

## **IDENTIFICAÇÃO ESPECÍFICA E QUANTIFICAÇÃO DOS EVENTOS BT11, YIELDGARD E YIELDGARD VT PRO EM GRÃOS E FOLHAS DE MILHO.**

BEATRIZ DOS SANTOS **CORRÊA**<sup>1</sup>; HAIKO E. **SAWAZAKI**<sup>2</sup>; SILVIO H. **GRANDI**<sup>3</sup>;

EDUARDO **SAWAZAKI**<sup>4</sup>

**Nº 12117**

### **RESUMO**

A detecção e quantificação de organismo geneticamente modificado (OGM) são exigência em quase todos os países para os quais o Brasil exporta alimentos. Atualmente já existem no Brasil, as culturas de algodão, soja e milho geneticamente modificadas autorizadas para produção comercial. O objetivo deste trabalho foi otimizar métodos oficiais europeus existentes que utilizam o sistema de PCR em Tempo Real com Taqman, pelo uso do sistema mais barato com SYBR Green ou o BRYT™ Green, para identificar e quantificar os eventos transgênicos denominados Bt11, YieldGard e YieldGard VT Pro em grãos e folhas de milho. Foram analisadas 10 amostras com os cinco eventos: Bt11, YieldGard, YieldGard VT PRO, Herculex I e AG8088YGRR2 (MON810X RR2 ou NK603) e folhas de milho com evento desconhecido, tendo sido utilizado 40/50ng para cada amostra. Foi testada a especificidade de 16 iniciadores desenvolvidos através da interação genoma/inserto. Pela otimização das reações observou-se que os iniciadores diferenciaram especificamente os eventos de milho Bt11, YieldGard e YieldGard VT PRO. As reações das curvas padrão resultaram nos valores de eficiência de PCR para os iniciadores do gene Adh1, eventos Bt11, YieldGard e YieldGard VT PRO de, respectivamente, 0,94; 0,97; 0,93 e 0,95.

<sup>1</sup> Bolsista CNPq: Graduação em Biologia, PUCCAMP, Campinas-SP, biazinha.sc@hotmail.com

<sup>2</sup> Orientadora: Pesquisadora, CRGV/IAC, Campinas-SP.

<sup>3</sup> Bolsista FAPESP, Biólogo, Campinas-SP.

<sup>4</sup> Colaborador: Pesquisador, CGF/IAC, Campinas-SP.

## ABSTRACT

The detection and quantification of genetically modified organisms (GMOs) are required in almost all countries to which Brazil exports food. There are now in Brazil, cotton, soybeans and GM maize authorized for commercial production. The objective of this study was to optimize existing European official methods using the PCR system with Taqman Real-Time, by using the cheaper system with SYBR Green or Green BRYTTM to identify and quantify the transgenic events knowed as Bt11, YieldGard and YieldGard VT Pro in grains and leaves of corn. We analyzed 10 samples with five events: Bt11, YieldGard, YieldGard VT PRO, Herculex I and AG8088YGRR2 (RR2 MON810X or NK603) and corn leaves with unknown event, using 40/50 ng for each sample. The specificity of 16 primers developed through interaction genome / insert were tested. By optimization of reaction was observed that the primers specifically detected the corn events Bt11, YieldGard and YieldGard VT PRO. The reactions of standard curves resulted in values of PCR efficiency for gene Adh1, events Bt11, YieldGard and YieldGard VT PRO, of respectively, 0.94, 0.97, 0.93 and 0.95

## INTRODUÇÃO

Os organismos geneticamente modificados (OGMs) são organismos vivos, como plantas, animais ou microorganismos, cujo material genético foi alterado. (TOZZINI, 2004). É importante ter o conhecimento da estrutura básica de um OGM para compreender o princípio de alguns métodos utilizados na detecção destes organismos. Um inserto de um OGM é coposto por 3 elementos: o promotor, que regula a leitura do gene (transcrição); o gene de interesse, que determina a característica desejável e o elemento terminador (CONCEIÇÃO et al., 2004).

Os elementos do inserto são levados em consideração para a detecção, seja diretamente para o desenho de iniciadores usados na detecção do DNA recombinante ou indiretamente para a detecção de proteínas ou produtos derivados dos OGMs. A grande quantidade de OGMs que vem sendo aprovada no mundo nos últimos anos e a suspeita de que não sejam seguros para o consumo, o levaram a detecções e quantificações em alimentos e ingredientes alimentares (TOZZINI, 2004).

Há variações da técnica da PCR e a utilizada para análise dos produtos durante a amplificação, é a PCR em tempo real (PCR - TR). A quantidade de produto amplificado durante a reação é estimada diretamente pela mensuração da fluorescência emitida. Durante a reação, a inserção de uma sonda especial de DNA permite a detecção de fluorescência, onde no ensaio TaqMan<sup>TM</sup>, esta sonda contém

uma molécula de emissão (repórter) e uma molécula de extinção (quencher). A molécula de emissão e a de extinção, quando estão próximas fisicamente, a emissão de fluorescência é anulada, portanto, nenhum sinal é detectado.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizada a metodologia da Europa de quantificação relativa de acordo com o utilizado pela JRC Compendium of Reference Methods for GMO analysis (DELOBEL, et al, 2008; SAVINI et al, 2008; MAZZARA et al, 2009), mudando-se apenas o tipo original com Taqman para o sistema SYBR Green ou BRYTT<sup>TM</sup> Green. Foram utilizadas as amostras de sementes de milho DKB390YG e AS1572YG (YieldGard); Impacto TL (Bt11); AG8088PRO, DKB185PRO, DKB390PRO, AG8016pro (YieldGard VT PRO); 30F35 (não transgênica); 10F35HX(HerculexI); AG8088YGRR2 (MON810X RR2 ou NK603) e folhas com evento desconhecido.

### Extração de DNA

A extração de DNA foi feita com trezentos miligramas da amostra homogeneizada, pelo método Brometo de Cetil Trimetil Amônio (CTAB) de Cardarelli et al. (2005). Foram realizados testes para verificar a presença de inibidores fazendo-se as curvas-padrão dos DNAs diluídos sequencialmente e comparando-se o valor da diluição esperada de 40ng/μl com o valor obtido pela plotagem das leituras de Ct obtidas pela análise do gene da álcool desidrogenase (Adh1).

### PCR em Tempo Real

As reações e condições foram otimizadas para cada iniciador e realizadas no ABI 7500 Fast da Applied Biosystems para um volume de 15,0 μl com 7,5 μl do Mix SYBR ou BRYTT Green e 67 a 134nM dependente de cada iniciador com 1 etapa de 95 °C por 10/2 minutos (dependente do kit de fluorescência) seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s, anelamento com temperatura dependente dos iniciadores por 25s (1 min e 30 s para curva padrão) e extensão a 60°C por 15 s.

Otimização iniciadores: A otimização determina a concentração mínima dos iniciadores que fornece o menor CT com maior magnitude do sinal gerado pelas condições de PCR, enquanto minimiza amplificação não específica. Foram realizados as análises com as misturas de concentrações dos primers abaixo especificados:

Iniciador Reverso (nM)	Iniciador senso (nM)		
	50	300	900
50	50/50	300/50	900/50
300	50/300	300/300	900/300

900

50/900

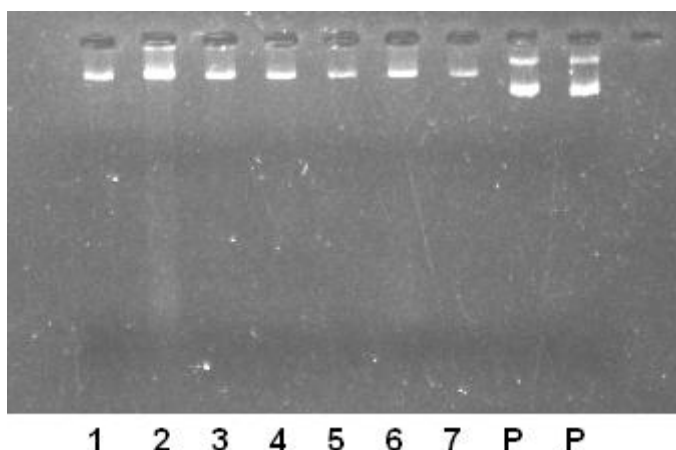
300/900

900/900

Para a quantificação relativa desenvolveu-se como iniciador de referência o baseado no gene *Adh1*. As curvas padrão foram realizadas com as diluições de S1 (20ng), S2(4ng), S3 (0,8ng) e S4 (0,16ng). Para a otimização da especificidade da reação de PCR em Tempo real as análises foram feitas com 40/50ng de DNA para cada amostra: .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta o perfil de 2µl de extração de DNA de várias amostras que pelo teste de inibidor mostraram pouca variação do valor esperado com o obtido pela curva padrão, confirmando a ausência de inibidor .



**FIGURA 1.** Amostras de DNA de milho: 2- DKB185 PRO, 2-AS1572 YieldGard, 3-2B710 HX, 4-30F35 normal, 5-30F35, 6-Impacto TL, 7-Maximus Viptera, P=Padrão PGEM de 40ng.

A extração de DNA de folhas deu resultado semelhante, assim como as análises que foram semelhantes as realizadas com DNA de grão.

A Tabela 1 apresenta os iniciadores desenvolvidos para reação com SYBR ou BRYT para serem evento-específico devido à interação genoma/inserto. São apresentados os dois pares de iniciadores estudados para cada evento, sendo que os com a terminação N foram os melhores.

**TABELA 1.** Sequência dos iniciadores utilizados para cada evento com as temperaturas em °C para o anelamento (*T<sub>a</sub>*) e dissociação (*T<sub>m</sub>*) e tamanho da amplificação em pares de bases (C)

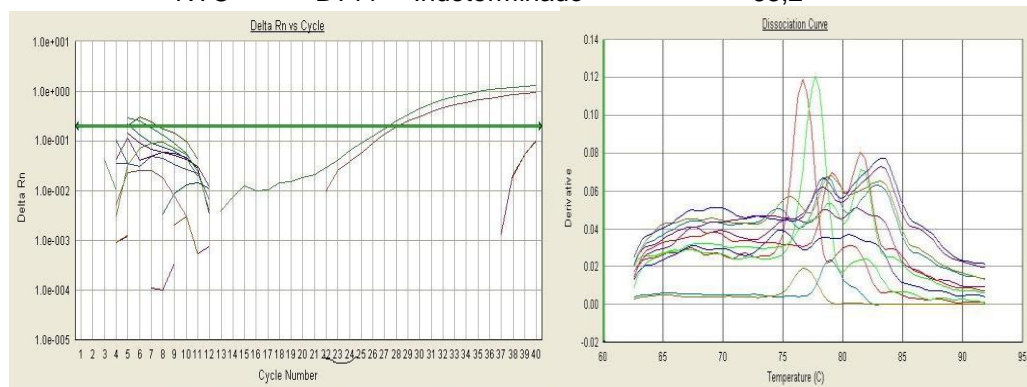
Iniciador/Nome comercial	Sequência 5'-3'	TTm	TTa	C
YGF/YieldGard	TCG AAG GAC GAA GGA CTC TAA CG	75	54	149

YGR/YieldGard	GGC AGA GGC ATC TTC AAC GA	74		
YGNF/YieldGard	GAC GAA GGA CTC TAA CGT TTA ACA	71	48	83
YGNR/YieldGard	ACC TTC CTT TTC CAC TAT CTT CAC	71		
Bt11F/Agrisure TL	GGG TTG TGT GGC CAT TTA TC	70	48	104
Bt11R/Agrisure TL	TGA CGC TCA GTG GAA CGA A	71		
Bt11NF/Agrisure TL	GGG TTG TGT GGC CAT TTA TCA TC	76	49	73
Bt11NR/Agrisure TL	ACG CTC AGT GGA ACG AAA ACT CA	77		
89034F/YG VT PRO	CAT ATT GAC CAT CAT ACT CAT	60	40	70
89034F/YG VT PRO	GTA TCT ATA ATA CCG TGG TTT	59		
89034NF/YG VT PRO	TTC TCC ATA TTG ACC ATC ATA CTC ATT GC	79	49	141
89034NF/YG VT PRO	AAG CTA GAT GTG CCA TGA AGA AAC TTT G	79		
ADHF	CCC GTC GTT TCC CAT CTC TTC CT	80	55	141
ADHR	TCC GAG ACC CTC AGT CCG ACA GT	80		
ADHNF	CCG TCG TTT CCC ATC TCT TCC T	77	53	128
ADHNR	AGT CCG ACA GTC CCT CAC CAG TTA	77		

A Tabela 2 apresenta a leitura dos Cts e a Figura 2 as curvas de amplificação e dissociação com o par de iniciadores Bt11NF e Bt11NR para 40 ng DNA de vários eventos em grãos de milho com a respectiva temperatura de dissociação (Tm). Verificou-se que embora tenha ocorrido amplificações para todos os eventos, a temperatura de dissociação foi diferente para os evento específicos Bt11, permitindo a diferenciação específica.

**TABELA 2.** Leitura dos Cts com o par de iniciadores Bt11NF e Bt11NR para 40 ng DNA de vários eventos em grãos de milho, com a temperatura de dissociação (Tm)

Eventos	Detector	Ct	StdDev Ct	Tm
Impacto TL	BT11	31,88	1,814	77,6
Impacto TL	BT11	29,32	1,814	78,3
DKB390YG	BT11	38,59	0,106	80,8
DKB390YG	BT11	38,44	0,106	80,8
AG8088RR2	BT11	36,28	0,797	82,6
AG8088RR2	BT11	35,15	0,797	79
DKB390PRO	BT11	37	1,528	81,2
DKB390PRO	BT11	34,83	1,528	81,2
30F35HX	BT11	35,85	0,367	82,6
30F35HX	BT11	35,33	0,367	82,6
NTC	BT11	Indeterminado		66,1
NTC	BT11	Indeterminado		68,2

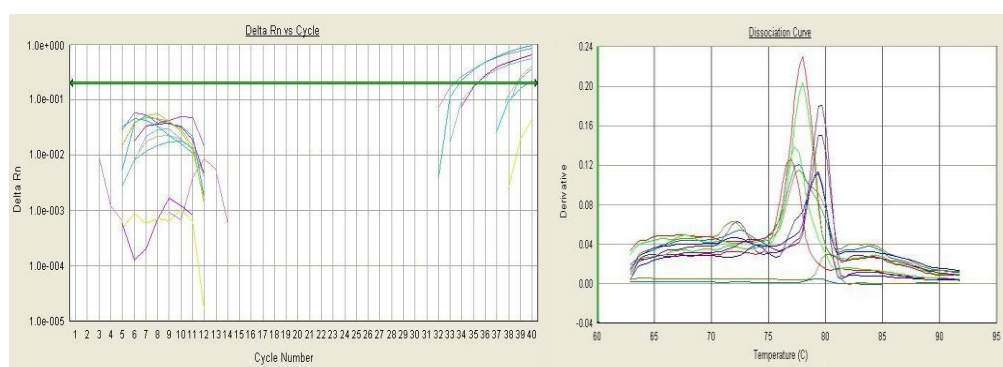


**FIGURA 2.** Curvas de amplificação e dissociação para 50 ng DNAs de vários eventos com os iniciadores Bt11FN e Bt11RN.

A Tabela 3 apresenta a leitura dos CTs com o par de iniciadores YGNF e YGNR para DNA de vários eventos em grãos de milho, com a respectiva temperatura de dissociação ( $T_m$ ). Verificou-se que para as amostras com o evento YieldGardian (DKB390PRO, DKB185PRO e AG8088RR2) as leituras de Ct foram menores confirmando a presença do evento. Embora a amostra 30F35Hx tenha apresentado leitura de Ct, é de maior valor e o  $T_m$  é diferente, podendo-se, portanto, diferenciar o evento YiedGard.

**TABELA 3.** Leitura dos CTs com o par de iniciadores YGNF e YGNR para DNA de vários eventos em grãos de milho, com a temperatura de dissociação ( $T_m$ )

Eventos	Detector	Ct	StdDev Ct	$T_m$
DKB390YG	Y Gard	29,5	1,325	76
DKB390YG	Y Gard	31,37	1,325	76,7
AS1572YG	Y Gard	31,16	0,015	77
AS1572YG	Y Gard	31,14	0,015	77,4
IMPACTO TL	Y Gard	Indeterminado		77,4
IMPACTO TL	Y Gard	39,35		77,4
AG8088RR2	Y Gard	33,83	0,137	77,7
AG8088RR2	Y Gard	33,64	0,137	77,4
30F35HX	Y Gard	36,49	0,703	79,1
30F35HX	Y Gard	37,48	0,703	79,1
NTC	Y Gard	Indeterminado		66,6
NTC	Y Gard	Indeterminado		87,2



**FIGURA 3.** Curvas de amplificação e dissociação de 40ng DNAs dos eventos da Tabela 3 com os iniciadores YGNF e YGNR.

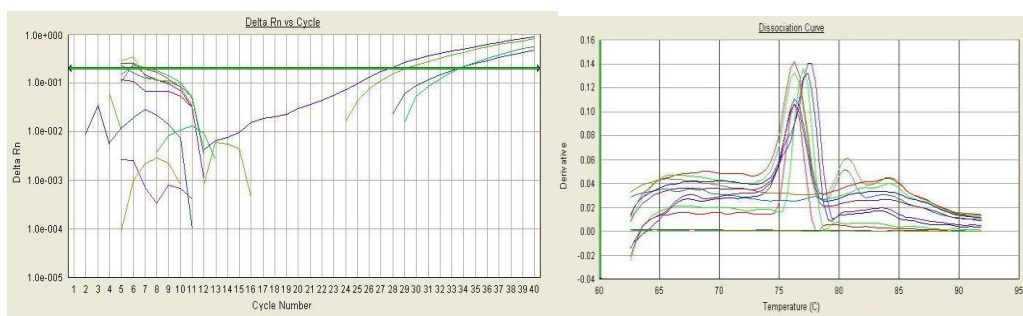
A Tabela 4 apresenta a leitura dos CTs com o par de iniciadores 89034NF e 89034NR para DNA de vários eventos em grãos de milho, com a temperatura de dissociação ( $T_m$ ). Verificou-se de acordo com a Tabela 4, que os CTs do evento VT



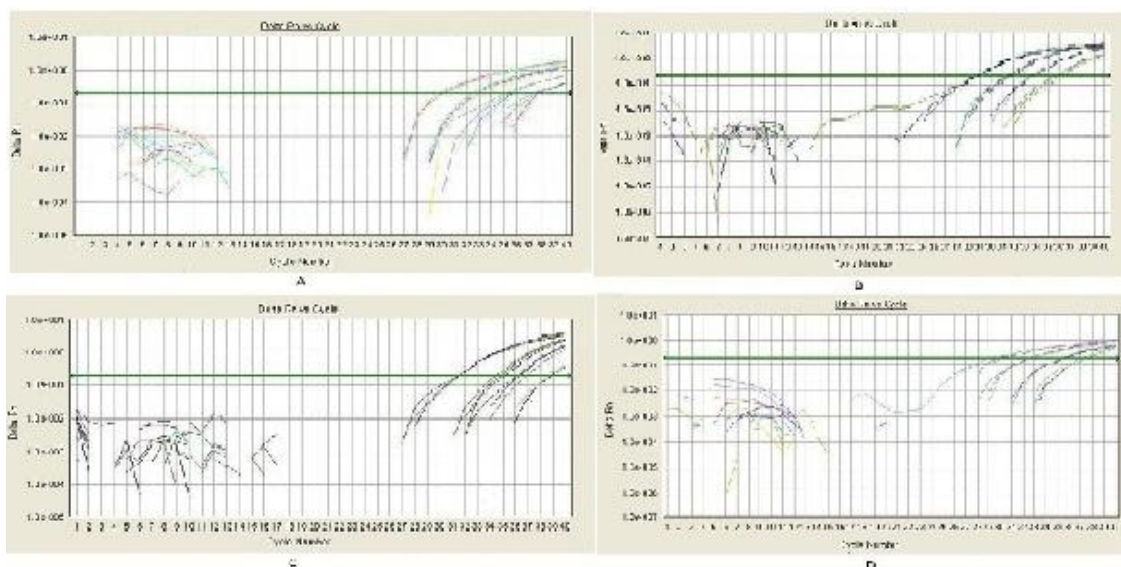
PRO só não diferenciaram a amostra Impacto TI, a qual, porém, teve leitura muito alta, portanto ocorrendo a diferenciação específica do evento YieldGard VT PRO.

**TABELA 4.** Leitura dos CTs com o par de iniciadores 89034NF e 89034NR para DNA de vários eventos em grãos de milho, com a temperatura de dissociação ( $T_m$ ).

Eventos	Detector	Ct	StdDev Ct	$T_m$
DKB390PRO	89034	34,37	0,637	77,4
DKB390PRO	89034	33,47	0,637	77,7
DKB185PRO	89034	38,31	1,769	77,4
DKB185PRO	89034	35,81	1,769	77,7
DKB390YG	89034	Indeterminado		80,1
DKB390YG	89034	Indeterminado		80,8
IMPACTO TL	89034	39,45	0,424	76,7
IMPACTO TL	89034	38,85	0,424	76,7
30F35HX	89034	Indeterminado		77
30F35HX	89034	Indeterminado		77
NTC	89034	Indeterminado		67,3
NTC	89034	Indeterminado		66,6



**FIGURA 4.** Curvas de amplificação e dissociação para 50 ng DNAs dos eventos da Tabela 4 com os iniciadores 89034NF e 89034NR



**FIGURA 5.** Curvas de amplificação das curvas padrão realizadas com as diluições de DNA S1, S2, S3 e S4 e com os iniciadores: A- ADHN; B- Bt11N; C- YGN; D- 89034, dos respectivos DNAs: 30F35 não transgênica, Impacto TL, DKB390YG e DKB390PRO.

Na Figura 5 são apresentadas as curvas de amplificação das curvas padrão realizadas com as diluições S1, S2 S3 e S4 dos DNAs das cultivares 30F35 não transgênica para o par de iniciadores ADHN, Impacto TL para o par de iniciadores Bt11N, DKB390YG para o par de iniciadores YGN e DKB390PRO para o par de iniciadores 38094N, cujas reações resultaram, respectivamente, nas eficiências de PCR de 0,94, 0,97; 0,93 e 0,95

## CONCLUSÃO

Verificou-se que os iniciadores desenvolvidos permitiram a diferenciação específica dos eventos de milho Bt11, YieldGard e YieldGard VT PRO.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo suporte financeiro

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARDARELLI, P.; BRANQUINHO, M.R.; FERREIRA, R.T.B.; CRUZ, F.P.; GEMAL, H.L.. Detection of GMO in food products in Brazil. The INCQS experience. **Food Control**, v.16, n.10, p.859-866, 2005.
- DELOBEL C.C., LARCHER S., MAZZARA M., VAN DEN EEDE G.; "Event-specific Method for the Quantification of Maize Event Bt11 Using Real-time PCR - Validation Report and Protocol" Online Publication DOI 10.2788/4370 (2008).
- MAZZARA, M.; GRAZIOLI E.; SAVINI C., VAN DEN EEDE G. Report on the verification of the performance of a MON810 Event-specific method on Maize line MON810 using Real time PCR- Online publication DOI 10.2788/59036 (2009)..
- PETIT, L. BARAIGE, F.;BALOIS, A-M.; BERTHEAU, Y.; FACH, P. Screening of genetically modified organisms and specific detection of Bt176 maize in flours and starches by PCR-enzyme linked immunosorbent assay. **European Food Research and Technology**, v.217, n.1, p.83-89, 2003.
- SAVINI C., BOGNI A., GRAZIOLI E., MUNARO B., MAZZARA M., VAN DEN EEDE G. "Event-specific Method for the Quantification of Maize Line MON89034 Using Real-time PCR - Validation Report and Protocol" Online Publication DOI 10.2788/68713 (2008).