



**IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS EVENTOS BOLLGARD I, ROUNDUP READY,
LIBERTY LINK E WIDESTRIKE EM ALGODÃO**

Larissa **Nogueira**¹; Milton Geraldo **Fuzatto**²; Haiko Enok **Sawazaki**³

Nº 14124

RESUMO - Com a finalidade de obtenção de uma metodologia mais barata para quantificação de evento transgênico, utilizou-se a metodologia de PCR em tempo real com BRYT™ Green. O DNA foi extraído de grãos de sete cultivares de algodão com evento e quatro sem evento, pelo método CTAB. As reações foram otimizadas para cada iniciador e realizadas para um volume de 15,0 µl. A análise de especificidade feita pelo método “Fast”, com os iniciadores desenvolvidos, mostrou total especificidade em relação a todos os eventos estudados. A quantificação foi feita pelo método “Standard”, baseada na curva-padrão do DNA evento, misturado a DNA sem evento, para reação com 100ng DNA, sendo relativa ao gene de referência (*acp 1*). A sensibilidade foi de 0,06%, o R2 variou de 0,98 a 0,99 e a Eficiência de PCR de 0,9 a 1,1. A variação das porcentagens de quantificação de amostras com evento entre 90-92 a 98-101 apresentaram um erro de 2 a 10%, com variância de 0,33 a 3, mostrando boa acurácia e repetitividade, indicando a possibilidade da análise específica e quantitativa de eventos transgênicos com uma metodologia mais barata.

Palavras-chaves: quantificação algodão transgênico, BRYT™ Green.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Engenharia Ambiental, UNICAMP, Campinas-SP; lalihnogueira@hotmail.com

2 Colaborador : Pesquisador do Instituto Agronômico, Campinas-SP; mfuzatto@iac.sp.gov.br

3 Orientador: Pesquisador do Instituto Agronômico, Campinas-SP; henok@iac.sp.gov.br



ABSTRACT- *In order to obtain a cheaper method to quantify the transgenic event, the method of real-time PCR with BRYT™ Green was used. The DNA was extracted from grains of cotton cultivars using seven with event and four without event by the CTAB method. The reactions were optimized for each primer, and performed in a total volume of 15.0 μ l. The analysis of specificity made by "Fast" method, using the developed primers showed total specificity for all events studied. The quantification was done by "Standard" method, based on the standard curve from the DNA of event, mixed with DNA without event, for reaction with 100ng of DNA, relative to the reference gene (acp 1). The sensitivity was 0.06%, the R2 ranged from 0.98 to 0.99 and the efficiency of PCR 0.9 to 1.1. The range of percentages of quantification of samples events among 90-92 to 98-101 have presented an error of 2 to 10%, with a variance from 0.33 to 3, showing good accuracy and repeatability pointing the possibility of using a cheaper method to analysis specific and quantitative of transgenic events.*

Key-words: quantification of transgenic cotton, BRYT™ Green.

1 INTRODUÇÃO

O algodoeiro, da mesma forma que as culturas de milho e soja, apresenta sementes com eventos transgênicos Bt (Bollgard e Wide Strike) para facilitar o controle de pragas (lagartas, pulgão, percevejo rajado e bicudo do algodoeiro) e ervas daninhas pela resistência a herbicidas: Resistência a Glifosato (RR) e Resistência a Glufosinato (LL).

A técnica de análise quantitativa evento-específica realizada por PCR em Tempo Real é o método oficial utilizado pela Europa através de métodos validados pela "European Commission" que é responsável pelo "European Union Reference Laboratory for GM food and feed". As metodologias validadas para detecção de OGM são acreditadas pela norma da International Organization of Standardization ISO 17025 e ISO 9001 e são encontradas na JRC Compendium of Reference Methods for GMO analysis (JRC-ISO/FDIS, onde FDIS é "Final Draft International Standard"). O site oficial da European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed (EU-RL GMFF) é: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/statusofdoss.htm>.

A vantagem do PCR em tempo real é possibilitar a determinação da quantidade original do DNA da amostra pois o nível de amplificação é monitorado continuamente durante os ciclos de PCR, enquanto o pcr comum só mostra o patamar final da amplificação, dependente da perda de eficiência da enzima e concentrações de substrato, nucleotídeos e iniciadores. Quando suficiente



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

produto é acumulado para produzir sinal de fluorescência detectável, o número do ciclo em que isto ocorre é chamado threshold cycle, ou CT. Como o CT é determinado na fase exponencial quando os reagentes não são limitantes, depende principalmente da quantidade inicial do substrato, sendo utilizado para calcular a quantidade inicial do substrato presente na reação.

A metodologia que usa o sistema de fluorescência denominado Taqman necessita além dos iniciadores, de sondas. Os detectores fluorescentes SYBR Green ou Green BRYTTM têm o mesmo princípio de detecção de produtos da reação de PCR. Conforme são criados os fragmentos amplificados, os corantes se ligam a cada nova cópia de DNA de fita dupla, aumentando a intensidade de fluorescência proporcionalmente a quantidade de produto de PCR formado. As vantagens deste sistema de monitoramento de reação é que o reagente fluorescente é mais barato que o Taqman e não requer sonda. A desvantagem é que pode originar sinal falso positivo quando ocorre ligação com DNA de fita dupla não específica, necessitando do desenvolvimento de iniciador específico e otimização da reação para amplificar apenas a banda desejada.

O objetivo do trabalho é a obtenção de uma metodologia mais barata, porém, eficiente, de diagnóstico e quantificação pela metodologia de PCR em Tempo real com o sistema com BRYT™ para quatro eventos de OGMs em algodão: MON 531 (Bolgard I), MON 1445 (Roundp Ready), LLcoton 25 (Liberty Link) e Widestrike (281-24-236) e Widestrike(3006-210-23), com o desenvolvimento de iniciadores específicos para os quatro eventos e a otimização dos iniciadores e da reação de pcr em tempo real para obtenção da curva padrão com eficiência de PCR na faixa de 99 a 101% de amplificação por ciclo. A realização de análises de OGMS visa facilitar os processos do agronegócio, visto a detecção e quantificação de organismo geneticamente modificado (OGM) ser exigência em quase todos os países para os quais o Brasil exporta alimentos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizada a metodologia de quantificação relativa de acordo com o utilizado pela JRC (ISO/FDIS), mudando-se apenas o tipo original com Taqman para o sistema com SYBR Green ou Green BRYTTM. Foram realizadas as curvas padrões para ambos evento e referência endógena. Para cada amostra, a quantidade do evento e a da referência endógena foram determinados das respectivas curvas padrões. Assim, a quantidade do evento dividida pela quantidade da referência endógena foi usada para se obter o valor do evento normalizado. Para a quantificação relativa do DNA dos eventos em testes de amostras, o número de cópias do evento foi dividido pelo número de cópias do gene de referência *acp1* (acyl carrier protein 1) do algodão e multiplicado por 100 para se obter o valor de porcentagem (%GM=evento/*acp1* X 100).



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

Foram utilizadas as amostras da Tabela 1. A extração de DNA foi feita com duzentas miligramas da amostra homogeneizada e moída pelo método Brometo de Cetil Trimetil Amônio (CTAB) de Cardarelli et al. (Food Control, v16, p.859-866, 2005). A integridade e quantificação do DNA extraído foram observadas utilizando-se corrida eletroforética.

Tabela 1. Cultivares/variedades utilizadas

DENOMINAÇÃO	MANTENEDOR	EVENTO	Tipo Resistência/ Proteína
DP 555 BGRR	D e PL BRASIL LTDA	BollgardI x RR	Lepdop e Glifosato/ Cry1Ac-CP4-EPSPS
DP 604 BG	D e PL BRASIL LTDA	BollgardI	Lepdópteros/ Cry1Ac
FM 951 LL	BAYER S.A.	LL	Glufosinato / PAT
FM 966 LL	BAYER S.A.	LL	Glufosinato / PAT
FM 975 WS	BAYER S.A	Widestrike	Lepidopteros / Cry 1F, / Cry1Ac-PAT
NUOPAL	D e PL BRASIL LTDA	BollgardI	Lepidopteros / Cry1Ac
NUOPAL RR	D e PL BRASIL LTDA	BollgardI x RR	Lepidopt e Glifosato / Cry1Ac-CP4-EPSPS
FMT 705	FMT	—	—
FMT 707	FMT	—	—
FMT 709	FMT	—	—
BRS 269	EMBRAPA	—	—

2.1 PCR em tempo real

Foi utilizada a metodologia de PCR em Tempo real de quantificação relativa com o sistema BRYT™ Green, utilizando-se o iniciador de referência do gene endógeno da acyl carrier protein 1 (acp1). As reações e condições foram otimizadas para o 7500 Fast Real Time da Applied Biosystems para um volume de 15,0 µl com 7,5 µl do mix BRYT™ Green (Go Taq qPCR Máster MIX) e 100 a 266 nM dependente do iniciador, com 1 etapa de 95 °C por 2 minutos, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s, anelamento de 57°C a 60°C por 60 s e extensão a 60°C por 60s. A curva-padrão foi feita com 20%, 2,86%, 0,41% e 0,06% do DNA evento misturado a DNA sem evento para reação de 100ng DNA.

A eficiência de PCR da curva padrão foi calculada a partir do valor de “slope” [curva de calibração obtida plotando-se os valores de CTs (Threshold Cycle: é o ciclo em que cada curva de amplificação atravessa o Threshold, servindo como base para comparação entre amostras; Threshold é o limiar de detecção estabelecido pelo usuário ao analisar resultados no final de uma corrida de pcr em tempo real) contra o logaritmo do numero de cópias do evento:

$$\text{Eficiência PCR} = E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$$

2.2 Otimização iniciadores



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

Foram otimizados os iniciadores desenvolvidos a partir dos existentes da JRC para reação com Taqman, como os do MON 531: QT-EVE-GH-004 de Mazzara et al., 2008a; MON 1445: QT-EVE-GH-003 de Mazzara et al., 2008b; LLCotton 25- QT-EVE-GH-002 de Mazzara et al., 2013, Widestrike: QT-EVE-GH-001a para gene *cry1F* evento 281-24-236 e Widestrike:QT-EVE-GH-001b para gene *cry1Ac* evento 3006-210-23 de Mazzara et al., 2006, para reação com BRYT™ Green, com o Primer 3.

2.3 Curva padrão

A calibração da amostra S1 foi preparada pela mistura da quantidade apropriada do DNA evento com DNA não OGM para obter 20% OGM evento em um total de 100ng de DNA de algodão para um volume de 5 µl. A amostra S2 foi preparada pela diluição de 1:6 de S1, amostra S3 pela diluição de 1:6 da S2, amostra S4 pela diluição 1:6 da S3. Para algodão o número de cópias absoluto na curva de calibração foi determinado pela divisão do peso DNA (nanogramas) pela média publicada do valor IC para genoma de algodão (2,33pg) (Arumuganathan & Earle, 1991). Portanto, 20% ($100.000/2,33 \times 0,2$) corresponde a 8.584 cópias genoma algodão se um genoma corresponde a 2,33pg do DNA haploide do genoma algodão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Teste de extração de DNA

Sendo a boa extração de DNA primordial para o sucesso da análise de PCR, foi realizado o teste de presença de inibidores onde os dados de comparação dos valores de Ct extrapolados com os valores Ct medidos pela amplificação do gene *acp1* para as amostras de algodão não mostraram diferença > 0,5 ciclo, indicando a ausência significativa de inibidores.

3.2 Análise especificidade

Foi testada a especificidade dos iniciadores desenvolvidos através da interação genoma/inserto, utilizando reação de 15,0 µl, com 20 ng de DNA pelo método “Fast”. Todas as sete variedades com evento quando analisadas com o iniciador específico da Tabela 2 deram resultado positivo e completamente específico em relação a todas as amostras dos outros eventos estudados, mostrando a curva de amplificação e o pico de dissociação apenas para a amostra com evento.

3.3 Análise quantitativa



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

A Tabela 2 apresenta os melhores iniciadores desenvolvidos pelo laboratório com temperatura de anelamento utilizada em °C (T), concentração utilizada em nM, comprimento da amplificação em pares de bases (C) e Eficiência de PCR (E) observados na obtenção das curva padrão.

Tabela 2. Iniciadores com temperatura de anelamento (°C), concentração em nM, comprimento da amplificação em pares de bases (C), e Eficiência de PCR (E).

Evento ou gene / Nome comercial	Primer senso 5'-3' / Primer antisenso 5'-3'	T	nM	C	E
MON1445 / Roundup Ready	148MON1445: CTT GAT TGG AGT AAG ACG ATT CAG	57	200	158	0,96
	254MON1445: ACA ACA TGC ATC AAT CGA CCT				
MON531 / Bollgard I	77BollgardI: TTG ATG TAC ACC AAA GAG AAA CC	57	200	155	0,92
	231BollgardI: CCT TGT AAA CGA TGT TAG TTT CC				
3006-210-23/Widestrike 1Ac	194Widecry1Ac: ATT GAG TAT GAT GTC CGG GAA A	57	200	60	1,1
	253Widecry1Ac: CCA TAT TGA CCA TCA TAC TCA TTG C				
281-24-236/Widestrike 1F	138Widecry1F: TGA TCC ATG TAG ATT TCC CTT ACT T	57	200	119	0,94
	257Wide cry1F: CAA ATT AAT ACC TTA GGG ACA ATG C				
LLCotton25/Liberty link	194LL:CCC TCA AGG AAC TAT TCA ACT	60	100	100	0,9
	293LL: AAC TGT GCT GTT AAG CTC AGA				
Acp1	89Acp: CCA TCT TTG CTT GCA GGT TTT	57	133	111	0,9
	199Acp: ACA ATA ACT TAC CGC AAG ACC TAC AG				

A CRL-GMFF (2009) dá as recomendações para avaliar e validar os métodos de análise de GMO pela Community Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed (CRL-GMFF) dentro do contexto da Comissão de regulação (EC) No. 1829/2003 da Europa.

No Brasil, o limite de OGMs é de 1%, determinado pelo Decreto 4.680 de 24 de abril de 2003. (BRASIL, 2003). Portanto, os limites mínimos da faixa linear seriam respectivamente de 0,1% e 5%, que é coberta pela faixa linear de trabalho da curva padrão realizada com a mistura do DNA com evento e sem evento para concentração de 20%, 2,85%, 0,4% e 0,05% em reação de 100ng DNA.

A Figura 1 apresenta as curvas de amplificação e dissociação das curvas padrões das amostras DP 555 BGRR, NUOPAL, FM 975 WS, FM 975 WS e FM 966 LL, respectivas aos eventos MON 1445, Bollgard I, Widestrike do gene *cry1Ac* e do gene *cry1F*, e do Liberty Link. Verifica-se que a curva de dissociação apresentou praticamente apenas um pico indicando a otimização do iniciador (apenas o Liberty Link apresentou bandas fracas de primers-dimers, porém, com curvas bem distintas). As curvas de regressão obtidas para todos os eventos mostraram a variação do coeficiente de linearidade R² de 0,98 a 0,99 com os Cts de 21,04-29,62 a 24,59-33,67, e a variação da eficiência de PCR de 0,9 a 1,1. Com relação as curvas do gene *acp 1* realizadas para cada evento o R² foi de praticamente 0,99 com a variação de CTs de 22,19-

30,29 a 23,43 a 31,32 e a eficiência de PCR de 0,91 a 1,1. Estes valores estão dentro das normas da CRL-GMFF (2009).

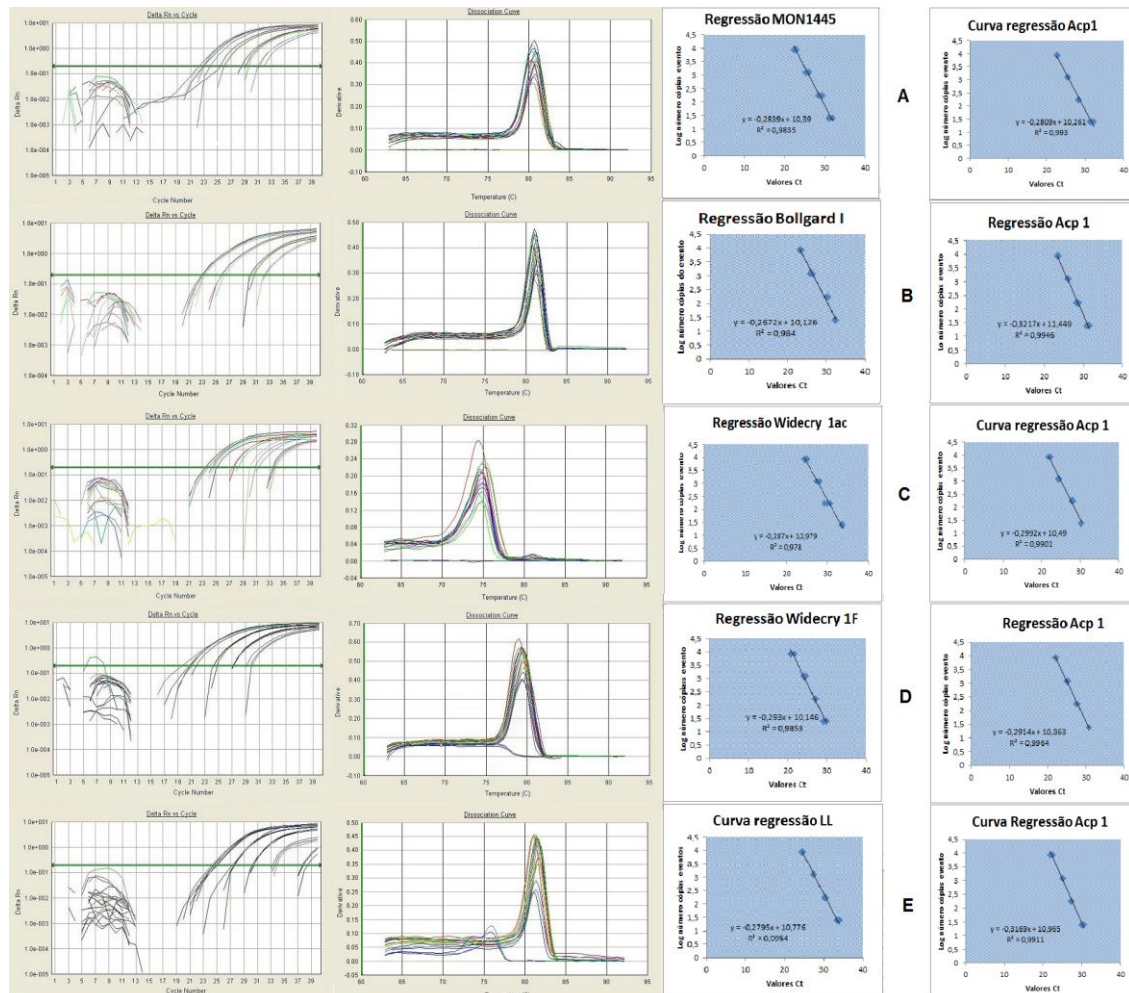


Figura 1. A Figura 1 apresenta as curvas de amplificação e dissociação relacionadas as curva padrão do evento, e da referência do gene *acp1* com iniciador 89/199, respectivamente dos eventos de algodão: A-MON 1445 com iniciador 148/254; B-Bollgard I com iniciador 77/231; C-Widestrike do gene *cry1Ac* com iniciador 194/253; D-Widestrike do gene *cry1F* com iniciador 138/257; E-Liberty Link com iniciador 194/253; referente às respectivas amostras, DP 555 BGRR, NUOPAL, FM 975 WS, FM 975 WS e FM 966 LL.

Os valores obtidos para a porcentagem de quantificação relativa para as três repetições das amostras da Figura 1 foram de 98, 101 e 98 (V=3) para o MON 1445; 91, 92, 92 (V = 0,33) para o Bollgard I; 92, 90, 91 (V=1) para o Widestrike do gene *cry1Ac*; 92, 94, 94 (V=1,33) para o Widestrike do gene 1F e 95, 94, 94 (V=0,33) para o Liberty Link. Comparando-se o valor quantitativo esperado de 100% para as amostras puras com evento utilizadas, a variação de 2 a 10% obtida está dentro das normas da CRL-GMFF de 13 abril 2009 (25%), mostrando a acurácia do método. A variação da variância de 0,33 a 3 também comprova a repetitividade.



4 CONCLUSÃO

Tendo sido observado para todos os iniciadores, total especificidade para cada respectivo evento, Limite de quantificação (LOQ) de 0,06% e eficiência de PCR dentro da faixa de 0,9-1,1 e ainda, tendo a variação das porcentagens de quantificação de amostras com evento um erro de 2 a 10% com variância de 0,33 a 3, verificou-se que este trabalho comprova a possibilidade da análise específica e quantitativa de eventos transgênicos com uma metodologia mais barata, com acurácia e repetitividade.

5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida. A FAPESP pelo auxílio financeiro. Ao GRGV - IAC, pela oportunidade de estágio.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARUMUGANATHAN K.; EARLE, E.D. Nuclear DNA content of some important plant species. **Plant. Molecular Biology Reporter**, v.9, p.208-218, 1991.

BRASIL. **DOU** - Diário Oficial da União. Decreto nº 4680 de 24 de abril de 2003 – Regulamenta o direito à informação, quanto aos alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal que contenham ou sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados, sem prejuízo do cumprimento das demais normas aplicáveis. Publicado no dia 25.04.2003. Seção I, p.2.

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

Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing. (http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/Min_Perf_Requirements_Analytical_methods.pdf), da **CRL-GMFF**, 13 abril 2009. 8p.

MAZZARA M, LARCHER S, SAVINI C, CHARLES DELOBEL C, VAN DEN EEDE G. E. Event-Specific Methods for the Quantitation of the Hybrid Cotton Line 281-24-236/3006-210-23 Using real-Time PCR-Validation Report and protocol - Sampling and DNA Extraction of Cotton Seeds. **EUR 22473 EN**. 2006. JRC33249 (ISBN 92-79-031107-4).

MAZZARA M, BOGNI A, FOTI N, VAN DEN EEDE G. Event-specific Method for the Quantification of Cotton Line MON 531 Using Real-time PCR - Validation Report and Protocol. **EUR 23651 EN**. 2008a. Luxembourg (Luxembourg): OPOCE.

MAZZARA M., BOGNI A., VAN DEN EEDE G.; "Event-specific Method for the Quantification of Cotton Line MON1445 Using Real-time PCR Validation Report and Protocol". **EUR 236512EN**. 2008b. JRC48853 (ISBN978-92-11052-8).

MAZZARA M., GRAZIOLI E., SAVINI C., VAN DEN EEDE G.; "Event-Specific Method for the Quantification of Cotton Line "LLCotton25" Using Real-time PCR v.1.01 - Validation Report and Protocol - Cotton Seeds Sampling and DNA Extraction". **EUR 26 148EN**. 2013. JRC84156 (ISBN978-92-79-233129-9).