

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS
ALIMENTOS

GUSTAVO LUIZ VENTURELLI

DESENVOLVIMENTO DE INICIADORES E SONDA ESPÉCIE-
ESPECÍFICOS PARA QUANTIFICAÇÃO POR PCR EM TEMPO
REAL DE FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.) EM ALIMENTOS

Florianópolis
2014

Gustavo Luiz Venturelli

**Desenvolvimento de iniciadores e sonda espécie-específicos
para quantificação por PCR em tempo real de feijão
(*Phaseolus vulgaris* L) em alimentos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Ana Carolina
Maisonave Arisi

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Venturelli, Gustavo Luiz

Desenvolvimento de iniciadores e sonda espécie-específicos para quantificação por PCR em tempo real de feijão (*Phaseolus vulgaris* L) em alimentos / Gustavo Luiz Venturelli ; orientadora, Ana Carolina Maissonave Arisi - Florianópolis, SC, 2014.

102 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. Feijão. 3. OGM. 4. qPCR. 5. Rotulagem. I. Arisi, Ana Carolina Maissonave. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade e capacitação para realização deste trabalho;

Aos meus pais, Valcemir e Elenir por me apoiarem e incentivarem todo o tempo. Também ao meu irmão Guilherme, por ser um companheiro para todas as coisas;

A professora Dra. Ana Carolina Maisonnave Arisi, pela oportunidade e orientação;

Aos meus colegas de laboratório, pela amizade e suporte ao longo destes dois anos. Especialmente ao Dr. Fábio Cristiano Angonesi Brod;

A Embrapa, pelo fornecimento das amostras para realização deste trabalho. Especialmente ao Dr. Josias de Corrêa Faria;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos, que possibilitou a realização desta dissertação;

Ao programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos e a Universidade Federal de Santa Catarina pela oportunidade;

A todas as pessoas que, de forma direta ou indireta, me auxiliaram na realização deste trabalho.

Porque dele e por ele, e para ele, são todas
as coisas; glória, pois, a ele eternamente.
Amém.

Romanos 11:36

VENTURELLI, Gustavo Luiz. **Desenvolvimento de iniciadores e sonda espécie-específicos para quantificação por PCR em tempo real de feijão (*Phaseolus vulgaris* L) em alimentos.** 2014. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

RESUMO

A cada ano, no Brasil, o número de aprovações para eventos geneticamente modificados cresce, bem como a área plantada de culturas transgênicas. Uma vez que no Brasil a legislação exige que produtos que contenham mais de 1% de organismos geneticamente modificados (OGM) em sua composição sejam rotulados, a identificação e quantificação destes OGM se fazem necessária. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método de detecção e quantificação, por PCR em tempo real, para o feijoeiro GM Embrapa 5.1 a partir de uma nova referência endógena táxon-específica para *Phaseolus vulgaris*, tendo como alvo uma sequência de um gene de proteína. Para isso, três genes candidatos foram selecionados e os iniciadores testados com SYBR Green. O ensaio para o gene da Arcelina não apresentou amplificação. Ambos os ensaios para o gene da Lectina e Faseolina apresentaram especificidade esperada, entretanto o da Lectina apresentou maior especificidade e eficiência. Uma sonda TaqMan foi então desenhada, para tornar o ensaio da Lectina ainda mais específico. A especificidade do ensaio LEC foi testada com 50 amostras de feijão, provenientes de dois pools genéticos, Andino e Mesoamericano e 15 amostras de controle negativo. O ensaio táxon-específico FEI, previamente desenvolvido, foi testado com 44 amostras de feijão, a fim de comparação com o ensaio LEC. As amostras de DNA de feijão apresentaram a amplificação esperada para ambos os ensaios, LEC e FEI, apresentando um Ct médio de $20,3 \pm 0,73$ e $26,34 \pm 1,26$, respectivamente. Isto sugere que o ensaio LEC possui uma especificidade maior que o ensaio FEI. A alta homogeneidade apresentada capacita o ensaio LEC a detectar variedades de feijão dos dois pools genéticos existentes. O ensaio LEC apresentou amplificação com Ct tardio (Ct > 35) para quatro amostras negativas, porém em apenas algumas reações onde foram testadas. As eficiências do método LEC foram testadas

com as amostras Pérola, Pérola GM, Pontal e Pontal GM e variaram de 92% a 101% com o R^2 variando entre 0,994 e 0,998. O limite de detecção para o método foi de 10^1 cópias de DNA genômico. Os resultados obtidos com o ensaio LEC estão dentro dos parâmetros propostos pelo *European Network of GMO Laboratories* (ENGL), podendo, desta forma, o ensaio ser utilizado em estudos de análise de feijão GM. Além disso, os iniciadores desenvolvidos podem ser utilizados para quantificação e detecção tanto do feijão convencional quanto do feijoeiro Embrapa 5.1 com ambos os sistemas de PCR, TaqMan e SYBR Green.

Palavras-chave: feijão. OGM. PCR. qPCR. Rotulagem.

VENTURELLI, Gustavo Luiz. **Development of specie-specific primers and probe for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) quantification by real time PCR in foods.** Dissertation (MsC in Food Science) – Postgraduate Program in Food Science, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC.

ABSTRACT

Every year the number of approvals for genetically modified events grows in Brazil as well as the area of cultivated transgenic crops. Once Brazilian legislation requires the labeling on products containing > 1% of GMOs in its composition, methods for the detection and quantification of new GMOs are necessary. The aim of the present work was to develop a new real time PCR assay for the detection and quantification of the GM common bean Embrapa 5.1 using a new taxon-specific endogenous reference targeting a coding gene of *Phaseolus vulgaris*. Three genes encoding common bean proteins were chosen and tested using SYBR Green chemistry. The assay for the Arcelin gene did not show amplification. Both Lectin and Faseolin assays showed the expected specificity although the Lectin assay presented higher specificity and efficiency. A TaqMan probe was then designed in order to develop a more specific detection method. The specificity of LEC assay was tested for 50 common bean samples from two gene pools, Andean and Mesoamerican, and 15 negative control samples. The previously developed taxon-specific FEI assay was evaluated by testing forty-four *Phaseolus vulgaris* varieties in order to compare with LEC assay. These common bean DNA samples presented the expected amplification signal and the mean Ct was 20.3 ± 0.73 and 26.34 ± 1.26 for LEC and FEI assays, respectively. It suggests that LEC assay has higher specificity than FEI assay. The high homogeneity makes the LEC assay able to reliably detect common bean varieties from both gene pools. LEC assay presented amplification at late Ct (Ct value > 35) in few reactions of four negative samples. The efficiencies of LEC method were performed using non-GM Pérola, non-GM Pontal, GM Pérola and GM Pontal samples and they ranged from 92% to 101% and R^2 ranged from 0.994 to 0.998. Moreover, this assay presented a limit of detection of 10^1 genome copies. The results showed that the LEC assay meets the requirements proposed by the ENGL

and it can be used in further studies of GM common bean analyses. Furthermore, the primers and probe developed in this work are suitable for both real time PCR detection chemistries, TaqMan and SYBR Green and they are suitable to detect and quantify either GM and non-GM common bean.

Keywords: common bean. GMO. PCR. qPCR. labeling

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1.1: Mapa do fragmento pBGMVRNAiAHAS contendo o gene *ahas* e o cassete AC1. O fragmento de interferência AC1 foi clonado com orientação senso e antisenso.....35
- Figura 1.2: Representação dos níveis de especificidade do módulo de PCR.....41
- Figura 1.3: Gráfico de amplificação apresentando o limiar de detecção (*threshold*) e o ciclo *threshold*.....43

Capítulo 2

- Figura 2.1: Curva padrão Taqman usando sonda LEC. A curva foi gerada a partir de quatro amostras de DNA (duas variedades de feijão transgênicas e duas variedades isogênicos não GM) em duplicata e três extrações de DNA independentes, realizadas em dias diferentes (n = 24).....64
- Figura 2.2: Valores de Ct obtidos utilizando os ensaios LEC (◇) e FEI (●) e DNA extraídos de diferentes variedades de feijão. Linha contínua: representa o valor médio de Ct para todas as variedades amplificadas com ensaio FEI. Linha tracejada: representa o valor médio de Ct para todas as variedades amplificadas com ensaio LEC.....66

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1.1 - Listagem de OGM autorizados no Brasil.....	31
---	----

Capítulo 2

Tabela 2.1 – Iniciadores e sonda desenhados para detecção taxon-específica de feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	57
Tabela 2.2 – Valores de Eficiência (E) da PCR e coeficiente de correlação (R ²) para as curvas padrão do ensaio SYBR Green usando PvLECF/PvLECR (500 nM) e amostras de DNA extraídas a partir de duas variedades de feijão GM e não GM (Pérola e Pontal) com os protocolos DNeasy kit e CTAB.....	60
Tabela 2.3 – Valores de Eficiência (E) da PCR e coeficiente de correlação (R ²) das curvas padrão para o ensaio TaqMan utilizando três concentrações de sonda PvLEC e amostras de DNA das amostras de feijão GM e não-GM (variedade Pérola) extraídas com os protocolos de extração DNeasy kit e CTAB.....	62
Tabela 2.4 – Valores de Eficiência (E) da PCR e coeficiente de correlação (R ²) das curvas padrão para o ensaio TaqMan usando amostras de DNA extraídas de duas variedades de feijão GM e não-GM (Pérola e Pontal) em três experimentos independentes.....	64
Table 2.5 – Valores de Ct médio obtido através do ensaio TaqMan (Sonda LEC 250 nM e iniciadores PvLECF/PvLECR 500 nM) e DNA extraídos dos controles negativos.....	67

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	21
CAPÍTULO 1.....	25
1. Revisão Bibliográfica.....	26
1.1. OGM na Agricultura.....	26
1.1.1. Plantas geneticamente modificadas.....	26
1.1.2. Cultivo de OGMs.....	28
1.2. Feijoeiro EMBRAPA 5.1.....	35
1.3. Rotulagem de alimentos GM.....	36
1.4. Detecção de OGMs por PCR.....	38
1.5. Quantificação de OGM por PCR em tempo real.....	41
1.5.1. Gene de referência endógena.....	46
CAPÍTULO 2.....	51
2. Uma referência endógena específica para o feijão comum (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) geneticamente modificado para quantificação de DNA por PCR em tempo real tendo como alvo o gene da lectina.....	52
2.1. INTRODUÇÃO.....	54
2.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
2.2.1. Material Vegetal.....	55
2.2.2. Extração de DNA.....	56
2.2.3. Primers and probe design.....	56
2.2.4. Condições da PCR em tempo real.....	57
2.2.5. Construção das curvas padrão.....	58
2.2.6. Especificidade do ensaio de referência endógena.....	59
2.3. RESULTADOS.....	59

2.3.1.	Especificidade do ensaio SYBR Green.....	59
2.3.2.	Parâmetros das reações para o ensaio SYBR Green.....	61
2.3.3.	Parâmetros da reação para o ensaio Taqman.....	62
2.3.4.	Repetibilidade do ensaio Taqman.....	63
2.3.5.	Especificidade e homogeneidade do ensaio de referência endógena Taqman.....	65
2.4.	DISCUSSÃO	67
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
	APÊNDICE.....	87

INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor de cultivares geneticamente modificados (GM), com uma área de 36,6 milhões de hectares plantados, ficando atrás apenas dos Estados Unidos. Segundo James (2012), em 2012, pelo quarto ano consecutivo, o Brasil aumentou sua área de produção de cultivo de plantas GM mais do que qualquer outro país do mundo. Isso se deve muito a um sistema rápido de aprovação de novos cultivares GM, que permitiu ao Brasil ter 18 novas variedades transgênicas aprovadas desde 2010 (CTNBio). O grande destaque dessas aprovações é o evento EMBRABA 5.1, que foi o primeiro feijoeiro resistente a vírus e desenvolvido exclusivamente com recursos públicos brasileiros.

O feijão é uma leguminosa cultivada em aproximadamente 100 países, envolvendo um grande número de gêneros e espécies, sendo o Brasil o maior produtor (VIEIRA, 2011; MAPA) e consumidor deste vegetal. O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é um dos cultivares de elevada relevância socioeconômica para o Brasil (RICHETTI et al., 2011), consistindo em um dos principais componentes de nossa dieta alimentar, sendo responsável por importantes fontes de proteína vegetal, em especial para a população de baixa renda (EMBRAPA, 2005). O Ministério da Agricultura (MAPA) estima que 70% dos brasileiros consomem feijão diariamente.

Apesar de ser o maior produtor mundial de feijão, o Brasil não supre sua demanda interna. Isso se deve as grandes perdas que ocorrem nas safras, sendo que um dos principais agentes causadores dessas perdas é o vírus do mosaico dourado.

O feijoeiro EMBRABA 5.1 apresenta resistência ao vírus do mosaico dourado (ARAGÃO, FRANCISCO J et al., 2013). As pesquisas para produção deste evento GM foram desenvolvidas em parceria por duas unidades da Embrapa: Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília, DF) e Arroz e Feijão (Goiânia, GO). As novas variedades garantem vantagens econômicas e ambientais, com a diminuição das perdas, garantia das colheitas e redução da aplicação de produtos químicos no ambiente (BONFIM et al., 2007; EMBRAPA, 2011).

O aumento do uso de plantas GM como alimento tem gerado discussões sobre sua biossegurança, e as questões

relacionadas ao comércio internacional de alimentos que são oriundos da biotecnologia moderna tem se intensificado, sendo uma tendência cada vez maior distinguir pela rotulagem os alimentos de origem GM daqueles que não são (MIRAGLIA et al., 2004).

Com a entrada do feijão GM EMBRAPA 5.1 no mercado brasileiro, a capacidade de detectar este evento se tornou uma necessidade legal (DINON et al., 2012). Um método para quantificação do feijão Embrapa 5.1 foi desenvolvido, sendo chamado de ensaio OLA, e teve como alvo o DNA recombinante presente neste evento GM. Neste mesmo trabalho, foi desenvolvido o ensaio FEI, para quantificação de *P. vulgaris*, porém apresentou resultados variáveis entre as amostras de feijão testadas (DINON et al., 2012). Atualmente, a legislação brasileira estabelece que os produtos vendidos; sejam eles embalados, a granel ou *in natura*; que contenham ou que sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados (OGMs) em uma concentração acima do limite de 1% na sua composição final deverão ser rotulados, indicando a presença do OGM (BRASIL, 2003a). Sendo assim, existe uma necessidade de monitoramento deste feijão GM nos alimentos comercializados no Brasil. Desta forma, métodos adequados e confiáveis para a detecção e quantificação de OGMs são necessários para cumprir os requisitos legais (DINON et al., 2012). A quantificação de um evento GM em alimentos é realizada pela determinação do número de cópias do DNA recombinante do evento GM sobre o número de cópias do DNA da espécie vegetal (HOLST-JENSEN; DE LOOSE; VAN DEN EEDE, 2006). Para quantificar o feijão GM em um alimento processado é necessário determinar a razão número de cópias de DNA recombinante presente no feijoeiro Embrapa 5.1 sobre o número de cópias de DNA de *Phaseolus vulgaris* presentes no alimento analisado.

Esta dissertação é apresentada em forma de capítulos, onde no primeiro capítulo é feita uma revisão bibliográfica, iniciando com uma abordagem sobre a situação dos OGMs na agricultura mundial; em seguida, sobre o feijoeiro GM desenvolvido pela Embrapa; a legislação de rotulagem para produtos transgênicos e sobre métodos de detecção e quantificação de OGMs. O segundo capítulo, apresentado em forma de artigo científico, trata do desenvolvimento de uma nova

referência endógena táxon-específica para *Phaseolus vulgaris* que permite a detecção e quantificação do feijoeiro GM Embrapa 5.1. Onde, através do método de qPCR, ensaios utilizando a tecnologia SYBR Green e TaqMan foram estabelecidos. Para isso, foram analisadas mais de 50 variedades de feijão, tanto GM como convencionais.

No final, são feitas considerações gerais sobre o trabalho, bem como os resultados obtidos e as perspectivas para futuros projetos.

Para desenvolver um método de detecção e quantificação para o feijoeiro GM Embrapa 5.1, foi desenvolvida uma nova referência endógena espécie-específica para *Phaseolus vulgaris*, que tivesse como alvo uma sequência de um gene codificante para uma proteína. Além disso, buscou-se uma referência endógena que apresentasse alta homogeneidade em diferentes variedades de feijão e pudesse ser utilizada juntamente com o ensaio OLA, que quantifica o evento Embrapa 5.1.

CAPÍTULO 1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. OGM NA AGRICULTURA

1.1.1. Plantas geneticamente modificadas

Um organismo geneticamente modificado é definido como um organismo que, por meio de qualquer técnica de engenharia genética, teve sua composição genética alterada (BRASIL, 2005). Isto envolve o isolamento do DNA, a definição da modificação do DNA e transferência do DNA para o genoma do organismo alvo, que conseqüentemente se torna um OGM. Este processo é definido como transformação genética (MIRAGLIA et al., 2004).

Tipicamente, as inserções em um OGM são formadas por pelo menos três elementos: 1) promotor, responsável pelo controle da expressão do gene inserido/alterado; 2) gene inserido/alterado, codifica uma proteína específica desejada; 3) terminador, sinaliza para o término da transcrição do gene inserido/alterado (MIRAGLIA et al., 2004).

Os primeiros OGMs do mercado foram plantas que continham genes que codificavam uma única proteína e eram regulados por alguns elementos comuns, como um promotor (geralmente o promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor) e um terminador (usualmente o terminador 3' nos da *Agrobacterium tumefaciens*) (HEMMER, 1997). A grande maioria das transformações geraram intencionalmente características agrônômicas, como tolerância a herbicidas (glifosato, glufosinato e oxinyl) e resistência a insetos (diversas formas das proteínas Cry, derivadas do *Bacillus thuringiensis*) (HOLST-JENSEN, 2009).

Comumente, os OGMs podem ser divididos em três gerações, onde na primeira geração estão as plantas com características agrônômicas, tais como tolerância a herbicidas, tolerância a inseticidas, resistência a vírus e tolerância a doenças. Esta geração trouxe benefícios principalmente para os produtores, melhorando a produtividade das culturas, reduzindo insumos agroquímicos e, posteriormente, a redução dos custos trabalhistas (YONEKURA-SAKAKIBARA; SAITO, 2006).

A segunda geração de OGMs inclui melhorias na qualidade do produto para fins nutricionais e industriais, apresentando alimentos com alto valor nutricional, qualidade *premium* e baixa alergenicidade. Exemplos disso são as oleaginosas com melhores perfis de ácidos graxos; alimentos enriquecidos com aminoácidos essenciais, minerais e vitaminas e alimentos funcionais GM com diversos benefícios para a saúde (YONEKURA-SAKAKIBARA; SAITO, 2006).

Em relação aos OGMs de terceira geração, a cultura é utilizada para produzir produtos farmacêuticos, tais como anticorpos monoclonais e vacinas ou produtos industriais, tais como enzimas e plásticos biodegradáveis (MOSCHINI, 2006).

Segundo Holst-Jensen et al. (2012), baseado na origem dos insertos, os OGMs podem também ser classificados em quatro diferentes gerações:

Primeira geração – transgene de característica única: a grande parte dos OGMs da atualidade liberados comercialmente fazem parte da primeira geração, os quais foram produzidos pela digestão por enzimas de restrição seguida pela ligação dos fragmentos de DNA. Nestes OGMs, o(s) gene(s) desejados foram inseridos juntamente com os promotores e terminadores praticamente universais, como o promotor 35S (P35S) do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) e seu terminador (T35S), e o promotor da nopalina sintase (P-*nos*) e seu terminador (T-*nos*) derivado da *Agrobacterium tumefaciens* (HEMMER, 1997).

Segunda geração – OGMs com várias características: os OGMs de segunda geração são provenientes de cruzamentos entre OGMs de primeira geração (por exemplo, Bt11 x GA21) ou retransformações de OGMs de primeira geração (por exemplo, algodão MON15985, retransformado do algodão MON531). Várias variedades de milho e algodão plantadas no momento são de segunda geração (JAMES, 2011).

Terceira geração – *near-intragenics*: a terceira geração de OGMs compreende os assim denominados

near-intragenics ou OGMs onde os elementos inseridos ainda não foram utilizados em outros OGMs conhecidos. Os *near-intragenics* são OGMs onde a maior parte do inserto é derivada do próprio hospedeiro e onde a parte recombinante do inserto é muito restrita, isto é, limitada a segmentos curtos derivados de um vetor de clonagem. Um exemplo de OGM *near-intragenic* é a batata AV43-6-G7 (HOLST-JENSEN et al., 2012).

Quarta geração – intragênicos e cisgênicos: segundo Lusser et al. (2011), os intragênicos verdadeiros e os cisgênicos poderão ser considerados como uma quarta geração de OGMs. Nestes OGMs, os elementos inseridos deverão ser, obrigatoriamente, derivados de um *pool* de genes disponíveis para recombinação natural para espécie recipiente. Assim, a detecção única dos elementos inseridos não pode ser utilizada como evidência da modificação genética (HOLST-JENSEN et al., 2012).

Com o desenvolvimento da engenharia genética, diversas metodologias para transformação genética de plantas surgiram e podem ser agrupadas em duas categorias: direta e indireta.

O método indireto é aquele no qual se utiliza um vetor, como *Agrobacterium tumefaciens* (CHILTON et al., 1977) ou *Agrobacterium rhizogenes* (CHILTON et al., 1982), de forma a intermediar a transferência de genes. Esse método tem sido bastante usado na obtenção de plantas transgênicas.

Os métodos de transferência direta de genes utilizam processos físicos ou químicos que causam modificações nas paredes e membranas celulares, facilitando a introdução de DNA exógeno. Para a primeira geração de OGMs, os métodos de eletroporação de protoplastos, a transformação por polietilenoglicol e a aceleração de partículas foram os que resultaram em maior número de espécies transformadas (FISK; DANDEKAR, 1993).

1.1.2. Cultivo de OGMs

Os primeiros produtos resultantes de manipulação genética apareceram no início dos anos 80 e o primeiro OGM autorizado para comercialização foi o tomate FlavrSavr, em 1994 (HOLST-JENSEN, 2009). No ano de 2012, 59 países concederam aprovações regulatórias para culturas GMs, permitindo a importação destes cultivares, tanto para uso alimentar como para ração animal e para a liberação no meio ambiente, sendo que 28 destes países plantaram variedades GMs comerciais. Um total de 2497 aprovações foram concedidas para 319 eventos de 25 cultivares. Sendo assim, existem hoje 59 países que aceitam alimentos GMs, incluindo os principais países importadores de alimentos, como o Japão, onde não se plantam transgênicos. Destes países que concederam aprovações para os cultivares GMs, os EUA lideram a lista dos países com mais cultivares aprovados, seguidos por Japão, Canadá, México, Austrália, Coreia do Sul, Nova Zelândia, União Europeia, Filipinas, Taiwan e África do Sul. O milho é a cultura com maior número de eventos aprovados (121), seguido pelo algodão (48), batata (31), canola (30) e soja (22). O evento que recebeu o maior número de aprovações regulatórias é o evento de milho tolerante a herbicida NK603 (50 aprovações); seguido pela soja tolerante a herbicida GTS-40-3-2 (48 aprovações); e pelo milho MON810, resistente a inseto (47 aprovações) (JAMES, 2012).

O ano de 2012 foi o 17º ano de comercialização dos cultivares GMs (1996-2012), onde todos os anos houve aumento de produção, sendo que em 12 anos o aumento foi superior a 10%. Estima-se que em 2012 foram cultivados mais de 170 milhões de hectares de lavouras transgênicas, sendo que pela primeira vez os países em desenvolvimento plantaram mais culturas biotecnológicas do que os países industrializados (JAMES, 2012). Dos 28 países que cultivam lavouras transgênicas, 18 são considerados mega-países, pois possuem uma área de cultivo de OGMs com 50 mil hectares ou mais, e são eles, por ordem de milhões de hectares: EUA (69,5), Brasil (36,6), Argentina (23,9), Canadá (11,6), Índia (10,8), China (4,0), Paraguai (3,4), África do Sul (2,9), Paquistão (2,8), Uruguai (1,4), Bolívia (1,0), Filipinas (0,8), Austrália (0,7), Myanmar (0,3), Burquina Faso (0,3), México (0,2), Espanha (0,1) e Chile (<0,1) (JAMES, 2012).

Com uma área de 36,6 milhões de hectares plantados, o Brasil é o segundo maior produtor de lavouras transgênicas do

mundo e tem emergido como líder mundial em cultivares GM (JAMES, 2012). Entretanto, apenas três culturas diferentes são cultivadas: milho, soja e algodão. Em 2011 um evento de feijoeiro foi aprovado, porém esse novo cultivar ainda não começou a ser plantado.

A primeira planta geneticamente modificada aprovada para ser comercializada no Brasil foi a soja Roundup Ready (Brasil, 2003a; Brasil, 2003b). Atualmente existem no Brasil 38 eventos transgênicos aprovados, para quatro culturas agrícolas diferentes. O milho lidera, com 19 eventos, seguido do algodão, com doze, da soja, com cinco, e do feijão, com um (CTNBio), conforme pode ser visto na Tabela 1.1.

Tabela 1.1 - Listagem de OGM autorizados no Brasil

Cultura	Nome comercial	Evento	Característica	Ano da aprovação
Soja	Roundup Ready	GTS-40-3-2	Tolerante a Herbicida (TH)	2005
	Cultivance	BPS-CV127-9	Tolerante a Herbicida (TH)	2009
	Liberty Link	A5547-127	Tolerante a Herbicida (TH)	2010
	Liberty Link	A2704-12	Tolerante a Herbicida (TH)	2010
	Intacta RR2 PRO	MON87701 & MON89788	Tolerante a Herbicida (TH) & Resistente a Inseto (RI)	2010
Milho	YieldGard	MON810	Resistente a Inseto (RI)	2007
	Liberty Link	T25	Tolerante a Herbicida (TH)	2007
	TL	Bt11	Resistente a Inseto (RI) & Tolerante a Herbicida (TH)	2007
	Roundup Ready 2	NK603	Tolerante a Herbicida (TH)	2008
	TG	GA21	Tolerante a Herbicida (TH)	2008
	Herculex	TC1507	Resistente a Inseto (RI) & Tolerante a Herbicida (TH)	2008
	YR YieldGard/RR2	NK603 & MON810	Tolerante a Herbicida (TH) & Resistente a Inseto (RI)	2009

TL/TG	Bt11 & GA21	Resistente a Inseto (RI) & Tolerante a Herbicida (TH)	2009
Viptera - MIR162	MIR162	Resistência a Insetos (RI)	2009
HR Herculex/RR2	TC1507 & NK603	Resistente a Inseto (RI) & Tolerante a Herbicida (TH)	2009
PRO	MON89034	Resistente a Inseto (RI)	2009
TL TG Viptera	Bt11 & MIR162 & GA21	Resistente a Inseto (RI) & Tolerante a Herbicida (TH)	2010
PRO2	MON89034 & NK603	Resistente a Inseto (RI) & Tolerante a Herbicida (TH)	2010
YieldGard VT	MON88017	Tolerante a Herbicida (TH) & Resistente a Inseto (RI)	2010
Power Core PW/Dow	MON89034 & TC1507 & NK603	Resistente a Inseto (RI) & Tolerante a Herbicida (TH)	2010
HX YG RR2	MON810 & TC1507 & NK603	Resistente a Inseto (RI) & Tolerante a Herbicida (TH)	2011
TC1507xMON810	TC1507 & MON810	Resistente a Inseto (RI) & Tolerante a Herbicida (TH)	2011

	MON89034 x MON88017	MON89034 & MON88017	Resistente a Inseto (RI) & Tolerante a Herbicida (TH)	2011
	Herculex XTRA™ maize	TC1507 x DAS- 59122-7	Tolerante a Herbicida (TH) & Resistente a insetos (RI)	2013
Algodão	Bolgard I	MON531	Resistente a Inseto (RI)	2005
	Roundup Ready	MON1445	Tolerante a Herbicida (TH)	2008
	Liberty Link	LLCotton25	Tolerante a Herbicida (TH)	2008
	Bolgard I Roundup Ready	MON531 & MON1445	Resistente a Inseto (RI) & Tolerante a Herbicida (TH)	2009
	Widestrike	281-24-236 & 3006-210-23	Resistente a Inseto (RI) & Tolerante a Herbicida (TH)	2009
	Bolgard II	MON15985	Resistente a Inseto (RI)	2009
	GlyTol	GHB614	Tolerante a Herbicida (TH)	2010
	TwinLink	T304-40 & GHB119	Resistente a Inseto (RI) & Tolerante a Herbicida (TH)	2011
	MON88913	MON88913	Tolerante a Herbicida (TH)	2011
	GlytolxTwinLink	GHB614 x T304-40 x GHB 119	Tolerante a herbicida (TH) & reistência a insetos (RI)	2012
	GTxLL	GHB614 x LLCotton25	Tolerante a Herbicida (TH)	2012
	BolgardII Roundup	MON 15985 x	Tolerante a Herbicida (TH) &	2012

	Ready Flex	MON 88913	Resistente a insetos (RI)	
Feijão	Embrapa 5.1	Embrapa 5.1	Resistente ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro	2011

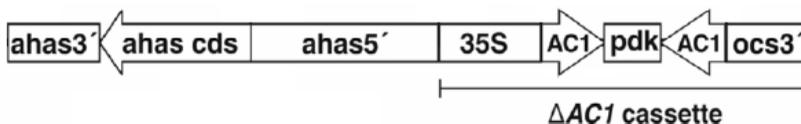
Fonte: MAPA, 2013

1.2. FEIJOEIRO EMBRAPA 5.1

O feijoeiro EMBRAPA 5.1 é um marco para a ciência brasileira. Além de ter sido o primeiro feijoeiro transgênico a ser aprovado no mundo, foi produzido por instituições públicas exclusivamente brasileiras.

Por mais de 10 anos pesquisadores da Embrapa estudaram formas de criar um feijoeiro resistente ao vírus do mosaico dourado. A partir da construção de um RNA de interferência, desenvolveram o evento EMBRAPA 5.1, que silencia o gene viral AC1 (*rep*), conferindo ao feijoeiro resistência ao vírus (Figura 1.1) (BONFIM et al., 2007).

Figura 1.1: Mapa do fragmento pBGMVRNAiAHAS contendo o gene *ahas* e o cassete AC1. O fragmento de interferência AC1 foi clonado com orientação senso e antisenso.



Fonte: modificado de BONFIM et al., 2007

A proteína do gene AC1 é a única estritamente essencial para a replicação do genoma viral, provavelmente sendo abundante no início do ciclo de infecção. Portanto, este pareceu ser um bom alvo para interromper o ciclo do vírus (BONFIM et al., 2007). Baseado na tecnologia de RNA de interferência, um gene quimérico, responsável pela expressão de um RNA contendo um fragmento do gene *rep* (AC1), foi inserido no feijoeiro. A partir desse RNA, uma sequência dupla-fita de RNA (dsRNA) é formada, fazendo com que sejam produzidos pequenos fragmentos de RNA de interferência (siRNA), que interferem negativamente na expressão do gene *rep*. Esses pequenos fragmentos de RNA, que passam a ser produzidos pela planta, são responsáveis pela ativação do mecanismo de defesa contra o BGMV (BONFIM et al., 2007).

Aragão et al. (2013) realizaram a caracterização molecular do feijoeiro Embrapa 5.1, onde confirmaram a presença do transgene em um único *locus*, correspondente a duas cópias intactas do cassete de RNAi e três cópias intactas do gene

AtAhas, sendo esses insertos flanqueados por sequências de genoma do feijoeiro. Análises de *Southern blot* mostraram que a estrutura dos transgenes permaneceram estáveis por oito gerações de autopolinização e após retrocruzamentos com a variedade comercial não transgênica.

Na análise de expressão do transgene por Northern Blot não foi possível detectar siRNA em sementes que foram cozidas por 10 minutos, demonstrando que este feijão GM está livre dos siRNA após o cozimento (ARAGÃO, FRANCISCO et al., 2013).

No final de 2011 a linhagem EMBRAPA 5.1 foi aprovada pela CTNBio (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança) para o cultivo comercial. Com esta aprovação, as sementes transgênicas serão multiplicadas e devem chegar ao mercado dentro de dois a três anos (EMBRAPA, 2011).

Uma vez que existe a necessidade legal de haver métodos para a detecção e quantificação de OGMs no Brasil (BRASIL, 2003a), foram desenvolvidos iniciadores e sonda taxón-específicos, tendo como alvo de referência a sequência de uma região promotora, PvSR2P, do feijoeiro convencional, sendo chamado de ensaio FEI. Iniciadores e sonda construção-específicos para o feijoeiro GM visando a junção entre o promotor P35S e a uma sequência do gene viral *rep* AC1, presentes no feijoeiro EMBRAPA 5.1, também foram desenvolvidos, sendo o ensaio denominado de OLA. Os iniciadores e sondas dos ensaios FEI e OLA demonstraram alta especificidade ao alvo e ambos os métodos se mostraram eficientes (DINON et al., 2012). Entretanto os resultados obtidos com este primeiro método táxon-específico com a sonda FEI apresentaram alta heterogeneidade entre as diferentes variedades de feijão testadas (DINON et al., 2012).

1.3. ROTULAGEM DE ALIMENTOS GM

A rotulagem e comercialização de alimentos contendo em sua composição a presença de qualquer OGM variam conforme regulamentação específica de cada país. A finalidade do cumprimento da legislação é garantir o direito de escolha do consumidor, bem como controlar o comércio e a rastreabilidade da cadeia produtiva.

Na União Europeia, a legislação estabelece o limite de detecção de 0,9% para rotulagem de alimentos que contenham ou que sejam produzidos com OGMs (EUROPEAN COMMISSION, 2003). Em diversos países, a rotulagem é obrigatória, mas os limites são variáveis: 3% na Coreia do Sul (KOREA, 2000), 5% no Japão e Taiwan (JAPAN, 2000), 1% na Austrália e na Nova Zelândia (STANDARD A18/2000). Nos EUA e no Canadá a rotulagem é voluntária (CFS, 2006).

No Brasil, o Decreto nº 4.680, de 24 de abril de 2003, estabelece que tanto os produtos embalados, como os vendidos a granel, ou *in natura*, destinados ao consumo humano ou animal, que contenham ou que sejam produzidos a partir de OGMs, com presença acima do limite de 1% do produto, deverão obrigatoriamente ser rotulados, e o consumidor deverá ser informado sobre a espécie doadora do gene no local reservado para a identificação dos ingredientes (BRASIL, 2003a).

Com a obrigatoriedade de rotulagem em alimentos contendo OGMs no Brasil, surgiram estudos a respeito da presença de OGM em alimentos comercializados no país. Cardarelli et al., (2005) realizaram um monitoramento para detectar a presença da soja GM *Roundup Ready* e dos milhos GM Bt176 e MON810 em produtos do mercado brasileiro. Essa foi a primeira vez em que a soja GM foi detectada em produtos voltados para consumo humano no Brasil. Um outro estudo foi realizado com a finalidade de fazer a detecção qualitativa e quantitativa de soja GM e milho GM em alimentos processados vendidos no Brasil (GREINER; KONIETZNY; VILLAVICENCIO, 2005).

Brod, et al. (2007) utilizou a técnica de *nested* PCR para detectar a presença de soja GM em amostras de farinha de soja, fórmula infantil e leite de soja em pó, onde apenas algumas amostras de farinha e leite em pó apresentaram resultados positivos para soja GM. Posteriormente, (BROD; ARISI, 2007) analisaram aditivos cárneos, que continham proteína de soja, para a presença de DNA de soja convencional e de DNA da soja GM RR. Os resultados demonstraram a presença de soja GM em aditivos cárneos. Em outro trabalho (BROD; ARISI, 2008), realizaram a detecção e quantificação de soja GM em produtos derivados de soja comercialmente vendidos em mercados de Florianópolis e foi verificada a presença de soja GM em amostras de proteína de soja texturizada e em leite de soja em pó.

Em um estudo realizado entre os anos de 2000 e 2005, pesquisadores analisaram, ano a ano, 100 produtos a base de milho e 100 produtos a base de soja e verificaram que, nesses 5 anos, o número de produtos contendo soja GM cresceu 65%. Já para as amostras de milho, verificaram que de 8 a 10% delas continham alguma variedade GM (GREINER, RALF; KONIETZNY, 2008). Já em outro estudo, foi monitorada a presença do milho GM MON810 em produtos derivados de milho vendidos no mercado brasileiro. O estudo foi realizado entre os anos de 2005 e 2007, onde 81 amostras foram testadas e em nenhuma delas foi detectada a presença do milho GM MON810 (DINON; DE MELO; ARISI, 2008).

Amostras de alimentos a base de soja foram analisadas entre os anos de 2004 e 2007, onde 68 amostras deram resultados positivos para a presença de soja GM. Entretanto, nenhum destes produtos indicava a presença de OGM em seus rótulos (BRANQUINHO; FERREIRA; CARDARELLI-LEITE, 2010). Assim como no trabalho de (BRANQUINHO et al., 2010), as amostras de alimentos a base de milho analisadas por (DINON et al, 2010b), no período de 2005 a 2007, não apresentaram amplificação para os milhos GM Bt11 e Bt176. Neste mesmo intervalo, (DINON et al, 2010a) testou amostras de alimentos a base de milho para a presença do promotor P35S e do gene cryIA(b). Das 68 amostras testadas, 18 foram positivas para o gene cryIA(b) e uma foi positiva para ambos, P35S e cryIA(b). Entre os anos de 2007 e 2008 foi monitorada a presença de soja RR em produtos a base de soja e carnes processadas do mercado brasileiro. Foi extraído o DNA de 59 amostras de alimentos e analisados por PCR, para a presença do gene da lectina e PCR aninhada para a presença do DNA recombinante presente na soja RR. Os resultados apontaram 54 amostras positivas para a lectina e seis para a soja RR (DINON et al, 2010c).

1.4. DETECÇÃO DE OGMS POR PCR

Como o DNA é uma molécula bastante estável, alimentos processados são geralmente analisados através da utilização de métodos baseados na pesquisa desta molécula (ANKLAM et al., 2002). Sendo assim, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

se tornou o sistema analítico mais usado na detecção de OGM, que é um método com elevada sensibilidade e especificidade para detecção de pequenas quantidades de DNA (ANKLAM et al., 2002; HOLST-JENSEN et al., 2003; LIPP, M et al., 2005).

A PCR é um processo que envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um fragmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. Essa reação baseia-se no processo de replicação do DNA celular. A tecnologia da PCR baseia-se no anelamento e extensão enzimática de um DNA molde usando um par de oligonucleotídeos sintéticos, denominados iniciadores. Esses iniciadores, que são artificialmente sintetizados, tem como base uma sequência de nucleotídeos complementares às sequências que delimitam o fragmento de DNA a ser amplificado (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

A reação de PCR envolve 3 etapas: (1) desnaturação, onde a dupla fita de DNA se abre, formando duas fitas simples, esta etapa ocorre pelo aumento da temperatura, geralmente 95°C; (2) anelamento dos iniciadores, se inicia com a diminuição da temperatura para em torno de 55-65°C, permitindo que os iniciadores se liguem a fita simples e a DNA polimerase se acople na fita molde; (3) extensão, nesta etapa, na presença de dNTPs, os iniciadores são estendidos por uma DNA polimerase termoestável (*Taq* polimerase), resultando na duplicação do material inicial (ANKLAM et al., 2002).

Para a análise dos OGMs, geralmente se utiliza um procedimento analítico, que engloba a extração e a purificação do DNA, a amplificação por PCR (em tempo real) e a avaliação dos dados. Historicamente, o método analítico foi considerado uma unidade indivisível, com referência a um fenômeno chamado de "efeito matriz" (HOLST-JENSEN et al., 2012). Porém, tem havido uma crescente aceitação de um novo modelo analítico, chamado de "abordagem modular" (HOLST-JENSEN; BERDAL, 2004).

Conforme (HOLST-JENSEN et al., 2012), a abordagem modular contempla as etapas de preparação da amostra, de extração do DNA e as reações de amplificação (PCR) como módulos separados, que juntos formam um método. Desta forma, um módulo pode ser definido como uma operação distinta e limitada, que é realizada com um material de entrada, que por sua vez gera dados ou um material de saída alterado. Um

exemplo pode ser um módulo para preparação de uma amostra, onde o material de entrada seriam grãos e o material de saída, farinha.

No contexto da detecção de OGM, o módulo de PCR pode ser dividido em quatro níveis de especificidade (figura 1.2) (HOLST-JENSEN et al., 2012):

Nível espécie/táxon específico: Este módulo detecta uma sequência conhecida, que é específica para o alvo espécie/táxon. A sequência alvo está sempre presente na espécie/táxon alvo e ausente em outros táxons. Além disso, não deve apresentar variação alélica (HERNANDEZ et al., 2004; PAPAZOVA et al., 2010). Os módulos espécie/táxon servem de base para calcular o teor (número de cópias) de DNA recombinante do OGM em relação ao teor (número de cópias) de DNA da espécie vegetal.

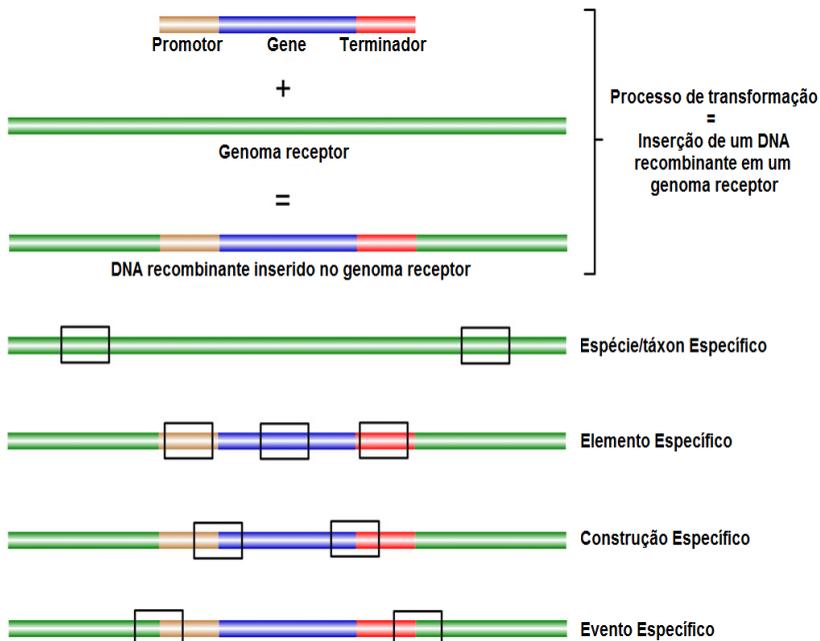
Nível elemento específico: é um módulo de PCR para um elemento específico único. Este elemento pode ser um promotor, um terminador, um *intron* ou um gene. Este módulo é adequado para determinar se uma amostra contém ou não OGMs. Entretanto, a presença de um desses elementos nem sempre é uma evidência conclusiva quanto a presença de material GM, sendo muitas vezes necessário adicionar outro módulo específico.

Nível construção-específico: tem como alvo um inserto de DNA com uma sequência composta por pelo menos dois elementos adjacentes, cuja conformação não existe naturalmente. Este modelo detecta sequências na junção entre dois elementos genéticos do DNA recombinante, por exemplo, a junção entre o promotor e o gene de interesse. Com estes métodos, um sinal positivo só irá aparecer na presença de material GM.

Nível evento-específico: este módulo visa uma sequência de um evento OGM único; tendo como alvo a junção entre o inserto de DNA recombinante e o

genoma da planta. São capazes de identificar e quantificar eventos específicos, porém, são incapazes de distinguir híbridos contendo dois ou mais eventos GMs (*stacked events*).

Figura 1.2: Representação dos níveis de especificidade do módulo de PCR.



Fonte: HOLST-JENSEN et al., 2012

1.5. QUANTIFICAÇÃO DE OGM POR PCR EM TEMPO REAL

Um aspecto importante na análise de OGM em alimentos é a quantificação, uma vez que no Brasil é necessário a rotulagem de alimentos contendo acima de 1% (BRASIL, 2003a). Entretanto, esta quantificação deve ser relativa a algo.

O método mais utilizado para quantificação de OGM em alimentos é a PCR em tempo real (qPCR). Esse método permite

monitorar a reação de PCR durante a sua ocorrência, em tempo real (ciclo a ciclo). Os resultados são geralmente expressos em percentual de material GM em relação ao material do organismo parental (BARROS; OLIVEIRA; MARIN, 2008). Isso significa que a base para cálculo do teor de material GM deve ser o material do organismo parental, sendo assim, a referência para estimativa do conteúdo de feijão GM por qPCR deve ser o DNA total de feijão utilizado na formulação do alimento.

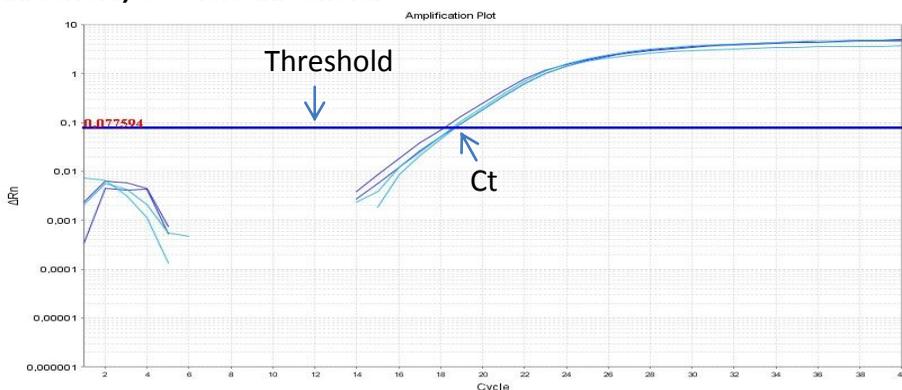
Os sistemas mais utilizados em PCR em tempo real são os corantes intercalantes (por exemplo, SYBR® Green) e as sondas de hibridização (por exemplo, TaqMan®) (LIPP, M et al., 2005). O principal corante intercalante utilizado é o SYBR Green I, que se liga inespecificamente à dupla fita de DNA, e não se liga à fita simples. Assim, durante a extensão dos iniciadores pela DNA polimerase, as moléculas de fluoróforo ligam-se ao DNA que está sendo sintetizado. O aumento da quantidade do DNA sintetizado resulta em um aumento do sinal fluorescente, que é medida ao final de cada extensão e observada em tempo real (MARKOULATOS et al., 2004).

Ensaios que fazem o uso desta técnica podem apresentar uma sensibilidade de menos de 10 cópias da sequência alvo (MORRISON et al., 1998). Uma desvantagem do sistema de quantificação que utiliza fluoróforo intercalante é a inespecificidade, já que toda fita dupla de DNA formada é quantificada, incluindo produtos não específicos e dímeros de iniciadores (GARCIA-CANAS; CIFUENTES; GONZALEZ, 2004). Apesar disso, a análise da curva de dissociação térmica característica dos produtos amplificados é uma ferramenta que auxilia na especificidade da análise dos resultados (WEIGHARDT, 2004).

O sistema de sonda de hibridização utiliza a atividade endonucleásica 5'-3' da DNA polimerase para produzir um sinal fluorescente. Esta sonda é constituída por um oligonucleotídeo, que contém uma sequência de nucleotídeos homóloga à sequência específica de uma das fitas do amplicon, marcado na extremidade 5' com um corante *reporter* fluorescente de alta energia e um *quencher* de fluorescência na extremidade 3'. Enquanto a sonda permanece intacta, a proximidade do *quencher* absorve a fluorescência emitida pelo *reporter*, pela transferência de energia. Na presença do alvo, durante a etapa de anelamento, a sonda se anela em uma das fitas do DNA alvo.

Durante a etapa de extensão, a enzima DNA polimerase degrada a sonda, ocorrendo liberação do corante *reporter* e emissão do sinal fluorescente. A degradação da sonda da fita do DNA alvo permite a continuação da extensão do iniciador até o final. Em cada ciclo de PCR outras moléculas do *reporter* vão sendo liberadas, ocorrendo assim um aumento da intensidade da fluorescência, que é proporcional à quantidade do produto de amplificação produzido (HEID et al., 1996).

Figura 1.3: Gráfico de amplificação, com sinal fluorescente (ΔRn) versus número de ciclos (Cycle), apresentando o limiar de detecção (*threshold*) e o ciclo *threshold*.



A qPCR possui as mesmas etapas que a PCR convencional, porém na qPCR é possível distinguir três fases distintas (figura 1.3):

1ª fase: fase “lag”, com flutuação correspondendo ao sinal do ruído de fundo (*background*). Nesta fase ainda não houve amplificação suficiente, sendo assim, não houve clivagem suficiente do corante *reporter* para detecção da fluorescência. A fase “lag” pode ser observada entre os ciclos 1 e 14 da figura 1.3.

2ª fase: fase exponencial, a quantidade de produtos de amplificação dobra a cada ciclo, com aumento contínuo do sinal fluorescente. A fase exponencial pode ser observada entre os ciclos 14 e 22 da figura 1.3.

3ª fase: formação de um platô. Fase final da reação, quando não há aumento do número de produtos de amplificação, por consequência, não há aumento de sinal fluorescente. A

formação de platô pode ser observada a partir do ciclo 22 da figura 1.3.

A quantificação na qPCR ocorre na fase exponencial, pois nessa fase é gerado um acúmulo de produtos amplificados, com conseqüente aumento da emissão de fluorescência. O ciclo onde o sinal fluorescente emitido ultrapassa o limiar de detecção de sinal permite inferir a concentração inicial do DNA alvo para cada amostra. O limiar de detecção (*threshold*) é definido dentro da fase exponencial, no ponto em que as réplicas sejam mais coincidentes (HEID et al., 1996).

O ciclo *threshold* (Ct) é o ciclo onde a curva de amplificação de cada DNA alvo cruza a linha *threshold*. Quanto maior for a quantidade inicial do alvo, mais cedo ocorre um aumento significativo da fluorescência e mais baixo será o valor de Ct (WEIGHARDT et al., 2004).

Esta metodologia tem sido utilizada e validada para detecção de OGMs em diversos estudos, onde a eficiência das sondas TaqMan tem sido comprovadas (TAVERNIERS et al., 2004; WEIGHARDT et al., 2004; FEINBERG et al., 2005; FERNANDEZ et al., 2005; CANKAR et al., 2006; BRANQUINHO et al., 2010; CORBISIER et al., 2010).

A validação de um método analítico é de suma importância, pois estabelece que um processo de análise seja aceitável para a sua finalidade. Em geral, o desenvolvedor do método gera evidências sobre a especificidade, precisão, limite de detecção e limite de quantificação do método para submissões regulatórias ou aplicações *in-house* (CHANDRAN; SINGH, 2007).

As validações são realizadas de acordo com parâmetros estabelecidos por órgãos competentes, como a ISO (*International Organization for Standardization*), *Codex Alimentarius* e ENGL (*European Network of GMO Laboratories*), sendo que pode haver algumas diferenças entre os parâmetros de cada órgão. Em se tratando de OGM, as especificações estabelecidas pela ENGL podem ser consideradas as mais apropriadas para se seguir, pois as normas por ela determinadas regulam praticamente todos os laboratórios e centros de pesquisa da União Europeia.

Alguns dos critérios estabelecidos pela ENGL para validação de um método são (ENGL, 2008):

Eficiência: é a taxa de amplificação que leva a uma inclinação de reta teórica de -3,32, com uma eficiência

de 100%. A eficiência da reação pode ser calculada pela seguinte equação: $E = 10^{(-1/s)} - 1$. O valor médio da inclinação da reta para uma curva padrão deverá estar na faixa de -3,1 a -3,6, que corresponde à eficiência entre 90 e 110%.

Coefficiente R^2 : O coeficiente R^2 é o coeficiente de correlação de uma curva padrão obtido por análise de regressão linear. Sendo que o valor médio de R^2 deve ser maior ou igual a 0,98.

Precisão – Repetibilidade Relativa do Desvio Padrão (RSD_r): é o desvio padrão relativo dos resultados obtidos em testes de repetibilidade. Desta forma, as condições de repetibilidade são condições onde os resultados dos testes são obtidos através do mesmo método, com materiais de ensaio idênticos, no mesmo laboratório, pelo mesmo operador, utilizando o mesmo equipamento em um curto intervalo de tempo. A repetibilidade relativa do desvio padrão deve ser menor ou igual a 25% através de toda a variação dinâmica do método.

Limite de Quantificação (LOQ): o limite de quantificação é a menor quantidade ou concentração do analito em uma amostra que pode ser quantificado de forma confiável com um nível aceitável de precisão e exatidão. O LOQ deve ser menor que 1/10 do valor da concentração do alvo, com um RSD_r menor ou igual a 25%.

Limite de Detecção (LOD): o limite de detecção é a menor quantidade ou concentração do analito em uma amostra, a qual pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, como demonstrado pela validação de um único laboratório. O LOD deve ser menor que 1/20 da concentração do alvo. Experimentalmente, métodos quantitativos devem detectar a presença do analito em pelo menos 95% das vezes dentro do LOD, assegurando 5% dos resultados para falsos negativos.

Precisão - Reprodutibilidade Relativa do Desvio Padrão (RSD_R): o desvio padrão relativo dos resultados dos testes obtidos em condições de reprodutibilidade. As condições de reprodutibilidade são condições onde os resultados dos testes são obtidos com o mesmo método, com materiais de ensaio idênticos, em diferentes laboratórios, com diferentes operadores, utilizando equipamentos diferentes. O desvio padrão da reprodutibilidade descreve as variações interlaboratoriais. A reprodutibilidade relativa do desvio padrão deve ser menor que 35% através de toda a variação dinâmica do método. Entretanto, em concentrações menores que 0,2% os valores menores que 50% são considerados aceitáveis.

Baseado nesses parâmetros, Scholtens et al. (2010) realizaram uma validação *in-house* de 19 métodos para soja GM, milho GM, canola GM e batata GM, onde 14 destes foram validados com base em um esquema de 8 dias, utilizando 8 amostras. Os outros 5 métodos foram validados a partir de um protocolo diferente. Desta forma, os dados obtidos apontaram o limite de detecção, precisão e exatidão. Além disso, o desvio padrão relativo para a repetibilidade e reprodutibilidade (RSD_r e RSD_R) também foram calculados. Neste estudo, os pesquisadores avaliaram se o mesmo era eficaz para a validação *in-house* apenas da etapa da PCR e se os resultados da repetibilidade e reprodutibilidade poderiam estimar a contribuição dos fatores “isolamento de DNA” e “dia da PCR”. Conforme o esperado, os resultados apontaram que estes fatores, além da reação de PCR em si, são fatores importantes para a variância total do método e devem ser incluídos nas validações *in-house*. Esta abordagem proposta deixa o processo de validação de novos métodos de detecção de OGM mais eficientes e mais precisos.

1.5.1. Gene de referência endógena

O método de detecção por qPCR é um sistema rápido e preciso para detecção e quantificação de OGM em amostras de alimentos processados. Estes alimentos apresentam em sua

composição DNA proveniente de diferentes espécies vegetais, sendo necessário um método capaz de identificar de forma específica o material genético da espécie de interesse no alimento. Dessa forma, para o desenvolvimento de um método confiável de quantificação de OGM, é necessária uma sequência táxon-específica como referência endógena (IIDA et al., 2005). A quantificação de um evento-específico e o método de referência endógena compõem a base da tecnologia de detecção quantitativa de OGM e a política de rotulagem (WU et al., 2010). Este método utiliza a amplificação de um transgene específico, sendo a principal abordagem para o cálculo da porcentagem de material GM a combinação de duas quantificações absolutas – a primeira para a sequência do transgene e a segunda para o gene táxon-específico. Sendo assim, a quantificação se dá através da relação entre um transgene com um gene de referência endógena, que apresenta uma estimativa da quantidade total do DNA do OGM na amostra (BROOThAERTS et al., 2008; CHAOUACHI et al., 2008; HERNANDEZ et al., 2001; WANG et al., 2010).

Para que esse método de quantificação possa ser executado, são necessários iniciadores específicos para o transgene e iniciadores específicos para detecção do gene de referência endógena (HERNANDEZ et al., 2001). A fim de que se obtenham resultados precisos, a escolha de uma referência endógena eficaz é de suma importância. Desta forma, o ensaio para detecção do gene de referência endógena deve ser sensível, preciso, reprodutível e táxon-específico, além de apresentar consistência na amplificação em diferentes cultivares (PATERNÒ, 2009). Por sua vez, o gene selecionado deve ser estável, apresentar baixo número de cópias e possuir alta homogeneidade entre os cultivares (CHAOUACHI; BERARD; SAID, 2013; CHAOUACHI et al., 2008)

Devido o aumento de alimentos GM no mercado, a detecção e quantificação desses produtos tem se tornado cada vez mais necessária. Sendo assim, já foram desenvolvidas metodologias para quantificação de diversas variedades de OGM. (HERNANDEZ et al., 2001) desenvolveram iniciadores táxon-específicos para colza (*Brassica napus*), para ser utilizado como referência endógena nos ensaios de PCR qualitativa e quantitativa. Para ambos os métodos, 20 variedades de colza foram testadas e os produtos de amplificação obtidos foram

idênticos para todas as amostras. Amostras de outras espécies de *Brassica* não apresentaram amplificação, assim como todas as outras amostras de controle negativo, demonstrando que a metodologia desenvolvida é específica para colza. Em outro trabalho com colza, (WU et al., 2010) utilizaram cinco genes de referência endógena, previamente desenvolvidos, para *Brassica napus*, onde analisaram a especificidade da PCR entre *B. napus* e outras espécies e testaram a estabilidade da quantificação entre diferentes cultivares de colza. Os resultados da PCR e do sequenciamento indicaram que nenhum dos métodos testados eram espécie-específico, como requerido pela política de rotulagem de OGM. Quando os genes foram utilizados na qPCR as metodologias para os genes *BnACCg8* e *HMG-I/Y* apresentaram relativamente uma maior heterogeneidade entre 10 diferentes cultivares.

Pesquisadores canadenses selecionaram o gene *acetil-CoA carboxilase* como gene de referência para detecção e quantificação de alfafa geneticamente modificada. Dois ensaios de PCR qualitativa foram desenvolvidos para a detecção da alfafa, onde ambos eram específicos para esta espécie. Com os resultados de PCR pode-se observar amplificação para as 12 variedades de alfafa e nenhum sinal de amplificação para as 15 amostras negativas. Um ensaio quantitativo de qPCR também foi desenvolvido, apresentando uma alta linearidade ($r > 0,99$) através das concentrações padrão de alfafa, variando de 100 a $2,0 \times 10^5$ pg de DNA de alfafa por PCR. Estes resultados mostraram que o método desenvolvido apresentou alta sensibilidade e especificidade para alfafa (ALEXANDER; REUTER; MCALLISTER, 2007).

O gene *waxy-D1* do trigo comum foi escolhido por pesquisadores japoneses para ser utilizado como referência endógena específica para detecção e quantificação do trigo. Nos ensaios utilizando sondas TaqMan, os resultados mostraram que a sequência de DNA escolhida é específica para o trigo comum, apresentando homogeneidade na PCR qualitativa e uma precisão na quantificação muito semelhante em 19 variedades de trigo comum distantemente relacionadas. Além disso, o ensaio apresentou um limite de detecção de 15 cópias de DNA. Desta forma, este ensaio mostrou ter um bom gene de referência táxon-específico para análise de trigo, incluindo testes com OGMs (IIDA et al., 2005).

Em um único trabalho, pesquisadores desenvolveram quatro metodologias de qPCR visando a detecção e quantificação específica de milho. Estas metodologias foram desenvolvidas em quatro laboratórios independentes, tendo como alvo diferentes sequências de milho. As quatro metodologias mostraram ter alta sensibilidade e exibiram um limite de quantificação abaixo de 100 cópias do DNA genômico do milho. Além disso, os métodos provaram ser específicos, sensíveis e confiáveis para serem utilizados como referência endógena de milho em análises de DNA, incluindo testes quantitativos de OGMs (HERNANDEZ et al., 2004).

Uma nova metodologia para a identificação de um novo gene de referência foi desenvolvida para a diferenciação de quatro seções de beterraba (*Beta vulgaris* L.) (*Beta*, *Corrollinae*, *Nanae* e *Procumbentes*), apropriada para a quantificação de beterraba geneticamente modificada. Foi então desenvolvido um ensaio de PCR para detectar unicamente espécies de beterraba da seção I do gênero *Beta*. A PCR apresentou resultados negativos para 7 espécies das outras 3 seções, 8 espécies relacionadas e 20 outras variedades diferentes da beterraba. A sensibilidade do ensaio foi de 15 cópias de genoma haploide e se mostrou adequado para a quantificação de OGMs em análises de rotina a partir de uma ampla variedade de matrizes (CHAOUACHI; ALAYA; et al., 2013).

Os genes do arroz *sucrose fosfato sintase* (*SPS*), *GOS9*, *fosfolipase D* (*PLD*) e *ppi fosfofrutoquinase* (*ppi-PPF*) foram selecionados como genes de referência endógena para serem utilizados na detecção de arroz GM. A fim de comparar a aplicabilidade destes genes como referência endógena, foram analisadas as variações nas sequências de nucleotídeos alvo em 58 variedades de arroz convencional, provenientes de diferentes localizações geográficas e diferentes origens filogenéticas. Os resultados do sequenciamento revelaram que regiões das sondas TaqMan para os genes de referência *GOS9* e *PLD* apresentaram polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) entre as cultivares de arroz testadas. Além disso, os ensaios de PCR para estes genes apresentaram um baixo desempenho na quantificação das variedades com SNPs. Em contrapartida, não foram detectados SNPs para os genes de referência *SPS* e *ppi-PPF*, inclusive estes genes mostraram ser aplicáveis como referência endógena do arroz, onde os ensaios apresentaram

baixa variação entre os valores de Ct e uma boa reprodutibilidade. A diferença entre os dois métodos é que a eficiência da PCR do *ppi-PPF* foi ligeiramente menor (WANG et al., 2010).

Baseado na homologia da sequência da β -frutosidase, dois pares de iniciadores foram desenvolvidos para a detecção, quantificação e diferenciação de quatro Solanaceae: batata (*Solanum tuberosum*), tomate (*Solanum lycopersicum*), pimenta (*Capsicum annuum*) e berinjela (*Solanum melongena*). Este estudo permitiu o desenvolvimento de quatro sondas TaqMan altamente específicas. Ensaios de duplex qPCR foram desenvolvidos para a quantificação simultânea do tomate e da batata, que trazem consigo uma vantagem adicional: são mais baratos e rápidos. Para a pimenta e a berinjela, apenas ensaios de simplex qPCR foram desenvolvidos. Todos os resultados sugeriram que os ensaios desenvolvidos são eficientes na quantificação do DNA de β -frutosidase em amostras complexas de tomate GM e batata GM, sendo assim o gene de β -frutosidase é um bom gene de referência endógena para análises de OGMs (CHAOUACHI et al., 2008).

Uma referência endógena para o feijão também já foi desenvolvida, ensaio FEI, tendo como alvo uma região promotora presente em *P. vulgaris*, entretanto os resultados apresentaram alta heterogeneidade entre as diferentes variedades de feijão (DINON et al., 2012), neste caso uma nova referência mais confiável deve ser desenvolvida.

CAPÍTULO 2

**UMA REFERÊNCIA ENDÓGENA ESPECÍFICA PARA O
FEIJÃO COMUM (*Phaseolus vulgaris* L.) GENETICAMENTE
MODIFICADO PARA QUANTIFICAÇÃO DE DNA POR PCR EM
TEMPO REAL TENDO COMO ALVO O GENE DA LECTINA**

2. UMA REFERÊNCIA ENDÓGENA ESPECÍFICA PARA O FEIJÃO COMUM (*Phaseolus vulgaris* L.) GENETICAMENTE MODIFICADO PARA QUANTIFICAÇÃO DE DNA POR PCR EM TEMPO REAL TENDO COMO ALVO O GENE DA LECTINA

Gustavo L. Venturelli¹; Fábio C. A. Brod¹; Gabriela B. Rossi¹; Naíra F. Zimmermann¹; Jaison P. Oliveira²; Josias C. Faria²; Ana C. M. Arisi^{1*}

¹Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, 1346, 88034-001, Florianópolis, SC, Brazil.

²Embrapa Arroz e Feijão, Caixa Postal 179, 75375-000, Santo Antônio de Goiás, GO, Brazil.

*Telefone: +554837215382; Fax +554837219943; endereço de e-mail: ana.arisi@ufsc.br

RESUMO

O desenvolvimento de uma referência endógena apropriada é essencial para a detecção e quantificação de organismos geneticamente modificados (OGM) por PCR em tempo real. Com base nisso, um novo método de detecção de referência endógena táxon-específica foi desenvolvido para *Phaseolus vulgaris* L. Três genes codantes de proteína do feijão foram selecionados como candidatos para referência endógena. Iniciadores visando esses genes candidatos foram desenhados e a detecção avaliada usando a tecnologia SYBR Green. O ensaio que teve como alvo o gene da lectina apresentou uma maior especificidade e eficiência do que os ensaios restantes e uma sonda TaqMan foi então desenhada, a fim de desenvolver um método de detecção mais específico. O ensaio LEC mostrou alta especificidade para 50 amostras de feijão de dois grupos de genes, Andino e Mesoamericano. Para as variedades de feijão geneticamente modificadas (GM), os resultados foram semelhantes aos obtidos pelas suas isolinhas não-GM, com a eficiência da PCR variando de 92% a 101%. Além disso, este ensaio apresentou um limite de detecção de 10^1 cópias do genoma. Os iniciadores e sonda desenvolvidos neste trabalho são adequados para PCR em tempo real usando ambos TaqMan e SYBR Green e eles são adequados para detectar e quantificar tanto o feijão GM quanto o não-GM.

Palavras-chave: feijão, OGM, qPCR, TaqMan, SYBR Green

2.1. INTRODUÇÃO

Atualmente o Brasil possui 36 eventos geneticamente modificados (GM) aprovados para quatro culturas: milho, algodão, soja e feijão (<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/12482.html>). A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) desenvolveu o evento Embrapa 5.1, o primeiro feijão GM (*Phaseolus vulgaris* L.) e a primeira variedade comercial GM desenvolvida na América Latina (ARAGÃO, FRANCISCO J L; FARIA, 2009). Este feijão GM foi aprovado pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) em setembro de 2011

(<http://www.mct.gov.br/index.php/%20content/view/333614.html>). O feijão Embrapa 5.1 é resistente ao Vírus do Mosaico Dourado do Feijão (BGMV), um geminivírus transmitido pela mosca branca *Bemisia tabaci*. Esse vírus é responsável doença do mosaico dourado no feijão, que causa mosaicos verde-amarelos nas folhas e crescimento atrofiado ou distorcido (ARAGAO et al., 1998; BONFIM et al., 2007; FARIA et al., 2006), e pode causar perdas de até 100% nas lavouras (ARAGAO et al., 1998). A construção de um RNA de interferência foi usada para o desenvolvimento do evento Embrapa 5.1, induzindo o silenciamento do gene viral AC1, gerando plantas com alta resistência ao vírus (ARAGÃO, FRANCISCO et al., 2013).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) tornou-se o sistema analítico mais utilizado para a detecção de OGM em alimentos processados, principalmente por causa da elevada sensibilidade e especificidade na detecção de pequenas quantidades de DNA (ANKLAM et al, 2002;. HOLST-JENSEN et al, 2003;.. LIPP, M et al, 2005). Um procedimento analítico para detecção de OGM inclui a extração e purificação de DNA, amplificação por PCR em tempo real e avaliação dos dados (HOLST-JENSEN et al., 2012). A detecção e quantificação do evento Embrapa 5.1 tornou-se uma necessidade legal, uma vez que a legislação brasileira atual exige a rotulagem de alimentos que contenham OGM acima do limite de $10 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (BRASIL, 2003). Além disso, este evento GM ainda não está autorizado na União Europeia sendo que a detecção de OGM não autorizados

também é necessária na UE. Assim, métodos adequados e confiáveis para quantificação de OGM são altamente necessários para o controle dos requisitos legais.

Para o desenvolvimento de um método confiável para quantificação de OGM, uma sequência táxon-específica é necessária como uma referência endógena (LIDA et al., 2005), pois a porcentagem do material GM presente deve ser expresso em número de cópias de DNA GM em relação ao número de cópias de DNA de um alvo táxon-específico, sendo o cálculo baseado no genoma haplóide (DINON et al., 2012). Uma referência endógena adequada precisa ser táxon-específico, estável, estar presente em baixo número de cópias no genoma e apresentar baixa heterogeneidade entre os diferentes cultivares. (CHAOUACHI; BERARD; et al, 2013.). Além disso, a referência táxon-específica pode ser uma ferramenta útil para a detecção de pequenas quantidades de DNA de uma determinada espécie em alimentos processados.

Em um trabalho anterior (DINON et al., 2012), uma sequência da região promotora do gene PvSR2 de *Phaseolus vulgaris* L. (QI et al., 2009) foi usado como uma referência endógena para a detecção táxon-específica de feijão. No entanto, a quantificação das diferentes variedades de feijão usando a sequência promotora PvSR2 (ensaio FEI) mostrou alta heterogeneidade (DINON et al., 2012). O objetivo do presente trabalho foi desenvolver um novo método de detecção táxon-específico tendo como alvo um gene codante que apresentasse alta homogeneidade entre diferentes variedades de feijão. Foram testados os iniciadores para genes codantes das proteínas α -faseolina, arcelina 5c e lectina. Iniciadores e sonda TaqMan tendo como alvo o gene da lectina foram desenvolvidos e ensaios SYBR Green e TaqMan foram utilizados com sucesso para a quantificação do feijão por PCR em tempo real.

2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1. Material Vegetal

Sword bean (*Canavalia gradiata*), feijão-fava (*Phaseolus lunatus*), feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), feijão GM Embrapa 5.1

derivado das cultivares Pérola e Pontal e os seus cultivares isogênicos não-GM, bem como 46 diferentes variedades de *Phaseolus vulgaris* L. foram fornecidos pela Embrapa Arroz e Feijão (Santo Antônio de Goiás, Estado de Goiás, Brasil) (Tabela Suplementar 1). Feijão disponível comercialmente (carioca, preto e vermelho), soja, milho, arroz, ervilha e lentilha foram comprados nos mercados locais de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. Materiais de referência certificados (CRM) de soja RR (5%, ERM-BF410), MON810 (5%, ERM-BF413f), Bt11 (4,89%, ERM-BF412f) e Bt176 (5%, ERM-BF411f) foram adquiridos da ERM (European Reference Materials, ERM, Geel, Bélgica) (Tabela Suplementar 1).

O material foliar foi obtido do seguinte modo: Duas sementes de cada variedade foram dispostas em papel de germinação umedecido e germinadas em uma câmara de crescimento a 25 °C, sem luz, durante dois dias. Após, as sementes foram transferidas para potes plásticos, contendo o substrato adequado e cultivadas em câmara de crescimento com ambiente controlado. Quando as plantas atingiram o tamanho apropriado, as folhas foram colhidas, embaladas em papel alumínio e armazenadas a -80 °C.

2.2.2. Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído de folhas, utilizando dois protocolos diferentes: método CTAB (BROD; ARISI, 2007; FERRARI et al., 2007; LIPP, M. et al., 1999) e DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen ®) com modificações (DINON et al., 2011). A concentração do DNA extraído foi determinada em espectrofotômetro Thermo Scientific NanoDrop 2000 (Wilmington, DE, EUA) com medições nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm.

2.2.3. Primers and probe design

Primers e sonda TaqMan foram desenhados com base nas sequências dos genes candidatos que codificam as proteínas do feijão α -Phaseolin (Acesso no GenBank X52626.1), Arcelin 5c (Acesso no GenBank AF193029.1) e lectina (Acesso no

GenBank J01261.1). Estas sequências tiveram sua especificidade testada *in silico*, utilizando a ferramenta Blastn. Os fragmentos que não apresentam homologia com outras sequências presentes no GenBank foram selecionados para o desenho dos iniciadores e sonda. Os iniciadores foram desenhados usando o software Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) e três pares foram selecionados, PvLEC, PvFAS e PvARC, cada um tendo como alvo uma sequência específica (Tabela 2.1). Os iniciadores foram sintetizados pela IDT (Coralville, IA, EUA). A sonda TaqMan tendo como alvo o gene da lectina de feijão também foi desenhada usando o software Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) e foi sintetizada pela Life Technologies (Foster City, CA, EUA) (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 – Iniciadores e sonda desenhados para detecção taxon-específica de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)

Iniciador/ Sonda	Sequencia 5'-3'	Amplicon (pb)	Tm Teórico
PvFASF	AAGGGTCCACTCCTGTTGCT	132	80
PvFASR	GTGTTCCAGGAGTTGTCAGAGTTG		
PvARCF	CTCAGGGTTGACGGAAAATACC	90	78
PvARCR	AGGATGTTGGAAAGTTTGTTCG		
PvLECF	AGTCTCATTCTTCTTTTCTGCTA	110	71
PvLECR	ATGGTGAATAATAAGCAGTGTAGATTG		
S. PvLEC	FAM-CTGTACACAACTAAAAT-MGB		

2.2.4. Condições da PCR em tempo real

A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) foi realizada no ABI PRISM 7500 Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para as reações de SYBR Green, três concentrações foram inicialmente testadas para cada par de iniciadores: 400, 500 e 600 nM. As reações de amplificação foram realizadas num volume final de 25 µL, contendo 12,5 µL de SYBR Green Master Mix 2X (Applied Biosystems), iniciadores,

água e 50 ng de DNA molde. Após otimização da concentração dos iniciadores, as reações foram realizadas num volume final de 25 μL , contendo 12,5 μL SYBR Green Master Mix 2X (Applied Biosystems), 500 nM de iniciadores PvLEC ou 600 nM de PvFAS, água e 50 ng de DNA molde.

A sonda TaqMan foi desenvolvida para a detecção da lectina e as reações foram realizadas com os iniciadores PvLEC, sendo que três concentrações de sonda foram testadas: 150, 250, e 350 nM. As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25 μL , contendo 12,5 μL de TaqMan Universal PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems), 500 nM de iniciadores PvLEC, sonda LEC, água e 50 ng de DNA molde. Após a otimização da concentração de sonda, as reações foram realizadas em um volume final de 25 μL , sendo 12,5 μL de TaqMan Universal PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems), 500 nM de iniciadores PvLEC, 250 nM de sonda LEC, água e 50 ng de DNA molde. Todas as reações foram realizadas em duplicata com as seguintes condições de ciclo: 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C, 40 ciclos de: 15 segundos a 94 °C e 1 min a 60 °C.

2.2.5. Construção das curvas padrão

Diluições seriadas com DNA genômico isolado das folhas de feijão GM Embrapa 5.1 Pérola e Pontal e as suas isolinhas não-GM foram realizadas em água, com concentrações finais equivalentes a 10^5 a 10^0 cópias de DNA. O número de cópias foi calculado a partir do valor de 1C de 637 Mbp para o genoma de *Phaseolus vulgaris* L. (Dinon et al., 2012), da constante de Avogadro ($6,023 \times 1,0^{23}$) e o peso molecular do DNA (660 Da/pb). Portanto, os números de cópias estimados nas curvas padrão foram calculados como sendo 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 e 10^0 cópias do genoma haplóide, correspondentes às concentrações de 69,8 ng a $6,98 \times 10^{-4}$ ng de DNA, que foram utilizadas como DNA molde nas reações de PCR. Cada curva padrão foi repetida em três PCR independentes em dias diferentes. As eficiências das reações foram determinadas utilizando a equação $E = 10^{(-1/s)} - 1$, onde E é a eficiência e s é a inclinação da reta obtido a partir da curva padrão. Os coeficientes de variação (CV) dos ensaios de qPCR foram

calculados pela divisão do desvio padrão pelo Ct médio, e expressos em %.

2.2.6. Especificidade do ensaio de referência endógena

A fim de avaliar a especificidade do método, o ensaio LEC foi testado com todo o material foliar disponível (Tabela Suplementar 1), utilizando as mesmas condições de reação descritas na seção anterior. Para avaliar a especificidade da referência endógena já disponível (DINON et al. De 2012), 48 amostras de DNA, incluindo 44 variedades de *Phaseolus vulgaris*, uma de *Phaseolus lunatus*, uma de *Vigna unguiculata*, uma de *Canavalia gradiata* e uma de *Glycine max* foram testadas por qPCR, utilizando o método FEI, desenvolvido por Dinon et al. (DINON et al., 2012). As concentrações de iniciadores e sonda foram, respectivamente, 500 nM e 250 nM para o ensaio LEC e 300 nM e 200 nM para o ensaio FEI.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Especificidade do ensaio SYBR Green

A especificidade dos iniciadores PvARC, PvFAS e PvLEC foi avaliada inicialmente para as variedades de feijão Pérola e Olathe não-GM, utilizando três concentrações de iniciadores: 600 nm, 500 nm e 400 nm. PvARC não apresentou amplificação ou valores tardios de Ct para todas as concentrações de iniciadores testadas (Tabela Suplementar 2). PvFAS e PvLEC apresentaram a amplificação esperada, entretanto PvFAS apresentou sinais de fluorescência mais elevados na curva de dissociação (Figura Suplementar 1) e valores de Ct mais baixos do que PvLEC (Tabela Suplementar 2). Com base nesses resultados, os iniciadores PvFAS (600 nm) foram, então, testados com sete variedades não transgênicas de feijão, duas variedades de feijão GM e onze variedades de plantas de controle negativo (milho, ervilha, lentilha, soja, arroz, feijão-caupi, quinoa, milho Bt 11, milho Bt 176, milho MON 810 e soja RR). Os resultados

demonstraram o breve sinal de amplificação esperado para todas as variedades de feijão ($Ct < 18$), enquanto o DNA das variedades de controle negativo apresentaram valores de Ct tardios ($Ct > 30$) (Tabela Suplementar 2). Para algumas variedades de controle negativo, o T_m do *amplicon* (fragmento amplificado) estava próximo do T_m apresentado pelas variedades de feijão. Por esta razão, foram realizadas reações contendo iniciadores PvFAS em concentrações de 100 nm, 200 nm e 300 nm e DNA a partir de uma variedade de feijão não-GM e sete variedades de controle negativo (milho, ervilha, lentilha, soja, feijão-caupi, milho Bt 11 e milho Bt 176). O DNA de feijão apresentou o sinal de amplificação esperado e as variedades de controle negativo apresentaram valores de Ct tardios (Tabela Suplementar 2). No entanto, o T_m do *amplicon* das variedades de controle negativo permaneceram próximas do T_m apresentados pelas variedades de feijão.

Tabela 2.2 – Valores de Eficiência (E) da PCR e coeficiente de correlação (R^2) para as curvas padrão do ensaio SYBR Green usando PvLECF/PvLECR (500 nM) e amostras de DNA extraídas a partir de duas variedades de feijão GM e não GM (Pérola e Pontal) com os protocolos DNeasy kit e CTAB

Amostra	DNeasy kit		CTAB	
	E (%)	R^2	E (%)	R^2
Pérola	102	0,998	105	0,999
Pérola GM	106	0,978	97	0,997
Pontal	98	0,991	102	0,999
Pontal GM	96	0,999	101	0,999

Os iniciadores PvLEC foram então testados para amostras de feijão e para as variedades de controle negativo, devido à falta de especificidade apresentada pelos iniciadores PvFAS. Reações contendo 500 mM de iniciadores PvLEC e DNA de sete variedades não transgênicas de feijão, duas variedades de feijão GM e onze variedades de controle negativo (milho, ervilha, lentilha, soja, arroz, feijão-caupi, quinoa, milho Bt 11, milho Bt

176, milho MON 810 e soja RR) foram testadas. Foi observado o sinal de amplificação esperado para todas as variedades de feijão ($Ct < 21$). Em relação às variedades de controle negativo, quatro amostras (milho, ervilha, feijão-caupi e quinoa) apresentaram a não amplificação esperada, enquanto sete amostras (lentilha, soja, arroz, milho Bt 11, milho Bt 176, milho MON 810 e soja RR) apresentaram valores de Ct tardios ($Ct > 35$) (Tabela Suplementar 2). Diferente dos iniciadores PvFAS, apenas uma variedade de controle negativo apresentou o T_m do *amplicon* próximo do T_m do *amplicon* apresentado pelas variedades de feijão (Tabela Suplementar 2). Os iniciadores PvLEC também foram testados na concentração de 200 nM para duas variedades não transgênicas de feijão e seis variedades de controle negativo (milho, arroz, lentilha, milho Bt 11, milho Bt 176 e milho MON 810) e os resultados foram semelhantes aos os encontrados anteriormente (Tabela Suplementar 2).

2.3.2. Parâmetros das reações para o ensaio SYBR Green

As curvas padrão foram construídas a partir de quatro concentrações de iniciadores PvLEC (500 nM, 400 nM, 300 nM e 200 nM). As reações foram realizadas com a amostra Pérola GM e sua isolinha não-GM. As eficiências variaram entre 106% e 123% e de 87% a 107 %, respectivamente (Tabela suplementar 3). Os iniciadores na concentração de 500 nM apresentaram as melhores eficiências, sendo 102% para a amostra Pérola não-GM e 106% para Pérola GM (Tabela Suplementar 3). Os experimentos futuros foram realizados com uma concentração padrão de iniciadores de 500 nM.

Depois de determinar a concentração ideal para os iniciadores PvLEC, a eficiência de amplificação foi determinada através de uma curva padrão proveniente de uma diluição seriada contendo 10^5 a 10^0 cópias de DNA das amostras GM e não-GM das variedades Pérola e Pontal. As amostras de DNA extraídas usando os métodos de extração DNeasy Mini kit (Qiagen[®]) e CTAB foram utilizadas como DNA molde. As eficiências variaram de 96% a 102% e de 97% a 105% para as amostras extraídas com DNeasy Mini kit (Qiagen[®]) e CTAB, respectivamente (Tabela 2.2). Os coeficientes de correlação (R^2)

variaram de 0,978 a 0,999 e de 0,997 a 0,999 para as amostras extraídas com DNeasy Mini kit (Qiagen®) e CTAB, respectivamente (Tabela 2.2).

2.3.3. Parâmetros da reação para o ensaio Taqman

As curvas padrão foram construídas a partir de três concentrações da sonda LEC (350 nM, 250 nM e 250 nM) e 500 nM de iniciadores PvLEC. As reações foram realizadas com as amostras Pérola sonda e sua isolinha não-GM, com amostras de DNA extraídos usando os métodos de extração DNeasy Mini kit (Qiagen®) e CTAB. As eficiências variaram de 91% a 104%, de 93% a 99% e de 84% a 97% para 350 nM, 250 nM e 150 nM, respectivamente (Tabela 2.3). As concentrações de 350 nM e 250 nM mostraram as eficiências mais adequadas, mas a concentração de 250 nM apresentou menor variação entre as eficiências e os valores de Ct mais breves para 10^5 cópias (19,5 para 250 nM e 21,6 para 350 nm) (Tabela Suplementar 4). Os experimentos futuros foram realizados utilizando uma concentração padrão de sonda de 250 nM.

Tabela 2.3 – Valores de Eficiência (E) da PCR e coeficiente de correlação (R^2) das curvas padrão para o ensaio TaqMan utilizando três concentrações de sonda PvLEC e amostras de DNA das amostras de feijão GM e não-GM (variedade Pérola) extraídas com os protocolos de extração DNeasy kit e CTAB

[Sonda] (nM)	Pérola				Pérola GM			
	DNeasy kit		CTAB		DNeasy kit		CTAB	
	E	R^2	E	R^2	E	R^2	E	R^2
350	97	0,995	102	0,997	104	0,976	91	0,999
250	99	0,994	96	0,996	93	0,992	94	0,999
150	92	0,998	97	0,995	92	0,998	84	0,998

2.3.4. Repetibilidade do ensaio Taqman

A fim de testar a repetibilidade do método, três experimentos de qPCR foram realizados em três dias, em duplicata. Em cada dia, um diferente extrato de DNA (DNeasy Mini kit) foi testado. As reações foram realizadas com as amostras Pérola GM, Pontal GM e suas isolinhas. Cada reação resultou em uma curva padrão, obtida a partir de uma diluição seriada contendo 10^5 a 10^0 cópias do genoma. As eficiências variaram de 86% a 103% para todas as qPCR, sendo 101%, 97% , 92% e 94% a eficiência média para as amostras Pérola não-GM, Pontal não-GM, Pérola GM e Pontal GM, respectivamente (Tabela 2.4). O R^2 variou de 0,994 a 0,998. Uma curva padrão geral foi gerada utilizando todos os dados obtidos a partir dos três dias de experimento, com as quatro amostras e em duplicata ($n = 24$), sendo as médias dos parâmetros de reação de 96% e de 0,999 para a eficiência e coeficiente de correlação, respectivamente (Figura 2.1). Os coeficientes de variação (CV) dos valores de Ct foram calculados a partir destes experimentos e apresentaram valores abaixo de 3,9% para todas as quatro variedades de feijão (Tabela suplementar 5).

Figura 2.1: Curva padrão Taqman usando sonda LEC. A curva foi gerada a partir de quatro amostras de DNA (duas variedades de feijão transgênicas e duas variedades isogênicos não GM) em duplicata e três extrações de DNA independentes, realizadas em dias diferentes (n = 24)

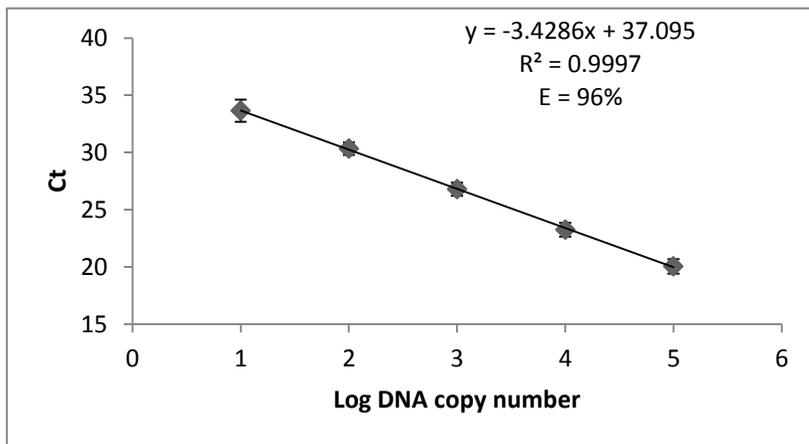


Tabela 2.4 – Valores de Eficiência (E) da PCR e coeficiente de correlação (R^2) das curvas padrão para o ensaio TaqMan usando amostras de DNA extraídas de duas variedades de feijão GM e não-GM (Pérola e Pontal) em três experimentos independentes.

Amostra	Dia 1		Dia 2		Dia 3		Média	
	E (%)	R^2						
Pérola	102	0,999	99	0,999	103	0,985	101	0,994
Pontal	100	0,998	98	0,999	93	0,996	97	0,997
Pérola GM	95	0,996	88	0,996	93	0,999	92	0,997
Pontal GM	100	0,999	96	0,999	86	0,997	94	0,998

2.3.5. Especificidade e homogeneidade do ensaio de referência endógena Taqman

A especificidade e homogeneidade do ensaio LEC (iniciadores PvLEC a 500 nM e sonda LEC a 250 nM) foram avaliadas com sessenta e cinco diferentes amostras de DNA, sendo cinquenta amostras de diferentes variedades de feijão (incluindo dois GM) e quinze de diferentes espécies utilizadas como controles negativo (incluindo três eventos GM de milho e um de soja) (Tabela Suplementar 2.1). As reações para *Phaseolus vulgaris* foram realizadas quatro vezes para as amostras Batatinha, CF800032, CF200074, CF200086, CF200043, CF240021, CF800392, CF200013, CF230030, CF240099, Embaixador e Campeiro e oito vezes para todas as outras amostras. Estas amostras de DNA apresentaram o sinal de amplificação esperado, sendo o Ct médio de $20,3 \pm 0,73$ (Figura 2.2). O ensaio táxon-específico FEI, que tem como alvo a sequência promotora PvSR2 (DINON et al., 2012), foi avaliado com o teste de quarenta e quatro variedades de *Phaseolus vulgaris*, a fim de comparação com o ensaio LEC. As reações foram realizadas quatro vezes para cada amostra. Todas as amostras apresentaram a amplificação esperada, sendo o valor médio do Ct de $26,34 \pm 1,26$ (Figura 2.2).

Para o DNA de folha de *Vigna unguiculata*, os resultados de ensaio LEC mostraram valores tardios de Ct ($Ct > 35$) em cinco das catorze reações (Tabela 2.4), enquanto para o DNA de grão os resultados de apresentaram Ct tardio para apenas uma reação de quatro. Para *Phaseolus lunatus*, foram detectados valores tardios de Ct ($Ct > 35$) em quatro de oito reações (Tabela 2.5). Para *Glycine max*, apenas uma reação de quatorze apresentou um valor tardio de Ct (Tabela 2.5). Todas as outras variedades de controle negativo (feijão branco, milho, ervilha, lentilha, grão de soja, arroz, quinoa, milho GM Bt11, milho GM Bt176, milho GM MON810 e soja GM RR) não apresentaram amplificação (Tabela 2.5).

Figura 2.2: Valores de Ct obtidos utilizando os ensaios LEC (◇) e FEI (●) e DNA extraídos de diferentes variedades de feijão. Linha contínua: representa o valor médio de Ct para todas as variedades amplificadas com ensaio FEI. Linha tracejada: representa o valor médio de Ct para todas as variedades amplificadas com ensaio LEC

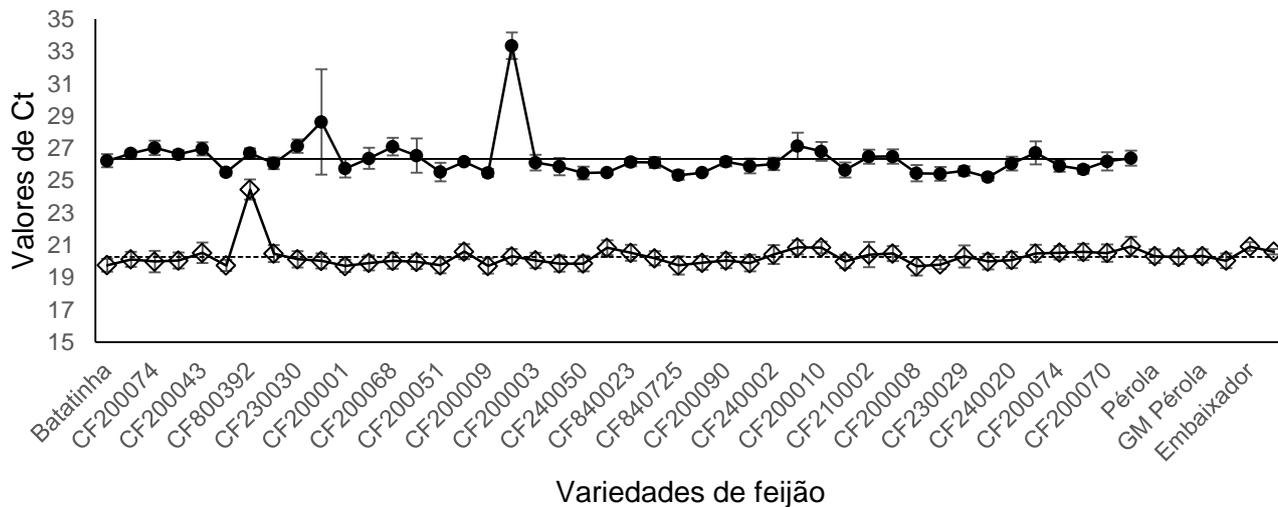


Table 2.5 – Valores de Ct médio obtido através do ensaio TaqMan (Sonda LEC 250 nM e iniciadores PvLECF/PvLECR 500 nM) e DNA extraídos dos controles negativos

Amostra	DNA	Ct	SD	Positivo/Total
<i>Canavalia gradiata</i>	Folha	nd	-	0/8
<i>Phaseolus lunatos</i>	Folha	36.47	0.64	4/8
<i>Vigna unguiculata</i>	Folha	36.51	0.63	5/14
<i>Glycine max</i>	Folha	34.84	-	1/14
<i>Zea mays</i>	Grão	nd	-	0/4
<i>Pisum sativum</i>	Grão	nd	-	0/4
<i>Lens culinaris</i>	Grão	nd	-	0/6
<i>Glycine max</i>	Grão	nd	-	0/4
<i>Oryza sp.</i>	Grão	nd	-	0/6
<i>Vigna unguiculata</i>	Grão	36.26	-	1/4
<i>Chenopodium quinoa W.</i>	Grão	nd	-	0/4
<i>Zea mays</i> (Bt11)	Grão	nd	-	0/4
<i>Zea mays</i> (Bt176)	Grão	nd	-	0/4
<i>Zea mays</i> (Mon810)	Grão	nd	-	0/6
<i>Glycine max</i> (RR)	Grão	nd	-	0/4

nd = não detectado

2.4. DISCUSSÃO

O feijão GM Embrapa 5.1 foi aprovado para comercialização no Brasil em 2011 e, por causa da legislação brasileira, que exige a rotulagem de produtos que contenham OGM, métodos para a quantificação deste novo OGM são necessários no Brasil, e também em outros países onde este feijão GM ainda não está aprovado para comercialização. Devido à sua elevada sensibilidade e especificidade, a PCR quantitativa em tempo real (qPCR) é a técnica mais utilizada para a análise de OGM. Quando se analisa um OGM por qPCR, a quantificação de uma referência endógena táxon-específica é necessária para expressar os resultados em números de cópias. Desta forma, um

alvo táxon-específico deve estar disponível para a detecção e quantificação confiável de um OGM. O presente trabalho relata o desenvolvimento de um novo método de qPCR para a detecção e quantificação do feijão (*Phaseolus vulgaris*) através de uma referência endógena táxon-específica.

Três genes que codificam as proteínas do feijão α -faseolina, arcelina 5c e lectina foram escolhidos como candidatos a referência endógena. Análises de alinhamento foram realizadas utilizando a ferramenta Blast-n e as regiões não apresentam homologies significantes com o DNA genômico de outras plantas. Os iniciadores foram então utilizados em testes de especificidade por PCR em tempo real, utilizando SYBR Green. O par de iniciadores PvARC, visando o gene arcelina 5c *ARC5-III*, não apresentou sinal de amplificação. A sequência *ARC5-III* foi originalmente obtida de uma linhagem selvagem de *Phaseolus vulgaris* da Colômbia e do cultivar Jalo da Embrapa (GERHARDT et al., 2000). A sequência do gene utilizada para o desenho dos iniciadores foi possivelmente diferente das sequências dos genes das variedades testadas e a presença de *mismatch* dentro das regiões de hibridação dos iniciadores podem ter causado a não amplificação observada. Os primeiros experimentos mostraram que o par de iniciadores PvFAS apresentaram valores de Ct mais breves quando comparados com o par de iniciadores PvLEC. No entanto, os iniciadores PvFAS apresentaram menos especificidade do que os iniciadores PvLEC e por esta razão o último foi utilizado nos experimentos posteriores.

Sondas TaqMan tem sido escolhidas para a maioria dos métodos padrão validados para análises de OGM, principalmente devido à sua elevada especificidade e à possibilidade de ensaios *multiplex*. No presente trabalho, uma sonda TaqMan foi desenvolvida para ser utilizada em conjunto com o par de iniciadores PvLEC e a concentração ótima foi determinada experimentalmente, a fim de desenvolver o ensaio táxon-específico LEC. A tecnologia *minor groove binding* (MGB) usada na sonda LEC melhora a especificidade da hibridação (KUTYAVIN et al., 2000), permitindo a criação de sondas mais curtas com Tm mais elevados (ANDERSEN et al., 2006).

A nova abordagem modular para validação de método, proposto por Holst-Jensen e Berdal (HOLST-JENSEN; BERDAL, 2004) sugere que a preparação da amostra, extração do DNA e PCRs para sequências alvo individuais, podem ser tratadas

como módulos separados, que em conjunto formam um método. Dessa forma, o método de extração de DNA deve proporcionar um DNA apropriado a partir de uma matriz específica. Sendo assim, a escolha do método de extração de DNA é essencial para o resultado do processo, pois pode influenciar no rendimento do DNA e na remoção de substâncias que poderiam interferir na PCR (CANKAR et al., 2006). Dois protocolos diferentes para a extração de DNA genômico foram utilizados para determinar a eficiência do ensaio LEC: o método CTAB e o método comercial DNeasy kit. Apesar das diferenças entre os métodos, os resultados apresentaram similaridade tanto em relação à eficiência quanto ao R^2 . Estes resultados são confirmados por aqueles relatados por Cankar et al (CANKAR et al., 2006). Comparando cinco métodos de extração de DNA comumente utilizados, esses autores concluíram que tanto os protocolos CTAB e DNeasy kit são adequados para a análise de OGM. Por ser um método mais rápido, o DNeasy kit foi usado como o método de extração de DNA padrão para os experimentos posteriores. De acordo com os padrões da ENGL (ENGL, 2008) os valores de eficiência de um método de detecção de confiança devem estar entre 90 e 110% e o R^2 deverá ser $\geq 0,98$. A eficiência média e os valores de R^2 obtidos para o ensaio LEC estavam de acordo com os requisitos da ENGL. Além disso, os valores de RSD foram menores do que 4%, mantendo-se abaixo do mínimo de 25%, proposto também pela ENGL.

O método de detecção de referência endógena deve cumprir alguns requisitos para que se tenha um resultado confiável. Ele deve ser específico o suficiente para identificação de uma espécie e estável entre diferentes variedades. Além disso, ele deve estar presente em uma única cópia no genoma ou, pelo menos, em baixo número de cópias (CHAOUACHI; BERARD; et al., 2013). Sabe-se que o feijão doméstico originase de dois grandes grupos distintos de genes, Andino e Mesoamericano (Gepts, 1998), sendo que as linhagens de feijão selvagens e domésticas apresentam grande variação genômica quando comparadas as populações dos grupos Mesoamericano e Andino (CHACON; PICKERSGILL; DEBOUCK, 2005; GEPTS et al., 1988). O ensaio LEC foi avaliado quanto à sua especificidade e estabilidade usando amostras de DNA obtidas a partir de cinquenta diferentes variedades de *Phaseolus vulgaris*

L., bem como a partir de espécies de feijão relacionadas. Estas variedades de feijão foram cultivadas em quatro das cinco regiões brasileiras, sendo em nove estados diferentes e vinte e nove cidades. As sementes utilizadas nestes experimentos variaram em tamanho, desde pequenas (até 20 g/100 sementes) até muito grandes (mais do que 40 g/100 sementes) e também variaram em doze grupos de cores. Estas caracterizações morfológicas sugerem que as variedades testadas provêm de ambos os grupos de genes (SINGH; GEPTS; DEBOUCK, 1991). Apesar da grande diferença entre as variedades, o gene da lectina mostrou alta estabilidade entre as amostras, que apresentam uma diferença de apenas 1,2 valores de Ct para quarenta e nove amostras, enquanto apenas uma apresentou um valor de Ct de 24,4. Isto pode ser devido à presença de *mismatches* nos iniciadores e/ou a região de anelamento da sonda para esta variedade ou o gene alvo pode estar presente em diferentes números de cópias. A alta homogeneidade nos valores de Ct entre as variedades testadas sugere que o número de cópias do alvo pode ser considerado o mesmo e que pode ser conservado tanto no grupo de genes Mesoamericano como no Andino. Neste caso, o ensaio LEC é capaz de detectar com segurança variedades de feijão de ambos os grupos de genes. Diferenças semelhantes de Ct foram encontradas em genes de referência para alfafa (ALEXANDER et al., 2007), trigo (IIDA et al., 2005), milho (HERNANDEZ et al., 2004), canola (HERNANDEZ et al., 2001), beterraba (CHAOUACHI; ALAYA; et al., 2013), arroz (Wang et al., 2010) e colza (Wu et al., 2010).

Nós já desenvolvemos um método de detecção táxon-específico para *Phaseolus vulgaris*, ensaio FEI, que mostrou alta especificidade quando testado contra amostras de controle negativo, mas também uma grande heterogeneidade (diferenças nos valores de Ct) entre variedades de feijão (DINON et al., 2012). No presente trabalho, variedades de *Phaseolus vulgaris* foram testadas utilizando o ensaio FEI e os resultados apresentados foram semelhantes aos relatados anteriormente. Uma grande diferença entre os valores de Ct e para os valores de desvio padrão foram observadas entre as variedades, quando comparada com os resultados obtidos para o ensaio LEC. Além disso, a amplificação do ensaio de FEI é detectada mais tarde do que a amplificação do ensaio LEC, como demonstrado pela diferença entre os valores médios de Ct.

Em relação às amostras de controle negativo, onze das quinze apresentaram o resultado esperado, com nenhum sinal de amplificação. Apenas algumas reações das quatro amostras restantes apresentaram amplificação com um Ct tardio (valor de Ct > 35). No caso da amostra de *Phaseolus lunatus*, quatro das oito reações apresentaram amplificação com Ct tardio, no entanto, ela pertence ao mesmo gênero do *P. vulgaris*.

O limite de detecção (LOD) do ensaio FEI foi descrito como entre 10^1 e 10^2 cópias de DNA (DINON et al., 2012). O valor médio de Ct para dez cópias foi de 38.21, sendo que algumas reações não apresentaram amplificação para esta quantidade de DNA. Por outro lado, o ensaio LEC apresentou um LOD inferior, como mostraram os sinais positivos observados em 24 das 24 reações para 10^1 cópias, com um valor médio de Ct de aproximadamente 33,5. Reações positivas também foram observadas em 9 das 24 reações a 10^0 cópias, com um valor médio de Ct de cerca de 35,5.

Este trabalho apresenta um novo método de detecção espécie-específico para a detecção e quantificação de *Phaseolus vulgaris* por amplificação em qPCR do gene alvo da lectina do feijão. Os resultados mostraram que o ensaio LEC satisfaz os requisitos propostos pela ENGL e pode ser utilizado em quantificação de feijão GM. Além disso, os iniciadores desenhados neste trabalho podem ser usado com TaqMan e SYBR Green. Desta forma, como um método alternativo, o SYBR Green pode também ser utilizado para a detecção de *Phaseolus vulgaris* L. e quantificação do feijão GM. Esta capacidade do SYBR Green foi observada em outros trabalhos com diversas variedades de plantas (BARBAU-PIEDNOIR et al., 2010; BARBAU-PIEDNOIR et al., 2012; HERNANDEZ et al., 2003; KLUGA et al., 2013; MBELLA et al., 2011). Além disso, o número de eventos transgênicos liberado no mercado em todo o mundo esta crescendo (HUBER et al. , 2013) e este novo método pode ser útil como análise de rotina para laboratórios de OGM nos países onde feijão GM ainda não está aprovado para comercialização.

O fornecimento de ferramentas analíticas e referências de DNA plasmidial para quantificação de novos eventos GM é de grande importância (BROD et al., 2013), portanto, este novo ensaio será útil para pesquisas que estão de acordo com a

legislação de rotulagem de OGM pelas autoridades reguladoras no Brasil e em outros países (BRANQUINHO et al., 2010).

AGRADECIMENTOS O presente trabalho teve o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Ministério da Ciência e Tecnologia, Brasil, Projetos do CNPq 471401/2012-9 e 470683/2012-0. G.L.V. recebeu bolsa de mestrado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). F.C.A.B. bolsa CAPES PNPd, A.C.M.A. bolsa de pesquisa do CNPq (PQ-2), G.B.R. bolsa de IC do CNPq e N.F.Z. bolsa CNPq PIBIT UFSC.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela suplementar 1 Amostras de diferentes variedades de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e outras espécies utilizadas neste estudo

Tabela Suplementar 2 teste de especificidade para os pares de iniciadores PvFAS, PvLEC e PvARC com diferentes concentrações utilizando o ensaio SYBR Green

Tabela Suplementar 3 Eficiências (E) da PCR para o ensaio SYBR Green usando o feijão Pérola GM e não-GM como DNA molde e diferentes concentrações de iniciadores

Tabela Suplementar 4 Comparação dos valores de Ct obtidos para o ensaio Taqman utilizando três concentrações de sonda, 500 nM dos iniciadores PvLEC e diluições seriadas de feijão GM e não-GM como DNA molde

Tabela Suplementar 5 Valores de Ct médio, SD e RSD de quatro variedades GM e não-GM de três experimentos independentes

Figura Suplementar 1 Curva de dissociação dos fragmentos gerados a partir das três referências endógenas alvo usando o feijão Olathe não-GM e Pérola como DNA molde. A α -faseolina, B lectina e C arcelina 5c

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para a detecção e quantificação do feijoeiro geneticamente modificado Embrapa 5.1 em alimentos através de uma nova referência endógena, três genes de proteínas do feijão foram selecionados. Os iniciadores baseados na sequência do gene Arcelina 5c não apresentaram amplificação para as amostras de feijão, sendo então descartados. Os iniciadores utilizando os genes da α -Faseolina e da Lectina como referência obtiveram as amplificações esperadas, demonstrando alta afinidade tanto com os feijões convencionais como GM. Porém, os iniciadores para o gene de Faseolina se mostraram menos específicos, apresentando amplificações tardias para todas as 11 amostras negativas testadas. Desta forma, apenas os iniciadores para o gene de Lectina (ensaio LEC) foram selecionados para os ensaios com sonda TaqMan.

O ensaio LEC foi então testado com 65 amostras, sendo 50 positivas e 15 negativas, apresentando alta especificidade para as amostras de feijão. Além da alta especificidade, o ensaio LEC mostrou homogeneidade entre as amostras provenientes dos dois pools genéticos de feijão, Andino e Mesoamericano. Esta homogeneidade também foi observada entre as amostras GM e convencionais. O ensaio apresentou também um limite de detecção de 10^1 cópias de DNA genômico. Desta forma, esta metodologia se mostrou adequada para detectar e quantificar tanto o feijoeiro GM Embrapa 5.1 como as amostras convencionais de feijão, provenientes de diferentes origens.

Sabendo-se que para a quantificação de OGMs em alimentos precisa-se de ensaios táxon-específicos e evento-específicos, sugere-se para futuras pesquisas o desenvolvimento de uma metodologia evento-específica para o feijoeiro Embrapa 5.1, para que possa ser utilizada juntamente com esta nova referência endógena na quantificação do feijão Embrapa 5.1 em alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, T.; REUTER, T.; MCALLISTER, T. Qualitative and quantitative polymerase chain reaction assays for an alfalfa (*Medicago sativa*)-specific reference gene to use in monitoring transgenic cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 8, p. 2918-2922, APR 18 2007.

ANDERSEN, C. B. et al. Equal performance of TaqMan, MGB, molecular beacon, and SYBR green-based detection assays in detection and quantification of roundup ready soybean. **J Agric Food Chem**, v. 54, n. 26, p. 9658-63, Dec 2006.

ANKLAM, E. et al. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. **European Food Research and Technology**, v. 214, n. 1, p. 3-26, JAN 2002.

ARAGAO, F. et al. Transgenic beans (*Phaseolus vulgaris* L.) engineered to express viral antisense RNAs show delayed and attenuated symptoms to bean golden mosaic geminivirus. **Molecular Breeding**, v. 4, n. 6, p. 491-499, 1998.

ARAGÃO, F. J. L.; FARIA, J. C. F. First transgenic geminivirus-resistant plant in the field. **Nature Biotechnology**, v. 27, n. 12, p. 1086-1088, 2009.

ARAGÃO, F. J. L. et al. Molecular characterization of the first commercial transgenic common bean immune to the Bean golden mosaic virus. **Journal of Biotechnology**, v. 166, n. 1–2, p. 42-50, 6/20/ 2013.

BARBAU-PIEDNOIR, E. et al. SYBR(A (R))Green qPCR screening methods for the presence of "35S promoter" and "NOS terminator" elements in food and feed products. **European Food Research and Technology**, v. 230, n. 3, p. 383-393, JAN 2010.

BARBAU-PIEDNOIR, E. et al. Four new SYBR (R) Green qPCR screening methods for the detection of Roundup Ready (R), LibertyLink (R), and CryIAb traits in genetically modified products.

European Food Research and Technology, v. 234, n. 1, p. 13-23, JAN 2012.

BARROS, N. E. F. D.; OLIVEIRA, E. M. M.; MARIN, V. A. Aplicabilidade da metodologia de reação de polimerase em cadeia em tempo real na determinação do percentual de organismos geneticamente modificados em alimentos. **Revista de Nutrição**, v. 21, p. 85-92, 2008.

BONFIM, K. et al. RNAi-mediated resistance to Bean golden mosaic virus in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, n. 6, p. 717-726, JUN 2007.

BRANQUINHO, M.; FERREIRA, R.; CARDARELLI-LEITE, P. Survey of compliance with labeling legislation in food containing GMOs in Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, n. 3, p. 220-225, MAY 2010.

BRASIL. Lei nº 10.814, de 15 de dezembro de 2003. Estabelece normas para o plantio e comercialização da produção de soja geneticamente modificada da safra de 2004, e dá outras providências. Disponível em <http://www2.camara.gov.br/legin/fed/lei/2003/lei-10814-15-dezembro-2003-497199-normaatualizada-pl.html>>. Acesso em 03 julho 2012.

BRASIL. **Decree no. 4.680, April 24, 2003. Regulates the information access concerning foods and ingredients containing or produced from genetically modified organisms.** D.O.U. Official Journal of Brazil, Brasília, Brazil 2003.

BROD, F.; ARISI, A. Recombinant DNA in meat additives: specific detection of roundup Ready(TM) soybean by nested PCR. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, n. 10, p. 1980-1984, AUG 15 2007.

_____. Quantification of roundup Ready (TM) soybean in brazilian soy-derived foods by real-time PCR. **International**

Journal of Food Science and Technology, v. 43, n. 6, p. 1027-1032, JUN 2008.

BROD, F. et al. Development of Plasmid DNA Reference Material for the Quantification of Genetically Modified Common Bean Embrapa 5.1. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 20, p. 4921-4926, MAY 22 2013.

BROD, F. C. A. et al. Nested PCR detection of genetically modified soybean in soybean flour, infant formula and soymilk. **Lwt-Food Science and Technology**, v. 40, n. 4, p. 748-751, 2007.

BROOHAERTS, W. et al. A single nucleotide polymorphism (SNP839) in the *adh1* reference gene affects the quantitation of genetically modified maize (*Zea mays* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 19, p. 8825-8831, 2008.

CANKAR, K. et al. Critical points of DNA quantification by real-time PCR - effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. **Bmc Biotechnology**, v. 6, AUG 14 2006.

CARDARELLI, P. et al. Detection of GMO in food products in Brazil: the INCQS experience. **Food Control**, v. 16, n. 10, p. 859-866, DEC 2005.

CENTER FOR FOOD SAFETY (CFS). Genetically engineered crops and foods: worldwide regulation and prohibition. Washington, DC, 2006. Disponível em: <<http://www.centerforfoodsafety.org>>. Acesso em: 27 julho. 2012.

CHACON, M.; PICKERSGILL, B.; DEBOUCK, D. Domestication patterns in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and the origin of the Mesoamerican and Andean cultivated races. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 110, n. 3, p. 432-444, FEB 2005.

CHANDRAN, S.; SINGH, R. S. P. Comparison of various international guidelines for analytical method validation. **Pharmazie**, v. 62, n. 1, p. 4-14, Jan 2007.

CHAOUACHI, M. et al. Development of real-time PCR method for the detection and the quantification of a new endogenous reference gene in sugar beet "*Beta vulgaris* L.": GMO application. **Plant Cell Reports**, v. 32, n. 1, p. 117-128, JAN 2013.

CHAOUACHI, M.; BERARD, A.; SAID, K. Relative quantification in seed GMO analysis: state of art and bottlenecks. **Transgenic Research**, v. 22, n. 3, p. 461-476, JUN 2013.

CHAOUACHI, M. et al. Development of a real-time PCR method for the differential detection and quantification of four Solanaceae in GMO analysis: Potato (*Solanum tuberosum*), tomato (*Solanum lycopersicum*), eggplant (*Solanum melongena*), and pepper (*Capsicum annuum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 6, p. 1818-1828, MAR 26 2008.

CHILTON, M. et al. AGROBACTERIUM-RHIZOGENES INSERTS T-DNA INTO THE GENOMES OF THE HOST PLANT-ROOT CELLS. **Nature**, v. 295, n. 5848, p. 432-434, 1982.

CHILTON, M.D. et al. Stable Incorporation of Plasmid DNA into Higher Plant Cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. **Cell**, Cambridge, v.11, p.263-271, 1977.

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA – CTNBIO. **Aprovações Comerciais: Plantas**. Brasília. Disponível em <http://www.ctnbio.gov.br/upd_blob/0001/1801.pdf>. Acesso em: 15 outubro 2013.

CORBISIER, P.; et al. Absolute quantification of genetically modified MON810 maize (*Zea mays* L.) by digital polymerase chain reaction. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.396, n.6, p.2143–2150, 2010.

DINON, A. et al. Primers and Probes Development for Specific PCR Detection of Genetically Modified Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) Embrapa 5.1. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 18, p. 4672-4677, MAY 9 2012.

DINON, A. Z.; ARISI, A. C. M. Screening maize food products sold in Brazil from 2005 to 2007 for the presence of cryIA(b) and P35S promoter. **International Journal of Biosafety and Biosecurity**, v. 1, p. 4-13, 2010.

DINON, A. Z.; BOSCO, K. T.; ARISI, A. C. M. Monitoring of Bt11 and Bt176 genetically modified maize in food sold commercially in Brazil from 2005 to 2007. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, p. 1566-1569, 2010.

DINON, A.; DE MELO, J.; ARISI, A. Monitoring of MON810 genetically modified maize in foods in Brazil from 2005 to 2007. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 6, p. 515-518, SEP 2008.

DINON, A. et al. Development and validation of real-time PCR screening methods for detection of cry1A.105 and cry2Ab2 genes in genetically modified organisms. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, n. 5, p. 1433-1442, MAY 2011.

DINON, A. Z.; TREML, D.; MELLO, C. S.; ARISI, A. C. M. Monitoring of GMO in Brazilian processed meat and soy-based products from 2007-2008. **Journal of Food Composition and Analysis** (Print), v. 23, p. 226-229, 2010.

EMBRAPA. **CTNBio aprova feijão transgênico desenvolvido pela Embrapa**. Brasília, 2011. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2011/setembro/3a-semana/ctnbio-aprova-feijao-transgenico-desenvolvido-pela-embrapa/?searchterm=feij%C3%A3o%20geneticamente%20modificado>> acesso em: 12 julho 2012.

EMBRAPA. **Cultivo do Feijão Comum em Rondônia**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodoFeijaoComumRO/index.htm>>. Acesso em: 12 julho 2012.

ENGL, E. N. O. G. M. O. L. **Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing**, 13 Oct 2008 2008.

EUROPEAN COMMISSION. Regulation (EC) n.1830/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 concerning the traceability and labeling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending directive 2001/18/EC. **Official Journal European Union**, L268, 2003.

FARIA, J. et al. Partial resistance to Bean golden mosaic virus in a transgenic common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) line expressing a mutated rep gene. **Plant Science**, v. 171, n. 5, p. 565-571, NOV 2006.

FEINBERG, M.; et al. Quantification of the 35S promoter in maize DNA extracts from genetically modified organisms using real-time polymerase chain reaction. Part 2: interlaboratory study. **Journal of AOAC International**, v.88, n.2, p.558-573, 2005.

FERNANDEZ, S; et al. Quantification of the 35S promoter in DNA extracts from genetically modified organisms using real-time polymerase chain reaction and specificity assessment on various genetically modified organisms. Part 1: Operating procedure. **Journal of AOAC International**, v.88, n.2, p.547-557, 2005.

FERRARI, C. et al. Evaluation of polymerase chain reaction and DNA isolation protocols for detection of genetically modified soybean. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 42, n. 10, p. 1249-1255, OCT 2007.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores em análise genética. 3ª ed. Brasília: **EMBRAPA-CERNAGEN**, 220p, 1998.

FISK, H.; DANDEKAR, A. THE INTRODUCTION AND EXPRESSION OF TRANSGENES IN PLANTS. **Scientia Horticulturae**, v. 55, n. 1-2, p. 5-36, AUG 1993.

GARCIA-CANAS, V.; CIFUENTES, A.; GONZALEZ, R. Detection of genetically modified organisms in foods by DNA amplification

techniques. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, n. 6, p. 425-436, 2004.

GEPTS, P. Origin and evolution of common bean: Past events and recent trends. **Hortscience**, v. 33, n. 7, p. 1124-1130, 1998.

GEPTS, P. et al. Dissemination Pathways of Common Bean (*Phaseolus-vulgaris*, Fabaceae) Deduced From Phaseolin Electrophoretic Variability .1. The Americas. **Economic Botany**, v. 42, n. 1, p. 73-85, Jan-Mar 1988.

GERHARDT, I. et al. Molecular characterization of a new arcelin-5 gene. **Biochimica Et Biophysica Acta-Genes Structure and Expression**, v. 1490, n. 1-2, p. 87-98, JAN 31 2000.

GREINER, R. **Methods for identification and quantification of genetically modified material in agricultural crops, processed food and animal feed in relation to regulatory requirements.** Journal of International Biotechnology Law. 1: 81 p. 2004.

GREINER, R.; KONIETZNY, U. Presence of genetically modified maize and soy in food products sold commercially in Brazil from 2000 to 2005. **Food Control**, v. 19, n. 5, p. 499-505, May 2008.

GREINER, R.; KONIETZNY, U.; VILLAVICENCIO, A. Qualitative and quantitative detection of genetically modified maize and soy in processed foods sold commercially in Brazil by PCR-based methods. **Food Control**, v. 16, n. 8, p. 753-759, OCT 2005.

HEID, C. A. et al. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, v. 6, n. 10, p. 986-994, Oct 1996.

HEMMER, W. Foods derived from genetically modified organisms and detection methods. **BATS-Report 2/97**, BATS, Basel, Switzerland; 1997.

HERNANDEZ, M. et al. Development and comparison of four real-time polymerase chain reaction systems for specific detection and quantification of *Zea mays* L. **Journal of**

Agricultural and Food Chemistry, v. 52, n. 15, p. 4632-4637, JUL 28 2004.

HERNANDEZ, M. et al. A rapeseed-specific gene, Acetyl-CoA carboxylase, can be used as a reference for qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenes from mixed food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 8, p. 3622-3627, AUG 2001.

HERNANDEZ, M. et al. Development of melting temperature-based SYBR Green I polymerase chain reaction methods for multiplex genetically modified organism detection. **Analytical Biochemistry**, v. 323, n. 2, p. 164-170, DEC 15 2003.

HOLST-JENSEN, A. Testing for genetically modified organisms (GMOs): Past, present and future perspectives. **Biotechnol Adv**, v. 27, n. 6, p. 1071-82, Nov-Dec 2009.

HOLST-JENSEN, A.; BERDAL, K. The modular analytical procedure and validation approach and the units of measurement for genetically modified materials in foods and feeds. **Journal of Aoac International**, v. 87, n. 4, p. 927-936, JUL-AUG 2004.

HOLST-JENSEN, A. et al. Detecting un-authorized genetically modified organisms (GMOs) and derived materials. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1318-1335, NOV-DEC 2012.

HOLST-JENSEN, A.; DE LOOSE, M.; VAN DEN EEDE, G. Coherence between legal requirements and approaches for detection of genetically modified organisms (GMOs) and their derived products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 8, p. 2799-2809, APR 19 2006.

HOLST-JENSEN, A. et al. PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 375, n. 8, p. 985-993, APR 2003.

HUBER, I. C. et al. Development and Validation of Duplex, Triplex and Pentaplex Real-time PCR Screening Assays for the

Detection of Genetically Modified Organisms in Food and Feed. **J Agric Food Chem**, Aug 2013.

IIDA, M. et al. Development of taxon-specific sequences of common wheat for the detection of genetically modified wheat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 16, p. 6294-6300, AUG 10 2005.

JAMES, C. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011**. ISAAA Brief n. 43. ISAAA: Ithaca, NY.

JAMES, C. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2012**. ISAAA: Ithaca, NY 2012.

JAPAN. Ministry of Agriculture Forestry and Fisheries. Food and Marketing Bureau. **Notification n. 1775**. Tokyo, Japan, 2000.

KLUGA, L. et al. Combinatory SYBR (R) Green Real-Time PCR Screening Approach for Tracing Materials Derived from Genetically Modified Rice. **Food Analytical Methods**, v. 6, n. 2, p. 361-369, APR 2013 2013.

KOREA. Ministry of Agriculture and Forestry. **Notification n. 2000-31**. Seoul, Korea, 2000.

KUTYAVIN, I. V. et al. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. **Nucleic Acids Res**, v. 28, n. 2, p. 655-61, Jan 2000.

LIPP, M. et al. IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder. **Journal of Aoac International**, v. 82, n. 4, p. 923-928, Jul-Aug 1999.

LIPP, M. et al. Polymerase chain reaction technology as analytical tool in agricultural biotechnology. **Journal of Aoac International**, v. 88, n. 1, p. 136-155, JAN-FEB 2005.

LUSSER, M.; et al. New plant breeding techniques. State-of-the-art and prospects for commercial development. **European Commission**. Report: EUR 24760 EN; 2011.

MARKOULATOS, P. et al. Qualitative and quantitative detection of protein and genetic traits in genetically modified food. **Food Reviews International**, v. 20, n. 3, p. 275-296, 2004.

MBELLA, E. et al. SYBR (R) Green qPCR methods for detection of endogenous reference genes in commodity crops: a step ahead in combinatory screening of genetically modified crops in food and feed products. **European Food Research and Technology**, v. 232, n. 3, p. 485-496, MAR 2011.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. **Listagem de OGM autorizados no Brasil**. 2012. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/portal/pls/portal/!PORTAL.wwwpob_page.show?_docname=1324452.PDF>. Acessado em: 21 julho 2012.

MIRAGLIA, M. et al. Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 7, p. 1157-1180, JUL 2004.

MORRISON, T. B.; WEIS, J. J.; WITTEWER, C. T.; Quantification of low copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. **BioTechniques**, v.24, p.954-962, 1998.

MOSCHINI G. Pharmaceutical and industrial traits in genetically modified crops: coexistence with conventional agriculture. **American Journal of Agricultural Economics**. 2006

PAPAZOVA, N. et al. Evaluation of the reliability of maize reference assays for GMO quantification. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, n. 6, p. 2189-2201, Mar 2010.

PATERNÒ, A. et al. Finding the Joker among the Maize Endogenous Reference Genes for Genetically Modified Organism (GMO) Detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 23, p 11086–11091, NOV 10 2009.

QI, X. et al. Zn stress-induced inhibition of bean PvSR2–GUS fusion gene splicing is gene-specific in transgenic tobacco.

Journal of Plant Physiology, v. 166, n. 11, p. 1223-1227, 7/15/2009.

RICHETTI, A; MELO, C. L. P.; SOUSA, J. P. B. Comunicado Técnico: Viabilidade Econômica da Cultura do Feijão Comum, Safra 2012, em Mato Grosso do Sul. **Embrapa**. Dourados. 9 p. 2011.

SCHOLTENS, I. et al. Practical experiences with an extended screening strategy for GMOs in real-life samples. **J Agric Food Chem**, Aug 2013.

SCHOLTENS, I. M. J. et al. Increased efficacy for in-house validation of real-time PCR GMO detection methods. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, n. 6, p. 2213-2227, Mar 2010.

SINGH, S.; GEPTS, P.; DEBOUCK, D. Races of Common Bean (*Phaseolus-vulgaris*, Fabaceae). **Economic Botany**, v. 45, n. 3, p. 379-396, Jul-Sep 1991.

STANDARD A18/1.5.2. Australia New Zealand Food Authority, User Guide – Labelling Genetically Modified Food. Disponível em:

<<http://www.foodstandards.gov.au/srcfiles/userguideGMlabeling0817.pdf>>. Acesso em: 19 abril 2011.

TAVERNIERS, I.; VAN BOCKSTAELE, E.; DE LOOSE, M. Cloned plasmid DNA fragments as calibrators for controlling GMOs: different real-time duplex quantitative PCR methods. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.378, p.1198-1207, 2004.

VIEIRA, L. M. Síntese anual da agricultura Santa Catarina 2009/2010. Florianópolis: **Epagri - ICEPA**, 2011.

WANG, C. et al. Evaluation of Four Genes in Rice for Their Suitability As Endogenous Reference Standards in Quantitative PCR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 22, p. 11543-11547, NOV 24 2010.

WEIGHARDT, F. Session 10. Quantitative PCR for the detection of GMOs. In: **The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms**. User manual. **Joint Research Centre**, Ispra, 2004. Disponível em: <<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20EN/Session10.pdf>>. acesso em: 28 julho 2012.

WU, G. et al. Comparison of Five Endogenous Reference Genes for Specific PCR Detection and Quantification of Brassica napus. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 5, p. 2812-2817, MAR 10 2010.

YONEKURA-SAKAKIBARA, K.; SAITO, K. Review: Genetically modified plants for the promotion of human health. n. 1573-6776 (Electronic), 2006.

APÊNDICE

Tabela suplementar 1 Amostras de diferentes variedades de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e outras espécies utilizadas neste estudo

Nome da espécie	Variedade/ Código da amostra	Evento	Fonte de DNA
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Pérola	-	Folha
	Pérola	EMBRAPA 5.1	Folha
	Pontal	-	Folha
	Pontal	EMBRAPA 5.1	Folha
	Embaixador	-	Folha
	Campeiro	-	Folha
	Batatinha	-	Folha
	CF800032	-	Folha
	CF200074	-	Folha
	CF200086	-	Folha
	CF200043	-	Folha
	CF240021	-	Folha
	CF800392	-	Folha
	CF200013	-	Folha
	CF230030	-	Folha
	CF240099	-	Folha
	CF200001	-	Folha
	CF810136	-	Folha
	CF200068	-	Folha
	CF200056	-	Folha
	CF200051	-	Folha
	CF200082	-	Folha
	CF200009	-	Folha
	CF200005	-	Folha
	CF200003	-	Folha
	CF200002	-	Folha
	CF240050	-	Folha

	CF200044	-	Folha
	CF840023	-	Folha
	CF800025	-	Folha
	CF840725	-	Folha
	CF840650	-	Folha
	CF200090	-	Folha
	CF240003	-	Folha
	CF240002	-	Folha
	CF200012	-	Folha
	CF200010	-	Folha
	CF200011	-	Folha
	CF210002	-	Folha
	CF200007	-	Folha
	CF200008	-	Folha
	CF220283	-	Folha
	CF230029	-	Folha
	CF240001	-	Folha
	CF240020	-	Folha
	CF240029	-	Folha
	CF200074	-	Folha
	CF200042	-	Folha
	CF200070	-	Folha
	CF200072	-	Folha
<i>Canavalia gradiata</i>	Feijão Branco	-	Folha
<i>Phaseolus lunatos</i>	Fava roxa	-	Folha
<i>Vigna unguiculata</i>	Caupi catalão	-	Folha
<i>Glycine max</i>	-	-	Folha
<i>Glycine max</i>	-	-	Grão
<i>Glycine max</i>	-	Roundup Ready	Grão
<i>Pisum sativum</i>	-	-	Grão
<i>Lens culinaris</i>	-	-	Grão
<i>Oryza sp.</i>	-	-	Grão

<i>Vigna unguiculata</i>	-	-	Grão
<i>Chenopodium quinoa</i> W.	-	-	Grão
<i>Zea mays</i>	-	-	Grão
<i>Zea mays</i>	-	Bt 11	Grão
<i>Zea mays</i>	-	Bt 176	Grão
<i>Zea mays</i>	-	Mon 810	Grão

Milho Bt 11	31,37	80,72	-	-	-	-	34,29	75,15	35,63	80,81	35,83	80,99
Milho Bt 11	31,39	80,72	-	-	-	-	33,94	75,70	34,29	80,08	36,89	75,51
Milho Bt 176	30,45	80,53	-	-	-	-	33,93	79,90	34,26	80,26	35,49	80,45
Milho Bt 176	30,61	80,72	-	-	-	-	33,66	73,87	35,57	80,26	33,33	75,51
Milho MON 810	33,35	79,80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Milho MON 810	32,56	75,41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Soja RR	34,49	74,50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Soja RR	34,49	77,42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Feijão preto	17,40	79,44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Feijão preto	17,77	79,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Feijão roxo	18,42	79,80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Feijão roxo	18,18	79,62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carioca	18,68	79,80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carioca	18,67	79,62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BRS Esplendor	17,90	79,80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BRS Esplendor	17,96	79,62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Olathe	14,45	79,94	18,87	79,94	17,92	79,77	-	-	-	-	-	-
Olathe	14,18	80,12	18,92	80,12	17,92	79,94	-	-	-	-	-	-
Pérola	15,53	79,98	18,88	80,12	17,91	79,94	16,06	79,35	16,27	79,53	15,75	79,72
Pérola	15,59	79,62	18,98	80,30	17,90	80,30	15,97	79,53	16,67	79,72	15,69	79,72

Caupi	-	-	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	-
Quinoa	-	-	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	-
Quinoa	-	-	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	-
Milho Bt 11	-	-	35,56	78,25	-	-	-	-	ND	ND	-	-
Milho Bt 11	-	-	36,66	78,07	-	-	-	-	36,81	62,35	-	-
Milho Bt 176	-	-	37,09	77,89	-	-	-	-	ND	ND	-	-
Milho Bt 176	-	-	37,91	78,25	-	-	-	-	35,06	79,17	-	-
Milho MON 810	-	-	35,36	70,76	-	-	-	-	36,78	68,38	-	-
Milho MON 810	-	-	35,18	68,57	-	-	-	-	ND	ND	-	-
Soja RR	-	-	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	-
Soja RR	-	-	39,16	71,50	-	-	-	-	-	-	-	-
Feijão preto	-	-	19,63	71,31	-	-	-	-	18,98	71,67	-	-
Feijão preto	-	-	19,56	71,13	-	-	-	-	19,20	71,31	-	-
Feijão roxo	-	-	18,70	71,86	-	-	-	-	-	-	-	-
Feijão roxo	-	-	18,54	71,86	-	-	-	-	-	-	-	-
Carioca	-	-	20,94	71,31	-	-	-	-	-	-	-	-
Carioca	-	-	21,22	71,13	-	-	-	-	-	-	-	-
BRS Esplendor	-	-	20,43	71,13	-	-	-	-	19,39	71,31	-	-
BRS Esplendor	-	-	20,20	70,76	-	-	-	-	19,78	71,12	-	-
Olathe	18,22	70,46	17,94	70,64	18,83	70,64	-	-	-	-	-	-

BRS Esplendor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BRS Esplendor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Olathe	37,17	72,79	ND	ND	38,65	77,62	-	-	-	-	-	-
Olathe	37,65	73,15	37,40	73,15	37,24	73,15	-	-	-	-	-	-
Pérola	ND	ND	37,14	62,41	ND	ND	-	-	-	-	-	-
Pérola	36,92	73,32	ND	ND	35,62	77,98	-	-	-	-	-	-
Pontal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pontal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pérola GM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pérola GM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pontal GM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pontal GM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ND = não detectado

- = não realizado

Tabela Suplementar 3 Eficiências (E) da PCR para o ensaio SYBR Green usando o feijão Pérola GM e não-GM como DNA molde e diferentes concentrações de iniciadores

[Iniciadore]	Pérola		Pérola GM	
	E (%)	R ²	E (%)	R ²
500	102	0,998	106	0,978
400	94	0,995	109	0,963
300	107	0,998	123	0,958
200	87	0,995	110	0,982

Tabela Suplementar 4 Comparação dos valores de Ct obtidos para o ensaio Taqman utilizando três concentrações de sonda, 500 nM dos iniciadores PvLEC e diluições seriadas de feijão GM e não-GM como DNA molde

[probe] (nM)	Pérola						Pérola GM					
	350		250		150		350		250		150	
Log cp number	Ct	SD	Ct	SD	Ct	SD	Ct	SD	Ct	SD	Ct	SD
5	21,60	0,00	19,34	0,62	22,41	0,16	21,68	0,01	19,94	0,07	22,22	0,04
4	24,82	0,06	23,09	0,20	25,67	0,07	24,79	0,11	23,26	0,06	25,55	0,02
3	28,64	0,11	26,85	0,06	29,48	0,16	28,63	0,12	26,74	0,01	29,15	0,08
2	32,38	0,22	30,48	0,30	33,24	0,31	32,13	0,23	30,57	0,14	33,13	0,22
1	34,80	0,29	33,34	0,27	36,21	0,67	36,27	0,09	34,98	0,03	36,03	1,20
0	nd	-	35,90	-	nd	-	36,68	0,40	36,63	0,31	nd	-

nd: não detectado

Tabela Suplementar 5 Valores de Ct médio, SD e RSD de quatro variedades GM e não-GM de três experimentos independentes

Log cp nº	Dia 1 Ct	Dia 2 Ct	Dia 3 Ct	Média Ct	SD	RSD
Pérola						
5	20,40	20,83	19,50	20,24	0,62	3,05
4	23,43	23,89	22,53	23,28	0,63	2,69
3	26,70	27,58	26,30	26,86	0,59	2,19
2	30,41	30,91	30,30	30,54	0,35	1,15
1	33,30	34,05	31,88	33,08	1,02	3,08
0	35,46	nd	nd	nd	-	-
Pontal						
5	20,41	20,48	19,12	20,00	0,69	3,46
4	23,58	23,72	22,48	23,26	0,62	2,65
3	26,84	27,40	26,11	26,78	0,60	2,22
2	29,86	30,85	29,67	30,13	0,57	1,90
1	33,89	33,79	33,04	33,57	0,63	1,86
0	36,96	37,19	35,32	36,49	1,33	3,64
Pérola GM						
5	20,27	20,79	19,17	20,08	0,75	3,73
4	23,34	23,97	22,38	23,23	0,72	3,11
3	26,64	27,56	26,23	26,81	0,62	2,31
2	30,51	31,03	29,74	30,43	0,58	1,92
1	33,96	35,47	33,04	34,16	1,32	3,87
0	36,20	nd	34,74	nd	-	-
Pontal GM						
5	19,91	20,46	19,17	19,85	0,58	2,92
4	23,19	23,94	22,47	23,20	0,68	2,92
3	26,47	27,50	26,15	26,71	0,64	2,38
2	30,02	31,00	29,69	30,24	0,68	2,26
1	33,06	34,04	34,16	33,75	0,61	1,79
0	34,83	nd	nd	nd	-	-

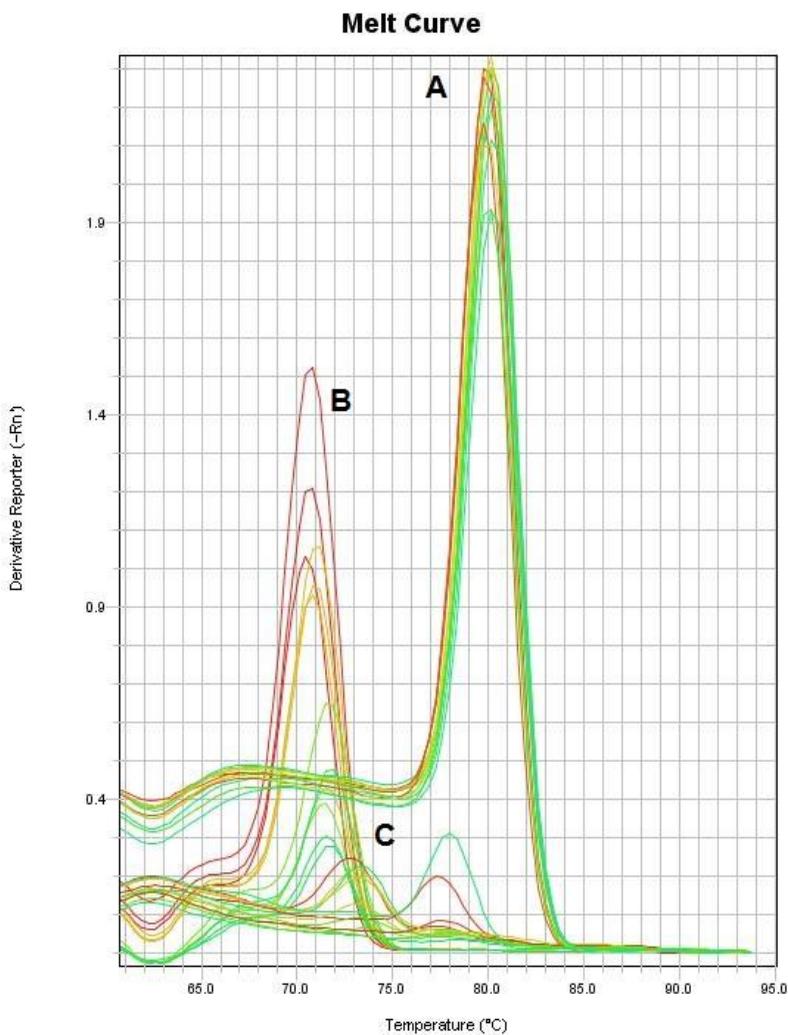


Figura Suplementar 1 Curva de dissociação dos fragmentos gerados a partir das três referências endógenas alvo usando o feijão Olathe não-GM e Pérola como DNA molde. A α -faseolina, B lectina e C arcelina 5c