



DETECÇÃO DE EVENTOS TRANSGÊNICOS EM AMOSTRAS DE MILHO (*ZeaMays*) PELA REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL

Carlos Alberto Machado de Oliveira¹
Nilo Ikuta²
Vagner Ricardo Lunge²

RESUMO

O milho (*Zea mays*) é umas das principais plantas de lavoura do Brasil com 27% da área total plantada em grãos. A produtividade atual alcançou uma taxa de 2,67% com a utilização de variedades melhoradas geneticamente, sendo convencionais ou transgênicos. O uso de milho GM no Brasil foi dado apenas em 2007 e é regulamentado pelo decreto 4680 de 25 de Abril de 2003 onde estabelece a rotulagem de produtos para consumo humano e animal com mais de 1% de OGM. O presente trabalho teve como objetivo implementar e validar técnicas de biologia molecular (PCR em tempo real) para a detecção de transgênicos em produtos comerciais. Cada evento transgênico é caracterizado por uma construção genética próprio onde a efetiva expressão do gene é dada por um promotor, gene principal e uma região terminadora. A detecção de OGMs de milho foi feita através da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) onde três regiões genéticas comuns a diversos eventos transgênicos foram utilizadas, sendo o promotor p-35S, gene principal Cry 1A.105 e região terminadora t-NOS. Sessenta e uma amostras foram analisadas, incluindo sementes de milho, farinhas, grãos de milho para elaboração de rações, milho em conserva e milho verde para consumo *in natura*. Em 19 amostras, nenhum dos alvos analisados foi detectado, sendo consideradas convencionais. As demais 42 amostras apresentaram eventos transgênicos. Os resultados demonstraram a efetiva detecção dos alvos analisados através da técnica de PCR, podendo ser aplicadas para detecção de eventos transgênicos de Milho GM.

Palavra-chave: PCR; OGM; Cry gene;

INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays*) é uma das mais importantes plantas de lavoura no Brasil com 27% da área de grãos cultivados. A produtividade das atuais lavouras de milho tem aumentado gradualmente (taxa anual de 2,67%) (MAPA, *s.d.*) com a utilização de variedades melhoradas geneticamente, sejam estas convencionais ou transgênicas (organismos geneticamente modificados, OGMs). A utilização de OGMs é relativamente recente, iniciando com a liberação da primeira cultivar que apresentava um gene isolado de uma bactéria que produzia toxina para controle de insetos em 2007. No entanto, a regulamentação para comercialização de alimentos com grãos transgênicos já havia sido previamente implementada com a publicação do decreto 4.680 (de 25 de abril de 2003) que estabeleceu que produtos com mais de 1% de OGM deveriam ser rotulados, sejam estes para consumo humano ou animal.

As atuais cultivares transgênicas comerciais são provenientes de dez principais eventos transgênicos (Tabela 1), caracterizados por uma construção genética definida e própria. As diferentes construções transgênicas têm um ou dois blocos de genes que codificam para tolerância a herbicidas e/ou resistência a insetos. Além do gene que determina a característica desejada, a efetiva expressão só é obtida com elementos adicionais, principalmente as regiões promotor e terminadora (ANKLAM et al., 2002).

1 Aluno do curso de Agronomia – Bolsista PROBITI/FAPERGS – carlos_machado@icloud.com

1 Professor doPPGBioSaúde – vagner.lunge@gmail.com

O presente projeto objetivou implementar e validar técnicas de biologia molecular (PCR em tempo real) para a detecção de transgênicos em produtos comerciais. As técnicas implementadas tiveram como alvo a região promotora P-35S, terminadora T-NOS e o gene principal Cry1A.105 (associado com resistência a insetos).

Tabela 1: Eventos transgênicos comercializados no Brasil

Nome comercial	Evento	Característica
Yield Gard	MON810	Resistentes a insetos
Libert Link	T25	Tolerante a Herbicida
TL	BT 11	Resistentes a insetos e Tolerante a Herbicida
Roundup Ready 2	NK603	Tolerante a Herbicida
TG	GA21	Tolerante a Herbicida
Herculex	TC1507	Resistentes a insetos e Tolerante a Herbicida
Viptera-Mir162	Mir162	Resistentes a insetos
Pro	MON89034	Resistentes a insetos
Yield Gard VT	MON88017	Resistentes a insetos e Tolerante a Herbicida
MIR 604	MIR604	Resistentes a insetos

http://www.ctnbio.gov.br/upd_blob/0002/2040.pdf

METODOLOGIA

Amostras

As amostras foram obtidas em cooperativas, empresas produtoras de sementes e agropecuárias locais. Também foram obtidos produtos *in natura* e processados industrialmente para consumo humano e animal, adquiridos no comércio.

Foram analisadas 61 amostras, sendo 18 sementes com numeração de cultivar (Tabela 2), 13 grãos de milho a granel utilizados para formulação de rações, 20 espigas de milho verde para consumo *in natura*, 6 farinhas de milho e 4 amostras de milho em conserva. (Tabela 3).

Tabela 2: Descrição das sementes de milho com cultivar conhecido

Tipo	Cultivar	HMG	P-35S	Cry 1A.105	T-Nos	Evento
Convencional	AG 8025	Pos	Neg	Neg	Neg	-
Convencional	BM 911	Pos	Neg	Neg	Neg	-
Convencional	FORMULA	Pos	Neg	Neg	Neg	-
Convencional	CELERON	Pos	Neg	Neg	Neg	-
Convencional	STATUS	Pos	Neg	Neg	Neg	-
Transgênico	AG 5011	Pos	Pos	Neg	Neg	MON810
Transgênico	BM 915 PRO	Pos	Pos	Pos	Pos	MON89034
Transgênico	BM 3066 PRO2	Pos	Pos	Pos	Pos	MON89034 x NK603
Transgênico	SHS 7990 PRO2	Pos	Pos	Pos	Pos	MON89034 x NK603
Transgênico	SHS 7915 PRO	Pos	Pos	Pos	Pos	MON89034
Transgênico	SHS 7920 PRO	Pos	Pos	Pos	Pos	MON89034
Transgênico	BM 3063 PRO2	Pos	Pos	Pos	Pos	MON89034 x NK603
Transgênico	FORMULA TL	Pos	Pos	Neg	Pos	Bt 11
Transgênico	CELERON TL	Pos	Pos	Neg	Pos	Bt 11
Transgênico	STATUS VIP3	Pos	Pos	Neg	Pos	Viptera, TL, TG, TL/TG
Transgênico	STATUS VIP	Pos	Neg	Neg	Pos	MIR162
Transgênico	DKB 240 PRO	Pos	Pos	Pos	Pos	MON89034
Transgênico	2B647 PW	Pos	Pos	Pos	Pos	MON89034 x TC1507 x NK 603

Tabela 3: Descrição das amostras de milho e produtos industrializados

Tipo Amostra	n	HMG	P-35S	Cry 1A.105	T-Nos	Prováveis Eventos
Farinha de Milho	1	Pos	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>	-
Farinha de Milho	5	Pos	Pos	Pos	Pos	MON89034
Grãos de Milho	2	Pos	Pos	<i>Neg</i>	Pos	TC1507
Grãos de Milho	2	Pos	Pos	Pos	Pos	MON89034
Grãos de Milho	1	Pos	Pos	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>	MON810 / Liberty / T25 / TC1507
Grãos de Milho	7	Pos	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>	-
Grãos de Milho	1	Pos	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>	Pos	Mir162 / NK 603 / GA21 / MON88017 / Mir 604
Milho em conserva	3	Pos	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>	-
Milho em conserva	1	Pos	Pos	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>	MON810 / Liberty / T25 / TC1507
Milho Verde	14	Pos	Pos	Pos	Pos	MON89034
Milho Verde	3	Pos	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>	-
Milho Verde	1	Pos	Pos	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>	MON810 / Liberty / T25 / TC1507
Milho Verde	1	Pos	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>	Pos	Mir162 / NK 603 / GA21 / MON88017 / Mir 604
Milho Verde	1	Pos	Pos	<i>Neg</i>	Pos	Bt11

Extração de DNA

O DNA das amostras de milho foram extraídos através do protocolo de adsorção em sílica (Boom, 1990) utilizando reagentes comerciais NewGene (Symbios Biotecnologia, Cachoeirinha, RS, Brasil).

Amplificação por PCR

Primers e sondas foram obtidos para a realização do estudo (Tabela 3). Após, foi realizada a etapa de amplificação do DNA para os genes alvo por PCR em tempo real utilizando o equipamento StepOne Plus (Life Technologies) e com as seguintes condições de amplificação: um ciclo inicial a 95°C por 3 minutos e 45 ciclos de 95°C durante 15 segundos, e 60°C durante 60 segundos para o duplex *cry 1A.105 – hmg* e para os mastermix *p-35S e t-NOS*, utilizamos 40 ciclos com as mesmas condições..

A detecção foi feita simultaneamente à amplificação, por meio de gráficos e ciclo limite de leitura (*Ct, cycletreshold*). A leitura é realizada de forma simples, visto que a apresentação de curva de amplificação (com a identificação do *Ct*) determina a positividade da amostra. A quantificação também foi feita a partir do número do *Ct*, assim, quanto menor o valor, mais concentrada é a amostra.

Tabela 4: Primers (F, forward; R, reverse) e sondas (P, probe) utilizados no trabalho

Primers	Sequencia 5' 3'	Tamanho Amplicon
P-35S – F	GCC TCT GCC GAC AGT GGT	82 bp
P-35S – R	AAG ACG TGG TTG GAA CGT CTT C	
P-35S – P	CAA AGA TGG ACC CCC ACC CAC G	
T-NOS – F	CAT GTA ATG CAT GAC GTT ATT TAT G	84 bp
T-NOS – R	TTG TTT TCT ATC GCG TAT TAA ATG T	
T-NOS – P	ATG GGT TTT TAT GAT TAG AGT CCC GCA A	
Cry1A.105 – F	TCAGAGGTCCAGGGTTTACAGG	113 bp
Cry1A105 – R	GTAGTAGAGGCATAGCGGGATTCTTG	
Cry1A105 – P	AGACATTCTTCGTCGCACAAGTGGAGGACC	
ZM1- F (hmg)	TTGGACTAGAAATCTCGTGCTGA	79 bp
ZM1- R (hmg)	GCTACATAGGGAGCCTTGTCCT	
ZM1- P (hmg)	CAATCCACACAAACGCACGCGTA	

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram a efetiva detecção dos alvos HMG, p-35S, Cry1A.105 e t-NOS em diferentes amostras de sementes transgênicas (Tabela 2). Em análises comparativas, o PCR em tempo real para o alvo P-35S demonstrou melhor desempenho analítico em comparação ao alvo T-NOS. Conforme esperado, Cry1A.105 foi efetivamente detectado nas cultivares que apresentavam este gene. As regiões promotoras p-35S e terminadora t-NOS também foram detectadas apenas nas cultivares que possuíam estas inserções. Todas as cultivares apresentaram resultado positivo para o gene HMG.

Após as demais 43 amostras serem analisadas e apresentarem resultado positivo para o gene HMG. Em 14 amostras, nenhum dos alvos de milho OGM foi detectado, sendo consideradas convencionais. As outras 29 amostras apresentaram eventos transgênicos, sendo 20 para os três alvos, três para P35S e t-NOS, duas para t-NOS e duas para P35S. A aplicação destas técnicas possibilitou detectar a ocorrência de transgênicos em 17 amostras de milho verde, cinco farinhas, seis grãos de milho e um milho em conserva. (Tabela 3)

Utilizando os primers e sondas descritos na tabela acima, todos os eventos liberados para comercialização no Brasil foram previamente identificados.

CONCLUSÃO

As análises realizadas podem ser aplicadas para detecção de eventos transgênicos em Milho OGM. Novos estudos serão realizados para uma análise qualitativa e quantitativa de transgênicos em sementes de milho e produtos alimentícios.

REFERÊNCIA

ABIEC. **Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne**. Disponível em <<http://www.abeic.com.br>> Acesso em 20/11/2011

Anklam, E.; Gadani, F.; Heinze, P.; Pijnenburg, H.; Eede.G.V.D Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. European. **Food Research and Technology**, n. 214, p. 3-26,2002.

Boom. R.; Sol. CJ.;Salimans. MM.; Jansen. CL.;Werheim-Van Dillen.PM.; Van Der Noordaa J.; Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **J Clin. Microbiol.** v.28, n.3, p.495-503, 1990.

CTNBio. **Comissão Técnica Nacional de Biossegurança**. Disponível em <http://www.ctnbio.gov.br/upd_blob/0002/2040.pdf> Acesso em 07/07/2015

MAPA. **Ministério da Agricultura, Abastecimento e Pecuária**. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/milho> > Acesso em 05/08/2015