

Validação de um método para detecção e quantificação de soja *Cultivance*[®] tolerante a herbicidas imidazolinonas por PCR convencional e quantitativo

LINO, E. J¹; KUWAHARA, M. K².; ARIAS, C. A².; MARCELINO, F.C.². ¹Universidade Estadual de Londrina; ²Embrapa Soja.

e-mail: francm@cnpso.embrapa.br_

Introdução

A Soja *Cultivance*[®] é o mais recente evento de soja aprovada para plantio e comércio no Brasil, em dezembro de 2009, pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). O evento foi desenvolvido pela Embrapa Soja e a empresa BASF, e teve inserido em seu genoma o gene *ahas* (ácido-hidroxiacético sintetase), de *Arabidopsis thaliana*, que promove resistência a herbicidas da família das imidazolinonas. Uma vez liberada para plantio e comércio, todo evento transgene deve ser passível de ser detectado, uma vez que há segregação dos mercados transgene 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 transgene, no entanto a técnica de PCR (reação em cadeia da DNA polimerase) vem sendo a principal metodologia utilizada, pois apresenta custo relativamente baixo, possui alta sensibilidade, o que permite 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 (LIPP *et al.*; 2005).

O objetivo deste trabalho foi validar um sistema para detecção e quantificação do evento de soja *Cultivance*[®] pela técnica de PCR convencional e quantitativo utilizando parâmetros de validação descritos pelo *Codex Alimentarius*, entre estes a especificidade, seletividade, sensibilidade, precisão, seletividade e os limites de detecção (qualitativo) e quantificação (quantitativo) do método.

Material de Métodos

Para validação da detecção e quantificação do alvo *ahas* foram utilizadas amostras de soja *Cultivance*[®] e convencional, ambas obtidas no Banco de Germoplasma (BAG) da Embrapa Soja. Para o desenho dos primers e sondas específicos para os genes *ahas* e lectina foi utilizado o software Primer Express (Applied Biosystems) (Tabela 1).

Para garantir a amplificabilidade, as amostras de soja foram testadas com primers específicos para o gene lectina, comumente empregado como referência endógena (RE) em soja. A robustez do método foi realizada variando as concentrações de primers, sondas, MgCl₂ e a temperatura de anelamento. No teste de seletividade, o DNA do evento *Cultivance*[®] foi misturado na mesma proporção (50ng DNA soja *Cultivance*[®] + 50 ng de DNA de outros materiais) com DNA oriundo

de amostras de outros eventos transgenes de soja (soja tolerante a seca – P2193 e soja RR); além de amostras de milho transgenes (eventos Bt11, Bt176, Yildgard® e Liberty Link®). A especificidade foi testada pela capacidade do sistema de detecção amplificar apenas o fragmento específico presente nas amostras de soja Cultivance®. Para testar a sensibilidade, o DNA de uma amostra 100% transgene para o evento Cultivance® foi diluída de modo a conter de 1000 a 1 cópia do gene alvo. As reações de PCR convencional foram conduzidas no termociclador modelo 7900 (Applied Biosystems), em um volume final de 25 µL contendo 2,5 Mmol /L de cada dNTP, 1 U de Taq DNA polimerase, 0,2 µmoles de primers, 125 ng DNA molde, KCl 50 Mmol /L e MgCl₂ 2,5 Mmol /L. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em géis de agarose 1,2% (p/v), e visualizados por meio de luz ultravioleta. Para determinar o Limite de Detecção (LOD), percentuais variando de 0.01, 0.1, 0.5, 1.0 de DNA transgene em relação ao DNA não transgênico foram testados em 10 replicatas. O percentual de falso negativo foi determinado pela razão entre o número de amostras classificadas erroneamente como negativas pelo número total de amostras analisadas. Para quantificação do evento Cultivance® foi desenvolvido o sistema baseado na metodologia TaqMan®. As reações foram padronizadas de modo a conter, em um volume final de 25 µL, 12,5 µL de TaqMan PCR Master Mix 2X, de 0,5 µM dos primers e 0,4 µM de sonda para o alvo lectina e 0,64X do Assay específico para o alvo ahas, 125 ng de DNA, sendo o volume final completado com água milliQ. Os parâmetros de ciclagem para as reações de amplificação foram: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 2 min, 60°C por 1 min, sendo coletados os dados nesta última etapa. A seletividade e especificidade foram determinadas utilizando as mesmas amostras testadas na PCR convencional, baseando-se nos valores mínimos e máximos de Ct obtidos. A linearidade do sistema foi determinada pela amplificação de amostras 100% transgênicas diluídas serialmente variando de 100 a 10⁻⁵. O logaritmo da diluição foi plotado em função dos valores de Ct, para o gene alvo e a RE, e a equação que descreve a variação dos valores de Ct em função da diluição foi gerada. Os valores de eficiência de cada sistema foram determinados pela fórmula $E = 10^{-1/\text{slope}}$.

Tabela 1 – Sequencia de primers e sondas para análises em PCR convencional e quantitativo.

<i>Gene</i>	<i>Sequência</i>	<i>Tamanho (pb)</i>
<i>RT-IMI F-PCR QL</i>	5' CGATCCTCTCAGAGATTTGCTAA 3'	890
<i>RT-IMI R-PCR QL</i>	5' GAATAAGAATGGAGAATTTGGCTACAA 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' CATCTCCTTCCGTTATGACATCGTT 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 R-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'	

* QL – primers para a PCR qualitativa; QT – primers para a PCR quantitativa

Resultados

Todas as amostras foram extraídas com sucesso e amplificadas com primers para o gene lectina, indicando ausência de inibidores da reação de PCR, tanto na PCR qualitativa (Figura 1) como na quantitativa. Neste caso o valor máximo de Ct (cycle threshold) obtidos para o alvo lectina, tanto nos testes de especificidade quanto de seletividade foram inferiores a 30, em todas as amostras de soja avaliadas.

O sistema para detecção apresentou elevada especificidade, sendo detectada a presença do fragmento esperado, de 890 pb, apenas quando DNA da amostra de soja Cultivance® foi utilizado na reação (Figura 2). Na análise quantitativa a especificidade pode ser considerada satisfatória, uma vez que todos eventos transgenes de milho apresentaram valores de Ct superiores a 34, enquanto para amostras de soja, superiores a 30, com exceção para a amostra de soja do evento P2193, que apresentou valores de Ct médio de 28,22. Para uma especificidade elevada, os valores de Ct para alvos não específicos devem ser superiores a 35 (Tabela 2).

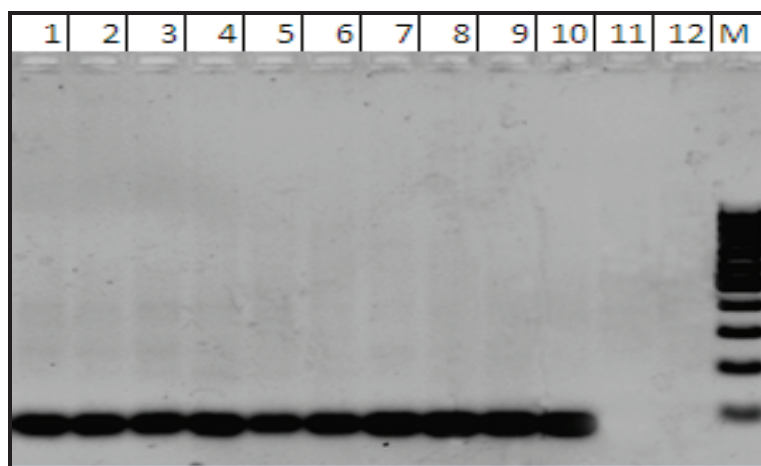


Fig 1 – Teste de Amplificabilidade do DNA das amostras de soja. 1 e 2- soja convencional; 3 e 4 - soja tolerante a seca P2193; 5 e 6- soja BtRR2; 7 e 8 - soja RR; 9 e 10 - soja Cultivance®; 11 e 12 – branco; M-marcador 100 pb. O DNA das amostras foi amplificado por PCR com primers específicos para o gene lectina. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2% p/v.



Fig 2 – Teste de Especificidade. O DNA das amostras de diferentes eventos de soja transgene, 1 e 2 - soja tolerante a seca P2193, 3 e 4 - milho Bt11, 5 e 6 - Milho Bt176, 7 e 8 - Yildegard, 9 e 10 - Liberty Link, 11 e 12 - milho convencional, 13 e 14 - soja RR, 15 e 16 - soja BtRR2, 17 e 18 - soja Cultivance®, 19 e 20 - soja convencional, 21 e 22 - soja Cultivance® 100%, 23 e 24 - soja Cultivance® 1%, 25 e 26- soja Cultivance® 0,5%, 27 e 28 - controle negativo, 29 e 30 - branco e M - marcador 1 Kb plus, foi amplificado com primers específicos para o gene *Ahas*, presente no evento de soja Cultivance®.

Tabela 2 – Seletividade e Especificidade das análises de quantificação de amostras de soja Cultivance® por PCR quantitativo.

Amostra	Especificidade				Amostra	Seletividade			
	Ct Alvo	SD	Ct RE	SD		Ct Alvo	SD	Ct RE	SD
P2193	28,22	0,434	25,99	0,952	P2193 + imi	21,22	0,473	26,28	0,122
Bt 176	35,37	0,289	34,29	0,263	Bt 176 + imi	25,26	0,268	27,68	0,227
Yildegard	35,01	0,784	34,19	0,577	Yild. + imi	25,44	0,724	28,08	0,569
L. Link	34,53	0,998	34,68	1,241	L. Link + imi	25,18	0,076	28,43	0,949
Milho conv	35,11	0,661	35,34	1,611	Milho + imi	25,39	0,458	27,85	0,273
Bt 11	35,71	2,106	33,15	0,208	Bt 11+ imi	25,50	0,342	28,96	1,500
RR	32,35	2,780	27,77	0,208	RR + imi	24,55	0,705	25,45	0,422
BtRR2	30,70	0,004	29,43	0,016	BtRR2 + imi	24,58	0,516	26,08	0,170
IMI	25,06	0,432	26,68	0,173	IMI + imi	25,93	1,507	27,47	1,290
Soja conv	31,52	2,880	27,53	1,223	Soja conv + imi	28,00	2,997	26,49	0,101

SD: desvio padrão Ct RE: cycle threshold da referência endógena

A seletividade apresentou resultados satisfatórios, permitindo que o evento transgene fosse detectado em misturas de DNA da soja *Cultivance*® com todos os eventos testados (Figura 3). Resultados similares foram obtidos na PCR quantitativa, onde todas as amostras contendo DNA do evento *Cultivance*®, mesmo na presença de outros eventos, apresentaram valores de Ct em média, em torno de 25 (Tabela 2).

O teste de sensibilidade demonstrou que o evento foi capaz de ser detectado até quando pelo menos 50 cópias do gene alvo estivessem presentes na reação qualitativa (Figura 4). O limite de detecção foi estabelecido em 0,1% sem ocorrência de falsos negativos (0%). Ainda, para o sistema qualitativo não foi observado a ocorrência de resultados falso positivos nas 10 repetições avaliadas.

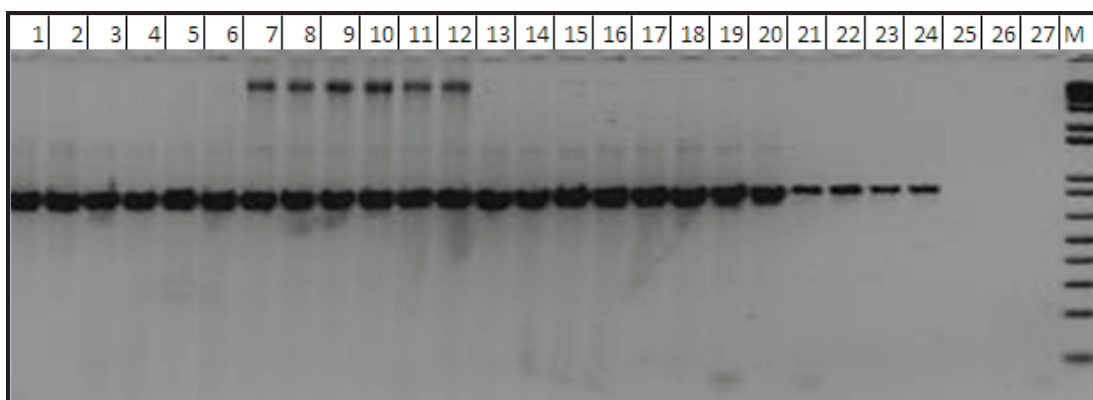


Fig 3 – Teste de Seletividade. O DNA do evento *Cultivance*® foi misturado na mesma proporção com DNA oriundo de amostras dos eventos de soja transgenes 1 e 2–soja tolerante a seca P2193, 3 e 4- milho Bt11, 5 e 6- Milho Bt176, 7 e 8- Yildegard, 9 e 10- Liberty Link, 11 e 12- milho convencional, 13 e 14- soja RR, 15 e 16 soja BtRR2, 17 e 18- soja convencional, 19 e 20- IMI 100%, 21 e 22- IMI 1%, 23 e 24 – IMI 0,5%, 25 e 26- controle negativo, 27 – branco e M-marcador 1 Kb plus. As amostras foram amplificadas com primers específicos para o gene *ahas* (IMI), presente no evento de soja *Cultivance*®,

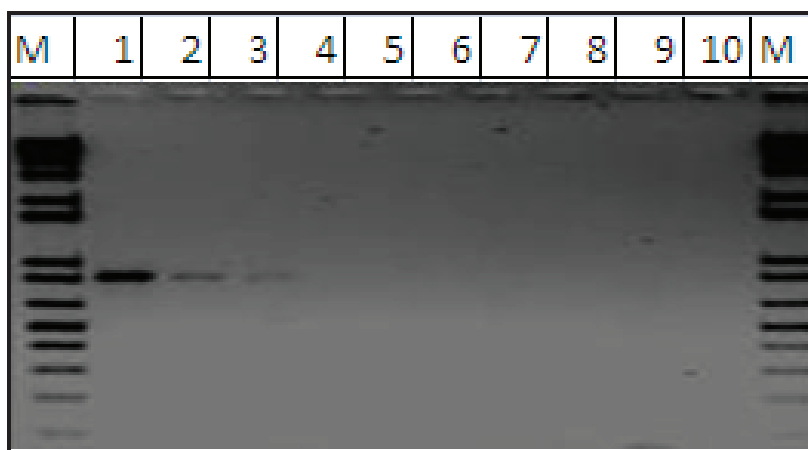


Fig 4 - Teste de Sensibilidade. Diferentes quantidades de DNA, 1000 a 1 cópia do evento *Cultivance*® (canaleta 1- 1000 copias, 2- 100, 3- 50, 4- 25, 5- 10, 6-5, 7-1, 8-0 cópias, 9- branco e M-marcador 1 Kb) foram amplificadas com primers específicos para o gene *Ahas*, presente no evento de soja *Cultivance*®.

A linearidade do método quantitativo pode ser avaliada a partir da inclinação da reta (coeficiente angular) obtida a partir dos valores de Ct alvo e Ct endógeno (Tabela 3).

Tabela 3 – Análise da linearidade do sistema para quantificação de amostras de soja evento *Cultivance*®.

	Equação da reta	R quadrado	Eficiência	Sensibilidade
Ct alvo	$Y = -3,109 + 21,79$	$R^2 = 0,999$	2,097234	3,109
Ct endógeno	$Y = -2,307 + 20,76$	$R^2 = 0,974$	2,713085	2,307

Visto que ainda não existem padrões de referência certificados (CRM) disponíveis para o evento transgene analisado, para dar continuidade a este trabalho, futuramente, serão desenvolvidos padrões de calibração baseados em misturas do DNA genômico da soja Cultivance® com DNA de soja convencional nas proporções de 50%, 25%, 10%, 5%, 2,0%, 1%, 0,5%, 0,1% e 0,01% do alvo transgênico com relação ao alvo endógeno. Amostras com quantidades conhecidas de percentual de soja transgene serão utilizadas para confirmar a qualidade da curva e dos padrões de calibração, e para determinar acuracidade, precisão, faixa de trabalho e limite de quantificação do sistema.

Dos parâmetros de desempenho avaliados até o momento, pode-se afirmar que o sistema apresenta qualidade satisfatória, principalmente para as análises de detecção. Nas análises quantitativas, serão avaliados ainda outras concentrações de primers presentes nas reações multiplex, bem como temperatura de anelamento, a fim de elevar a especificidade do método.

Referências

LIPP, M.; SHILLITO, R.; GIROUX, R.; SPIEGELHALTER, F.; CHARLTON, S.; PINERO, D.; SONG, P. (2005). Polymerase Chain Reaction Technology as Analytical Tool in: **Agricultural Biotechnology J. AOAC Int.** 88:136-9154.