

## Validação de um método para detecção e quantificação de eventos de soja gm tolerante a herbicidas imidazolinonas por PCR convencional e quantitativo

---

CAMPOS-FILHO, P.J.<sup>1</sup>; LOPES, V.S.<sup>2</sup>; KUWAHARA, M. K.<sup>3</sup>; LOPES, I.O.N.<sup>3</sup>; ARIAS, C.A.<sup>3</sup>; MARCELINO, F.C.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Norte do Paraná - Unopar; <sup>2</sup>Centro Universitário Filadélfia - Unifil; <sup>3</sup>Embrapa Soja, francm@cnpso.embrapa.br

A Embrapa Soja vem desenvolvendo, em conjunto com a empresa BASF, um novo evento de soja transgênica resistente a herbicida, também conhecida como Soja *Cultivance*<sup>®</sup>. O evento geneticamente modificado teve inserido em seu genoma o gene *ahas*, de *Arabidopsis thaliana*, que promove resistência ao imazapyr, herbicida da família das imidazolinonas. Quando chegar ao mercado, espera-se que seja uma alternativa ao uso da soja RR, que vem sendo a única opção de soja transgene cultivada no Brasil, o que tem levado ao uso sucessivo de um mesmo herbicida, e conseqüente ocorrência de resistência.

Uma vez que venha a ser liberada para plantio e comércio, todo evento transgênico deve ser passível de ser detectado, pois há segregação dos mercados transgênico e convencional no país, além de quantificado, em cumprimento com o Decreto de Rotulagem (Nº 4.680 de 25 de abril 2003), que estabelece a obrigação de informar no rótulo a presença de transgênico desde que esta seja acima de 1 % da composição do produto final. Diferentes metodologias podem ser empregadas para a detecção, identificação e quantificação de eventos transgênicos, no entanto, a técnica de PCR (reação em cadeia da DNA polimerase) vem sendo a principal metodologia utilizada, pois apresenta custo relativamente baixo e possui alta sensibilidade, permitindo que o alvo

seja detectado tanto em produtos *in natura*, como grãos, farelo e ração, como em produtos processados, como os mais variados tipos de alimentos que apresentam soja em sua composição.

A validação de um método constitui um processo que visa a estabelecer características de performance e limitações do mesmo. Tem como objetivo garantir procedimentos uniformes, visando à obtenção de resultados robustos e com elevada repetibilidade. O emprego de métodos independentes, sem a consideração de alguns critérios mínimos de performance, tem levado a resultados altamente discrepantes em análises de detecção e quantificação de Organismos Geneticamente Modificados (OGMs) (Lipp et al., 2005).

O objetivo deste trabalho foi validar um método para detecção e quantificação do evento de soja *Cultivance*<sup>®</sup> pela técnica de PCR convencional e quantitativo. Foram avaliados os parâmetros de validação para as análises de detecção e quantificação de transgenes descritos pelo *Codex Alimentarius*, entre estes a especificidade, seletividade, sensibilidade. Posteriormente, serão avaliados a precisão e os limites de detecção (qualitativo) e quantificação (quantitativo) do método.

Para garantir a amplificabilidade, as amostras de soja foram testadas com *primers* específicos para o gene lectina, comumente empregado como referência endógena em soja. Para avaliar a seletividade, o DNA do evento *Cultivance*<sup>®</sup> foi misturado na mesma proporção (50 ng DNA soja *Cultivance*<sup>®</sup> + 50 ng de DNA de outros materiais) com DNA oriundo de amostras de outros eventos transgenes de soja (soja tolerante à seca eventos Dreb1A, Dreb2 e soja RR); além de amostras de milho transgênico (eventos Bt11 e Bt176). A especificidade foi testada pela capacidade do sistema de detecção amplificar apenas o fragmento específico presente nas amostras de soja *Cultivance*<sup>®</sup>. Para testar a sensibilidade, o DNA de uma amostra 100 % transgene para o evento *Cultivance*<sup>®</sup> foi diluído de modo a conter de 1000 a 1 cópia do gene-alvo. As reações de PCR convencional para o gene-alvo (*ahas*) e a referência endógena (lectina) foram conduzidas no termociclador modelo 7900

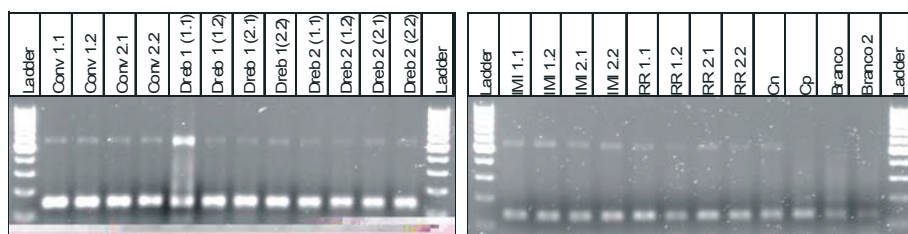
(Applied Biosystems), em um volume final de 25  $\mu$ L contendo 2,5 Mmol /L de cada dNTP, 1 U de Taq DNA polimerase, 0,4 pmoles de *primers*, 50 ng DNA molde, KCl 50 Mmol /L e MgCl<sub>2</sub> 1,5 Mmol /L. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em géis de agarose 1,2 % (p/v) contendo 0,1 mg/mL de brometo de etídeo, e visualizados por meio de luz ultravioleta. Para quantificação do evento *Cultivance*<sup>®</sup> será utilizado o sistema baseado na metodologia *TaqMan*<sup>®</sup>. Os *primers* e sondas específicos para os genes *ahas* e lectina foram desenhados utilizando o software Primer Express (Applied Biosystems) e marcados com diferentes fluoróforos. As amostras serão quantificadas utilizando o método de quantificação relativa baseada na construção de uma curva-padrão, utilizando padrões de calibração baseados em misturas do DNA genômico da soja *Cultivance*<sup>®</sup> com DNA de soja convencional nas proporções de 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 % e 0,0 1% do alvo transgênico com relação ao alvo endógeno. O logaritmo da porcentagem de transgene será plotado em função dos valores de delta Ct e a equação que descreve a variação dos valores de delta Ct em função da porcentagem de transgenes será gerada.

**Tabela 1.** Sequência de *primers* e sondas para análises em PCR convencional.

Gene	Sequência	Tamanho (pb)
<i>Ahas F-PCR QL</i>	5' ATA GGA AAGCGAAACTG 3'	310
<i>Ahas r-PCR QL</i>	5' CGAACACTGCTCTTAGCGAAAT 3'	
<i>Lec F-PCR QL</i>	5' GCCCTCTACTCCACCCCATCC 3'	118
<i>Lec R-PCR QL</i>	5' GCCCATCTGCAAGCCTTTTTGTG 3'	
<i>Ahas F-PCR QT</i>	5' CAAGAACATGTGTTGCCGATGAT 3'	71
<i>Ahas r-PCR QT</i>	5' CATCTCCTCCGTTATGACATCGTT 3'	
<i>Sonda-Ahas</i>	5' CCGAATGGTGGCACTTT 3	
<i>Lec F-PCR QT</i>	5' TCC CGA GTG GGT GAG GAT AG 3'	80
<i>Lec Rr-PCR QT</i>	5' CAT GCG ATT CCC CAG GTA TG' 3'	
<i>Sonda-Lec</i>	5' TCT CTG CTG CCA CGG GAC TCG 3'	

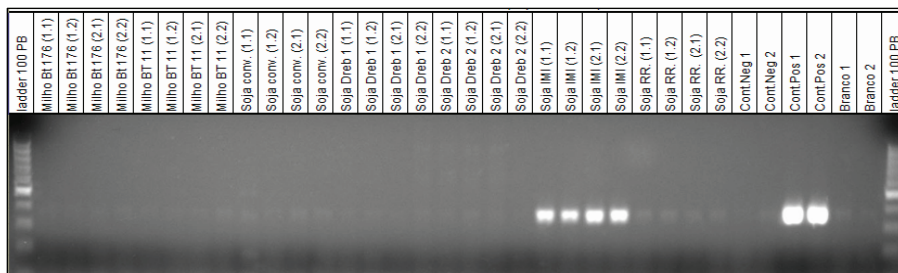
De acordo com os resultados dos ensaios em *PCR* qualitativo, após a extração de DNA, todas as amostras de soja foram capazes de ser amplificadas com *primers* para o gene lectina, indicando ausência de inibidores da reação de *PCR* (Fig. 1).

O sistema para detecção apresentou elevada especificidade, sendo detectada a presença do fragmento esperado, de 320 pb, apenas quando foi adicionado DNA da amostra de soja *Cultivance*<sup>®</sup> na reação. Em todos os eventos testados não foi observada a presença do fragmento transgênico correspondente (Fig. 2). De modo similar, a seletividade também foi satisfatória, permitindo que o evento transgênico fosse detectado em misturas de DNA com todos os eventos testados (Fig. 3).

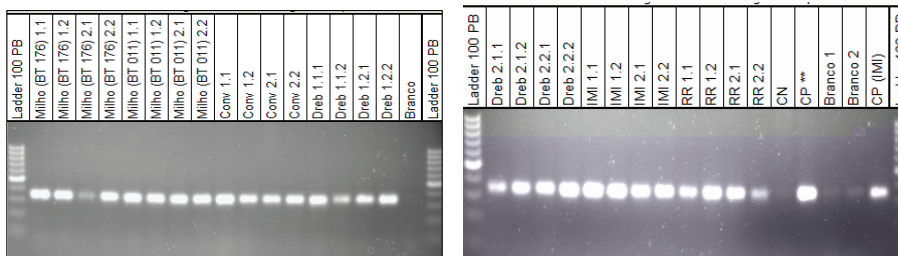


**Fig. 1.** Teste de Amplificabilidade do DNA das amostras de soja. O DNA das amostras de todos os eventos de soja transgene e convencional foi extraído e amplificado por *PCR* com *primers* específicos para o gene lectina. Cn-Controlle negativo e Cp-Controlle positivo. Os fragmentos foram separados por eletroforese.

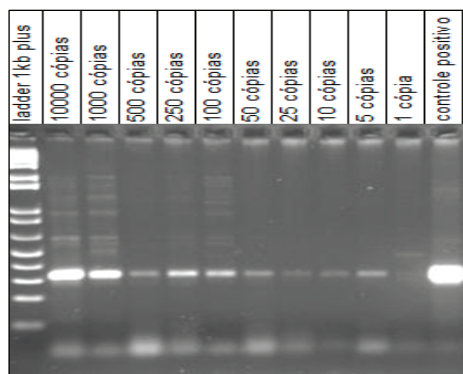
O teste de sensibilidade demonstrou que o evento foi capaz de ser detectado até quando pelo menos 5 cópias do gene-alvo estivessem presentes na reação (Fig. 4).



**Fig. 2.** Teste de Especificidade. O DNA das amostras de diferentes eventos de soja transgênica, (soja tolerante à seca, eventos Dreb1A e Dreb2, soja RR); além de amostras de milho transgenes (eventos Bt11 e Bt 176) foi amplificado com *primers* específicos para o gene *Ahas*, presente no evento de soja *Cultivance*<sup>®</sup>.



**Fig. 3.** Teste de Seletividade. O DNA do evento *Cultivance*<sup>®</sup> foi misturado na mesma proporção com DNA oriundo de amostras dos eventos de soja transgênica Dreb1A, Dreb2 e a soja RR, além de amostras de milho transgênico dos eventos Bt11 e Bt 176. As amostras foram amplificadas com *primers* específicos para o gene *Ahas*, presente no evento de soja *Cultivance*<sup>®</sup>. Cn-Controle negativo e Cp-Controle positivo.



**Fig. 4.** Teste de Sensibilidade.

Diferentes quantidades de DNA, 1000 a 1 cópia do evento *Cultivance*<sup>®</sup>, foram amplificadas com *primers* específicos para o gene *Ahas*, presente no evento de soja *Cultivance*<sup>®</sup>. Os fragmentos foram separados por eletroforese em géis agarose 1,2 %.

Dos parâmetros de desempenho avaliados até o momento, pode-se afirmar que o sistema apresenta qualidade satisfatória. As próximas análises visam a testar a precisão e limite de detecção do método, bem como executar a avaliação dos mesmos critérios na quantificação do percentual do transgene, em misturas contendo o evento *Cultivance*<sup>®</sup>.

## Referências

LIPP, M.; SHILLITO, R.; GIROUX, R.; SPIEGELHALTER, F.; CHARLTON, S.; PINERO, D.; SONG, P. Polymerase chain reaction technology as analytical tool in agricultural biotechnology. **Journal of AOAC International**, v. 88, p.136-154, 2005.