foi utilizada a enzima DNA polimerase de *E. coli*, cuja temperatura ótima de polimerização é de 37°C. Esta era adicionada manualmente em cada ciclo de amplificação e como era termicamente instável, ocorria destruição sempre que a temperatura era elevada a 95°C para provocar a desnaturação do DNA molde. O passo decisivo para a expansão da técnica de PCR ocorreu quando Saiki et al. (1988) isolaram um DNA polimerase (*Taq* polimerase) de uma bactéria (*Thermus aquaticus*) que vive em fontes térmicas, polimeriza a 72°C e mantém sua atividade durante algumas horas à 95°C. Isto possibilitou a automatização completa do processo da PCR (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Além disso, a baixa temperatura de funcionamento da DNA polimerase de *E. coli* propiciava o aparecimento de pareamentos errôneos no sistema, gerando ao final produtos de PCR inesperados.

A *Taq* polimerase não faz revisão *in vitro*. Se quando ocorrer a cópia pela primeira vez do DNA alvo, houver introdução uma base errada em uma das duas fitas, 25% do produto final estará com sua sequência diferente. Para evitar este problema os testes devem ser realizados em duplicata, pois a probabilidade da *Taq* polimerase cometer o mesmo erro nas duas reações é muito reduzida; se o resultado das duas amostras for conflitante é indicativo que houve erro em um dos tubos.

3. OBJETIVOS

Testar duas metodologias de extração de DNA;

Validar os *primers* obtidos e confrontar os resultados com o teste rápido colorimétrico;

Testar o poder de detecção dos *primers* em lotes de sementes com contaminação varietal de 1%; 2%; 3%, 4% e 5%.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” e também no laboratório de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu-SP. Foi realizado o teste colorimétrico tradicional e seus resultados comparados com os encontrados com a técnica de PCR convencional. Foram usadas 14 cultivares; dessas, foram pré-selecionadas seis cultivares com sementes de reação positiva à peroxidase; quatro cultivares com reação negativa e quatro cultivares com reação positiva e negativa como mostra a tabela 1:

Tabela 1. Cultivares de soja com suas respectivas reações à peroxidase.

Cultivares	Peroxidase
BRS 320	+
BRS 284	+
BRS 232	+
BRS 7860RR	+
BRSMG 760SRR	+
BRS295RR	+
BRS 326	-
BRS 8160RR	-
Nutrisoy	-
BRS Valiosa RR	-
BRSGO 8060	+/-
BRS 270RR	+/-
FTS Campo Mourão RR	+/-
BRS 239	+/-

Fonte: Embrapa Soja, 2011

4.1 TESTE COLORIMÉTRICO

O procedimento utilizado foi o mesmo preconizado por Buttery; Buzzell (1968). Para cada cultivar, foi utilizada uma semente com pedaços do tegumento retirado ao longo desta. O teste foi realizado em 2 repetições de 50 sementes de cada cultivar. O tegumento de cada semente foi retirado com o auxílio de uma lâmina de corte, sem deixar qualquer fragmento do eixo embrionário, ou dos cotilédones, aderido ao mesmo. As partes dos tegumentos foram colocadas em tubos de ensaio de 10 x 75 mm juntamente com dez gotas de uma solução 0,5% de guaiacol ou a quantidade suficiente para cobrir totalmente os tegumentos.

Logo em seguida, foram adicionadas gotas de água oxigenada de 40 volumes (12% de peróxido de hidrogênio na solução).

A formação ou não de coloração foi observada após 30 a 40 segundos, sendo mais evidente após alguns minutos. As cultivares com alta atividade da peroxidase no tegumento produziram cor marrom avermelhada intensa, designada como reação positiva, enquanto, após o mesmo período, as cultivares dotadas de baixa ou nula atividade não apresentaram alteração quanto à coloração, caracterizando reação negativa. Quando ocorreram dúvidas quanto à coloração foram adicionadas algumas gotas adicionais de água oxigenada para confirmar o resultado. Além disso, várias repetições da mesma semente foram utilizadas com o objetivo de confirmação do resultado. Cultivares cujas sementes tiveram coloração marrom no tegumento, e não na solução, também foram caracterizadas como de reação positiva.

A solução de guaiacol usada foi uma suspensão em pó concentrada (Sigma®). Para elaborar a solução estoque a 1% foi diluído 1 mL da solução concentrada em 19 mL de álcool etílico P.A. para a obtenção de 20 mL de solução. Para a solução de trabalho a 0,5% foram diluídos 10 mL de solução estoque (1%) de guaiacol e 10 mL de água destilada para 20 mL de solução final.

A solução de trabalho de concentração 1% foi obtida a partir do reagente peróxido de hidrogênio P.A., encontrado nas concentrações de 35%, 32% e 30%. A solução de peróxido de hidrogênio foi armazenada em frasco escuro e, mantida em geladeira.

Para a confecção de água oxigenada 40 volumes foi utilizado 1 mL de

peróxido de hidrogênio (35%) em 34 mL de água destilada para se obter 35 mL de solução de trabalho. Tanto a água oxigenada quanto o guaiacol foram armazenados em geladeira.

4.2 TESTE DOS *PRIMERS*

A obtenção dos *primers* é dividido em várias fases: busca e escolha das sequências de interesse; alinhamento das sequências e determinação do consenso; seleção da região consenso mais conservada, além da escolha e teste dos *primers* (GARCÊS, LIMA, 2004).

A composição de G-C, tamanho do *primer*, temperatura de anelamento, formação de dímeros e estruturas secundárias, foram considerados por ocasião do desenho dos *primers*. No caso da peroxidase em soja, há uma mutação com deleção de 87 pares de base no final 5' do gene esse fator causa a baixa atividade da peroxidase sendo responsável pelo gene recessivo “ep”.

Os *primers* foram obtidos de acordo com os descritos no trabalho de Gijzen (1997):

prx 9 (+: Forward): ATGCATGCAGGTTTTTCAGT

prx 10 (-:Reverse): TTGCTCGCTTTCTATTGTAT

prx 29 (+:Forward): CATAAACAATACGTACGTGAT

4.3 EXTRAÇÃO DE DNA DA SEMENTE

Os métodos utilizados para a extração de DNA foram o método proposto por McDonald et al. (1994) e por um kit comercial (Invisorb® Spin Plant Mini Kit para 50 amostras).

Primeiramente, amostras de 100 sementes foram maceradas em um moinho básico analítico de batelada para moagem de impacto (da marca IKA modelo A11). Posteriormente, a amostra macerada foi transferida para um tubo (Eppendorf®) de 1,5 mL. O restante da amostra macerada foi transferido para um tubo tipo Falcon de 50 mL e armazenadas em freezer à -80°C.

Os métodos utilizados na extração do DNA das sementes inteiras foram os seguintes:

4.3.1 Extração pelo método McDonald et al. (1994)

Foram adicionados 800 µL de tampão de extração ao tubo com a amostra e homogeneizado em vórtex por 30 segundos à 1 minuto. Em seguida, foi centrifugado por 5 minutos à 13.2 rpm e o sobrenadante transferido para um novo tubo de 1,5 mL. Nova centrifugação foi realizada por 4 minutos e o sobrenadante transferido para um novo tubo de 1,5 mL. A eliminação de proteínas foi feita adicionando-se 10 µL de Proteinase K (10mg/mL) e 10µL de 1mM CaCl₂ (este último reagente é opcional). Os tubos foram colocados em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Após esse tempo foram adicionados 800µL de isopropanol gelado e deixado precipitar por 2 minutos. Depois de outra centrifugação por 7 minutos à 13.2 rpm foi retirado o sobrenadante e o precipitado seco por 15 minutos.

O *pellet* foi resuspenso em 300µL de tampão tipo TE contendo 40 µg/µL de RNase A. As amostras foram colocadas em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Após esse tempo, foram retiradas do banho-maria e adicionados 800µL de isopropanol gelado e deixado precipitar por 2 minutos. Centrifugou-se por 7 minutos à 13.2 rpm, e foi retirado o sobrenadante e o precipitado seco por 15 minutos. O *pellet* foi resuspenso em 300µL de TE.

Para fazer o tampão de extração foi utilizado uma solução de Tris-HCl 1M pH 7,5 onde foi dissolvido 121,1 gramas de Tris base em 800 mL de água destilada. O pH foi ajustado com HCl concentrado. O volume foi completo até 1L; solução SDS 10% onde se diluiu 100 gramas de SDS em 700 mL de água destilada e deixado em banho-maria a 50°C até diluir completamente. Depois o volume foi ajustado até 1 L; a solução de EDTA 500mM e pH 8,0 foi feita com 186,1 gramas de EDTA e 800 mL de água destilada e homogeneizado com agitador magnético. O pH foi ajustado com NaOH em pastilhas até chegar a 8,0. Depois o volume também foi completado até 1L.

A solução de NaCl foi feita com a diluição de 292,2 gramas em 1L de água destilada.

O preparo da solução de extração foi realizado de acordo com a tabela 2:

Tabela 2. Protocolo para preparação do tampão de extração de DNA pelo método de McDonald et al. (1994).

	Conc. Estoque	Conc. Final	para 10mL
Tris-HCl pH 7,5	1mol/L	200mM	2mL
NaCl	5mol/L	288mM	575µL
EDTA	500mM	25mM	500µL
SDS	10%	0,5%	500µL
H2O	-	-	6,5mL

Para fazer o tampão TE foi utilizada a solução de Tris-HCl pH 8,0 e EDTA 500mM pH 8,0 usada no tampão de extração. Foi utilizado 1mL de Tris e 200µL de EDTA em 1000 mL de solução. O volume foi completo para 1L com água destilada.

4.3.2 Extração pelo kit

O material macerado e conservado em tubos do tipo Eppendorf® de 1,5mL a -80°C foi retirado do freezer e adicionado 400µL de “*Lysis Buffer P*” e 20µL de Proteinase K em cada tubo. Todas as amostras foram homogeneizadas em vortex e incubadas em banho-maria à 60°C por 30 minutos, agitando-se o tubo.

Paralelamente foi colocado também à 60°C o “*Elution Buffer D*” que deve ficar nessa temperatura até seu uso no último passo do protocolo.

Após este tempo, as amostras foram retiradas do banho-maria e seu conteúdo transferido para o “*Prefilter*” colocado em um tubo de 2,0mL. Centrifugou-se por 1 minuto à 12.000 rpm. O “*Prefilter*” foi descartado e na solução remanescente foi adicionado 200µL de Binding Buffer P e homogeneizado em vortex.

Depois de homogeneizada, a solução foi transferida para o “*Spin Filter*”, já colocado em outro tubo de 2,0mL, e incubada por 1 minuto. Centrifugou-se por 1 minuto à 12.000 rpm. Descartou-se o filtrado e o filtro foi recolocado no tubo.

Foram adicionados 550µL de “*Wash Buffer I*” e centrifugado por 1 minuto a 12.000 rpm. Descartou-se o filtrado e o filtro foi recolocado no tubo.

Então 550µL de “*Wash Buffer II*” foram adicionados ao “*Spin Filter*” e centrifugados por 1 minuto a 12.000 rpm.

Esse procedimento de lavagem com “*Wash Buffer I*” e “*Wash Buffer II*” foi repetido mais uma vez. Depois da segunda lavagem com *Wash Buffer II* o filtro foi centrifugado por 2 minutos a 12.000 rpm para retirar o etanol remanescente.

Descartou-se o tubo de 2,0mL e o “*Spin Filter*” foi transferido para um tubo de 1,5mL onde foram adicionados 100µL em cada amostra de “*Elution Buffer D*” pré-aquecido. Incubou-se por 3 minutos. O término do protocolo constitui da centrifugação das amostras por 1 minuto a 10.000 rpm.

Cada amostra foi quantificada em Nanodrop® 2000C da Thermo e os valores usados para o cálculo da concentração para a reação da PCR.

4.4 REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA (PCR)

As reações de PCR foram realizadas em termociclador da marca Eppendorf® Mastercycler Gradient no laboratório de Genética Vegetal do Instituto de Biociências da UNESP/Botucatu-SP, em tubos de 0,5µL empregando-se os reagentes segundo a tabela 3 e a combinação de *primers* utilizados se é apresentada na tabela 4.

Tabela 3. Protocolo da reação de PCR utilizada para detectar peroxidase em sementes de soja.

Solução estoque	Concentração (µL)/ 50 µL	Conc. Final
10x PCR Buffer	5	1x
25 mM MgCl ₂	4	2 mM
10 mM MIX dNTP's	1,25	250 µM
10 µM <i>Primer F</i>	2	0,4 µM
10 µM <i>Primer R</i>	2	0,4 µM
1000 U/µL <i>Taq</i> Polimerase	0,05	1 U
DNA (variável)	-	30 ng
Água Deionizada	-	Até 50 µL

Os gradientes de temperatura consistiram em uma desnaturação inicial de 2 minutos a 94°C. Foram 30 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94°C, 45 segundos de anelamento a 60°C e 1 minuto de extensão a 72°C. Ao final, 7 minutos de extensão a 72°C o programa foi encerrado e foi programado para ficar a 10°C.

As sequencias obtidas foram posteriormente aplicadas em géis de agarose para a avaliação.

Tabela 4. Combinação de *primers* utilizados e suas respectivas sequências.

<i>primer</i> Forward	Sequência	<i>primer</i> Reverse	Sequência
<i>prx9</i>	ATGCATGCAGGTTTTTCAGT	<i>prx10</i>	TTGCTCGCTTTCTATTGTAT
<i>prx29</i>	CATAACAATACGTACGTGAT	<i>prx10</i>	TTGCTCGCTTTCTATTGTAT

4.5 ELETROFORESE

Os géis de agarose foram confeccionados na concentração de 1%. Foram usados 1,2 gramas de agarose em pó em 120 mL de tampão TAE 1X para a confecção do gel. A agarose e o tampão foram colocados em um Erlemeyer e aquecidos em forno microondas por 2:30 minutos ou até total diluição da agarose. Posteriormente, o gel foi esfriado em água e despejado em bandeja onde foi adicionado um pente de vinte dentes. Em seguida, o gel foi deixado esfriar até total solidificação.

O tampão TAE foi obtido a partir do tampão TAE 50x e diluído na proporção 20mL de tampão 50x para 80 mL água destilada.

Para ser aplicado no gel, foi utilizado 2µL de solução de azul de bromofenol como corante, 1µL de GelRed® diluído (1µL de GelRed® em 500µL de água destilada autoclavada) e 4µL da amostra de DNA amplificada pelo PCR.

A eletroforese foi realizada a uma tensão elétrica de 120 V por 30 minutos. As imagens foram obtidas em fotodocumentador (Transiluminador UV MiniBis®) que permitiu a visualização e posterior análise do DNA amplificado.

4.6 CONTAMINAÇÃO VARIETAL

As sementes da cultivar BRS Valiosa, confirmada anteriormente para a ausência da peroxidase (reação negativa), foi contaminada manualmente com sementes da cultivar BRS 7860RR conhecida pela presença de peroxidase (reação positiva) através do teste colorimétrico, na proporção de 1, 2, 3, 4 e 5%.

Os *bulks* foram de 100 sementes cada com a proporção de contaminação apresentada na tabela 5:

Tabela 5. Números de sementes com reação positiva em *bulks* de sementes com reação negativa e suas respectivas porcentagens de contaminação.

Sementes negativas	Sementes positivas	Porcentagem (%)
99	1	1
98	2	2
97	3	3
96	4	4
95	5	5

Foi realizada a reação de PCR, eletroforese e análise do gel conforme descrito anteriormente. Posteriormente, foi realizada a maceração dos *bulks* e a extração de DNA pelo método do kit.

4.7 ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados foram avaliados pela observação dos géis de agarose. Foram verificadas as ausências e presenças de um padrão de bandas nos géis a fim de comparar com os resultados colorimétricos previamente feitos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 TESTE COLORIMÉTRICO

Entre as quatro cultivares descritas com reação negativa à peroxidase, a BRS 8160 RR (Figura 2) e a Nutrisoy (Figura 3) tiveram 100% das sementes analisadas com reação negativa. Nas cultivares BRS 326 e BRS Valiosa RR foram constatados 2% e 1%, respectivamente, nas figuras 4 e 5.



Figura 2. (a) Sementes da cultivar BRS 8160 RR e (b) 100% das sementes com reação negativa à peroxidase como mostra a seta. Botucatu/SP, 2013 (Fotos: B. Panoff, 2013).

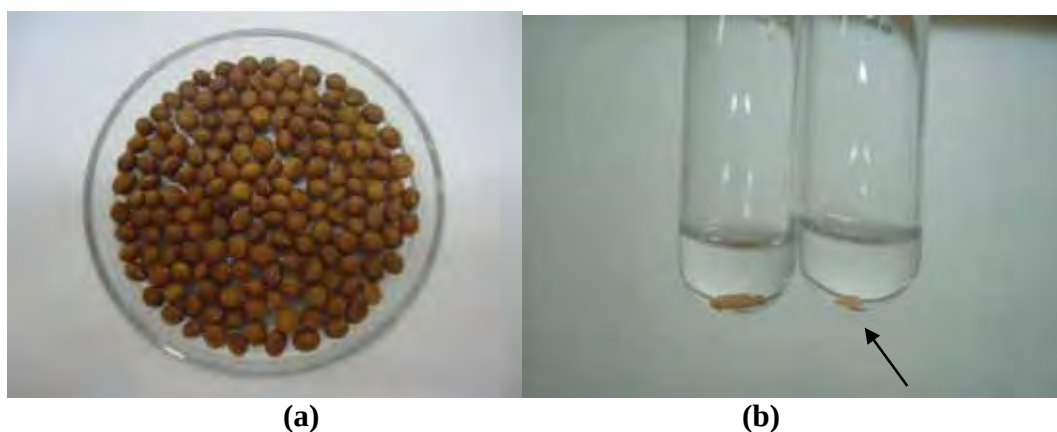


Figura 3. (a) Sementes da cultivar Nutrisoy e (b) 100% das sementes com reação negativa à peroxidase como mostra a seta. Botucatu/SP, 2013 (Fotos: B. Panoff, 2013).

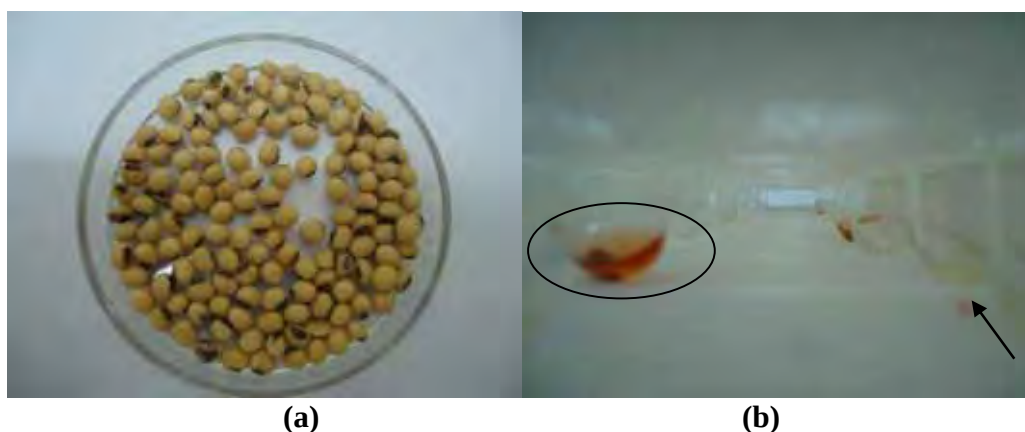


Figura 4. (a) Sementes da cultivar BRS 326 e (b) os 2% de sementes com reação positiva marcadas pelo círculo em meio as sementes de soja com reação negativa à peroxidase destacada pela seta. Botucatu/SP, 2013 (Fotos: B. Panoff, 2013).

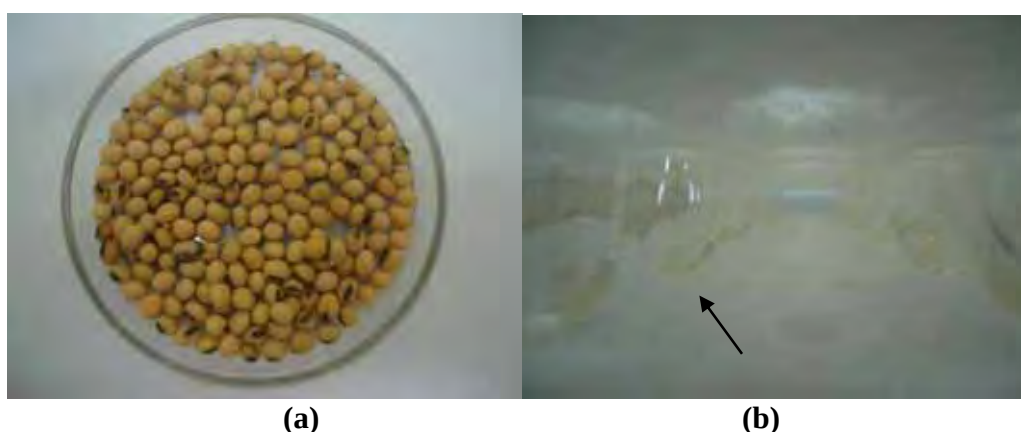


Figura 5. (a) Sementes da cultivar BRS Valiosa e (b) 99% de sementes com reação negativa como mostra a seta. Botucatu/SP, 2013 (Fotos: B. Panoff, 2013).

O teste realizado nas sementes das seis cultivares com reação positiva à peroxidase, quatro delas, a BRS 320 (Figura 6), a BRSMG 760SRR (Figura 7), a BRS 295RR (Figura 8) e a BRS 284 (Figura 9) tiveram 100% das sementes com a reação positiva. Por outro lado, as cultivares BRS 7860RR e BRS 232 apresentaram 2% de contaminação negativa como mostram as figuras 10 e 11.

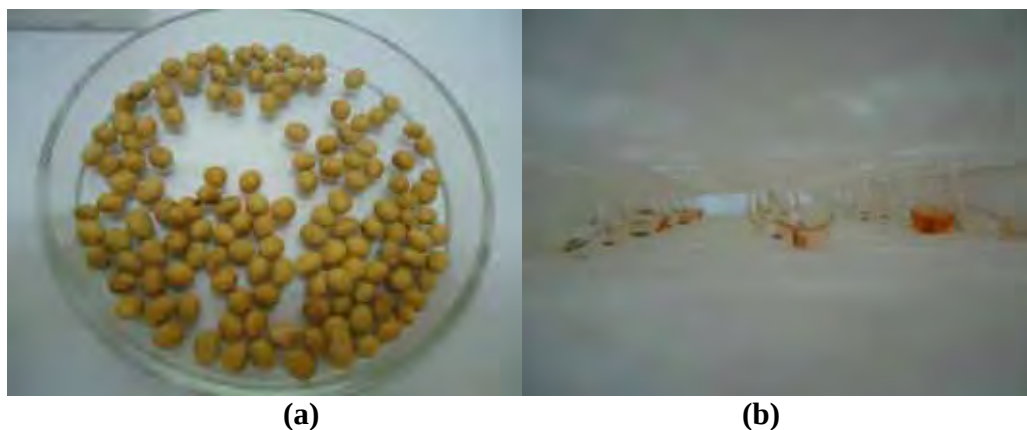


Figura 6. (a) Sementes da cultivar BRS 320 e (b) 100% das sementes com reação positiva à peroxidase. Botucatu/SP, 2013 (Fotos: B. Panoff, 2013).

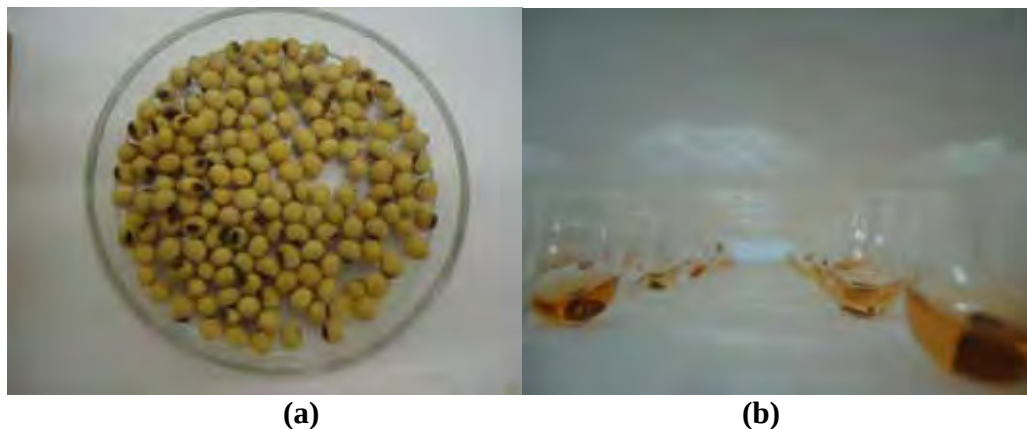


Figura 7. (a) Sementes da cultivar BRSMG 760SRR e (b) 100% das sementes com reação positiva à peroxidase. Botucatu/SP, 2013 (Fotos: B. Panoff, 2013).

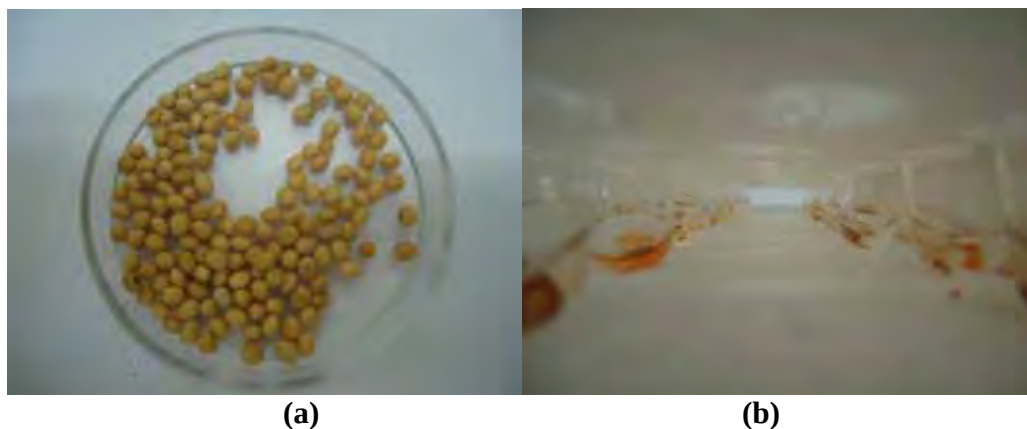


Figura 8. (a) Sementes da cultivar BRS 295RR e (b) 100% das sementes com reação positiva à peroxidase. Botucatu/SP, 2013 (Fotos: B. Panoff, 2013).

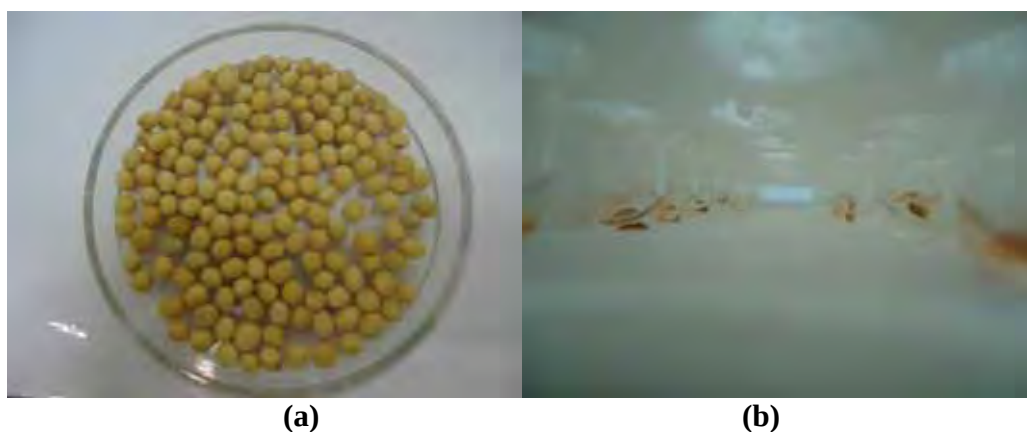


Figura 9. (a) Sementes da cultivar BRS 284 e (b) 100% das sementes com reação positiva à peroxidase. Botucatu/SP, 2013 (Fotos: B. Panoff, 2013).

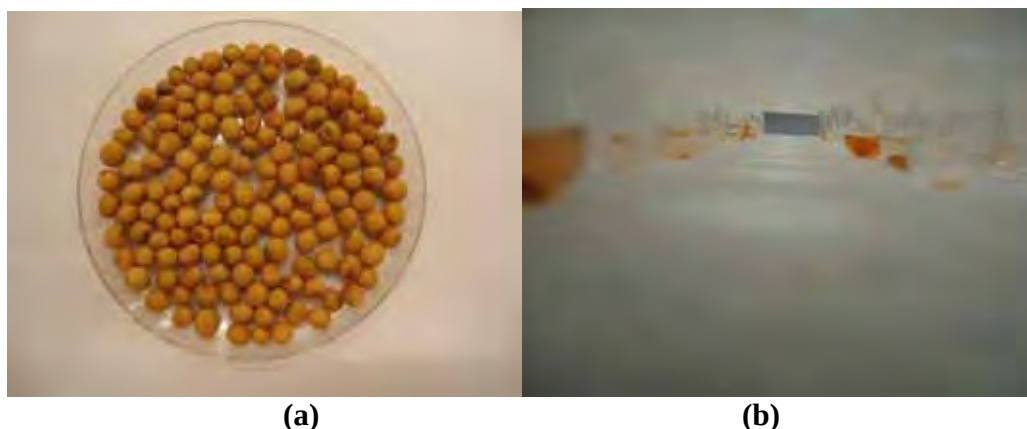


Figura 10. (a) Sementes da cultivar BRS 7860RR e (b) 98% das sementes com reação positiva à peroxidase. Botucatu/SP, 2013 (Fotos: B. Panoff, 2013).

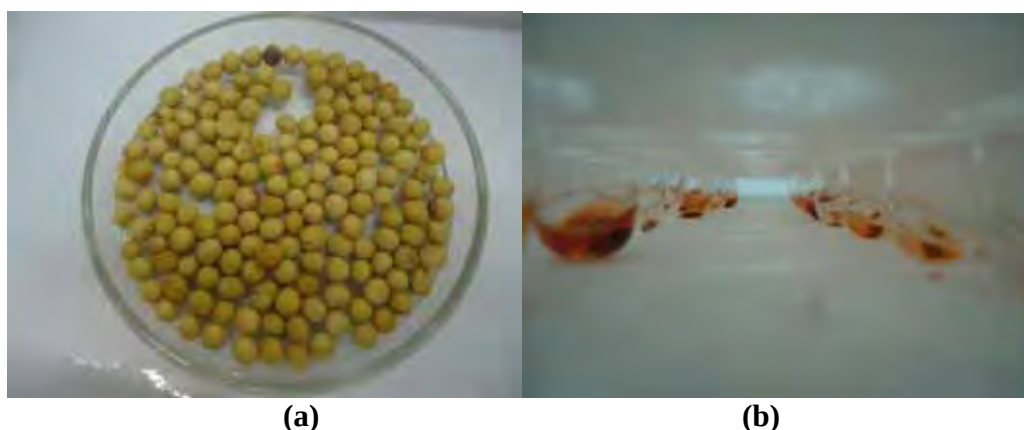


Figura 11. (a) Sementes da cultivar BRS 232 e (b) 98% de sementes com reação positiva nas positiva à peroxidase. Botucatu/SP, 2013 (Fotos: B. Panoff, 2013).

Nas cultivares previamente descritas como dupla reação, somente a cultivar BRSGO 8060 não teve esse comportamento apresentando 100% das sementes com reação negativa à peroxidase (Figura 12). As demais mostraram porcentagens distintas em relação às sementes com reação positiva e negativa. A cultivar BRS 270RR apresentou 64% das sementes com reação negativa e 36% com reação positiva (Figura 13). Já a BRS 239 apresentou 56% das sementes com reação negativa e 44% com reação positiva (Figura 14). A FTS Campo Mourão RR que está descrita com 50% de sementes positivas e a outra metade negativas, mostrou quase esse comportamento com 54% de suas sementes com reação negativa e 46% com reação positiva à peroxidase como mostra a figura 15.

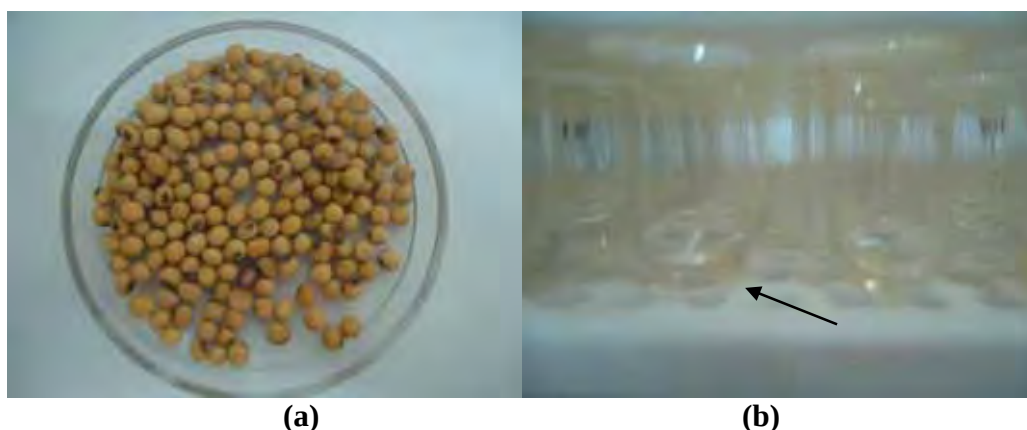


Figura 12. (a) Sementes da cultivar BRSGO 8060 e (b) 100% das sementes com reação negativa à peroxidase como mostra a seta. Botucatu/SP, 2013 (Fotos: B. Panoff, 2013).

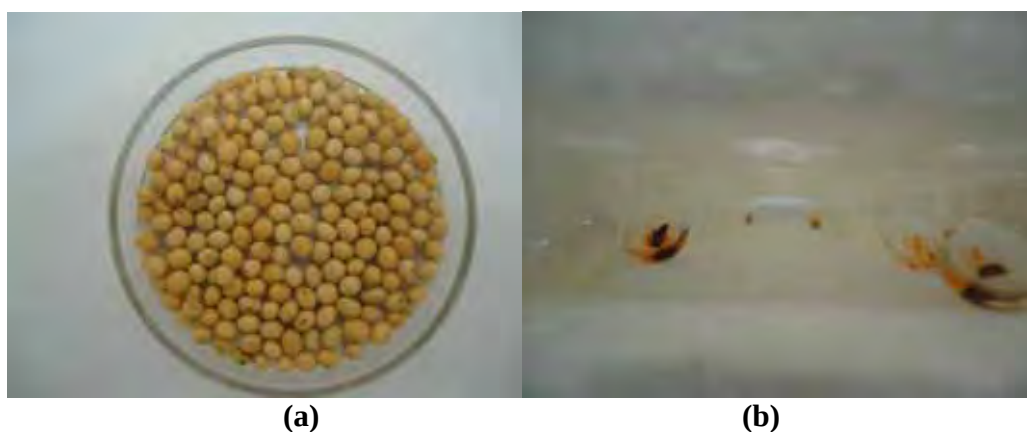


Figura 13. (a) Sementes da cultivar BRS 270RR e (b) sua dupla reação à peroxidase. Botucatu/SP, 2013 (Fotos: B. Panoff, 2013).

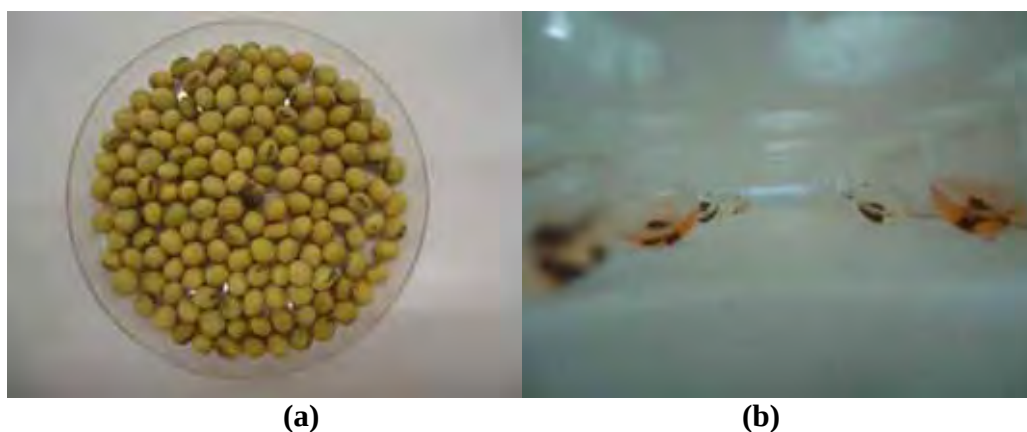


Figura 14. (a) Sementes da cultivar BRS 239 e (b) sua dupla reação à peroxidase. Botucatu/SP, 2013 (Fotos: B. Panoff, 2013).



Figura 15. (a) Sementes da cultivar FTS Campo Mourão RR e (b) sua dupla reação à peroxidase. Botucatu/SP, 2013 (Fotos: B. Panoff, 2013).

Como nas cultivares descritas com reação positiva ou negativa houve no máximo 2% de sementes com reação diferente à peroxidase, infere-se a causa como

contaminação varietal. Esse resultado é semelhante ao obtido por Costa et al. (1979) que, das cultivares por eles estudadas somente uma apresentou consistentemente as duas reações. Os autores atribuíram a causa dessa reação atípica à mistura varietal ou alguma segregação. Payne (1976), também obteve dados semelhantes em estudos com 55 cultivares de soja nos Estados Unidos, pois observou que uma dessas cultivares teve reações positivas e atribuídas á misturas varietais.

Já Zorato; Schuster (2011) afirmaram que uma cultivar com até 1% de sementes de reação contrária não pode ser considerada de dupla reação, pois para a maioria das análises só uma reação será obtida. Os autores também afirmaram que baixo nível de reação diferente à peroxidase (abaixo de 1%), por si só, não representa mistura de outra cultivar.

A cultivar BRSGO 8060 apresentou uma reação diferente à descrição de dupla reação da cultivar. Em contrapartida, as demais cultivares tiveram o comportamento de suas descrições. Esse aspecto foi exposto por Costa et al. (1979) segundo os quais as cultivares de soja podem apresentar misturas varietais significantes no decorrer do tempo e cultivo. Convém salientar, ainda, que o fato de sementes de uma cultivar reagir de maneira diferente pode ser atribuído a alguma segregação.

Explicando esse fator, Zorato; Schuster (2011), referiram-se à possibilidade de fecundação cruzada da ordem de até 1% em soja até 1 metro de distância, apesar de ser uma espécie de autofecundação. Essa dupla reação entre sementes pode ocorrer porque no processo de multiplicação de sementes novas de soja, a semente genética é constituída de mais de uma linha pura. No caso em que mais de uma linha pura apresente reação positiva à peroxidase e uma ou mais linhas puras apresentem reação negativa, as sementes da cultivar apresentarão tanto reação positiva quanto negativa. O fato ocorre em várias cultivares do Brasil cujo registro tenha sido obtido no passado.

5.2 TESTE DOS *PRIMERS*

A combinação de *primers prx9 + prx29*, como era esperado, não apresentou amplificação na técnica de PCR, por se tratar de dois iniciadores do tipo

“Forward”; sem o *primer* reverso para fechar a fita de DNA. Já para os *primers prx29 + prx10* houve amplificação, assim como para a combinação *prx9 + prx10*.

Diferentemente dos resultados de Gijzen (1997) onde os *primers prx29 + prx10* apresentaram amplificação para as duas reações de peroxidase, inclusive para a negativa, pela metodologia de extração de McDonald et al. (1994) não houve essa amplificação para a reação negativa. Todavia, deve-se considerar a baixa resolução do gel de agarose onde as banda foram ausentes ou não tão claras e marcadas; muito provavelmente devido à possível interferência de algum componente do protocolo de extração de DNA pelo método de McDonald et al. (1994) na reação de PCR.

Como ocorreu, não deve haver amplificação nas reações negativas devido a uma deleção de 87 pb na extremidade 5' no final do gene (GIJZEN, 1997).

5.3 TESTE DAS METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO DE DNA

A Figura 16 mostra as duas metodologias testadas, a do kit foi a que proporcionou seus melhores resultados, juntamente foi feito um novo teste de *primers* com a combinação *prx9 + prx10* e *prx29 + prx10*. Não houve amplificação de nenhuma amostra extraída pela metodologia de McDonald et al. (1994).

Os melhores resultados pela extração de DNA com o kit comercial para a semente inteira fez com que os resultados corroborassem com os de Gijzen (1997), ou seja, a combinação de *primers prx9 + prx10* proporcionou amplificação para amostra positiva e não ocorreu amplificação para a negativa e o tamanho de fragmento em torno de 860 pb. Já os *primers prx29 + prx10*, possibilitou a amplificação do gene recessivo *eep* (negativo), oque não era desejado.

Não houve amplificação em nenhuma amostra com a metodologia de McDonald et al. (1994) provavelmente devido ao uso de substâncias quelantes como EDTA e SDS no protocolo que podem facilmente inibir a reação de PCR. Segundo Schaefer (2006), as desoxiribonucleases (DNases) necessitam de íons metal para a sua atividade, podendo ser facilmente inativadas por agentes quelantes, como o ácido etilenodiaminotetracético disódico (EDTA), ou pelo calor (10 minutos a 65°C). É mencionada também outra hipótese pelo mesmo autor para a não amplificação da PCR segundo a qual vários inibidores da reação de

PCR já foram identificados. Estes incluem detergentes iônicos (SDS e Sarcosil), fenol, heparina, xilenocianol e azul de bromofenol.

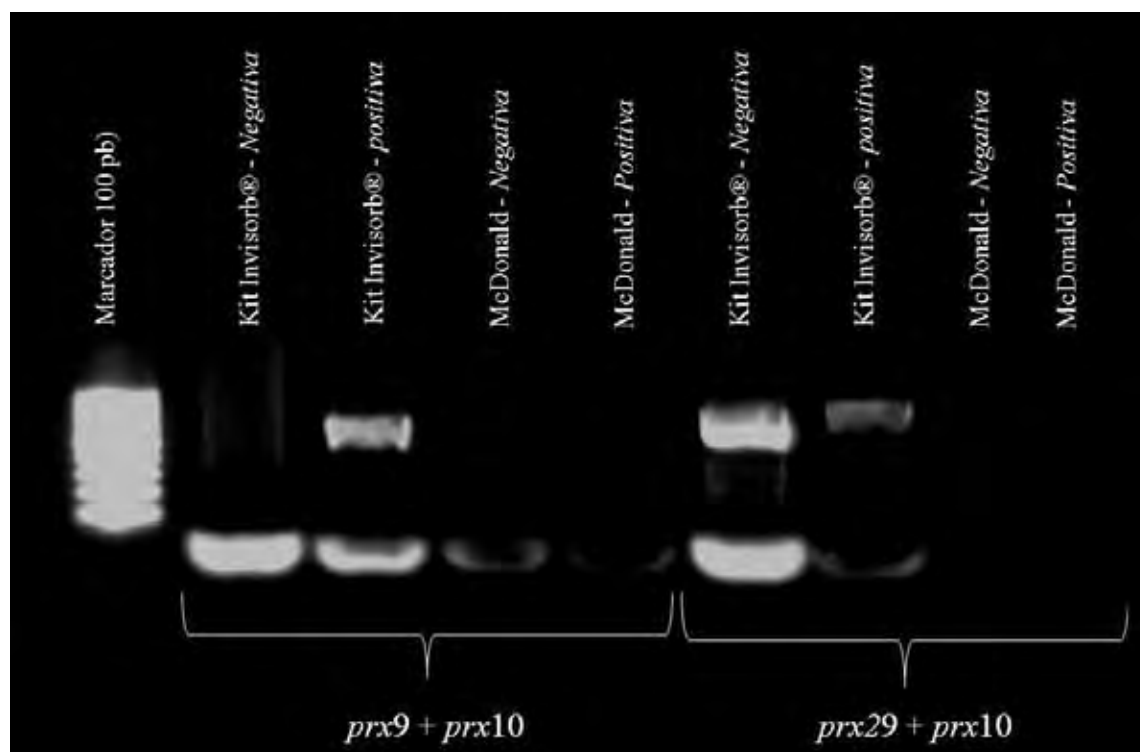


Figura 16. Gel de eletroforese com as duas metodologias de extração de DNA da semente inteira e teste de *primers* em duas cultivares, uma com reação positiva e outra com reação negativa à peroxidase. Botucatu/SP, 2013 (Fotos: B. Panoff, 2013).

Uma solução sugerida para o problema de amplificação da PCR é que em casos de contaminação da amostra uma nova extração do DNA e/ou precipitação do DNA com etanol pode ser feita. A contaminação de amostras com proteinase K pode ter como efeito a digestão da *Taq* DNA polimerase. Neste caso, desnaturar a enzima a 95°C durante 5 minutos (SCHAEFER, 2006).

Em um estudo de marcadores microssatélites em cultivares de milho, Ramos (2004) relatou um problema com isolamento de DNA das amostras, onde a presença de quantidade elevada de impurezas associadas ao DNA isolado a partir de sementes também contribui para a redução na concentração de DNA extraído. As sementes são estruturas de multiplicação vegetal, com tecido de reserva rico em carboidratos, lipídios e proteínas, responsável pelo suprimento do embrião durante o processo de germinação (Carvalho;

Nakagawa, 2000). Essas substâncias de reserva dificultam o isolamento do DNA, exigindo maior número de lavagens com solvente orgânico, durante o protocolo de extração. Esse procedimento implica, também, em redução na quantidade total de DNA isolado, pois parte dessas moléculas não se separam de outros compostos orgânicos e são consequentemente descartadas.

McDonald et al. (1994) demonstraram que a qualidade e a quantidade do DNA extraído de sementes secas de milho, algodão, soja, trigo e trevo vermelho foram satisfatórias para o sucesso de análises moleculares do tipo RAPD. Para as sementes de amendoim, o protocolo de extração deixou a desejar no quesito qualidade, em função do alto teor de óleo encontrado nessas sementes, o que sugere a necessidade de maior número de lavagens para a purificação do DNA. Schuster et al. (2004) testaram um protocolo para a extração de DNA de sementes de soja sem a adição das enzimas proteinase K e RNase A, utilizadas por McDonald et al. (1994) e observaram resultados inferiores tanto para a qualidade como a quantidade de DNA extraído (RAMOS, 2004).

5.4 REAÇÃO DE PCR CONVENCIONAL

O DNA foi extraído de todas as amostras de sementes das 14 cultivares estudadas. Na tabela 6 a estão dispostos os valores da quantificação de DNA pelo método de McDonald et al. (1994) e pelo kit e na figura 17 e 18 o gel de integridade das referidas amostras respectivamente.

A 14 amostras não apresentaram amplificação do fragmento de interesse no gel como mostra a figura 19, pois todas as amostras que apresentaram amplificação foi de um fragmento maior que 1500 pb que não corresponde ao anelamento com os *primers prx9 + prx10*. O DNA foi extraído pela metodologia de McDonald et al. (1994).

Conforme ilustrado na figura 20, com o DNA extraído da semente inteira proveniente do kit comercial e o uso da combinação dos *primers prx9 + prx10*, a reação de PCR para todas as amostras negativas não houve amplificação com total ausência de bandas. Todavia, as cultivares consideradas positivas apresentaram um determinado padrão de bandas no gel que esteve ausente nas amostras consideradas negativas. Várias regiões foram

amplificadas incluindo as de comprimento de DNA de 890 pb que é o comprimento de interesse.

Tabela 6. Concentração de DNA das amostras extraídas pelos métodos McDonald et al., (1994) e kit em ng/μL.

Amostra	McDonald et al. (1994) (ng/μL)	Kit (ng/μL)
1-BRS 326	401,3	176
2-BRS 8160	474,5	154
3-Nutrisoy	1698,2	156,1
4-BRS Valiosa	1072,3	162,7
5-BRSGO 8060	1234,2	240,5
6-BRS 270RR	1204,5	187
7-BRS 239	1024,9	166,4
8-FTS Campo Mourão	1382	205,4
9-BRS 320	847,4	279,9
10-BRS 7860RR	744	240,9
11-BRSMG 760SRR	844,1	383,9
12-BRS 295RR	731,3	462,3
13-BRS 284	902,2	138,3
14-BRS 232	1626,3	290,4

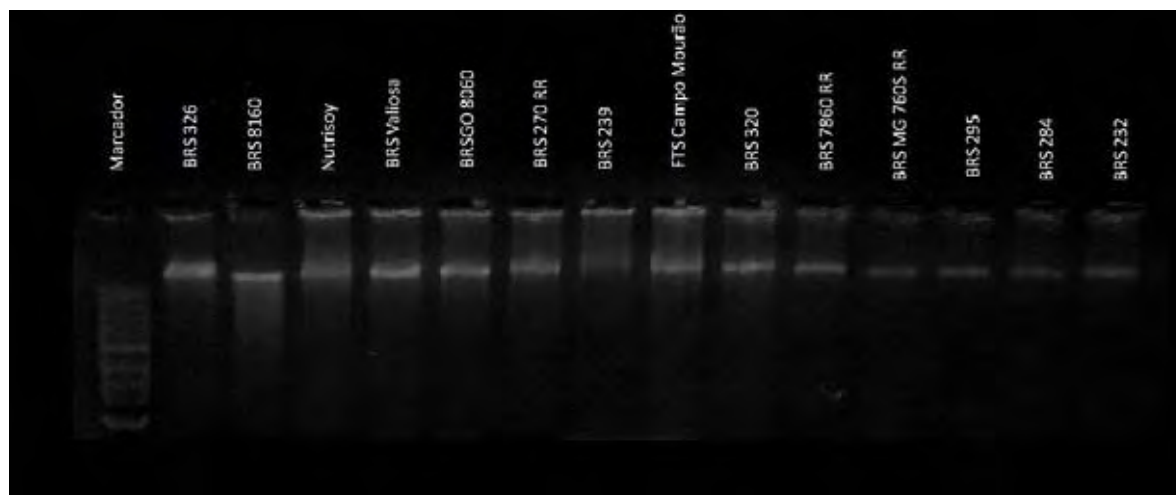


Figura 17. Gel de integridade de DNA das 14 amostras extraídas pelo método de McDonald et al. (1994) das 14 cultivares de soja. Botucatu/SP, 2013 (Fotos: B. Panoff, 2013).

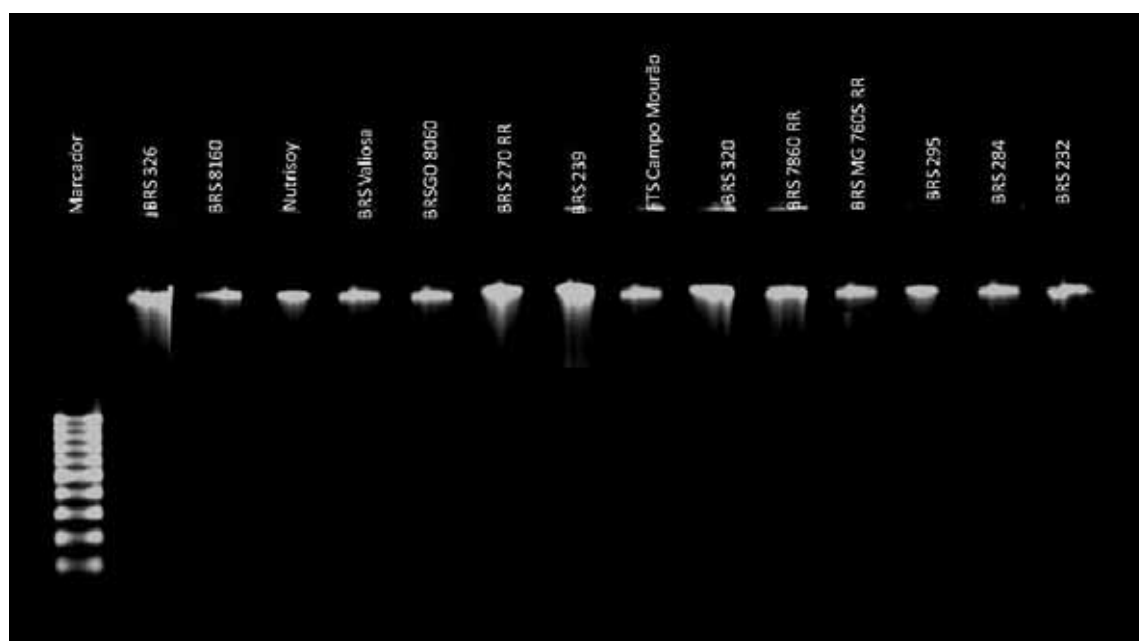


Figura 18. Gel de integridade de DNA das 14 amostras extraídas pelo método do kit da das 14 cultivares de soja. Botucatu/SP, 2013 (Fotos: B. Panoff, 2013).

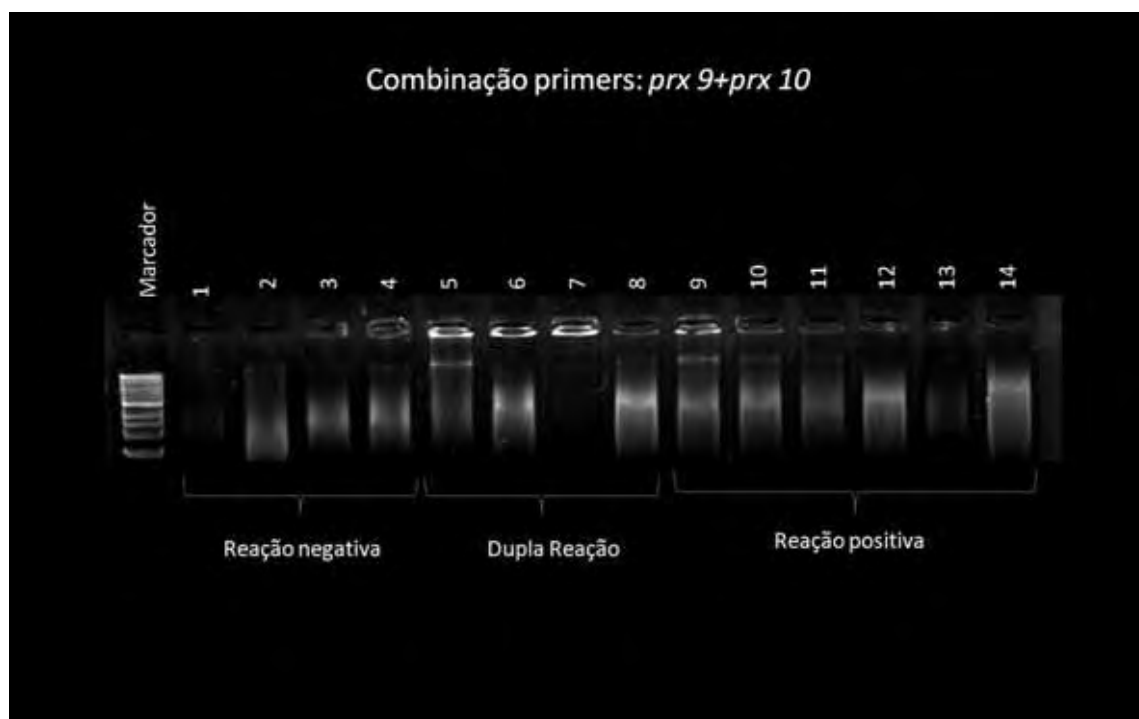


Figura 19. Gel de eletroforese com o produto da PCR proveniente do DNA extraído pela metodologia de McDonald et al. (1994). Botucatu/SP, 2013 (Fotos: B. Panoff, 2013).

Já as cultivares de dupla reação apresentaram-se semelhantemente às cultivares positivas, tiveram amplificação dos fragmentos e a presença de várias bandas. Assim, pôde-se separar as 14 cultivares por essa metodologia em dois grupos bem distintos: um de ausência da peroxidase e outro de presença como mostra a figura 20, incluindo as cultivares duvidosas pelo método colorimétrico.

As cultivares duvidosas foram separadas das negativas; todavia, em geral, a intensidade de bandas foi inferior quando comparada com as cultivares consideradas positivas.

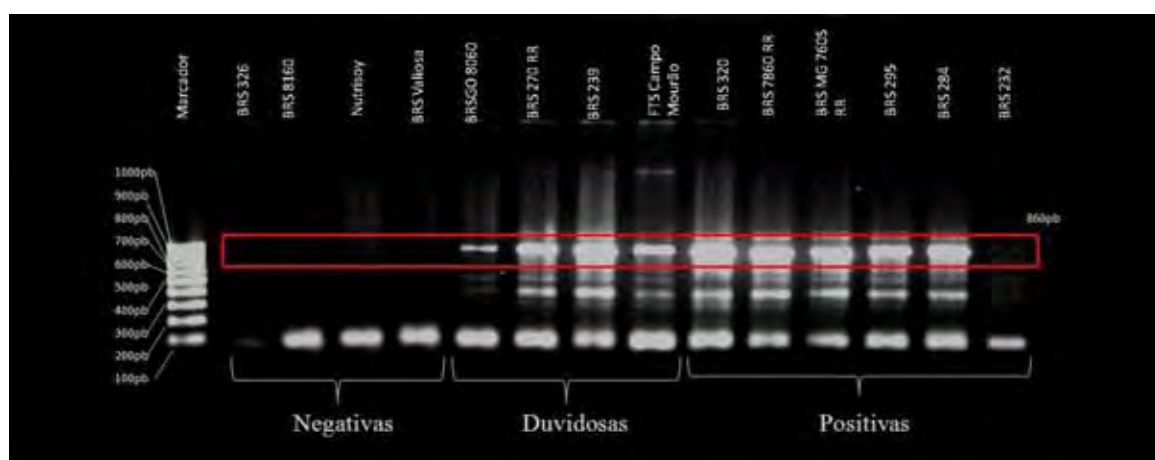


Figura 20. Gel de eletroforese com o produto da PCR proveniente do DNA extraído pela metodologia do kit comercial. Em destaque está o padrão de bandas com o tamanho do fragmento de interesse Botucatu/SP, 2013 (Fotos: B. Panoff, 2013).

Os resultados obtidos são semelhantes aos de Oliveira et al (1996) que, trabalhando com 14 cultivares de reações diferentes de peroxidase, obtiveram com o teste de isoenzimas as cultivares que mostraram atividade de peroxidase no tegumento da semente detectada pela presença de bandas no gel e foram designadas como grupo de reação positiva e os que não apresentaram atividade, ausência de bandas no gel, como grupo de reação negativa. Todavia, as isoenzimas podem ser influenciadas pelo ambiente, o que não acontece com o DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Dentro do grupo de cultivares de reação positiva da peroxidase não ocorreram diferenças qualitativas entre as bandas, apenas variações de intensidade das mesmas, como também constatado por Oliveira et al. (1996).

5.5 REAÇÃO DE PCR APÓS A CONTAMINAÇÃO DOS LOTES.

Na tabela 7 são apresentadas as concentrações de DNA obtidas pela metodologia do kit nas contaminações:

Tabela 7. Quantificação das amostras contaminadas em ng/ μ L.

Amostra	ng/μL
1%	116,3
2%	186,8
3%	118,4
4%	190,4
5%	387,7

Não houve amplificação para nenhuma porcentagem de contaminação das amostras positivas em negativas como mostra a figura 21.

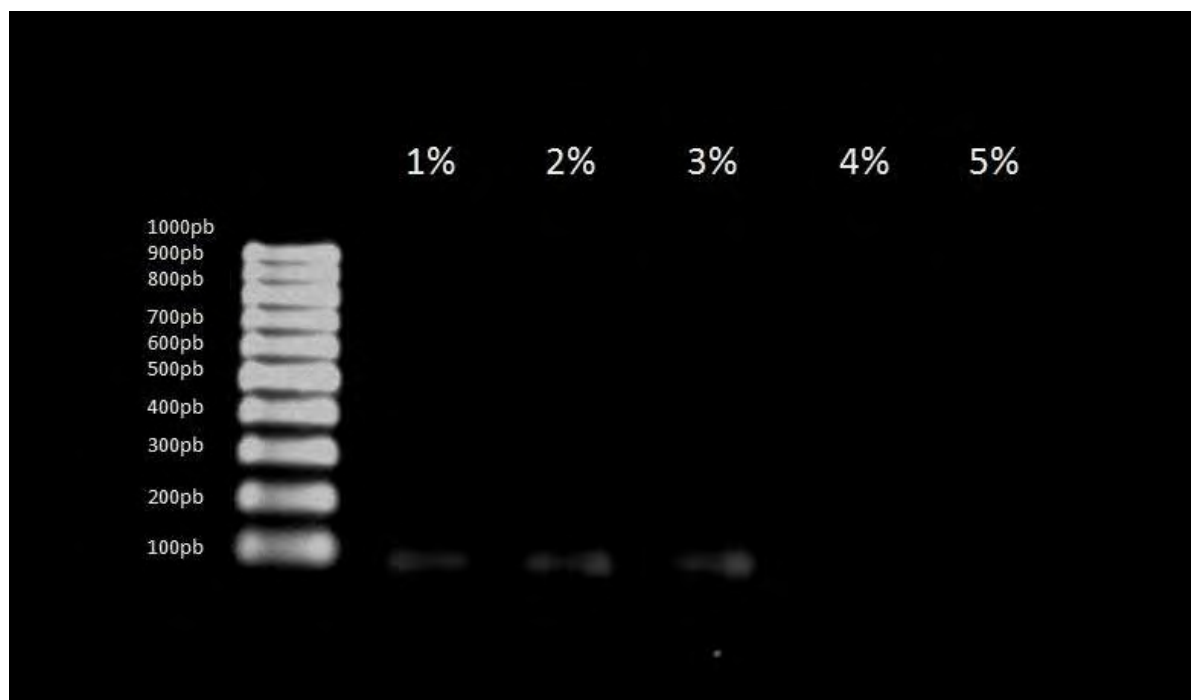


Figura 21. Gel da contaminação com o produto da PCR proveniente do DNA extraído pela metodologia do kit. Botucatu/SP, 2013 (Fotos: B. Panoff, 2013).

No processo de certificação de sementes um lote de soja é reprovado, quanto à ocorrência de sementes de outras cultivares, quando o número de sementes contaminantes for maior que o limite número máximo, que é de 3 sementes em 1000 g

(BRASIL, 2009). Porém esta quantidade de sementes é inviável para a utilização da metodologia da peroxidase.

Para tornar a metodologia mais aplicável, Schuster et al (2004) sugerem que mesmo adotando a utilização de *bulks*, a análise molecular deve ser realizada apenas nas sementes identificadas como duvidosas na análise visual, uma vez que é inviável analisar todas as sementes da amostra.

A análise de DNA extraído de sementes consideradas duvidosas pelo método de análise visual com marcadores moleculares microssatélites é eficiente na determinação da pureza genética de lotes de sementes de soja (SCHUSTER et al., 2004). Como a análise de um *bulk* de sementes com diferentes contaminações não se mostrou satisfatório, considerando a metodologia utilizada, uma alternativa é analisar as sementes duvidosas, visualmente ou pelo método colorimétrico, mediante extração do DNA somente dessas sementes.

Ramos (2004), trabalhando com diferentes níveis de contaminação varietal em milho e utilizando a técnica de microssatélites para detecção observou, que a presença da linhagem contaminante foi detectada na amostra com até 1% (T2) de mistura. Esta constatação é suficiente para impedir a utilização do lote em avaliação, uma vez que não é tolerada a presença de sementes de outros genótipos em sementes básicas de milho. Neste trabalho não foi possível detectar com a metodologia de PCR em misturas com até 5% de contaminação. Nas cultivares duvidosas, que possuíam porcentagem de sementes positivas acima de 36%, se apresentaram positivas na reação de PCR. Isso ocorreu devido ao *bulk* de sementes que foram avaliados ter sido composto de 100 sementes onde aproximadamente 50% delas ter apresentado reação positiva à peroxidase, o que é uma quantidade significativa para ser detectado pelo teste.

A detecção de níveis mínimos de contaminação é primordial à implementação de métodos destinados à avaliação de pureza varietal de sementes. Se esses níveis de detecção puderem se associar ao uso de amostra com várias sementes “*bulk*”, onde representem uma repetição dentro da análise a ser realizada, a eficiência na obtenção de resultados pode ser elevada, assim como o custo por análise pode ser reduzido, melhorando a agilidade nos programas de controle de qualidade. Até o presente momento, a maioria das

análises moleculares, na área de sementes, são realizadas em amostras com sementes individuais, que implicam em maior gasto de tempo e de reagentes (RAMOS, 2004).

Segundo Ramos (2004), a técnica de microsatélites utilizando amostra com DNA extraído de até 100 sementes pode ser recomendada com segurança em análises de determinação de pureza varietal em lotes de sementes de linhagens de milho. Este fato não foi constatado utilizando PCR em sementes de soja no presente trabalho, onde 100 sementes não foram suficientes com a contaminação estudada.

Salgado (2001) verificou eficiência do método de microsatélite foi eficiente para determinação da pureza genética em lotes de sementes híbridas de milho; porém as avaliações foram realizadas, individualmente, ou seja, cada semente foi considerada uma amostra. Entretanto, o trabalho realizado por Schuster et al. (2004), utilizando amostras com misturas de DNA proveniente de várias sementes de soja, permitiu afirmar que métodos de análise em “*bulk*” de amostras de DNA de sementes atípicas, através de microsatélites, fornecem resultados com mesma precisão de análise individual e com custo inferior. Essa diferença na opção por amostra com várias sementes ou apenas com uma semente resulta do caráter codominante do marcador microsatélite (RAMOS, 2004).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o crescente número de cultivares em recomendação, muitas vezes com reduzida diferença genética entre elas, torna-se cada vez mais difícil a verificação de contaminação varietal pelo método da peroxidase.

Muitas vezes a descrição da cultivar por parte de laboratórios oficiais de análise de sementes não coincide com o resultado da verificação de outras cultivares realizada pelo obtentor. Apesar do teste bioquímico da reação à peroxidase ser bastante simples e de baixo custo, sua interpretação envolve certa subjetividade.

Buttery; Buzzell (1968) foram os autores da primeira tentativa de identificação de cultivares de soja utilizando dois métodos baseados na atividade da enzima peroxidase: o eletroforético e o colorimétrico.

Foi observado que as cultivares de soja poderiam ser separadas em dois grupos com base na atividade, alta ou baixa, da peroxidase no tegumento. Buzzell; Buttery (1969), após análise genética, relataram que a referida atividade da enzima é controlada por um gene dominante. Alta atividade da presença de, pelo menos, um alelo dominante (EpEp ou Epep), enquanto que baixa atividade resulta da presença do par recessivo (epep). Segundo Zabet (2009) o uso da semente inteira no teste de reação da peroxidase é tão eficiente quanto o uso apenas do tegumento da semente.

Existem três possibilidades para as variações positivas em sementes que apresentam reação negativa da peroxidase, quais sejam: mistura varietal, material vegetal utilizado de forma inadequada (tegumento com vestígios dos cotilédones ou sementes inteiras com danos no tegumento) ou mesmo cultivares com reação positiva/negativa da peroxidase.

O presente estudo mostrou que a extração de DNA de um bulk de sementes inteiras pelo kit é eficiente na identificação de sementes com reações positivas ou

negativas. Esta é uma alternativa mais confiável para elucidar possíveis dúvidas que surgem quando empregada a técnica colorimétrica.

7. CONCLUSÕES

A extração de DNA pela metodologia do *kit* com a semente inteira foi mais eficiente do que a extração pelo método do McDonald et al. (1994);

Das combinações de *primers* testadas, a combinação *prx9* + *prx10* foi a que amplificou a região do DNA presente nas cultivares descritas como positivas e duvidosas e não amplificou as negativas;

A metodologia não foi eficiente em detectar as porcentagens de contaminações estudadas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para a análise de sementes**. Brasília, DF, 2009. 399 p.
- BRUNETTI, I.L.; FARIA-OLIVEIRA, O.M.M. Sistemas quimiluminescentes com peroxidase (EC: 1.11.1.7) e suas aplicações em análises clínicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas básica aplicada**, v. 16, p. 55-77, 1996.
- BUTTERY, B.R.; BUZZELL, R.I. Peroxidase activity in seeds of soybean varieties. **Crop Science**, 8(6):722-725, 1968.
- BUZZELL, R.I.; BUTTERY, B.R. Inheritance of peroxidase activity in soybean seed coats. **Crop Science**, 9: 387-388, 1969.
- CAMPA, A. Biological roles of plant peroxidases: know and potential function. In: EVERSE, K.; GRISHAM, M.B (Eds). **Peroxidase in chemistry and biology**. New York: CRC Press, 1991. v. 2, p. 25.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588 p.
- CHEN, H.; VIERLING, R. A. Molecular cloning and characterization of soybean peroxidase genes families. **Plant Science**, v. 150, p. 129-137, 2000.
- CLEMENTE, E.; PASTORE, G. M. Peroxidase and polyphenoloxidase: the importance for food technology. **Boletim Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n. 2, p.167-171, 1998.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, quarto levantamento**, janeiro 2013. Brasília, 2013, 29 p.
- COSTA, M. P.; PEREIRA, L. A. G.; FRANÇA-NETO, J. B. Método da peroxidase na identificação de cultivares de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 01, nº 1, p.89-91, 1979.

EHRlich, H. **PCR Technology – principles and applications for DNA amplification**. New York: Stockton Press, 1989.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores em Análise Genética**. 2ªed., Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1998.

GARCÊS, S. P. S.; LIMA, A.O. S. Desenho e Validação *in silico* de *Primers* Intragenéricos. **II Workshop de Tecnologia da Informação Aplicada ao Meio Ambiente** – CBComp, 2004

GASPAR, T.H.; PENEL, C.; THORPE, T.; GREPPIN, H. **Peroxidases 1970-1980**: a survey of their biotechnical and physiological roles in higher plants. Geneva: Universidade de Geneva, Centro de Botanique, 1982. 324p.

GASPAR, T. Integrated relationships of biochemical and physiological peroxidase activities. In: GREPPIN, H.; PENEL, C.; GASPAR, T. (Ed.) **Molecular and physiological aspects of plant peroxidases**. Geneve: University of Geneve, 1986. p.455-468.

GIJZEN, M., VAN HUYSTEE, R., BUZZELL, R. I. Soybean seed coat peroxidase. A comparison of high-activity and low-activity genotypes. **Plant Physiology**. 103: 1061- 1066, 1993.

GIJSEN, M. A deletion mutation at the *ep* locus causes low seed coat peroxidase activity in soybean. **The Plant Journal**, v. 12, n. 5, p. 991-998, 1997.

HENRIKSEN, A., MIRZA, O., INDIANI, C., TEILUM, K., SMULEVICH, G., WELINDER, K. G., GAJHEDE, M. Structure of soybean seed coat peroxidase: a plant peroxidase with unusual stability and haem-apoprotein interactions. **Protein Science**. 10: 108-115, 2001.

LARSEN, A. L.; BENSON, W. C. Variety specific variante of oxidative enzymes from soybeans seed. **Crop Science**, 10: 493-495, 1970.

LIMA, G.P.P.; BRASIL, O.G.; OLIVEIRA, A.M. Poliaminas e atividade da peroxidase em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado sob estresse salino. **Scientia Agricola**, v.56, p.21-25, 1999.

MAFRA, I.; OLIVEIRA, M. B. P. P. **Organismos geneticamente modificados e alimentos derivados**: II. Métodos de detecção e quantificação; Alimentação Humana; 11 (2); 71-89, 2005.

McDONALD, M.B., ELLIOT, L. J.; SWEENEY, P. M. DNA extraction from dry seeds for RAPD analyses in varietal identification studies. **Seed Science & Technology**, 22:171-176, 1994.

McKEE, G.W. Chemical and biochemical techniques for varietal identification. **Seed Science & Technology**, Zürich, v.1 ,n.1, p.181-199, 1973.

MENEZES, N. L. et al. Caracterização de vagens e sementes de soja. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 3, p. 387-391, 1997.

MENEZES, S. M. et al. Detecção de soja geneticamente modificada tolerante ao glifosato por métodos baseados na atividade de enzimas. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 26, nº 2, p.150-155, 2004.

MOREIRA, C.T.; SOUZA, P.I.M.; FARIAS NETO, A.L.; ALMEIDA, L.A. **Ocorrência de variações na coloração do hilo de sementes de cultivares de soja [*Glycine max* (L.) Merrill]**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 1999.

MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, 155:335-50, 1987.

NEVES, V. A. Ionically Bound Peroxidase from Peach Fruit. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, vol.45, n.1 Curitiba Mar. 2002.

OLIVEIRA, A. C. B. et al. Análise eletroforética da peroxidase do tegumento da semente como complemento na identificação de cultivares de soja. **Revista Ceres**, 43(247): 319-325, 1996.

PASSARDI, F.; COSIO, C.; PENEL, C.; DUNAND, C. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. **Plant Cell Reports** v. 24, p.255-256, 2005.

PAYNE, R.C. Seed coat peroxidase activity as an aid in differentiating soybean cultivars. **The Newsletter of the Association of Seed Anal**, 50(1):45-5, 1976.

RAMOS, N. P. **Determinação da pureza varietal em lotes de sementes de milho através de marcadores morfológicos e microssatélites**. Piracicaba, 104 p., 2004. Tese (Doutorado) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.

ROSSINI, M. C.; IRIGON, D. L.; KRZYZANOWSKI, F. C.; VERNETI, F. de J. Caracterização de 26 cultivares de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] recomendadas para a região Sul – Brasil. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 17, n. 2, p. 227-235, 1995.

SCHUSTER, I. et al. Determinação da pureza varietal de sementes de soja com o auxílio de marcadores moleculares microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.3, p.247-253, mar. 2004.

SAIKI, R. K., et al. *Primer* directed enzymatic amplification of DNA with a thermoestable DNA polymerase. **Science**, 239: 487-491, 1988.

SAIKI, R.K. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnostics of sickle cell anemia. **Science**, 230: 1350-1354, 1985.

SAHOTA, A. S.; DESORMEAUX, R. W. Soybean seed coat peroxidase activity test for cultivar purity determinations. **Newsletter of the Association of Official Seed Analysts**, v. 64, n. 2, p. 1-4, 1997.

SALGADO, K.C.C. **Certificação da pureza genética em sementes híbridas de milho por meio de marcadores morfológicos e moleculares**. Lavras, 2001. 67p. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Lavras.

SCHAEFER, R. Técnicas em biologia molecular. **Documento 116, Embrapa Suínos e Aves**, Concórdia, 24 p., ISSN 0101-6245, 2006.

SIEGEL, B.Z. Plant peroxidases: an organism perspective. **Plant Growth Regulation**, v.12, p. 303-312, 1993.

SOUZA, F. H. D. & MARCOS-FILHO, J. The seed coat as a modulator of seed environment relationships in Fabaceae. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, p. 365-375, 2001.

VÁMOS-VIGYÁZO, L.; Polifenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. **CRC Critical Reviews in Food Science**. Nutrition 1981, 49-127.

Welinder, K. G. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. **Current Opinion in Structural Biology**, 2: 388-393, 1992.

ZABOT, L. **Caracterização agrônômica de cultivares transgênicas de soja cultivadas no Rio Grande do Sul**. 2009. 280 f. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria/RS.

ZORATO, M. F.; SCHUSTER, I. Uso da peroxidase na análise de pureza genética em sementes de soja. **Anuário Associação Brasileira de Sementes e Mudas 2011**, Brasília, p. 20-23, 2011.