

Detecção quantitativa de genes de milho *Bt* em microcosmos ⁽¹⁾

Beatriz Maria Ferrari⁽²⁾; Letícia Romani Mizuhira⁽³⁾; Siu Mui Tsai⁽⁴⁾; Danielle Gregório Gomes Caldas⁽⁵⁾

⁽¹⁾ Trabalho executado com recursos do CNPq e CAPES. ⁽²⁾ Pós-Graduada em Ciências, pelo Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA, USP), Piracicaba, São Paulo. bferrari@cena.usp.br. ⁽³⁾ Aluna de iniciação científica pelo Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA, USP), Piracicaba, SP. ⁽⁴⁾ Professora Titular, Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, São Paulo. ⁽⁵⁾ Pós-Doutoranda, pelo Centro de Energia Nuclear na Agricultura, (CENA, USP), Piracicaba, SP.

RESUMO: Durante anos o cultivo de milho geneticamente modificado (GM) vem sendo utilizado para controlar insetos praga da Família Lepidoptera e o impacto ambiental dessas culturas GM tem sido questionado em relação ao destino desses resíduos no ambiente. Com a decomposição de plantas GM no solo e a liberação de exsudados pelas raízes aumenta-se a quantidade de DNA transgênico no ambiente, possibilitando a probabilidade de transferência horizontal de genes para os microrganismos do solo, os quais são naturalmente competentes para adquirir o novo material genético, e a adsorção de DNA e proteínas às partículas do solo. Desta forma, a ocorrência, o destino e a persistência de genes em dois tipos de solo, arenoso e argiloso, em diferentes condições de temperatura, 15 e 25°C, foram estudados, em nível de microcosmos para o milho *Bt* Yieldgard evento MON810. O fragmento HSP70-*cry1Ab* persiste por mais tempo no solo arenoso a 25°C, enquanto o fragmento 35S-HSP70 persiste mais no solo arenoso a 15°C. O fragmento *cry1Ab*-planta persiste durante o período amostrado em ambos os solos e temperatura, sendo que foi verificado maior número de cópias do gene para o solo argiloso a 15°C. Os três conjuntos de *primers* utilizados foram adequados para monitorar os genes no ambiente, no entanto, o primer que codifica a região *cry1Ab*-planta pode ser o mais indicado para fazer essa avaliação a campo.

Termos de indexação: persistência, *cr1Ab* e qPCR

INTRODUÇÃO

As culturas geneticamente modificadas (GM) expressam proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) denominadas Cry ou delta endotoxinas. Essas proteínas apresentam ação tóxica e são altamente específicas a larvas de insetos das ordens: Lepidoptera, Diptera e Coleoptera (Soberón et al., 2007).

O cultivo das culturas GM tem sido questionado sobre o risco ao ecossistema natural e agrícola, devido à presença de organismos não alvos como nematóides, minhocas e a microbiota do solo, que

estão expostos às toxinas de *Bt* durante o período de crescimento das plantas (Gruber et al., 2011). A exposição desses organismos às toxinas de *Bt* pode ocorrer por meio da liberação de exsudados de raízes no solo (Saxena & Stotzky, 2000), liberação de pólen e pela incorporação de resíduos de plantas após a colheita (Losey et al., 1999).

No solo as toxinas de *Bt* podem ser adsorvidas rapidamente pelos minerais de argila, ácido húmico e pelo complexo organo-mineral. E após a adsorção, a atividade inseticida das toxinas Cry permanece ativa no solo por um do longo período e pode resistir à degradação por microrganismo (Stotzky, 2000).

Similarmente as toxinas Cry, os genes *cry* podem ser incorporados ao solo durante o desenvolvimento das culturas transgênicas, mas poucos estudos têm avaliado o tempo de permanência desses genes no solo. Desta forma, objetivo deste trabalho foi detectar e quantificar a ocorrência e a persistência de fragmentos derivados de transgenia do milho *Bt* Yieldgard evento MON810 em diferentes tipos de solo e temperatura, em nível de microcosmo.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA/USP em condições controlada sob fotoperíodo (16h luz: 8h escuro), duas condições de temperatura (15 e 25°C) e dois tipos de solo. O solo com textura argilosa foi coletado na Fazenda Areão no município de Piracicaba, SP e o solo com textura arenosa foi amostrado na Fazenda Anhembi no município de Anhembi, SP.

Estudo em Microcosmos

A persistência de genes de milho *Bt* foi estudada em microcosmos contendo dois tipos de solo, arenoso e argiloso que foram coletados em áreas que não apresentavam histórico de cultivo de plantas transgênicas. O DNA das folhas de milho *Bt* foi extraído de acordo com o método descrito por Doyle & Doyle (1990). Em seguida, o DNA genômico foi diluído em água destilada esterilizada e adicionado a 200g de solo, arenoso e argiloso. O

volume de água utilizado foi ajustado de acordo com a capacidade de retenção de água dos solos utilizados no experimento. Os controles negativos foram misturados com uma quantidade equivalente de água destilada. Os solos mantidos a 15 e 25°C foram coletados no período $t = 0, 1, 2, 10, 30, 60, 90, 180$ e 291 dias, sendo que 0 representa o primeiro tempo de incubação.

Deteção e quantificação de genes do milho *Bt*

Para detectar e quantificar a presença dos genes de milho *Bt*, *primers* foram desenhados de acordo com a construção gênica inserida no milho *Bt* (evento MON810) (Esquema 1), e o programa utilizado foi o Primer 3 (Tabela 1).

O termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems) foi usado para a detecção quantitativa de genes do milho *Bt* por PCR fluorescente em tempo real (qPCR) com SYBR Green I como corante fluorescente.

Esquema 1 – Construção gênica do evento MON810

DNA planta	CaMV 35S	HSP70	<i>cry1Ab</i>	DNA planta
------------	----------	-------	---------------	------------

Tabela 1 - Sequência de *primers* desenhados para o milho *Bt* evento MON 810

<i>Primers</i> *	Sequência 5'-3' (Forward/Reverse)	Amplicon (pb)	T° C
A	ATC TTG CTC GAT GCC TTC TC /ATG CAC TCG TTG ATG TTT GG	120	61
B	TGA CGA ACA ATC CCA CTA TC /GGC AGT AAC AAA GGC AGA GG	147	60
C	CAA GTG TGC CCA CCA CAG C /GCA AGC AAA TTC GGA AAT GAA	106	62

* Fragmentos da construção gênica: A = fragmento HSP70-*cry1Ab*; B = 35S-HSP70; C = *cry1Ab*-planta.

Deteção de genes por qPCR em amostras de microcosmos

A extração de DNA total das amostras de solo foi realizada usando o *Kit Power Soillyzer DNA Extraction™* (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA) de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, foi utilizado o termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems) para a detecção quantitativa de genes do milho *Bt* Yieldgard por PCR fluorescente em tempo real (qPCR) com SYBR Green I como corante fluorescente.

A quantidade inicial de cópias de cada fragmento do milho *Bt* que foi misturado ao volume de água destilada esterilizada, e que posteriormente foi adicionada ao solo arenoso e argiloso encontra-se

na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Número de cópias de fragmentos da construção gênica do milho *Bt* MON810

Fragmentos	Cópias	
	Solo argiloso	Solo arenoso
HSP70- <i>cry1Ab</i>	8,78 ^{E+05}	8,61 ^{E+05}
35S-HSP70	1,14 ^{E+06}	1,15 ^{E+06}
<i>cry1Ab</i> -planta	2,12 ^{E+06}	2,10 ^{E+06}

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este estudo teve como propósito identificar a construção gênica de fragmentos geneticamente modificados em plantas e sua persistência no solo.

Para o fragmento HSP70-*cry1Ab*, incubado a 15 e 25°C no solo arenoso durante 291 dias, foi observado um decréscimo no número de cópias do fragmento até 180 dias, após esse período não houve detecção, foi observado que a temperatura de 25°C manteve maior número de cópias do fragmento HSP70-*cry1Ab* chegando a ser 5 vezes maior nos dias 10 e 30 após a incubação (**Figura 1A**). O solo argiloso manteve similares resultados ao solo arenoso para ambas as temperaturas Curiosamente, o solo argiloso mantido em uma temperatura de 15°C manteve detecção até 291 dias e foi observado um incremento no número de cópias do fragmento HSP70-*cry1Ab* de 5 e 2 vezes nos dias 2 e 90, respectivamente (**Figura 1B**).

O fragmento 35S-HSP70 incubado em solo arenoso com a temperatura de 15°C resultou em menor decréscimo que o solo incubado a temperatura maior de 25°C (**Figura 2A**). Similares resultados foram obtidos quando para o solo argiloso, onde os maiores valores foram encontrados quando mantidos em temperatura de 15°C, exceto para as três primeiras amostragens (**Figura 2B**).

O fragmento *cry1Ab*-planta, incubado com solo arenoso resultou em um decréscimo com o passar do tempo, exceto o tempo zero as demais avaliações resultaram de 1 a 7 vezes mais cópias do fragmento em todo período avaliado quando mantido na temperatura de 15°C (**Figura 2A**). Para o solo argiloso, foi verificado um decréscimo do número de cópias do fragmento em ambas as temperaturas até 60 dias, surpreendentemente o número de cópias do fragmento mantido a temperatura de 25°C continua a aumentar significativamente seus valores (**Figura 2B**).



CONCLUSÕES

Sob condições controladas em microcosmos e usando *primers* específicos, foi possível detectar o gene *cryAb*, persistindo até o período amostrado de 291 dias, sob temperatura de 25°C em solo arenoso sem histórico de cultivo de milho Bt. Sob 15°C, a degradação do gene em solo ocorre em menor taxa, especialmente em solo argiloso. O uso de *primers* específicos para o milho *Bt* (Mon810) pode ser usado para monitoramento do gene em solos durante a produção do milho *Bt*, com a ressalva de que o gene apresenta persistência entre 10²-10³ cópias, podendo se manter no solo na cultura subsequente.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES e ao CNPq pelas bolsas concedidas e financiamento do projeto.

REFERÊNCIAS

DOYLE J.J., DOYLE J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12:13-15p., 1990.

FRANCHI, M.; BRAMANTI, E.; BONZI, L.M.; ORIOLI, P.L.; VETTORI, C.; GALLORI, E. Clay-nucleic acids complexes: characteristics and implications for the preservation of genetic material in primeval habitats. **Origem, Lifem Evolutio Biosphere**, 29:297-315, 1999.

GRUBER, H.; PAUL, V.; MEYER, H.H.D.; MULLER, M. Determination of insecticidal *cry1Ab* protein in soil collected in the final growing seasons of a nine-year field trial of Bt-maize MON810. **Transgenic Research**, 21:77-88, 2011.

LOSEY, J.E.; RAYOR, L.S.; CARTER, M.E. Transgenic pollen harms monarch butterflies. **Nature**, 20:399-214, 1999.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning. A laboratory manual, 2.ed. Cold Spring Harbor Laboratory 1989, 1659p.

SAXENA, D.; STOTZKY, G. Insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* is released from roots of transgenic Bt corn *in vitro* and *in situ*. **FEMS Microbiol Ecology**, 33: 35-39, 2000.

SOBERÓN, M.; FERNÁNDEZ, L.E.; PÉREZ, C.; GILL, S.S.; BRAVO, A. Mode of action of mosquicidal *Bacillus thuringiensis* toxin. **Toxicon**, 49:597-600, 2007.

STOTZKY, G. Persistence and biological activity in soil of insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* and of bacterial DNA bound on clays and humics acids. **Journal Environmental Quality**, 29:691-705, 2000.

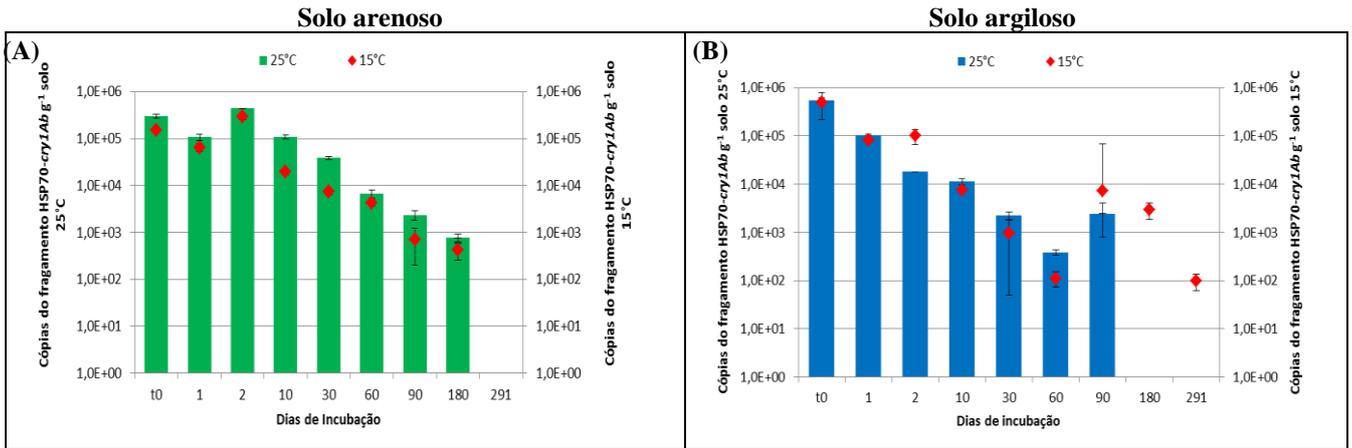


Figura 1. Persistência dos fragmentos HSP70-*cry1Ab* da construção gênica do milho *Bt* MON810 em solos arenoso e argiloso (A e B) em microcosmos, mantidos nas temperaturas de 15 e 25°C durante 291 dias de incubação. Erros nas barras e pontos de dispersão representam o desvio padrão de 6 repetições.

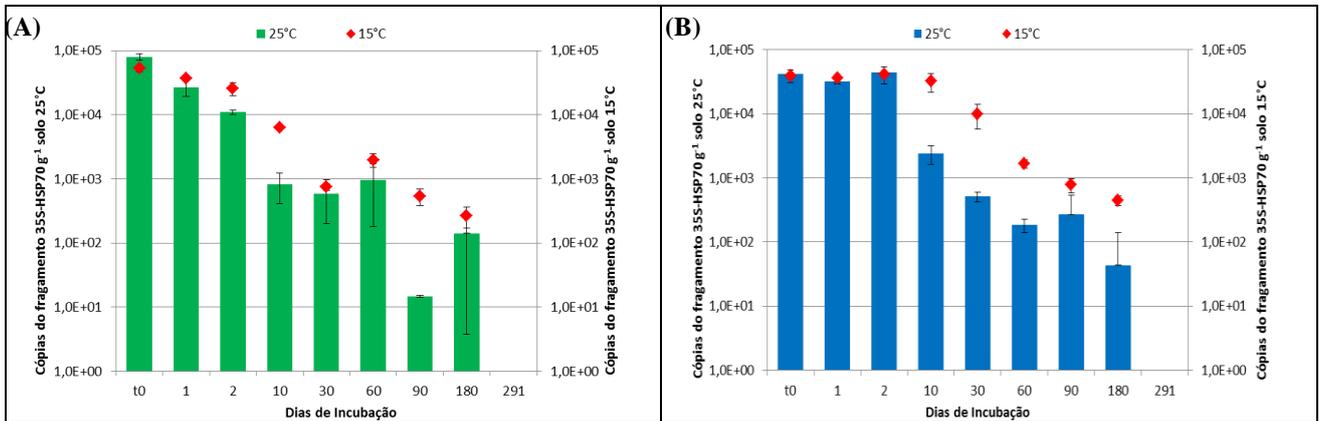


Figura 2. Persistência dos fragmentos 35S-HSP70 da construção gênica do milho *Bt* MON810 em solos arenoso e argiloso (A e B) em microcosmos, mantidos nas temperaturas de 15 e 25°C durante 291 dias de incubação. Erros nas barras e pontos de dispersão representam o desvio padrão de 6 repetições.

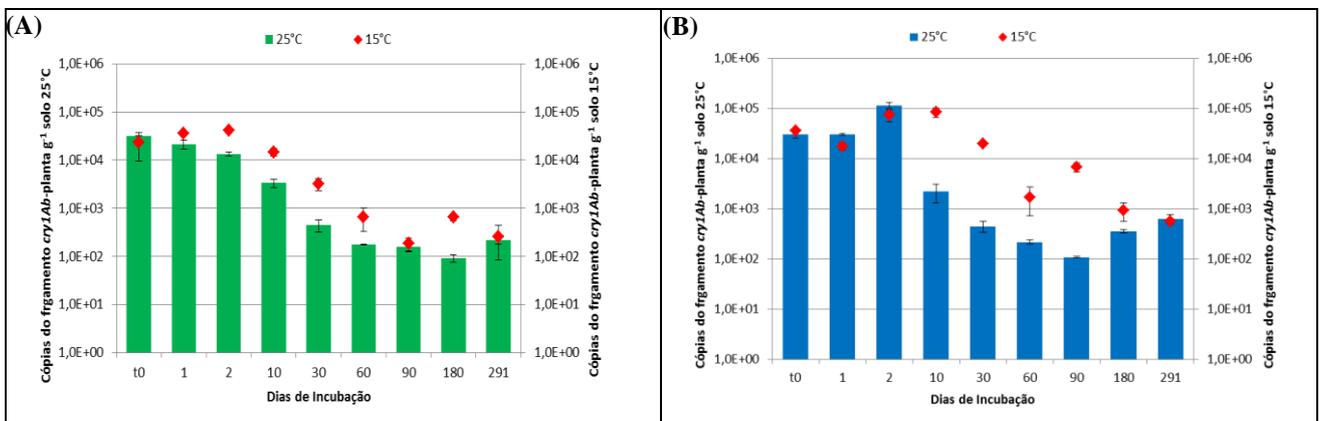


Figura 3. Persistência dos fragmentos *cry1Ab*-planta da construção gênica do milho *Bt* MON810 em solos arenoso e argiloso (A e B) em microcosmos, mantidos nas temperaturas de 15 e 25°C durante 291 dias de incubação. Erros nas barras e pontos de dispersão representam o desvio padrão de 6 repetições.