



DETECÇÃO DE EVENTOS TRANSGÊNICOS DE MILHO (*Zea Mays*) EM PRODUTOS *IN NATURA* E PROCESSADOS INDUSTRIALMENTE PELA REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (qPCR)

Carlos Alberto Machado de Oliveira¹
Nilo Ikuta²
Vagner Ricardo Lunge²

Resumo

O Milho Geneticamente Modificado ocupou, na última safra (2015/16), aproximadamente 13,2 milhões de hectares, sendo o segundo grão GM mais cultivado no país. Atualmente no Brasil, o milho transgênico conta com 21 eventos GM liberados para comercialização. O Decreto n° 4680/03 determina que qualquer produto que contenha acima de 1% de OGM em sua composição final deve ser rotulado como transgênico. O presente projeto objetivou detectar a presença de grãos de milho transgênico em produtos alimentícios humanos e animais. A detecção de milho transgênico foi realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), tendo como alvo três regiões genéticas: promotor p-35S, gene principal cry 1A.105 e região terminadora t-NOS. Sessenta e uma amostras foram analisadas, incluindo 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 pela técnica de qPCR, podendo ser aplicadas para detecção de eventos transgênicos em alimentos e rações.

Palavras-chave: PCR; OGM; Cry gene;

INTRODUÇÃO

O Milho Geneticamente Modificado ocupou, na última safra (2015/16), aproximadamente 13,2 milhões de hectares, sendo o segundo grão GM mais cultivado no país (ISAAA, 2016). Atualmente no Brasil, o milho transgênico conta com 21 eventos GM liberados para comercialização provenientes de dez principais eventos transgênicos (Tabela 1), seja com resistência a insetos da ordem das lepidópteras, tolerância aos herbicidas glifosato e/ou glifoninato de amônia, ou mesmo as duas características juntas no mesmo evento, 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 promotoras e terminadoras (Anklam et al., 2002). No Brasil, o Decreto n° 4680/03 determina que qualquer produto que contenha acima de 1% de OGM em sua composição final deve ser rotulado como transgênico. A necessidade de rotulação para produtos alimentícios, assim como a restrição para o uso cultivares transgênicos na cadeia produtiva de milho orgânico, tornam necessárias técnicas que possibilitem o rastreamento e a quantificação rápida dos grãos que contenham eventos transgênicos.

Técnicas de PCR em tempo real têm sido efetivas no rastreamento de transgênicos. O presente projeto objetivou testar produtos alimentícios humanos e animais que utilizem milho

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

² Professor do PPGBioSaúde – vagner.lunge@gmail.com

na sua composição. As técnicas utilizadas tiveram como alvos: o promotor p-35S, o terminador t-NOS, o gene principal cry 1A.105 (associado com resistência a insetos) e o gene endógeno do milho *hmg*.

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

CTNBio (2015)

METODOLOGIA

Amostras

As sementes de milho 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 cultivares (Tabela 3), 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 4).

Extração de DNA

O DNA das amostras foi extraído pelo protocolo de adsorção em sílica (Boom et al., 1990) utilizando reagentes comerciais NewGene (Simbios Biotecnologia. Cachoeirinha, RS, Brasil).

Amplificação por PCR

Primers e sondas foram obtidos para a realização do estudo (Tabela 2). 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 mastermix *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 2: 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*, *cry 1A.105* e *t-NOS* em diferentes amostras de milho transgênico (Tabela 3). Todas cultivares apresentaram resultado positivo para o gene *hmg*. Conforme esperado, *cry 1A.105* foi efetivamente detectado nas cultivares PRO. As regiões promotoras *p-35S* e terminadora *t-NOS* também foram detectadas apenas nas cultivares transgênicas com estes elementos.

As demais 43 amostras foram analisadas e também apresentaram 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 *p-35S* e *t-NOS*, duas para *t-NOS* e duas para *p-35S*. 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 4)

Tabela 3: Descrição das sementes de milho com cultivar conhecido

Tipo	Cultivar	<i>hmg</i>	<i>p-35S</i>	<i>cry 1A.105</i>	<i>t-Nos</i>	Evento
Convencional	AG 8025	+	-	-	-	-
	BM 911	+	-	-	-	-
	FORMULA	+	-	-	-	-
	CELERON	+	-	-	-	-
	STATUS	+	-	-	-	-
Transgênico	AG 5011	+	+	-	-	MON810
	BM 915 PRO	+	+	+	+	MON89034
	BM 3066 PRO2	+	+	+	+	MON89034 x NK603
	SHS 7990 PRO2	+	+	+	+	MON89034 x NK603
	SHS 7915 PRO	+	+	+	+	MON89034
	SHS 7920 PRO	+	+	+	+	MON89034
	BM 3063 PRO2	+	+	+	+	MON89034 x NK603
	FORMULA TL	+	+	-	+	Bt 11
	CELERON TL	+	+	-	+	Bt 11
	STATUS VIP3	+	+	-	+	Viptera, TL, TG, TL/TG
	STATUS VIP	+	-	-	+	MIR162
	DKB 240 PRO	+	+	+	+	MON89034
	2B647 PW	+	+	+	+	MON89034 x TC1507 x NK 603

Tabela 4: Descrição das amostras de milho e produtos industrializados

	n	hmg	p-35S	cry 1A.105	t-Nos	
Farinha Milho	1	+	-	-	-	<i>Convencional</i>
	5	+	+	+	+	Transgênico
Grãos de Milho	2	+	+	-	+	Transgênico
	2	+	+	+	+	Transgênico
	1	+	+	-	-	Transgênico
	7	+	-	-	-	<i>Convencional</i>
	1	+	-	-	+	Transgênico
Milho em Conserva	3	+	-	-	-	<i>Convencional</i>
	1	+	+	-	-	Transgênico
Milho Verde	19	+	+	+	+	Transgênico
	3	+	-	-	-	<i>Convencional</i>
	1	+	+	-	-	Transgênico
	1	+	-	-	+	Transgênico
	3	+	+	-	+	Transgênico

CONCLUSÃO

As análises realizadas podem ser aplicadas para detecção de eventos transgênicos em produtos alimentares formulados com milho e para a validação de produtos rotulados como orgânicos livre de transgênicos. Novos estudos serão realizados para uma análise qualitativa de transgênicos em sementes, produtos comerciais e rações animais.

REFERÊNCIAS

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, C.J.; SALIMANS, M.M.; JANSEN, C.L.; WERHEIM-VAN DILLEN, P.M.; VAN DER NOORDAA, J.; Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*. n.28, v.3, p. 495-503, 1990.

CTNBio. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – Resumo Geral das Plantas Geneticamente Modificadas Aprovadas para Comercialização. Disponível em: http://www.ctnbio.gov.br/upd_blob/0002/2040.pdf. Acesso em: 07/07/2015

ISAAA. International Service For The Acquisition of Agri-biotech Applications – 20th Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2015. Disponível em: http://cib.org.br/wp-content/uploads/2016/04/2016_04_13_RelatorioISAAA_Eng.pdf. Acesso em: 04/05/2016

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