



VIVIAN ELIAS NASCIMENTO

**FLUXO GÊNICO E MÉTODOS DE DETECÇÃO
E QUANTIFICAÇÃO DE MILHO
GENETICAMENTE MODIFICADO**

LAVRAS – MG

2011

VIVIAN ELIAS NASCIMENTO

**FLUXO GÊNICO E MÉTODOS DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO
DE MILHO GENETICAMENTE MODIFICADO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Sementes, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora
Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho

LAVRAS – MG

2010

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Nascimento, Vivian Elias

Fluxo gênico e métodos de detecção e quantificação de milho geneticamente modificado / Vivian Elias Nascimento. – Lavras : UFLA, 2010.

116 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientadora: Édila Vilela de Resende Von Pinho.

Bibliografia.

1. Transgênicos. 2. Coexistência. 3. Pureza genética. 4. Fecundação cruzada. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.1523

VIVIAN ELIAS NASCIMENTO

**FLUXO GÊNICO E MÉTODOS DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO
DE MILHO GENETICAMENTE MODIFICADO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Sementes, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 20 de dezembro de 2010.

Dra. Cristhiane Abegg Bothona SYNGENTA

Dr. Magno Antônio Patto Ramalho UFLA

Dra. Maria Laene Moreira de Carvalho UFLA

Dr. Renzo Garcia Von Pinho UFLA

Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho
Orientadora

**LAVRAS - MG
2010**

Aos meus pais, André e Rosângela, por todo o amor, dedicação, incentivo e exemplo de responsabilidade e luta.

Aos meus irmãos, Vinícius e Juninho, pelo carinho e amizade que nos unem.
Todos os dias da minha vida agradeço a Deus pela família linda que ele me deu!

Ao meu noivo, Paulo Eduardo, pelo amor e apoio.

Aos meus amigos e familiares, pelo amor e incentivo em todos os momentos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelas oportunidades e por iluminar o meu caminho.

À Profa. Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho, pela excelente orientação, ensinamentos e exemplo de dedicação.

Ao professor Renzo Garcia Von Pinho, pela coorientação e colaboração.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, pela oportunidade de realização do doutorado.

À empresa Syngenta Seeds, pela parceria na condução deste trabalho.

À pesquisadora Cristhiane Abegg Bothona, pela valiosa colaboração e sugestões.

Às agências de fomento Capes, pela concessão da bolsa de estudos, CNPq e à Fapemig, que financiou parte deste trabalho.

Aos alunos de iniciação científica Juninho, Bruno, Bruna, Laís, Russian, demais estagiários do Setor de Sementes, Ronaldo e Alisson da Ecosafe, pelo auxílio na condução dos experimentos, com responsabilidade e dedicação.

Aos colegas pós-graduação, Adriano, Alexana, Gustavo, Flavinha, Heloísa, Elise, Letícia, Patrícia, Rodrigo e Gabi, pela amizade e apoio.

Aos funcionários do Setor de Sementes, Wilder 1, Wilder 2, Viviane, Elenir, Dalva e Dona Elza, pelo auxílio e bom convívio nesse período.

Aos professores Renato Mendes Guimarães, Maria Laene Moreira de Carvalho, João Almir de Oliveira e ao pesquisador Antônio Rodrigues Vieira, pelos ensinamentos e atenção sempre concedida.

À Veridiana, do suporte científico da Applied Biosystems e ao Nilson Cesar, do MAPA, pela atenção e sugestões na condução do trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

Com o avanço das áreas com milho transgênico no Brasil e com a necessidade de controlar a pureza genética de sementes e grãos, aumenta a demanda por pesquisas para estimar o fluxo gênico nesta espécie. Além disso, é preciso trabalhar com tamanhos de amostras representativos dos lotes nos testes para a certificação da pureza genética em sementes e grãos. Neste sentido, o presente trabalho foi realizado com os seguintes objetivos: estimar o tamanho de amostra para a detecção de milho geneticamente modificado por meio da amostragem sequencial; estimar o fluxo gênico de milho transgênico, com resistência a insetos, em campos de produção de grãos e avaliar metodologias para a detecção e identificação de organismos geneticamente modificados. Para a avaliação do fluxo gênico, amostras de grãos foram coletadas em lavouras contendo milho convencional e transgênico, nos municípios de Itumirim, Uberlândia, Paracatu e Tupaciguara, em Minas Gerais; Itapetininga e Pedrinhas, em São Paulo e Assaí e Ponta Grossa, no Paraná. As análises para a estimativa do fluxo gênico foram realizadas no Laboratório Central de Sementes da Universidade Federal de Lavras, por meio da técnica de PCR em tempo real. Para a avaliação da sensibilidade dos testes de tiras para a detecção de OGM, sementes transgênicas foram misturadas às sementes convencionais nos níveis: 0,2%, 0,4% e 0,8%, para o evento Bt11 e 0,4%, 0,8% e 1,6%, para o evento MON810. Para a avaliação da sensibilidade da PCR multiplex, sementes transgênicas foram misturadas a sementes convencionais nos níveis de 20%, 10%, 5%, 2%, 1% e 0,5%. A amostragem sequencial foi simulada em lotes de sementes de milho com 0,5%, 1% e 4% de contaminação com sementes do milho transgênico. Observou-se que a amostragem sequencial possibilitou a redução do tamanho de amostra em relação ao tamanho de amostra fixa, para lotes de sementes com contaminação acima de 1% de contaminação com OGM. No nível de contaminação de 0,5%, não foi possível tomar nenhuma decisão quanto ao tamanho de amostra. A sensibilidade do teste para a detecção de OGM é fundamental para estimar o tamanho da amostra e, conseqüentemente, evitar os resultados falso-negativos. Em Itapetininga, SP, foi onde ocorreram as maiores taxas de fecundação cruzada, acima de 10%, até a distância de 50 metros. Observou-se que, em média, 82% da fecundação cruzada ocorreram nos primeiros 30 metros e em todas as localidades foram observados níveis inferiores a 1% de OGM na distância de 100 metros. No teste de tiras, os eventos Bt11 e MON810 não foram detectados nos níveis de 0,4% e 0,8%, como especificado pelo fabricante e pela técnica de PCR multiplex foram observadas especificidade para os diferentes eventos e sensibilidade de 1% para os eventos Bt11 e MON810.

Palavras-chave: Transgênicos. Coexistência. Pureza genética.

ABSTRACT

The increased presence of transgenic maize in cultivation areas of Brazil and the need to monitor the genetic purity of seeds and grains, has led to an increase in demand for research to estimate gene flow in this species. It's also of high importance, work with sample sizes representative of the seed lots in the tests to certify the genetic purity of seeds and grains. In this work, the goal was estimate the sample size for detection of genetically modified (GM) maize by sequential sampling, estimate the gene flow of transgenic corn with resistance to insects in fields of grain production, and evaluate methods for detection and identification of genetically modified organisms. For the assessment of gene flow, grain samples were collected in fields containing conventional and transgenic maize in the municipalities of Itumirim-MG, Uberlândia-MG, Paracatu-MG, Tupaciguara-MG, Itapetininga-SP, Pedrinhas-SP, Assaí-PR e Ponta-Grossa-PR. The analysis for the estimation of gene flow was performed at the Central Laboratory of Seeds of the Federal University of Lavras by real time PCR. To evaluate the sensitivity of the strip tests for detection of GMOs, transgenic seeds were mixed with conventional seeds at the levels of 0.2, 0.4 and 0.8 percent for the event Bt11, and 0.4, 0.8 and 1.6 percent for the event MON810. In order to assess the sensitivity of multiplex PCR, transgenic seeds were mixed with conventional seeds at levels of 0.5, 1, 2, 5, 10 and 20 percent. The sampling sequence was simulated in lots of corn seeds contaminated with 0.5, 1 and 4 percent of transgenic seeds. It was observed that, for seed lots with contamination above 1 percent of GMOs, the sequential sampling allowed a reduction of the sample size in relation to a fixed-size sample. In the level of 0.5 percent of contamination, it was not possible to make any decision regarding the sample size. The test sensitivity for the detection of GMOs is essential to estimate the sample size and thus avoid false-negative results. The highest rates of outcrossing occurred at our research area in Itapetininga-SP, with rates above 10 percent up to a distance of 50 meters. Results show that, on average, 82 percent of cross-fertilization occurred within a distance of 30 meters. On the other hand, levels below 1 percent of GMOs were observed at distances within 100 meters. In strip tests, the presence of Bt11 and MON810 were not detected at levels of 0.4 and 0.8 percent, as specified by the manufacturers. By the PCR technique it was observed specificity for the different events and sensitivity of 1 percent for the events Bt11 and MON810.

Keywords: Transgenic. Coexistence. Genetic purity.

SUMÁRIO

| | | |
|------------|--|-----|
| | CAPÍTULO 1 Introdução Geral..... | 10 |
| 1 | INTRODUÇÃO | 11 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO | 14 |
| 2.1 | Transgênicos..... | 14 |
| 2.2 | Milho Bt | 16 |
| 2.3 | Fluxo gênico..... | 20 |
| 2.4 | Padrões de isolamento de campos..... | 24 |
| 2.5 | Métodos para a detecção e quantificação de OGM..... | 28 |
| 2.6 | Amostragem sequencial..... | 36 |
| | REFERÊNCIAS | 38 |
| | CAPÍTULO 2 Estimativa do tamanho da amostra para a detecção de milho geneticamente modificado..... | 47 |
| 1 | INTRODUÇÃO | 50 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS | 52 |
| 2.1 | Amostragem sequencial..... | 52 |
| 2.2 | PCR..... | 55 |
| 2.3 | Teste de tiras..... | 56 |
| 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 57 |
| 4 | CONCLUSÃO | 63 |
| | REFERÊNCIAS | 64 |
| | CAPÍTULO 3 Fluxo gênico de milho geneticamente modificado com resistência a insetos..... | 66 |
| 1 | INTRODUÇÃO | 69 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS | 71 |
| 2.1 | Local e material..... | 71 |
| 2.2 | Extração de DNA | 74 |
| 2.3 | Quantificação de OGMs por meio da técnica de PCR em tempo real (RTq-PCR)..... | 74 |
| 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 76 |
| 3.1 | Safra 2008/2009..... | 76 |
| 3.2 | Safrinha 2009..... | 81 |
| 3.3 | Safra 2009/2010..... | 84 |
| 4 | CONCLUSÃO | 93 |
| | REFERÊNCIAS | 94 |
| | CAPÍTULO 4 Detecção de milho geneticamente modificado com resistência a insetos..... | 97 |
| 1 | INTRODUÇÃO | 100 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS | 102 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 2.1 | Local de condução do experimento..... | 102 |
| 2.2 | Teste de tiras de fluxo lateral..... | 102 |
| 2.3 | PCR multiplex..... | 103 |
| 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 106 |
| 3.1 | Teste de tiras..... | 106 |
| 3.2 | PCR multiplex..... | 110 |
| 4 | CONCLUSÃO..... | 115 |
| | REFERÊNCIAS | 116 |

CAPÍTULO 1
INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

Em 2009, o Brasil ocupou a segunda posição no mundo em relação à área com lavouras geneticamente modificadas (GM), sendo essa estimada em 21,4 milhões de hectares, das quais 5 milhões de hectares foram cultivados com milho transgênico resistente a insetos (JAMES, 2010).

Até o ano de 2008, somente dois eventos de milho transgênico, com resistência a insetos, eram autorizados no país, o MON810 da empresa Monsanto e o Bt11 da Syngenta. Essa denominação, milho Bt, é derivada da fonte dos genes utilizados nesta tecnologia, a bactéria *Bacillus thuringiensis*, cuja principal característica é a produção de cristais de proteínas que controlam seletivamente alguns grupos de insetos.

No Brasil, cultivares de milho *Bt* são promissoras, em razão do ataque de pragas que resulta em perdas acentuadas na produção e aplicações intensivas de inseticidas. Cultivares de milho Bt podem apresentar resistência à broca-da-colmo (*Diatraea saccharalis*), lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) e lagarta-da-espiga (*Helicoverpa zea*), que causam danos aos grãos e, conseqüentemente, na qualidade do produto final (SIQUEIRA et al., 2004)

Assim, com o avanço das áreas com milho transgênico no Brasil e, principalmente, em função dos novos eventos aprovados na Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), aumenta a demanda por pesquisas para estimar o fluxo gênico, o tamanho de amostra que represente os lote de sementes e grãos durante a certificação da pureza genética e para a avaliação de métodos de detecção desses eventos.

Na realidade, fluxo gênico é um fenômeno comum a todas as espécies de plantas e contribui para o surgimento de novas combinações gênicas, gerando variabilidade nas populações e até originando espécies importantes de plantas

cultivadas. Mas, sua notoriedade deve-se aos transgênicos, sobretudo para a garantia de pureza genética em sementes e grãos.

O fluxo gênico pode ocorrer devido à disseminação do pólen, à mistura de sementes ou à presença de plantas voluntárias, provenientes de cultivos anteriores nas áreas de cultivo. Todas essas três fontes podem ser importantes agentes de fluxo gênico, mas o controle da disseminação do pólen é o que implica em mais cuidados, uma vez que o milho é uma espécie alógama e apresenta protandria, aumentando a probabilidade de ocorrência de fecundação cruzada.

Apesar de se observarem, na literatura, vários trabalhos relacionados ao fluxo gênico nessa cultura, os resultados têm sido contraditórios e poucas pesquisas têm sido realizadas com ocorrência de fluxo gênico de uma cultivar geneticamente modificada para uma convencional.

Atualmente, a rotulagem de alimentos contendo material transgênico é exigida pela legislação brasileira. O Decreto nº 4.680, de abril de 2003, trata da rotulagem obrigatória para todos os alimentos ou ingredientes de alimento, com o limite para rotulagem de 1% de OGMs (BRASIL, 2003). Nesse sentido, é necessário padronizar e validar métodos para a detecção e a quantificação de organismos geneticamente modificados, ou OGMs, em alimentos e ingredientes alimentares, e para a certificação da pureza genética de grãos e sementes.

No entanto, para a certificação da pureza genética e o estabelecimento de padrões relacionados ao isolamento dos campos de sementes e de produção de grãos, há a necessidade de se estimar o tamanho da amostra a ser analisada para a identificação e a quantificação do evento transgênico. Assim, técnicas de amostragem, a exemplo da sequencial, devem ser estudadas para que se obtenha um resultado com confiabilidade e repetibilidade. O tamanho da amostra pode variar com os métodos utilizados para a detecção de transgênicos. Diversos métodos foram desenvolvidos para a detecção e a identificação de eventos

transgênicos em plantas e sementes. De maneira geral, estes métodos podem ser classificados em duas categorias. A primeira inclui aqueles que requerem a amplificação de um segmento de DNA com subsequente detecção direta ou indireta do produto final. A segunda inclui métodos que envolvem a avaliação de proteínas codificadas.

A técnica de PCR, que consiste na amplificação seletiva de sequências específicas da molécula de DNA, é o principal método utilizado na detecção e na quantificação de OGMs. Embora apresente algumas limitações, a alta sensibilidade, a especificidade e a capacidade de detectar uma ampla série de eventos que apresentam diferentes construções gênicas explicam a sua escolha para a realização de análises de detecção de OGMs e seus derivados. Por meio da PCR em tempo real é possível realizar a quantificação destes ácidos nucleicos de maneira precisa.

Nesse contexto, o presente trabalho foi realizado com os objetivos de estimar o tamanho da amostra para a detecção de organismos geneticamente modificados, estimar o fluxo gênico em campos de produção de milho transgênico (Milho Bt) para a definição de isolamentos de áreas, visando à coexistência entre os dois sistemas de cultivo e avaliar a sensibilidade da técnica de PCR e do teste de tiras para a detecção dos eventos Bt11 e MON810.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Transgênicos

De todas as novas tecnologias empregadas na produção agrícola, nenhuma tem despertado tanto interesse e causado tanta discussão como o cultivo de plantas geneticamente modificadas (PGMs), obtidas pela técnica do DNA recombinante, também conhecidas como transgênicas. Mesmo diante de acirradas controvérsias, os cultivos transgênicos expandiram-se por todo o mundo, tornando-se a tecnologia mais rapidamente adotada que se conhece na história da agricultura, sendo apontada como crucial para romper a barreira da produtividade (MANN, 1999) e oferecer solução para as limitações impostas por estresses bióticos e abióticos, especialmente em áreas onde baixas produtividades, má nutrição e fome são ameaças constantes (HERRERA-ESTRELLA, 2000).

A área global oficialmente cultivada com plantas transgênicas, em 2009, foi de 134 milhões de hectares. Destaca-se uma taxa de crescimento anual de 7%, correspondendo a 9 milhões de hectares. Naquele mesmo ano, 77% dos 90 milhões de hectares de soja cultivados mundialmente eram transgênicos; para o algodão, foram 49% dos 33 milhões de hectares; para o milho, foram 26% dos 158 milhões de hectares cultivados e, para a canola, 21% dos 31 milhões de hectares (JAMES, 2009).

Conforme previsto nos relatórios anteriores do *International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications* (ISAAA), os países em desenvolvimento continuaram com uma participação crescente nos plantios transgênicos, a exemplo do Brasil, que teve a área aumentada em 5,6 milhões de hectares, no ano de 2009. Neste mesmo ano, 46% da área global agrícola com organismos geneticamente modificados (OGMs), o equivalente a 49,4 milhões

de hectares, foram cultivados em países em desenvolvimento. Vale ressaltar que os cinco principais países em desenvolvimento nos quais se cultivam as lavouras GM abrangem os três continentes. São eles a Índia e a China, na Ásia; a Argentina e o Brasil, na América Latina e a África do Sul, no continente africano. Coletivamente, esses países representam 2,6 bilhões de pessoas ou 40% da população global. O crescente impacto coletivo dos cinco principais países em desenvolvimento é uma importante e contínua tendência com implicações para a adesão e aceitação mundial das lavouras GM no futuro (JAMES, 2009).

Em 2009, o número de países que aderiram a essa tecnologia permaneceu o mesmo de 2008, em 25, com a Costa Rica sendo incluída na lista pela primeira vez e a Alemanha interrompendo o seu plantio de milho Bt no final da safra de 2008. A Costa Rica e o Chile cultivam OGMs exclusivamente para o mercado de exportação de sementes.

Desde 1996, a tolerância a herbicida tem se mantido como o evento dominante, com 83,6 milhões de hectare (62%). Pelo terceiro ano consecutivo, em 2009, os eventos com genes combinados duplos e triplos ocuparam uma área maior do que as variedades resistentes a insetos, com 21% e 15%, respectivamente (JAMES, 2009).

No Brasil, em 1995, foi promulgada a Lei 8.974/95, de biossegurança, que objetivava estabelecer normas de biossegurança para regular o uso da engenharia genética e a liberação no meio ambiente de organismos geneticamente modificados. Pela Medida Provisória nº 1.015, de 29 de maio de 1995, a CTNBio foi implementada e passou a integrar a estrutura do Ministério da Ciência e Tecnologia (BORÉM, 2001). Em meados de 1998, foram autorizados o cultivo e a comercialização de soja *Roundup Ready* no Brasil, com posterior suspensão do direito de plantio dessa variedade em todo o território nacional por meio de liminar judicial. Nos anos subsequentes, houve a

comercialização de sementes de soja ilegais provenientes principalmente da Argentina e do Uruguai.

Em março de 2005, foi aprovada a Lei nº 11.105/05, que estabeleceu as normas de segurança e os mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados. A partir da aprovação desta lei foi observado aumento significativo no número de eventos transgênicos submetidos à avaliação na CTNBio.

Em 2009, o Brasil ocupou a segunda posição em área cultivada com lavouras GM no mundo, estimando-se em 21,4 milhões de hectares, o maior aumento em qualquer país do mundo, correspondente a 35% em relação ao ano de 2008. Dos 21,4 milhões de hectares, 16,2 milhões de hectares foram cultivados com soja RR®, 5 milhões com milho Bt, em ambas as safras de verão e a safrinha e 145.000 hectares com algodão GM.

Em 2009, houve aumento de 400% na área com milho transgênico no Brasil, com destaque para os eventos Bt, com resistência a insetos.

2.2 Milho Bt

Segundo o Conselho de Informações sobre Biotecnologia - CIB (2002), o termo Bt é utilizado para indicar proteínas extraídas da bactéria *Bacillus thuringiensis*, que está presente naturalmente no solo em todo o mundo. Esta bactéria já tem sido utilizada na preparação de inseticidas biológicos. A sua principal característica está na produção de cristais de proteínas que matam seletivamente alguns grupos de insetos. Estes cristais de proteínas (Cry proteínas) são nocivos para determinados grupos de insetos e precisam ser ingeridos pelos mesmos para que haja o efeito inseticida. Após a ingestão, enzimas digestivas dos próprios insetos ativam a toxina em forma de proteína. A proteína Cry se liga a receptores específicos das células da parede do intestino

dos insetos, provocando o rompimento das mesmas. Os insetos param de se alimentar em menos de 2 horas e, se ingeriram quantidade suficiente de toxina, morrem em dois ou três dias.

Cultivares de milho geneticamente modificada podem apresentar resistência à broca-da-colmo (*Diatraea saccharalis*), lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) e lagarta-da-espiga (*Helicoverpa zea*), a exemplo do transgênico MON810, Monsanto Europa S.A. (2006). As variedades MON810 são capazes de produzir, em pequenas quantidades, a proteína Bt (Cry1 Ab), para o controle destes insetos.

O milho Bt11, da empresa Syngenta, também foi modificado geneticamente para ser resistente ao ataque da broca-europeia-do-colmo (*Ostrinia nubilalis*), uma praga importante do milho cultivado nos Estados Unidos e na Europa. Adicionalmente, também oferece resistência a outros lepidópteros-praga, tais como a lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*), a lagarta-da-espiga (*Helicoverpa zea*) e a broca-do-colmo-do-milho (*Diatraea saccharalis*). O milho Bt11 produz a proteína inseticida Cry1Ab, derivada de *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki (*Btk*) cepa HD-1. Esse evento também expressa o gene *pat* clonado do actinomiceto aeróbico comum do solo, *Streptomyces viridochromogenes* cepa Tu494, que codifica a enzima fosfotricina-N-acetiltransferase (PAT). A enzima PAT foi utilizada como um marcador para seleção, permitindo a identificação da planta transformada, e tornando-a resistente ao herbicida fosfotricina, também conhecido como glufosinato de amônio - ingrediente ativo dos herbicidas Basta, Rely, Finale e Liberty (COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA - CTNBio, 2007).

O glufosinato de amônio, que tem como ingrediente ativo o L-isômero de fosfotricina (L-PPT), é um herbicida de amplo espectro que inibe a enzima glutamina sintetase em cloroplastos, bloqueando a síntese de glutamina via

glutamato e, portanto, a assimilação de NH_4^+ (MANDERSCHIED; WILD, 1986). A inibição da glutamina sintetase resulta em acúmulo de NH_4^+ e, conseqüentemente, na morte da planta. A amônia é formada naturalmente pelas plantas por meio da fotorrespiração, da redução de nitrato e do metabolismo de aminoácidos, o que resulta em quantidades letais de NH_4^+ (JOY, 1988).

Com a alteração genética a que é submetida, a planta torna-se capaz de quebrar a molécula da proteína, liberando a amônia. Como as plantas que crescem à sua volta não contam com este mecanismo, ocorrem intoxicação e morte das mesmas (CIB, 2007).

Rice (1998) estimou que se 80% da área total ocupada com milho nos Estados Unidos fosse ocupada com híbridos *Bt*, haveria uma redução na aplicação de até 540 toneladas de inseticida. O cultivo de milho doce *Bt* em três estados norte-americanos apresentou controle eficaz de *Ostrinia nubilalis* e aumentou em 70%-100% a produção de espigas comercializáveis e em 90%-100% os produtos processados no período de dois anos (BURKNESS et al., 2002). Em estudo desenvolvido no estado de Nebraska, EUA, Waquil, Villela e Foster (2002) verificaram que híbridos de milho transgênico expressando toxinas Cry e submetidas à infestação artificial com *Spodoptera frugiperda* produziram cerca de 32% mais grãos que as testemunhas suscetíveis.

Outro benefício observado em plantas *Bt* é que a proteção do milho contra o ataque de lagartas diminui a infestação das espigas por fungos e, conseqüentemente, a contaminação dos grãos por micotoxinas como a fumonisina que, além de tóxica, é carcinogênica (MUNKVOLD; HELLMICH; RICE, 1999).

Recentemente, em estudo realizado nos EUA, observou-se que o plantio de cultivares transgênicas diminuiu de 20% a 70% a incidência da broca europeia em plantações vizinhas de milho convencional. A pesquisa foi

realizada em lavouras de cinco estados do meio-oeste dos Estados Unidos, de 1996 a 2009 (TABASHNIK, 2010).

No Brasil, culturas de milho *Bt* são promissoras, em razão do ataque de pragas que resultam em perdas acentuadas na produção e aplicações intensivas de inseticidas. Assim, qualquer tecnologia capaz de reduzir a necessidade de aplicação de produtos químicos é vantajosa, sob os aspectos de logística da atividade, econômico, ambiental e de segurança do trabalhador rural.

Em estudos de Fernandes et al. (2003) foi observada redução da infestação natural de *Spodoptera frugiperda* de 73% em híbrido convencional para 34% em híbrido transgênico, expressando o gene Cry1Ab, em áreas experimentais no estado de São Paulo, o que evidencia a eficiência da tecnologia no controle dessa praga.

Embora tenha sido comprovada a eficiência dos eventos Bt para o controle de insetos na cultura do milho e a CTNBio afirmar que as tecnologias já autorizadas são seguras para o consumo humano, há preocupação com o fluxo gênico que pode comprometer a pureza genética da cultivar convencional, inviabilizando a comercialização de grãos e sementes.

Ressalta-se que, para a exportação de grãos, há a necessidade de atender aos padrões dos países importadores. Esses padrões são variáveis entre esses países e, dependendo do país importador, qualquer traço de transgênico pode inviabilizar a exportação. Esta condição exige um controle de qualidade nos campos de produção de sementes e de grãos, durante os processos de produção no campo e no processamento pós-colheita.

2.3 Fluxo gênico

Apesar dos benefícios evidentes das cultivares geneticamente modificadas, a preocupação com o fluxo gênico tornou-se um dos principais temas de debate das comunidades científicas e da população (BORÉM, 2001).

Na realidade, o fluxo gênico é um fenômeno comum a todas as espécies de plantas e contribui para o surgimento de novas combinações gênicas, gerando variabilidade nas populações e até originando espécies importantes de plantas cultivadas. Mas, a sua maior notoriedade, sem dúvida alguma, é devido aos transgênicos (RAMALHO; SILVA, 2004).

A possibilidade de ocorrência de dispersão de transgene para espécies silvestres tem recebido grande atenção na análise de biossegurança porque, segundo alguns ambientalistas, esse fato poderia mudar as propriedades genéticas das espécies nativas, com prejuízo para a biodiversidade. Deve ser salientado também que genes, uma vez introduzidos no parente silvestre, poderão, por meio da recombinação, ser disseminados. É evidente que a seleção natural irá atuar e, assim, ele só permanecerá na população se conferir alguma vantagem seletiva (BORÉM, 2001).

É importante lembrar que a transferência gênica pode ocorrer independentemente do transgene. Assim, genes de características agronômicas, tais como resistência a insetos e tolerância a condições ambientais adversas e a herbicidas, têm sido transferidos para as plantas cultivadas pelos métodos convencionais de melhoramento e podem ser transferidos para outros organismos, por meio de transferência vertical e horizontal, com impactos comparáveis aos das plantas geneticamente modificadas (ARAGÃO, 2004).

Atualmente, é comum separar o fluxo gênico vertical, que ocorre entre indivíduos da mesma espécie e o fluxo gênico horizontal, entre indivíduos de espécies diferentes.

O fluxo gênico pode ocorrer devido à disseminação do pólen, à mistura de sementes ou à presença de plantas voluntárias, proveniente de cultivos anteriores nas lavouras. Todas essas três fontes podem ser importantes agentes de fluxo gênico, mas o controle do pólen é o que implica em mais cuidados (RAMALHO; SILVA, 2004). Segundo Aragão (2004), a maioria dos polens transportados pelo vento atinge o solo em um raio de 100 metros, fazendo com que plantas que estejam a distâncias maiores tenham chances pequenas de polinização.

Várias condições são necessárias para que o fluxo gênico ocorra em condições de campo, como existência de indivíduos sexualmente compatíveis, coincidência temporal e espacial dos indivíduos, fecundação cruzada e grande longevidade do pólen (CHÈVRE et al., 1998).

A frequência do fluxo gênico vertical varia com a espécie e as condições ambientais. No que se refere à diferença entre as espécies, os geneticistas as classificam, de acordo com a frequência de autofecundação natural, em espécies autógamias, cuja frequência de autofecundação é, em média, superior a 95%; alógamas, em que essa frequência é inferior 5% e intermediárias, aquelas que se situam entre esses dois extremos (ALLARD, 1999).

Entre as espécies alógamas está o milho, que é uma das plantas em que o fluxo gênico tem sido mais amplamente estudado. É uma planta monóica, com polinização realizada predominantemente pelo vento. A liberação do pólen, normalmente, inicia-se antes que o estilo-estigma da mesma planta esteja exposto e receptível na espiga e continua, normalmente, por até 13 dias. Sendo assim, dificilmente o pólen produzido fertiliza o óvulo da mesma planta (RAMALHO; SILVA, 2004).

Alguns trabalhos já foram realizados envolvendo o fluxo gênico com transgênicos na cultura do milho. Uma revisão desses trabalhos foi apresentada por Easthan e Sweet (2002), que relataram resultados obtidos com a distância de

dispersão do pólen contendo o gene Bt no Canadá, em sete campos diferentes. Foi observado que quase a totalidade de dispersão dos polens, 89%, ocorreu nos primeiros 5 metros e, na maioria dos casos, uma pequena porcentagem atingiu 100 m de distância.

Altman (2003) relata que, na Espanha, tem sido cultivado milho GM e orgânicos há vários anos, mostrando a viabilidade da coexistência entre essas tecnologias.

No Brasil, o Ministério da Agricultura e Abastecimento recomenda a distância de 200 a 400 m para manter a pureza genética em campos de produção de sementes de milho. Para maior segurança, ainda se pode realizar a semeadura em momentos diferentes. Normalmente, 30 dias de diferença são suficientes para impedir que ocorra coincidência no florescimento. Utilizando o isolamento espacial e temporal, a probabilidade de fluxo gênico é praticamente nula (BORÉM; RAMALHO, 2002). Lankey (2002) discute outras opções de isolamento que podem ser utilizadas, como, por exemplo, alguma barreira física ou o transgênico macho estéril e, no caso de experimentos, proceder ao despendoamento.

Porém, em estudos realizados na European Environment Agency – EEA (2002) foi verificada a possibilidade de cruzamento de milho GM com convencional a uma distância de até 800 metros da cultura GM, acima e muito além daquela distância de isolamento de 200 metros recomendada. Nesses estudos observou-se que o pólen do milho pode se conservar viável de 24 horas a alguns dias, dependendo das condições climáticas. Constatou-se que os 200 metros de distância, recomendados para o isolamento, manterão a pureza genética de 99% na maioria dos casos.

O fluxo gênico horizontal é o que ocorre quando há passagem dos alelos ou genes entre indivíduos de espécies diferentes. Portanto, as

possibilidades de ocorrência do fluxo gênico horizontal são dependentes da espécie e do local de origem.

Com relação às preocupações com o fluxo gênico horizontal de espécies transgênicas, deve-se considerar que a quase totalidade das espécies cultivadas no Brasil foi introduzida e não há espécies silvestres relacionadas com as quais possam cruzar, como no caso do milho e da soja, o que impede a ocorrência de fluxo gênico por meios sexuais. Há, contudo, casos de espécies, como o algodão e arroz, que têm espécies silvestres relacionadas e, nesse caso, o fluxo gênico horizontal pode ocorrer. Nessas áreas, onde há risco de ocorrência de fluxo gênico, o plantio de OGMs não é seguro e, por isso, são exigidas medidas adicionais de segurança. Em campos experimentais com cultivares de algodão *Bt*, são exigidas, para áreas com até 5 hectares, bordadura com 12 linhas de uma cultivar não *Bt* e, se a parcela for superior a essa dimensão, até 24 linhas de bordadura. Estes plantios só são autorizados em locais distantes de, no mínimo, 4.800 m do algodoeiro silvestre (*Gossypium tomentosum*) (SIQUEIRA et al., 2004). Sugere-se também plantar ao redor outra malvacea, que tenha o mesmo polinizador de *Gossypium tomentosum* e áreas de exclusão para reduzir ainda mais a ocorrência de fluxo gênico (WOZNIAK, 2002).

No caso específico do milho (*Zea mays L.*), seus parentes selvagens mais próximos são encontrados na América do Norte, sendo o México o provável centro de origem. Provavelmente, foi domesticado entre 8.000 e 10.000 anos atrás, sendo o teosinte considerado um ancestral comum do milho. Ambas as espécies têm $n = 10$ cromossomos e cruzam-se facilmente, produzindo descendentes férteis viáveis. No Brasil, não ocorre teosinte ou outro parente do milho e, sendo assim, dificilmente ocorre o fluxo gênico horizontal para essa espécie (RAMALHO; SILVA, 2004).

O risco de escape gênico para várias espécies de interesse agrônômico da Inglaterra foi classificado em três categorias, com base na taxa de fecundação

cruzada e na existência de parentes silvestres na natureza: Grupo I = mínimo risco, Grupo II = médio risco e Grupo III = alto risco (RAYBOULD; GRAY, 1993). No Grupo I foram incluídos batata, milho, trigo e centeio, entre outros. O risco de fluxo gênico do milho para uma espécie silvestre, na Inglaterra, é mínimo, embora seja uma espécie com elevada taxa de fecundação cruzada. Essa reduzida probabilidade de escape gênico deve-se ao fato de naquele país não existirem parentes silvestres do milho ocorrendo na natureza. No entanto, o milho deveria ser classificado no grupo de alto risco no México, centro de diversidade dessa espécie, onde seus parentes silvestres ocorrem espontaneamente na natureza. Portanto, para existir alto risco de escape gênico, a espécie deve apresentar elevada taxa de polinização cruzada e devem existir parentes silvestres compatíveis com ela, compartilhando o mesmo habitat (BORÉM, 2001).

Em função do que foi discutido, pode-se estabelecer que a cultura do milho no Brasil tem alta probabilidade de ocorrência de fluxo gênico vertical, porém, a probabilidade de ocorrer o fluxo horizontal é praticamente nula, por não haver espécies silvestres aparentadas. No entanto, são necessários mais estudos sobre o escape gênico dessa espécie no Brasil, uma vez que a liberação do milho transgênico ocorreu recentemente e pouco se sabe sobre o fluxo gênico em milho Bt sob diferentes condições de produção.

2.4 Padrões de isolamento de campos

Com o aumento das áreas com transgênicos há a necessidade de controle da pureza genética, durante o processo de produção de sementes e grãos, transgênicos e convencionais. A contaminação genética deve ser evitada principalmente por meio de isolamentos espacial e temporal (ANDRADE; BORBA, 1993).

Para a definição do isolamento das áreas de produção de sementes de milho, deve-se considerar a natureza alógama das plantas. Assim, para garantir a perfeita separação entre o campo de produção de semente e outros campos com a cultura do milho, tanto para semente quanto para grão, devem-se observar alguns cuidados, evitando-se a fecundação cruzada indesejável, garantindo, assim, a pureza genética das sementes produzidas. Para a produção de sementes, é exigida distância mínima da fonte de pólen contaminante de 400 metros para híbridos especiais e 200 metros para demais híbridos, sem bordadura (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA, 2009). Segundo os padrões estabelecidos pelo MAPA para a cultura do milho, são considerados híbridos especiais os milhos pipoca, doce, superdoce, branco, ceroso e outros (MAPA, 2005). Na União Europeia, a distância mínima de separação é 200 metros para todas as categorias de produção de sementes de milho, considerada suficiente para manter uma pureza de 99,9% (INGRAM, 2000).

O isolamento é importante para evitar a contaminação por pólen de outras cultivares indesejáveis, o que, além de causar desuniformidade no lote de sementes a ser produzido, pode provocar redução da produção no cultivo seguinte. Da mesma maneira, a presença de plantas atípicas causa a contaminação do lote de sementes e, em consequência, pode reduzir a produção e a uniformidade da lavoura no próximo plantio (ANDRADE; BORBA, 1993).

O milho é uma planta de polinização aberta e, normalmente, a deiscência e a dispersão do pólen ocorrem entre 2 e 3 dias antes da emergência dos estigmas, o que favorece a polinização cruzada, não evitando, porém, que alguma autofecundação possa ocorrer (NICOLI et al., 1993). A polinização geralmente começa ao nascer do sol e um pendão pode liberar pólen por mais de uma semana, podendo um campo de produção ter polinização efetiva com duração entre 2 e 14 dias. Por outro lado, a receptividade de uma espiga ocorre

tão logo os estilos-estigmas sejam liberados da palha. Havendo pólen viável, sua polinização é completada em até três dias após esta liberação. Caso contrário, esses estilo-estigmas podem permanecer receptivos ao pólen por um período de 7 a 8 dias (NICOLI et al., 1993).

Segundo Luna (2001), o pólen de milho pode percorrer uma distância de até 32 km, se o vento for constante e a trajetória for retilínea. Contudo, o mesmo autor constatou que o pólen viável foi detectado a uma distância máxima de 200 m a partir da planta que o originou.

Em 2004, no Canadá, foram realizados inúmeros estudos nos quais os pesquisadores do *Eastern Cereal and Oilseed Research Center*, demonstraram que, no milho Bt, a taxa de dispersão do pólen depende da distância da fonte do pólen, da direção do vento e da coincidência da liberação do pólen com a emissão dos estilos-estigmas das espigas. A porcentagem de cruzamento foi menor do que 1% dentro de uma distância de 28 metros na direção do vento e de 10 metros na direção oposta ao vento, porém, constatou-se que 200 m é a distância mais apropriada para a separação entre duas cultivares (MA; SUBEDI; REID, 2004).

Raynor, Ogden e Hayes (1972) estimaram, em seu trabalho, que 98% do pólen liberado pela planta de milho ficava nela mesma e que menos de 1% do pólen chegaria a uma distância de até 60 m. Posteriormente, Jarosz et al. (2003) afirmaram que 95% do pólen chegaria a ser depositado em um diâmetro de 10 m no campo de sementes.

Jemison e Vayda (2001) utilizaram tecnologia a *Roundup Ready* como marcador genético para avaliar a distância percorrida pelo pólen de milho em uma área de 0,3 ha com plantas convencionais. Em dois anos de cruzamento livre entre as plantas, foram observadas plantas com o gene RR na proporção de 1,34%, 0,48% e 0,39% a 30, 35 e 40 m de distância do centro da área onde estavam as plantas com esse gene, respectivamente.

De acordo com um estudo publicado na Itália (CENTRO DI DOCUMENTAZIONE SULLE AGROBIOTECNOLOGIE, 2006), uma distância de separação de 18 metros é suficiente para a coexistência entre milho geneticamente modificado e convencional, respeitando-se o limiar europeu de 0,9% de OGM nos produtos tradicionais. O estudo foi realizado em 40 hectares, no qual se avaliou a disseminação dos genes entre campos por meio da expressão de xênia em grãos com cores distintas. Segundo os autores, o fluxo de genes é inferior a 0,5%, em uma distância de 30 metros.

Halsey et al. (2005), testando o deslocamento do pólen de milho sob a influência do vento, chegaram à conclusão de que o pólen de milho, por apresentar pouco peso, pode ser deslocado até a uma distância de 166 m, quando o vento atingir uma velocidade de 10 km h⁻¹. Em situações sem vento ou com baixa intensidade, ele percorreria uma distância de até 20 m. Em três anos de avaliações, na Califórnia e em Washington, EUA, apenas 0,0059% dos grãos de pólen chegaram a atingir 200 m de distância.

No Brasil, a CTNBio, no uso de suas atribuições e de acordo com o Decreto 5.591 de 22 de novembro de 2005, determinou, em 20 de julho de 2006, que, para que seja concedida a autorização de liberação planejada de milho GM no meio ambiente, as entidades ou instituições interessadas deverão estabelecer bordadura de contenção com dez linhas de milho não geneticamente modificado ao redor das parcelas experimentais e manter distância de 400 metros de outros plantios com milho ou estabelecer bordadura de contenção com vinte linhas de milho não geneticamente modificado ao redor das parcelas experimentais e respeitar período mínimo de 40 dias entre datas de florescimento de outros plantios de milho, mantendo a distância de 10 metros (CTNBio, 2006). Já para as liberações comerciais, conforme Resolução Normativa nº4, de 16 de agosto de 2007, a distância entre lavouras GM e convencionais deve ser igual ou superior a 100 metros ou, alternativamente, 20 metros, desde que acrescida de

bordadura com, no mínimo, dez fileiras de plantas de milho convencional de porte e ciclo vegetativo similar ao milho transgênico (CTNBio, 2007).

O isolamento dos campos de produção de semente é fundamental para garantir a pureza genética. As barreiras naturais, com outras culturas de porte elevado, são permitidas para diminuir os isolamentos por distância, porém, a redução dos isolamentos pelo aumento do número de bordas ou o uso de barreiras naturais podem resultar em fracasso quando existem ventos muito fortes, por ocasião do período de polinização e cuja direção seja favorável à contaminação.

Apesar do estabelecimento de isolamento pela CTNBio, há uma discussão a respeito de que o exigido hoje não seja suficiente para assegurar a coexistência entre plantios convencionais e transgênicos em função da ocorrência de fluxo gênico. Consequentemente, envolve também o risco de perda de contratos de produtores com empresas que compram e negociam somente grãos convencionais.

Para estimar o fluxo gênico em campos de produção de sementes e grãos, podem-se adotar marcadores morfológicos e moleculares.

2.5 Métodos para a detecção e quantificação de OGM

Os marcadores moleculares são utilizados em análises genéticas com as mais diversas finalidades, tais como identificação de clones, linhagens, cultivares, taxa de diversidade, fluxo gênico e, atualmente, na quantificação da taxa de fecundação cruzada.

De maneira geral, os métodos para detecção de sementes de espécies GM podem ser classificados em duas categorias. A primeira categoria inclui métodos que requerem a amplificação de um segmento de DNA com subsequente detecção direta ou indireta do produto final. A segunda inclui

métodos que envolvem o emprego de anticorpos marcados, como o *enzyme linked immunosorbant assay*, ou teste ELISA e os testes de tiras por fluxo lateral, que detectam proteínas específicas presentes em sementes e plantas GM (AHMED, 2002).

A técnica de PCR, que consiste na amplificação seletiva de sequências específicas da molécula de DNA, é o principal método utilizado na detecção e quantificação de OGMs. Nesse caso, a PCR amplifica um segmento da construção gênica inserida na planta. Embora o método tenha algumas limitações, a alta sensibilidade, a especificidade e a capacidade de detectar uma ampla série de eventos e de distinguir as variedades geneticamente modificadas que apresentam diferentes construções gênicas explicam a sua escolha para a realização de análises de detecção de OGMs e seus derivados (AHMED, 2002).

Em virtude de a legislação brasileira exigir a rotulagem de alimentos apresentando OGMs acima de 1% e a exportação de grãos para países que adotam padrões diferenciados para importação de grãos transgênicos, faz-se necessária a adoção de metodologias que possibilitam a quantificação de transgênicos. Assim, a técnica mais adequada para este fim tem sido a reação em cadeia da DNA polimerase em tempo real (RTq-PCR), que permite a determinação da concentração dos produtos de amplificação durante a fase exponencial do PCR, permitindo traçar uma estimativa da quantidade inicial do DNA, ácido desoxirribonucleico, amplificado (AHMED, 2002). Esta metodologia foi validada para detecção de OGMs em estudo anterior (CANKAR, 2005).

Nesta técnica, a quantidade de produto amplificado durante a reação é estimada diretamente pela mensuração da fluorescência emitida. Durante a reação, a inserção de uma sonda especial de DNA permite a detecção de fluorescência. No ensaio TaqMan®, esta sonda contém uma molécula *repórter*, de emissão, e uma molécula *quencher*, de extinção. Quando a molécula *reporter*

e a *quencher* estão próximas fisicamente, a emissão de fluorescência é anulada, portanto, nenhum sinal pode ser detectado. Durante a amplificação, a sonda é degradada, afastando o *reporter* do *quencher*, resultando na emissão do sinal fluorescente, que é captado por uma câmera digital. O ensaio descrito acima é o mais utilizado para detecção de OGMs (WEIGHARDT et al., 2004), porém, existem outras sondas utilizadas para estimar a concentração de produto amplificado na RTq-PCR, como o SYBR Green I e o molecular *beacons* (AHMED, 2000).

O percentual de OGM no alimento é obtido comparando-se a curva da amostra analisada com uma curva de calibração padrão (WEIGHARDT et al., 2004). Empiricamente, a concentração de DNA na RTq-PCR é inversamente proporcional ao número de ciclos que ocorrem durante a fase exponencial da PCR.

A PCR em tempo real é altamente sensível, precisa, segura, rápida e capaz de detectar uma ampla série de eventos GM. Além disso, o produto da reação é analisado diretamente, reduzindo significativamente o risco de contaminação (BRODMANN, et al., 2002; HOLST-JENSEN et al., 2003; MIRAGLIA et al., 2004).

Segundo os critérios de aceitação do European Network of GMO Laboratories - ENGL (2008), a eficiência de uma reação de PCR em tempo real deve estar entre $90\% \leq ef \leq 110\%$ e $R^2 \geq 0,98$. A eficiência é a taxa de amplificação que leva a um *slope* teórico de -3,32, com uma eficiência de 100% em cada ciclo. O R^2 é o coeficiente de correlação de uma curva padrão obtida pela análise de regressão linear.

Na quantificação de OGM em alimentos para bebês, produtos dietéticos, bebidas de soja, sobremesas, talharim e cereais contendo soja RR e milho Bt, a RTq-PCR demonstrou ser eficaz. A sensibilidade da técnica é de aproximadamente 0,01% de OGM (WEIGHARDT et al., 2004).

Greiner, Konietzny e Villavicencio (2005) analisaram 100 produtos alimentícios à base de soja e outros 100 à base de milho, comercializados no Brasil em 2000 e 2001, por meio da RTq-PCR. Desses, 13% dos produtos à base de soja, em 2000, e 21%, em 2001, apresentavam a soja RR, dentre os quais farinha de soja, produtos à base de tofu, sopas instantâneas, isolado protéico de soja, alimentos para dietas vegetarianas e produtos de panificação. Nos produtos à base de milho, foi detectada a presença de Bt176, MON810 em 8% e 9% dos alimentos nos anos de 2000 e 2001, respectivamente, em amostras de biscoitos, polenta e farinha de milho. Cardarelli et al. (2005) analisaram 89 alimentos à base de soja e milho e, destes, 18% apresentaram soja tolerante a glifosato, sendo que nenhum alimento apresentou milho GM. Brod et al. (2007) analisaram 37 produtos alimentares à base de soja e, destes, 51% apresentaram resultado positivo para a presença de soja RR.

Os OGMs, geralmente, são caracterizados pela presença de um ou mais segmentos de DNA exógenos, que podem ou não proporcionar a expressão de novas proteínas. Sendo assim, a detecção destes organismos é focalizada na sequência de DNA exógena ou na proteína transgênica. A análise de rotina de produtos alimentícios contendo OGMs compreende três etapas: 1 - detecção; 2 - identificação do OGM presente na amostra, para determinar se este é autorizado e 3 - quantificação do OGM no produto, para checar a necessidade de rotulagem ou não, conforme a legislação (PETIT et al., 2003).

A maioria dos OGMs aprovados para uso alimentar possui sequências comuns, como o promotor 35S, proveniente do vírus do mosaico da couve-flor (VMCF) e o terminador NOS, proveniente do gene da nopalina sintetase de *Agrobacterium tumefaciens* (HOLST-JENSEN et al., 2003; BORDONI et al., 2004), todas elas passíveis de serem detectadas por meio da técnica de PCR.

A técnica de PCR apresenta alto grau de seletividade e sensibilidade, critérios estes que fazem com que este método seja o mais empregado na

maioria dos laboratórios analíticos interessados na detecção de OGMs e seus subprodutos. Tendo em vista o fato de que os produtos destinados à análise geralmente já sofreram algum tipo de processamento que pode interferir na integridade e na quantidade do alvo, é necessário considerar possíveis interferências na sensibilidade, qualquer que seja o método a ser utilizado (PEANO, 2004).

Apesar de os métodos imunológicos e PCR diferirem quanto à sensibilidade, à velocidade e ao custo por análise, observa-se grande concordância entre os resultados obtidos com os dois tipos de metodologia. Contudo, a robustez, o custo por análise, a necessidade de resposta qualitativa rápida, a velocidade de execução, os limites legais e o treinamento de pessoal podem definir a escolha em favor de métodos imunológicos rápidos, principalmente daqueles em configuração mais simples, a exemplo do método de tiras (STAVE, 2002).

O teste da tira de fluxo lateral é feito de nitrocelulose e tem anticorpos que reconhecem a proteína alvo, proveniente da modificação genética. No teste é utilizado um duplo anticorpo no formato de sanduíche. Anticorpos específicos a proteínas-alvo são acoplados a um reagente colorido e incorporados na tira de teste. Quando a tira é colocada numa pequena quantidade de extrato que contenha a proteína proveniente da modificação genética, um complexo proteína-anticorpo é formado com parte do anticorpo incorporado ao reagente colorido. Este complexo colorido flui por capilaridade através de uma membrana porosa. A membrana contém duas zonas de captura, uma específica para o complexo proteína-anticorpo e outra para os anticorpos não reagidos, acoplados ao reagente colorido. Estas zonas de captura exibem uma coloração avermelhada quando o complexo proteína-anticorpo e ou o reagente colorido são capturados nas zonas específicas da membrana. A presença de apenas uma linha, linha de controle, na membrana indica um resultado negativo, enquanto o aparecimento

duas linhas indica que uma amostra é positiva. Nesse teste, o resultado é observado dentro de 5 a 10 minutos, além de ter um baixo custo quando comparado com outros testes (AHMED, 2002).

O MAPA, por meio da IN42, de dezembro de 2006, aprovou o regulamento para extensão de escopo de credenciamento dos laboratórios de análise de sementes públicos e privados, credenciados por ele, para realizarem análises ou ensaios para detecção qualitativa ou quantitativa e identificação de sementes de organismos geneticamente modificados autorizadas para uso comercial (MAPA, 2006). Por meio da IN43 foi aprovada também a utilização do programa computacional SeedCalc, aliado ao uso das tiras de fluxo lateral, como ferramenta ou método alternativo para a quantificação da presença de sementes de algodão GM em amostras de sementes de algodão convencional, assegurando o limite de 1% (um por cento) de presença adventícia de sementes GM em sementes convencionais, para as proteínas CP4EPSPS, PAT/BAR e CryIac, considerando-se para tal a soma dos valores de *upper limit* obtidos no programa SeedCalc para cada proteína (MAPA, 2006).

Cunha et al. (2005), comparando métodos de detecção de sementes de soja GM, concluíram que o teste de tiras é eficiente e viável para checagem rápida, por exemplo, na recepção de sementes em uma unidade de beneficiamento de sementes, permitindo agilidade na tomada de decisão.

Os marcadores morfológicos também podem ser utilizados para a detecção de fluxo gênico em campos de produção de grãos e de sementes e, dependendo das características das cultivares envolvidas, podem ser utilizadas para a avaliação de fecundação cruzada em milho transgênico.

O termo xênia é originário do grego *xenos*, que significa “um estranho ou hóspede”; o prefixo meta indica superioridade ou pode, ainda, indicar mudança ou transformação como metamorfose (DENNEY, 1992).

De acordo com Denney (1992), o efeito xênia é ocasionado pela ação direta do pólen no embrião e no endosperma, alterando a cor, a textura e o peso das sementes de frutíferas e grãos, enquanto metaxênia indica que o pólen tem ação direta nos tecidos maternos da planta-mãe.

Segundo Brink e Cooper (1947), foi Focke, em 1881, quem criou o termo xênia para todas as mudanças da forma ou da cor, em muitas partes da planta, atribuídas à ação do pólen estranho. Essa definição não foi bem aceita e, posteriormente, surgiram várias outras. De acordo com Denney (1992), uma das definições mais antigas foi idealizada por Winburne, em 1962, que definiu xênia como sendo o efeito imediato do pólen sobre o endosperma, devido à dupla fertilização, afetando, assim, o aspecto da semente.

Para Mercer (2001), o fenômeno de xênia pode ser definido como o resultado do cruzamento que se manifesta na geração da planta-mãe. Este fenômeno tem grande importância, uma vez que é possível verificar seu efeito na geração do cruzamento, ganhando-se tempo.

Em vários experimentos envolvendo diversos tipos de híbridos, tem sido verificado que o efeito do pólen estranho altera o desenvolvimento de grãos de milho, geralmente promovendo diferenças no peso e na qualidade de sementes autofecundadas e de fertilização cruzada. Sabe-se que esse efeito do grão de pólen pode ocorrer tanto no embrião como no endosperma ou em ambos, pois, devido à dupla fertilização, a fêmea contribui com metade dos gametas femininos para formar o embrião e $2/3$ para formar o endosperma, e o macho contribui com metade dos gametas masculinos para o embrião e $1/3$ para o endosperma (LUDERS, 2006).

Segundo Denny (1992), os resultados de xênia podem ser interpretados como uma manifestação precoce da heterose, a qual aumenta a habilidade do endosperma, modificado geneticamente pela polinização cruzada, em acumular os fotoassimilados, determinando, assim, o peso final do grão. Quanto maior for

a divergência entre a planta receptora e a planta doadora de pólen, maiores são as chances desse fenômeno ocorrer.

Mercer (2001), trabalhando com linhagens de milho branco (B203, B204 e B207) e amarelo (A20, A33 e A47), verificou que houve expressivo aumento na produtividade (7,9%), quando se polinizou a linhagem branca com a amarela em relação à polinização da linhagem branca x branca, mostrando que o efeito xênia contribui com o incremento no peso dos grãos e, conseqüentemente, na produtividade média da planta. Foi possível concluir também que o efeito xênia variou, como em outros experimentos, com a linhagem polinizadora e receptora, o que é um indicativo de que esse fenômeno não pode ser generalizado para todos os casos.

No caso do milho, além da produtividade, outros caracteres também podem sofrer o efeito xênio, como teor de óleo, proteína, amido e outras substâncias químicas que tornam o grão de melhor qualidade e mais atrativo para mercados específicos (LUDERS, 2006).

Assim, dependendo dos genótipos envolvidos, contaminações resultantes de pólen estranho poderão ser identificadas nas sementes, sem a necessidade de avaliação das características das plântulas, bem como a utilização do efeito xênia para detectar escape gênico em OGMs.

Para a detecção de OGM, existem fatores importantes a serem considerados. Entre eles estão o tamanho ideal de amostra e a amostragem aleatória de um lote de sementes e grãos. Outro aspecto é a sensibilidade e a especificidade do teste, que podem afetar as taxas de resultados falso-positivos ou falso-negativos (REMUND et al., 2001).

2.6 Amostragem sequencial

Muitas são as técnicas disponíveis para a detecção de OGMs, mas o tamanho da amostra a ser analisada tem sido um dos principais questionamentos, por se tratarem de análises caras e do grande número de amostras que devem ser analisadas, principalmente com a liberação de eventos transgênicos de milho, como o Bt 11, o T25, o TC1507 e o MON810.

Na avaliação da qualidade de sementes, o método convencional de amostragem prevê uma amostra de tamanho fixo. Porém, mais recentemente, em face das técnicas disponíveis e da quantidade de amostras a serem analisadas em laboratório de rotina, há a necessidade de estudos relacionados principalmente à amostragem sequencial. A vantagem em relação à amostragem de tamanho fixo é que a amostragem sequencial caracteriza-se por envolver amostras de tamanho variável, o que pode levar a uma redução nos custos, porém, mantendo-se o controle dos erros que poderiam ser cometidos. Outra diferença é que, enquanto na amostragem convencional, procura-se estimar os parâmetros populacionais para depois, eventualmente, testar uma hipótese a respeito dos mesmos, na amostragem sequencial é testada uma hipótese a respeito desses parâmetros sem a preocupação e estimá-los (LOPES, 2003).

Os métodos clássicos para a amostragem de tamanho fixo e os métodos inferenciais estão descritos em diversos trabalhos. Desde sua criação, a teoria da amostragem sequencial tem sido aplicada por diversos autores. Entre eles estão Estefanel (1977), Ellis e Whitehead (1987), Jackish, Lindner e Sieg (1984), Santana (1994) e Lopes (2003), que colocam seus elementos de uma maneira que torna possível uma imediata aplicação em situações práticas envolvendo a área de ciências agrárias.

Para elaborar um plano de amostragem sequencial é necessário conhecer a distribuição da variável que está sendo levantada pela amostragem, formular

hipóteses e estabelecer os riscos de tomar decisões erradas. Na amostragem sequencial, as unidades amostrais são examinadas em sequências e os resultados são obtidos por meio dos limites previamente determinados. Assim, com base na primeira observação, pode-se chegar a uma das três seguintes decisões: (1) aceitar a hipótese H formulada, (2) rejeitar a hipótese H e (3) continuar a amostragem. Se for tomada a decisão (3), outra unidade amostral é examinada e, com base nos resultados acumulados, as três possíveis decisões são examinadas novamente. O processo é continuado até que se possa tomar a decisão (1) ou a (2) (LOPES, 2003).

Em outras áreas, como a entomologia e a fitopatologia, a amostragem sequencial é uma ferramenta que visa diminuir a aplicação de produtos químicos para a redução de custos e menor impacto ambiental.

Dentre as principais distribuições utilizadas estão a binomial e a beta-binomial. A binomial considera constante a probabilidade das unidades amostrais se apresentarem infestadas ou infectadas. Já a distribuição beta-binomial considera a possibilidade de existirem diferentes probabilidades de sucesso entre as unidades amostrais (MENDONÇA, 2003).

Trabalhos para estimar o tamanho da amostra são escassos por exigirem conhecimento nas áreas de estatística e biologia. Nesse sentido, a definição do tamanho da amostra e métodos para a detecção, identificação e quantificação de OGMs são importantes nos estudos de fluxo gênico em campos de produção de sementes e grãos de milho.

REFERÊNCIAS

AHMED, F. E. Detection of genetically modified organisms in foods. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 20, n. 5, p. 215-223, 2002.

AHMED, F. E. Molecular markers for early cancer detection. **Journal of Environmental and Science Health**, [s.l.], v. 18, p. 75-125, 2000.

ALLARD, R. W. **Principles of plant breeding**. 2nd ed. Nova York: J. Wiley, 1999.

ALTMAN, K. **Co-existence between organic, traditional and biotech agriculture**. Bern: University of Bern, 2003.

ANDRADE, R. V.; BORBA, C. S. Fatores que afetam a qualidade das sementes. In: EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo. **Tecnologia para produção de sementes de milho**. Sete Lagoas, 1993. p. 7-9. (EMBRAPA/CNPM/Circular técnica, 19).

ARAGÃO, F. J. L. Organismos geneticamente modificados: impacto do fluxo gênico. In: MIR, L. (Org.). **Genômica**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2004. v. 1, p. 767-783.

BORDONI, R. et al. Detection and quantitation of genetically modified maize (Bt-176 Transgenic maize) by applying ligation detection reaction and universal array technology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, p. 1.049-1.054, 2004.

BORÉM, A. **Escape gênico & transgênicos**. Viçosa, MG: UFV, 2001.

BORÉM, A.; RAMALHO, M. A. P. Escape gênico e impacto ambiental. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 5, n. 28, p. 44-47, 2002.

BRASIL. **Decreto nº 4.680, de 24 de abril de 2003**. Regulamenta o direito à informação, assegurado pela Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990, quanto aos alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal que contenham ou sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados, sem prejuízo do cumprimento das demais normas aplicáveis. Disponível em: <<http://www.presidencia.gov.br>>. Acesso em: 20 ago. 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa, n. 9**. Normas para produção, comercialização e utilização de sementes. Brasília, DF: Sistema de Consulta à Legislação, 2005. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: 09 nov. 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa, n. 42**. Brasília, DF: Sistema de Consulta à Legislação, 2006. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: 09 nov. 2010.

BRINK, R. A.; COOPER, D. C. The endosperm in seed development. **The Botanical Review**, Wisconsin, v. 13, n. 9, p. 479-541, 1947.

BROD, F. C. A. et al. Nested PCR detection of genetically modified soybean in soybean flour, infant formula and soymilk. **LWT**, [s.l.], v. 40, p. 748-751, 2007.

BRODMANN, P. D. et al. Real-time quantitative polymerase chain reaction methods for four genetically modified maize varieties and maize DNA content in food. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 85, p. 646-653, 2002.

BURKNESS, E. C. et al. Efficacy and risk efficiency of sweet corn hybrids expressing a *Bacillus thuringiensis* toxin for Lepidopteran pest management in the Midwestern US. **Crop Protection**, Surrey, v. 21, p. 157-169, 2002.

CANKAR, K. et al. Real-time pollymerase chain reaction detection of Cauliflower mosaic virus to complement the 35S screening assay for genetically modified organisms. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 88, n. 3, p. 814-822, 2005.

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

CENTRO DI DOCUMENTAZIONE SULLE AGROBIOTECNOLOGIE.
Informações científicas e econômicas sobre a utilização da biotecnologia na agricultura. Desenvolvido pela CEDAB, 2006. Disponível em:
<<http://www.cedab.it/>> Acesso em: 31 maio 2008.

CHÈVRE, M. A. et al. Characterization at backcross generations obtained underfield conditions from oilseed rape-wild radish F1 interespecific hybrids: an assessment at transgene dispersal. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 97, p. 9-98, 1998.

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA. **Legislações**. Desenvolvido pela CTNBio, 2006. Disponível em:
<<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/11957.html>>. Acesso em: 31 maio 2010.

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA. **Parecer técnico nº 1255/2008**. Informações sobre liberações comerciais. 2007. Disponível em:
<<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/11354.html>>. Acesso em: 10 dez. 2010.

CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA.
Biotecnologia na mídia. Desenvolvido por Roberta Jansen, 2007. Apresenta informações sobre a aprovação do milho transgênico da Bayer no Brasil. Espanha. Disponível em: <<http://www.cib.org.br/midia.php?ID=21183>>. Acesso em: 10 dez. 2010.

CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA. **Em dia com a ciência**. Desenvolvido pelo CIB, 2002. Apresenta informações sobre a Consultoria que atesta benefícios dos GMs na Espanha. Disponível em: <http://www.cib.org.br/em_dia.php?id=20>. Acesso em: 15 maio 2007.

CUNHA, C. S. M. et al. Comparação de métodos na detecção de sementes de soja geneticamente modificada resistente ao glifosato. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 27, n. 1, p. 167-175, 2005.

DENNY, J. O. Xenia includes metaxenia. **Hort Science**, Alexandria, v. 27, n. 7, p. 722-728, July 1992.

EASTHAM, K.; SWEET, J. **Genetically modified organisms (GMOs): the significance of gene flow through pollen transfer**. Copenhagen: [s.n.], 2002. (European Environment Agency, n. 28).

ELLIS, R. H.; WHITEHEAD, J. Open truncated and triangular sequential seed testing procedures. **Seed Science & Technology**, New Delhi, v. 15, n. 1, p. 1-17, 1987

ESTEFANEL, V. **A amostragem sequencial baseada no teste sequencial da razão de probabilidade e seu uso no controle das lagartas da soja no estado do Rio Grande do Sul**. 1997. 117 p. Dissertação (Mestrado em Experimentação e Estatística) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

EUROPEAN ENVIRONMENTAL AGENCY. **Genetically modified organisms (GMOs): the significance of gene flow through pollen transfer**. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2002. (Environmental issue report 28)

EUROPEAN NETWORK OF GMO LABORATORIES (ENGLAND). **Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing**. [S.l.]: CRL-GMFF, Oct. 2008.

FERNANDES, O. D. et al. Efeito do milho geneticamente modificado MON 810 sobre a lagarta do cartucho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 2, n. 2, p. 25- 35, 2003.

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**, Guildford, v. 6, n. 8, p. 753-759, 2005.

HALSEY, M. E. et al. Isolation of Maize from Pollen-Mediated Gene Flow by Time and Distance. **Crop Science**, Madison, v. 45, n. 6, p. 2.172-2.185, Nov./Dec. 2005.

HERRERA-ESTRELLA, L. R. Genetically modified crops and developing countries. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 124, p. 923-925, 2000.

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

INGRAM, J. **Report on the Separation Distances Required to Ensure Cross-Pollination is Below Specified Limits in Non-Seed Crops of Sugar Beet, Maize and Oilseed Rape**. 2000. Report Commissioned by the UK Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAFF). Project n° RG0123. Disponível em: <<http://www.agindustries.org.uk/scimac/otherdoc/NIABSepDistReview.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2010.

JACKISH, W.; LINDNER, H.; SIEG, M. Sequentielle verfahren bei der keimfähigkeits-bestimmung von getreide unter anwendung der saurefuchsin-methode. **Seed Science & Techonology**, New Delhi, v. 12, n. 2, p. 697-706, 1984.

JAMES, C. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops**. Ithaca, 2009. (ISAAA Brief, n. 41).

JAROSZ, N. et al. Field measurements of airborne concentration and deposition rate of maize pollen. **Agricultural and Forest Meteorology**, Amsterdam, v. 119, p. 37-51, 2003.

JEMISON, J. M.; VAYDA, M. E. Cross pollination from genetically engineered corn: Wind transport and seed source. **AgBioForum**, Columbia, v. 4, n. 2, p. 87-92, 2001.

JOY, K.W. Ammonia, glutamine and asparagine: a carbon-nitrogen interface. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 66, p. 2.103-2.109, 1988.

LANKEY, K. R. **GMO's and gene flow**: A plant breeding perspective. [S.l.: s.n.], 2002.

LOPES, M. M. **Amostragem sequencial e marcadores microsatélites na avaliação da qualidade genética em lotes de sementes de milho**. 2003. 47 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

LUDERS, R. R. **Efeito xenia em híbridos comerciais de milho visando ao aumento da produtividade**. 2006. 125 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

LUNA, V. S. et al. Maize pollen longevity and distance isolation requirements for effective pollen control. **Crop Science**, Madison, v. 41, p. 1.551-1.557, 2001.

MA, B. L.; SUBEDI, K. D.; REID, L. M. Extent of crossfertilization in maize by pollen from neighbouring transgenic hybrids. **Crop Science**, Madison, v. 44, p. 1.273-1.282, 2004.

MANDERSCHIED, R.; WILD, A. Studies on the mechanism of inhibition by phosphinothricin of glutamine synthetase isolated from *Triticum aestivum* L. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 123, p. 135-142, 1986.

MANN, C. C. Crop scientists seek a new revolution. **Science**, Washington, DC, v. 283, p. 310-314, 1999.

MENDONÇA, L. A. **Métodos de estimação por intervalo do coeficiente de correlação intraclasse, para dados com distribuição beta-binomial, via simulação Monte Carlo**. 2003. 52 p. Dissertação (Mestrado em Estatística e Experimentação Agropecuária) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MERCER, J. R. **Implicações do fenômeno Xênia nos programas de melhoramento de milho**. 2001. 53 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MIRAGLIA, M. et al. Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 42, p. 1.157-1.180, 2004.

MONSANTO EUROPA S.A. **Nuevas Publicaciones**. Desenvolvido pela Monsanto Europa S.A., 2006. Apresenta informações sobre o cultivo de variedades de milho YieldGard® protegidas contra brocas. Disponível em: <http://www.monsanto.es/Novedad/guia_yieldgard_2006_portugues.pdf> Acesso em: 15 mar. 2008.

MUNKVOLD, G. P.; HELLMICH, R. L.; RICE, L. G. Comparison of fumonisin concentrations in kernels of transgenic *Bt* maize hybrids and non-transgenic hybrids. **Plant Disease**, St. Paul, v. 83, p. 130-138, 1999.

NICOLI, A. M. et al. Produção das sementes. In: EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo. **Tecnologia para produção de sementes de milho**. Sete Lagoas, 1993. p. 11-21. (EMBRAPA/CNPMS/Circular técnica, 19).

PEANO, C. et al. Qualitative and quantitative evaluation of the genomic DNA extracted from GMO and Non-GMO foodstuffs with four different extraction methods. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 23, p. 6.962-6.968, 2004.

PETIT, L. et al. Screening of genetically modified organisms and specific detection of Bt176 maize in flours and starches by PCR-enzyme linked immunosorbent assay. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 217, p. 83-89, 2003.

RAMALHO, M. A. P.; SILVA, N. O. Fluxo gênico em plantas. In: MIR, L. (Org.). **Genômica**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2004. v. 1, p. 863-884.

RAYBOULD, A. F.; GRAY, A. J. Genetically modified crops e hybridization with wild relatives: A UK perspectives. **Journal of Applied Ecology**, Oxford, v. 30, p. 199-219, 1993.

RAYNOR, G. S.; OGDEN, E. C.; HAYES, J. V. Dispersion and deposition of corn pollen from experimental sources. **Agronome Journal**, Madison, v. 64, n. 4, p. 420-426, July/Aug. 1972.

REMUND, K. M. et al. Statistical considerations in seed purity testing for transgenic traits. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 11, p. 101-119, 2001.

RICE, M. E. Yield performance of *Bt* corn. **Integrated Crop Management**, Ames, v. 480, n. 1, Jan. 1998. Disponível em: <<http://www.ipm.iastate.edu/ipm/icm/1998/1-19-1998/yieldbt.html>>. Acesso em: 1 jun. 2008.

SANTANA, D. G de **Adaptação do teste do pH do exsudado e viabilidade do uso da amostragem sequencial na rápida definição sobre o destino de lotes de sementes de milho**. 1996. 79p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SIQUEIRA, J. O. et al. Interferência no agrossistema e riscos ambientais de culturas transgênicas tolerantes a herbicidas e protegidas contra insetos. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, DF, v. 21, n. 1, p. 11-81, jan./abr. 2004.

STAVE, J. W. Protein immunoassay methods for detection of biotech crops: Applications, limitations, and practical considerations. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 85, n. 3, p. 780-786, 2002.

TABASHNIK, B. E. Communal Benefits of Transgenic Corn. **Plant Science**, Limerick, v. 330, p. 189-190, 2010.

WAQUIL, J. M.; VILLELA, F. M. F.; FOSTER, J. E. Resistência do milho (*Zea mays* L.) transgênico (*Bt*) à lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 1, n. 3, p. 1-11, 2002.

WEIGHARDT, F. et al. Real-time polymerase chain reaction-based approach for quantification of the pat gene in the T25 *Zea mays* event. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 87, p. 1.342-1.355, 2004.

WOZNIAK, C. A. Gene flow assessment for plant-incorporated protectants by the Biopesticide and Pollution Prevention Division, U.S. EPA. In: SCIENTIFIC METHODS WORKSHOP, 2002, Columbus. **Ecological and agronomic consequences of gene flow from transgenic crops to wild relatives**: meeting abstract, Columbus: The Ohio State University, 2002.

CAPÍTULO 2
ESTIMATIVA DO TAMANHO DA AMOSTRA PARA A DETECÇÃO DE
MILHO GENETICAMENTE MODIFICADO

RESUMO

Com o aumento da demanda por sementes e grãos transgênicos, e para atender à legislação vigente de rotulagem e para a certificação de pureza genética, é necessária a realização de trabalhos para estimar o tamanho da amostra a ser analisada para identificar e quantificar o evento transgênico. Assim, técnicas de amostragem, como, por exemplo, a sequencial, devem ser estudadas, para se obter um resultado com confiabilidade e repetibilidade. Este trabalho foi realizado com o objetivo de estimar o tamanho da amostra para a detecção de organismos geneticamente modificados, por meio da amostragem sequencial utilizando a técnica de PCR e teste de tiras. A amostragem foi simulada em lotes de sementes de milho com 0,5%, 1% e 4% de contaminação com sementes de milho transgênico resistente a insetos, MON810. Foram formuladas as hipóteses H_0 : o lote de sementes híbridas está dentro dos padrões aceitáveis de pureza e H_1 : o lote de sementes não está dentro dos padrões aceitáveis. Os riscos envolvidos nas tomadas de decisão para rejeição ou aceitação do lote de sementes foram α e β , que foram fixados em 0,05. A amostragem foi realizada em sequências crescentes de grupos de sementes, simulados com o programa SeedCalc8 e analisados até a detecção, por meio da técnica de PCR e teste de tiras. O tamanho médio de amostra (TMA) também foi estimado. Com exceção do nível de contaminação de 0,5%, todos os demais níveis podem ser detectados com um número de sementes menor que o exigido pelo tamanho de amostra fixo $n=400$. No nível de contaminação de 0,5%, não foi possível tomar nenhuma decisão quanto ao tamanho de amostra. A sensibilidade do teste para detecção do evento GM é fundamental para estimar o tamanho da amostra e, conseqüentemente, evitar os resultados falso-negativos e falso-positivos.

Palavras-chave: Amostragem sequencial. Transgênicos. Pureza genética.

ABSTRACT

The increasing demand for transgenic seeds and grains and in order to attend the rules for labeling genetically modified organisms (GMOs) and to the certification of genetic purity, has led to a demand for research to estimate the sample size analyzed for identification and quantification of transgenic events. In this way, sampling techniques, such as the sequential, should be studied in order to obtain a result with reliability and repeatability. In this study was estimated the sample size for identification and quantification of GMOs, by sequential sampling using PCR technique and strip tests. The sequential sampling was simulated in lots of corn seeds contaminated with 0.5, 1 and 4 percent of transgenic seeds, MON810. The hypotheses formulated were H_0 : the lot of corn seeds are within the acceptable standards of purity and H_1 : the lot of corn seeds are not within the acceptable standards of purity. The risks involved in making decisions for acceptance or rejection of a seed lot were α and β , which were fixed at 0.05. The sampling was done in increasing sequences of groups of seeds, simulated with the program SeedCalc8 and analyzed by PCR and strips tests. The average of sample size (TMA) was also estimated. The levels of contamination 1 and 4 percent could be detected with a smaller number of seeds required by the fixed-size sample, $n = 400$. In the level of 0.5 percent of contamination, it was not possible to make any decision regarding the sample size. The test sensitivity for the detection of GMOs is essential to estimate the sample size and thus avoid false negative results.

Keywords: Sequential sampling. Transgenic. Genetic purity.

1 INTRODUÇÃO

Com a liberação dos transgênicos no Brasil, ficou evidente a importância de avaliação da pureza genética de cultivares em sementes e grãos. Em 2009, o Brasil ocupou a segunda posição em relação à área com lavouras geneticamente modificadas (GM) no mundo. Nesse mesmo ano foram cultivados, no país, 5 milhões de hectares com milho geneticamente modificado, o que representou aumento de 400% em relação ao ano de 2008. Atualmente, onze eventos de milho transgênicos estão aprovados para a comercialização (COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA - CTNBio, 2010).

Muitas são as técnicas disponíveis para a detecção de organismos geneticamente modificados, ou OGMs, mas o tamanho da amostra a ser analisada tem sido um dos principais questionamentos, por se tratar de análises caras e devido ao grande número de amostras que devem ser analisadas.

Dessa forma, com o aumento da demanda por sementes transgênicas e para atender ao mercado externo, a legislação vigente de rotulagem, coexistência e certificação de pureza genética, há a necessidade da realização de pesquisas para estimar o tamanho da amostra a ser analisada para a identificação e a quantificação do evento transgênico.

Na avaliação da qualidade de sementes, o método convencional prevê uma amostra de tamanho fixo. Porém, recentemente, em face das técnicas disponíveis, do tempo gasto para amostrar e da quantidade de amostras a serem analisadas em laboratórios de rotina, vem se notando maior interesse em estudos relacionados à amostragem sequencial.

A amostragem sequencial caracteriza-se por utilizar amostras de tamanho variável. Uma vez formulada a hipótese de que o lote está dentro do padrão exigido pelo sistema de certificação e fiscalização, pode-se aceitá-la,

rejeitá-la ou continuar amostrando, baseando-se nos resultados acumulados de cada amostragem. A vantagem em relação à amostragem de tamanho fixo é que a amostragem sequencial caracteriza-se por envolver amostras de tamanho variável, o que pode levar a uma redução nos custos, porém, mantendo-se o controle dos erros que poderiam ser cometidos.

Santana et al. (1994) constataram a viabilidade de se utilizar a amostragem sequencial, com redução do tamanho de amostra, para determinar a qualidade fisiológica de sementes de milho. Lopes (2003), estudando o tamanho de amostra para avaliação da qualidade genética em lotes de sementes de milho, também constatou a possibilidade de redução do tamanho de amostra em relação ao tamanho de amostra fixa, para lotes de sementes com mistura varietal acima de 1%.

A importância da amostragem sequencial neste contexto está na possibilidade de redução do tamanho da amostra do teste, igualdade de riscos nas tomadas de decisão e confiança nos dados obtidos.

Diante disso, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de estimar o tamanho da amostra, por meio da amostragem sequencial, para a detecção de organismos geneticamente modificados, utilizando a técnica de PCR.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem sequencial

O trabalho foi conduzido no laboratório Central de Sementes da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG. A amostragem sequencial seguiu metodologia citada por Lopes (2003) e foi simulada em lotes de sementes com conhecidos percentuais de sementes transgênicas de milho MON810, com resistência a insetos. Optou-se por esse evento devido à menor expressão do evento em sementes, quando comparado com o evento Bt11, observada por meio do teste de tiras e PCR (NASCIMENTO et al., 2010). Dessa forma, o tamanho de amostra necessário para a detecção desse evento serve de padrão para os outros, com maior expressão.

Para a obtenção dos lotes, sementes de milho transgênicas DKB390Y foram misturadas às sementes convencionais (DKB390) nos níveis de 4% (lote 1), 1% (lote 2) e 0,5% (lote 3) em relação ao número de sementes. Em seguida, as sementes foram homogeneizadas em um divisor centrífugo Gamet.

Nesse estudo, optou-se pelo nível máximo de contaminação de 4%, pois este era padrão de pureza genética, até o ano de 1996, para sementes fiscalizadas de milho.

Foram formuladas as hipóteses H_0 : o lote de sementes híbridas está dentro dos padrões aceitáveis de pureza e H_1 : o lote de sementes não está dentro dos padrões aceitáveis. Os riscos envolvidos nas tomadas de decisão para rejeição ou aceitação do lote de sementes foram α e β . O primeiro se refere ao risco de o produtor rejeitar um lote de sementes que atende às exigências mínimas de pureza genética. Por outro lado, β se refere ao risco de o consumidor comprar um lote que não atende às exigências mínimas de pureza genética. Os valores de α e β foram fixados em 0,05.

Foram considerados os limites para os valores de pureza genética, representados por p_0 e p_1 , em que p_0 é o limite inferior e se refere à percentagem de pureza genética mínima tolerada para as sementes de milho e p_1 , limite superior e se refere à percentagem de pureza genética ideal para as sementes híbridas de milho. Os valores calculados para p_0 e p_1 variam com os níveis de contaminação nos lotes de sementes (Tabela 1).

Tabela 1 Valores de p_0 e p_1 para diferentes níveis de contaminação em lotes de sementes híbridas de milho. UFLA, Lavras, MG, 2010

| Níveis de contaminação (%) | p_0 | p_1 |
|----------------------------|-------|-------|
| 0,5 | 0,995 | 0,999 |
| 1 | 0,990 | 0,999 |
| 4 | 0,960 | 0,999 |

P_0 : percentagem de pureza genética mínima tolerada

P_1 : percentagem de pureza genética ideal

A amostragem foi realizada em sequência crescente de grupos de sementes simulados por meio do programa SeedCalc8 (REMUND et al, 2001; LAFFONT et al, 2005) e analisados até detecção, por meio da técnica de PCR e teste de tiras. SeedCalc é um software livre e pode ser obtido no site da International Seed Testing Association (ISTA) (<http://www.seedtest.org/en/content---1--1143.html>).

O tamanho médio de amostra (TMA) também foi estimado em função de p (probabilidade de aceitação de H_0), podendo ser feita a partir da expressão (WALD, 1947):

$$TMA(p) = \frac{P(p).(b-c) + c}{p - a}$$

em que

$$P(p) = \frac{\left(\frac{1-\beta}{\alpha}\right)^w - 1}{\left(\frac{1-\beta}{\alpha}\right)^w - \left(\frac{\beta}{1-\alpha}\right)^w}$$

é a probabilidade de aceitação de H_0 : $p = p_0$

$$a = \frac{\text{Ln } \frac{1 - p_0}{1 - p_1}}{\text{Ln } \frac{p_1 (1 - p_0)}{p_0 (1 - p_1)}} \qquad b = \frac{\text{Ln } \frac{\beta}{1 - \alpha}}{\text{Ln } \frac{p_1 (1 - p_0)}{p_0 (1 - p_1)}}$$

$$c = \frac{\text{Ln } \frac{1 - \beta}{\alpha}}{\text{Ln } \frac{p_1 (1 - p_0)}{p_0 (1 - p_1)}}$$

em que

n : tamanho de amostra

a , b e c : coeficientes das duas retas, aceitação, continuação ou rejeição

p_0 : limite aceitável

p_1 : limite ideal

Os valores de p e W estão associados pela expressão:

$$p = \frac{1 - \left(\frac{1 - p_1}{1 - p_0}\right)^W}{\left(\frac{p_1}{p_0}\right)^W - \left(\frac{1 - p_1}{1 - p_0}\right)^W}$$

2.2 PCR

Para a extração do DNA das sementes, foi utilizado o DNeasy Plant Mini Kit™ (Qiagen), conforme recomendação do fabricante. A quantificação do DNA foi avaliada pela medida da absorbância a 260 nm em espectrofotômetro (NanoVue-GE Healthcare) e em gel de agarose 0,8%.

As reações de PCR consistiram de 100 ng de DNA, 0,2 μM de *primer* (Tabela 2), 0,2 μM de dNTP, 50 mM MgCl₂ e 2,5 U da enzima Taq polimerase, em um volume total de 25 μL. As amplificações foram realizadas com uma etapa de desnaturação inicial de 95°C, por 5 minutos, seguida por 39 ciclos de 95°C, por 20 segundos; 58°C, por 30 segundos; 72°C, por 30 segundos e uma etapa final de 72°C, por 5 minutos.

A avaliação da sensibilidade foi feita visualmente em géis de agarose 3%.

Tabela 2 Relação dos *primers* utilizados no sistema PCR. UFLA, Lavras, MG, 2010

| <i>Primers</i> | Nome | Sequência | Pares de base |
|----------------|----------------------|---|---------------|
| MON810 milho | HS01-cry CR01 | AGT TTC CTT TTT GTT GCT CTC CT GAT GTT TGG GTT GTT GTC CAT | 197 |
| Zeína milho | Zel 1-5' Zel 1-3' | CCT CAG TCG CAC ATA TCT ACT ATA CT CTA GAA TGC AGC ACC AAC AAA | 508 |

2.3 Teste de tiras

Foram utilizadas sementes de cultivares comerciais de milho DKB 390 convencional e Yieldgard (MON810), como controle negativo e positivo. Utilizou-se o equivalente a 160 g de sementes, conforme recomendações do kit. Os materiais foram triturados, durante 30 segundos, em liquidificador e, posteriormente, adicionados 200 ml de tampão diluído para amostra. Para proceder ao teste, 0,5 ml do extrato triturado foram pipetados e colocados em um tubo de 1,5ml, na presença da tira, contendo os anticorpos. As leituras das tiras foram realizadas após 10 minutos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pode-se observar, pelos dados da Tabela 3, que, à exceção do lote 3, com 0,5% de contaminação com OGM, todos os demais níveis de contaminação podem ser detectados com um número menor do que o exigido pelo tamanho de amostra fixo $n=400$. O tamanho fixo de 400 sementes é recomendado nas Regras para a Análise de Sementes, para análise de outras cultivares (BRASIL, 2009). Ressalta-se que tanto pela técnica de PCR como pelo teste de tiras, não foi possível detectar contaminação de 0,5%, não permitindo tomar nenhuma decisão a respeito do tamanho de amostra.

Pela Figura 1, observa-se a detecção do evento MON810 em amostras de 74 sementes em lotes com 4% de contaminação e 300 sementes em lotes com 1% de contaminação. Para a avaliação do lote 3, com 0,5% de contaminação, foram amostradas 600 sementes. No entanto, o evento não foi detectado por meio da técnica de PCR. Esse resultado foi confirmado no teste de tiras, com a presença apenas da linha controle, ou seja, um teste falso-negativo para o transgênico (Figura 2). O número de 600 sementes foi determinado por meio do Programa SeedCalc, considerando 0,5% de contaminação e 95% de probabilidade de a amostra apresentar 0,5% ou menor valor de contaminação. Sendo assim, as empresas que optarem por níveis de contaminação inferiores a 1% devem utilizar métodos de detecção mais sensíveis, a exemplo da PCR em tempo real, que apresenta sensibilidade de 0,01% (WEIGHARDT et al., 2004).

Tabela 3 Número de sementes necessárias no plano de amostragem sequencial para a decisão de aceitar ou rejeitar o lote, em função da percentagem de contaminação determinado pela técnica de PCR. UFLA, Lavras, MG, 2010

| Lote | Nível de contaminação (%) | Número de sementes |
|------|---------------------------|--------------------|
| 1 | 4,00 | 74 |
| 2 | 1,00 | 300 |
| 3 | 0,50 | Não detectável* |

$\alpha=\beta=0,05$

Lopes (2003), trabalhando com amostragem sequencial para determinação de pureza genética em sementes de milho, observou que o número de sementes necessário seria 40, 280 e >400 sementes, para os níveis de 4%, 1% e 0,5%, respectivamente. Essa diferença nos resultados encontrados deve-se ao nível de expressão do gene nas sementes. Por isso, faz-se necessário avaliar a expressão do gene e a sensibilidade do teste para a detecção em sementes e grãos geneticamente modificados.

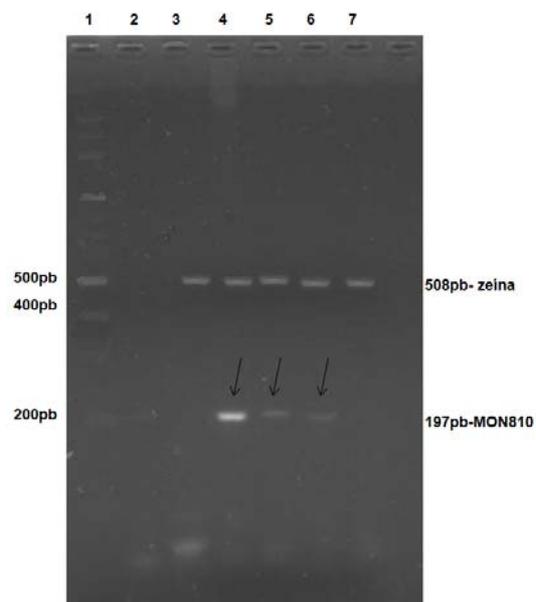


Figura 1 Resultado da PCR multiplex para a detecção do evento MON810. Linhas 1-7: padrão de DNA de 100 pb, controle negativo, amostra de milho convencional, MON810, 4%, 1% e 0,5% de MON810

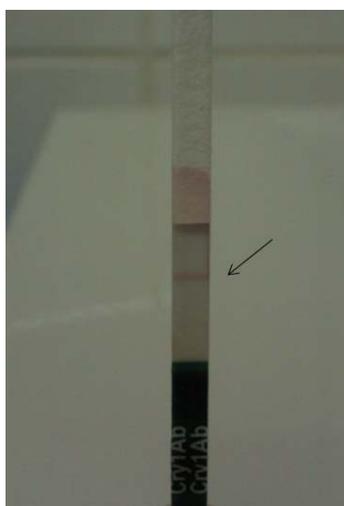


Figura 2 Resultado do teste de tiras negativo para a detecção do nível de contaminação de 0,5%.

Por meio de simulação, média teórica, foi observado que, para a detecção de um lote com 0,5% de contaminação, seria necessário analisar, em média, 654 sementes para que se possa tomar uma decisão de aceitação ou rejeição do lote de sementes, com um risco de 5% de erro para o produtor e consumidor (Tabela 4). Observa-se que quanto maior a exigência em relação aos padrões de pureza genética, maior é o número de sementes necessário na amostragem. Vale ressaltar, que apesar da exigência de se analisar um número de sementes superior ao exigido pela amostragem de tamanho fixo ($n = 400$), a amostragem sequencial garante, em um mesmo nível de segurança, proteção tanto para o consumidor quanto para o produtor, com relação à pureza genética.

Tabela 4 Tamanho médio de amostra (TMA (p)) para lotes de sementes de milho com diferentes porcentagens de contaminação. UFLA, Lavras, MG, 2010

| Contaminação (%) | P | P(p) | TMA (p) |
|------------------|--------|--------|---------|
| 0,5 | 0,9950 | 0,9500 | 654 |
| 1 | 0,9900 | 0,9500 | 188 |
| 4 | 0,9600 | 0,9500 | 24 |

p: percentagem de pureza mínima tolerada

P(p): probabilidade de aceita H_0

Já para os lotes com 1% e 4% de contaminação, por meio de simulação, é necessário analisar 188 e 24 sementes, respectivamente. Simulando pelo programa Seedcalc, uma amostra com 24 sementes nos permitiria afirmar que esse mesmo lote de sementes teria 88,27% de pureza ou, baseando-se no intervalo de confiança bilateral, que a verdadeira proporção de impureza neste lote avaliado estaria entre 0,99% e 37,99%, com um índice de confiança de 95%.

Quando amostradas 188 sementes pelo mesmo programa, foi detectada impureza de 1,58%, conforme Figura 3.

De acordo com Anklan e Neumann (2002), a sensibilidade do método utilizado para a detecção do transgênico vai estimar, em parte, o tamanho apropriado da amostra. Assim, uma ótima estratégia de amostragem é um balanço entre sensibilidade, custo e confiança.

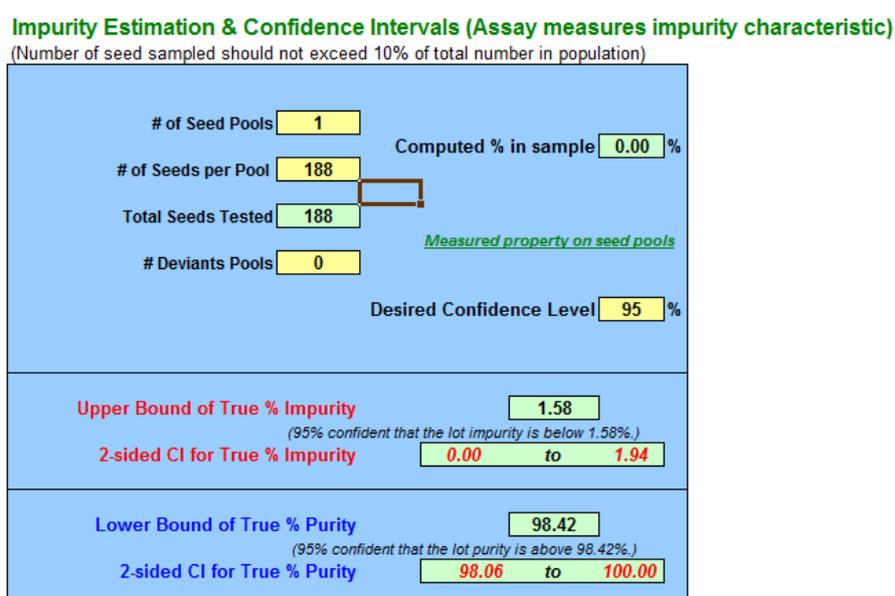


Figura 3 Planilha do programa Seedcal8, simulado para uma amostra de 188 sementes

Ressalta-se, no entanto, a eficiência da amostragem sequencial em reduzir o tamanho da amostra para estimar a pureza em lotes com mais de 1% de contaminação por OGMs, sem aumentar o risco de erro para o produtor e consumidor. Estes resultados corroboram os obtidos em outros trabalhos

envolvendo o uso da amostragem sequencial em sementes (ELLIS; WHITEHEAD, 1987; SANTANA, 1994; KATAOKA, 2007), nos quais foi constatada a vantagem da utilização da amostragem sequencial em relação à amostragem de tamanho fixo, quanto à redução do número de sementes utilizadas e redução do tempo gasto para se tomar uma decisão sobre a qualidade de um determinado lote sob avaliação.

Essa diminuição do número de sementes a serem analisadas é de suma importância quando se utilizam técnicas rápidas e precisas, como os testes de fluxo lateral (tiras) e PCR, visando rapidez e menor custo.

Nesse sentido, a amostragem sequencial é uma alternativa, tendo ainda como vantagem o aspecto de que a tomada de decisão a respeito do destino do lote não é unilateral, ou seja, o risco de o produtor rejeitar um lote de sementes que atende às exigências mínimas de pureza genética e o risco de o consumidor comprar um lote que não atende às exigências mínimas de pureza genética (α e β) são os mesmos.

O fato de não ter sido possível estimar o tamanho de amostras em lotes com valores iguais ou inferiores a 0,5% de contaminação é uma limitação quando padrões adotados para a comercialização de sementes e grãos são inferiores a 0,5%. Embora ainda não existam padrões oficiais de pureza definidos pelo governo, os mesmos são adotados no controle de qualidade interno das empresas.

4 CONCLUSÃO

Para a detecção do evento MON810 em lotes com 4% e 1% de contaminação, o tamanho da amostra é de 74 e 300 sementes.

Não é possível estimar o tamanho de amostra em lotes com 0,5% de contaminação com o evento MON810 utilizando a técnica de PCR.

O tamanho da amostra para a detecção do evento geneticamente modificado é influenciado pela sensibilidade do teste utilizado.

A amostragem sequencial possibilita a redução do tamanho de amostra em relação ao tamanho de amostra fixa, para lotes de sementes com contaminação acima de 1% de OGM.

REFERÊNCIAS

ANKLAM, E.; NEUMANN, D. A. Method development in relation to regulatory requirements for detection of GMOs in the food chain. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 85, p. 754-756, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura e reforma Agrária. **Regras para análises de sementes**. Brasília, DF: SNDA, DNDV, CLAV, 2009.

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA. **Informações sobre liberações comerciais**. Desenvolvido pela CTNBio. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/1.html> > Acesso em: 30 out. 2010.

ELLIS, R. H.; WHITEHEAD, J. Open, truncated and triangular sequential seed testing procedures. **Seed Science & Technology**, New Delhi, v. 15, n. 1, p. 1-17, 1987.

KATAOKA, V. Y. et al. Uso da amostragem sequencial na avaliação da morfologia interna de sementes de mamona (*Ricinus communis*) pela análise de imagem. In: ENCONTRO MINEIRO DE ESTATÍSTICA, 7., 2007, Lavras. **Programa e resumos**. Lavras: [s.n.], 2007.

LAFFONT, J. et al. Testing for adventitious presence of transgenic material in conventional seed or grain lots using quantitative laboratory methods: statistical procedures and their implementation. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 15, p. 197-204, 2005.

LOPES, M. M. **Amostragem sequencial e marcadores microssatélites na avaliação da qualidade genética em lotes de sementes de milho**. 2003. 47 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

NASCIMENTO, V. E. et al. Especificidade e sensibilidade da técnica de PCR para detecção de milho geneticamente modificado. In: CONGRESSO

NACIONAL DE MILHO E SORGO, 28., 2010, Goiânia. **Resumos**. [S.l.: s.n.], 2010.

REMUND, K. et al. Statistical considerations in seed purity testing for transgenic traits. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 11, p. 101-119, 2001.

SANTANA, D. G. de **Adaptação do teste do pH do exsudado e viabilidade do uso da amostragem sequencial na rápida definição sobre o destino de lotes de sementes de milho**. 1996. 79p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

WALD, A. **Sequential analysis**. New York: J. Wiley, 1947.

WEIGHARDT, F. et al. Real-time polymerase chain reaction-based approach for quantification of the pat gene in the T25 Zea mays event. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 87, p. 1.342-1.355, 2004.

CAPÍTULO 3
FLUXO GÊNICO DE MILHO GENETICAMENTE MODIFICADO COM
RESISTÊNCIA A INSETOS

RESUMO

Apesar dos benefícios evidentes dos cultivares geneticamente modificados, a preocupação com o escape dos transgenes ou fluxo gênico tornou-se um dos principais temas de debate das comunidades científicas, entre produtores e pela população. Assim, com o avanço das áreas com milho transgênico no Brasil, aumenta a demanda por pesquisas para estimar o fluxo gênico nessa espécie. Diante disso, este trabalho foi realizado com o objetivo de estimar o fluxo gênico em campos de produção de milho transgênico com resistência a insetos, por meio da técnica de PCR em tempo real. Para a avaliação do fluxo gênico, amostras de grãos foram coletadas em lavouras contendo milho convencional e transgênico, nos municípios de Itumirim, Uberlândia, Paracatu e Tupaciguara, em MG; Itapetininga e Pedrinhas, em SP, e Assaí e Ponta Grossa, no PR. As análises do fluxo gênico foram realizadas no Laboratório Central de Sementes da Universidade Federal de Lavras, por meio da técnica de PCR em tempo real. As amostras de sementes foram coletadas a partir de 5 metros de distância da fonte com o milho transgênico, a cada 10 metros nos primeiros 50 metros e equidistantes de 50 metros a partir de 50 metros. Foram coletadas 10 espigas de plantas individuais por ponto em quatro repetições, totalizando 40 espigas para cada distância amostrada. Após as coletas, as sementes foram debulhadas e armazenadas em câmara fria. Para extração do DNA, foi utilizado o reagente PrepMan®. Como material de referência para determinação do percentual de OGMs nas amostras, foram utilizados os padrões de referência certificados com níveis de 0,1%, 0,5%, 1,0%, 2,0% e 5,0% (p/p) de milho Bt11 e MON810. As reações de PCR quantitativo foram efetuadas no equipamento ABI PRISM® 7500 *Sequence Detection System*. As amostras foram amplificadas utilizando-se *TaqMan GMO Maize 35S Detection Kit* para os alvos CaMV 35S (promotor) e zeína (referência endógena). Todas as amostras foram processadas em triplicatas. Observou-se que, em média, 82% da fecundação cruzada ocorreram nos primeiros 30 metros. Em Itapetininga, SP, foram observadas as maiores taxas de fecundação cruzada, acima de 10% até a distância de 50 metros, porém, inferiores a 1% na distância 100 metros. A ocorrência do fluxo gênico foi altamente influenciada pela topografia e coincidência de florescimento entre os genótipos envolvidos.

Palavras-chave: Transgênicos. Fecundação cruzada. PCR em tempo real.

ABSTRACT

Despite the benefits of genetically modified crops, the concern over gene flow has become a major topic of discussion in scientific communities, producers and the population. Therefore, with the increasing presence of transgenic maize in cultivation areas of Brazil has led to an increase in demand for research to estimate gene flow. In this study was estimated the gene flow of insect-resistant transgenic maize in fields of grain production, by real time PCR. For the assessment of gene flow, grain samples were collected in fields containing conventional and transgenic maize in the municipalities of Itumirim-MG, Uberlândia-MG, Paracatu-MG, Tupaciguara-MG, Itapetininga-SP, Pedrinhas-SP, Assaí-PR e Ponta-Grossa-PR. The analysis for the estimation of gene flow was performed at the Central Laboratory of Seeds of the Federal University of Lavras. The seed samples were collected five meters away from the GM maize source, each ten meters in the first 50 meters and equidistant from 50 meters. It was collected ten corn cobs from individual plants in four replicates, totaling 40 corn cobs at each distance. After harvesting, the seeds were dried and stored in cold chamber. The reagent PrepMan® was used for DNA extraction. Certified reference materials with levels of 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 and 5.0 percent (w / w) of maize Bt11 and MON810, were used for the quantification of GMO on the samples. The quantitative PCR reactions were performed on the ABI PRISM® Sequence Detection System (Applied Biosystems). The samples were amplified using the TaqMan GMO Maize 35S Detection Kit for the targets CaMV 35S (promoter) and zein (endogenous reference). The samples were processed in triplicate. Results show that, on average, 82 percent of cross-fertilization occurred within a distance of 30 meters. The highest rates of outcrossing occurred at our research area in Itapetininga-SP, with rates above 10 percent up to a distance of 50 meters. On the other hand, levels below 1 percent of GMOs were observed at distances within 100 meters. The gene flow was influenced by topography and coincidence of flowering among the genotypes involved.

Keywords: Transgenic. Outcrossing. Real-time PCR.

1 INTRODUÇÃO

De todas as novas tecnologias empregadas na produção agrícola, nenhuma tem despertado tanto interesse como o cultivo de plantas geneticamente modificadas (OGM). Mesmo diante de acirradas controvérsias, os cultivos transgênicos expandiram-se por todo o mundo, tornando-se a tecnologia mais rapidamente adotada que se conhece na história da agricultura, sendo apontada como crucial para romper a barreira da produtividade e oferecer solução para as limitações impostas por estresses bióticos e abióticos (MANN, 1999).

Apesar dos benefícios evidentes das cultivares geneticamente modificadas, a preocupação com o fluxo gênico tornou-se um dos principais temas de debate entre as comunidades científicas, assim como entre a população. O fluxo gênico é um fenômeno comum a todas as espécies de plantas e contribui para o surgimento de novas combinações gênicas, gerando variabilidade nas populações e até originando espécies importantes de plantas cultivadas. Mas, a sua maior notoriedade, sem dúvida alguma, deve-se aos transgênicos.

O fluxo gênico pode ocorrer devido ao pólen, às sementes ou às plantas voluntárias, proveniente de cultivos anteriores. Todas essas três fontes podem ser importantes agentes de fluxo gênico, mas a contaminação com o pólen tem demandado o uso de estratégias para evitar a sua ocorrência.

Em espécies alógamas, como o milho, cuja frequência de autofecundação é, em média, inferior a 5%, o fluxo gênico tem sido amplamente estudado. É uma planta monóica, com polinização predominantemente realizada pelo vento, apresenta protandria e, assim, dificilmente, o pólen produzido pelo pendão fertiliza os óvulos da mesma planta.

Em 2009, o Brasil ocupou a segunda posição em área com cultivo de organismos geneticamente modificados no mundo, ou seja, um aumento de 35%

em relação ao ano de 2008. Dos 21,4 milhões de hectares, 5 milhões foram cultivados com milho Bt, nas safras de verão e safrinha (JAMES, 2009).

Assim, com o avanço das áreas com milho transgênico no Brasil, aumenta a demanda por pesquisas para estimar o fluxo gênico nessa espécie, visando à manutenção da pureza genética em cultivares durante os processos de produção de grãos e sementes. Diversos estudos sobre polinização e fluxo gênico em milho já foram realizados, porém, até o momento, poucos estudos foram realizados com milho transgênico para as condições brasileiras.

No Brasil, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), no uso de suas atribuições, determinou que, para as liberações comerciais, conforme Resolução Normativa nº 4 de 16 de agosto de 2007, a distância entre lavouras GM e convencionais vizinhas deve ser igual ou superior a 100 metros ou, alternativamente, 20 metros, desde que acrescida de bordadura com, no mínimo, dez fileiras de plantas de milho convencional de porte e ciclo vegetativo similar ao milho transgênico.

Apesar do estabelecimento do isolamento das lavouras de milho convencional das transgênicas pela CTNBio, há discussões a respeito do fato de que o exigido hoje não seja suficiente para assegurar a coexistência entre plantios convencionais e transgênicos, em função da ocorrência de fluxo gênico. Diante disso, este trabalho foi realizado com o objetivo de estimar o fluxo gênico de milho transgênico, com resistência a insetos, por meio da técnica de PCR em tempo real.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local e material

O experimento foi conduzido em campos de produção de grãos nos municípios de Itumirim, Uberlândia, Paracatu e Tupaciguara, em MG; Itaptinga e Pedrinhas, SP; Assaí e Ponta Grossa, PR e no Laboratório Central de Sementes da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG, devidamente habilitado, conforme os requisitos da NBR ISO/IEC 17025:2005 e credenciado no MAPA para a execução de tais análises.

Para estimar o fluxo gênico em Itumirim, nas safras verão 2008 e verão 2009, o experimento foi instalado conforme Figura 1. Em um quadrado central, de aproximadamente 1.000 m², foram cultivadas aproximadamente 6.500 plantas transgênicas, do híbrido DKB390 YieldGard®, espaçadas de 0,8 metros entre linhas e, externa a este, a versão convencional, DKB390. O sincronismo de florescimento das cultivares transgênicas e convencionais foi avaliado no estádio R1, em quatro repetições de 100 plantas.

Nas demais áreas, os campos foram instalados conforme mostrado na Figura 2. Nestas áreas, o fluxo gênico foi avaliado visando o monitoramento pós-liberação comercial do evento Bt11, exigido pela CTNBio, para a empresa Syngenta Seeds. Na Tabela 1 encontram-se as cultivares utilizadas nas diferentes localidades.

Vale ressaltar que foram utilizados campos comerciais de produtores com o objetivo de avaliar a situação real dessas áreas, conforme requerimento de monitoramento incluindo o fluxo gênico. O monitoramento visa atender a Resolução Normativa 5, de 12 de março de 2008, da CTNBio.

Tabela 1 Relação das cultivares de milho utilizadas nas diferentes localidades

| Local | Convencional | Transgênico |
|--------------|---------------------|--------------------|
| Itumirim | DKB390 | DKB390Y |
| Uberlândia | IMPACTO | MAXIMUS TL |
| Paracatu | DKB390 | MAXIMUS TL |
| Tupaciguara | AG7088 | MAXIMUS TL |
| Itapetininga | MAXIMUS | MAXIMUS TL |
| Assaí | FORMULA | MAXIMUS TL |
| Ponta Grossa | IMPACTO | MAXIMUS TL |
| Pedrinhas | IMPACTO | TORK TL |

As amostras de sementes foram coletadas a partir de 5 metros de distância da fonte transgênica, a cada 10 metros nos primeiros 50 metros e equidistantes de 50 metros a partir de 50 metros, conforme ilustrado nas Figuras 1 e 2. A distância máxima avaliada variou entre locais, em função da área disponível para amostragem em cada campo analisado.

Foram coletadas 10 espigas de plantas individuais por ponto com quatro repetições espaçadas de 5 metros, totalizando 40 espigas para cada distância amostrada. Após as coletas, as espigas foram transportadas para o Laboratório Central de Sementes da UFLA, onde foram submetidas à secagem a 35°C, até os grãos atingirem o teor de água de 14%. Os grãos foram debulhados manualmente, acondicionadas em sacos de papel e armazenadas em câmara fria regulada a 10±2°C e 75% UR±5, até as análises.

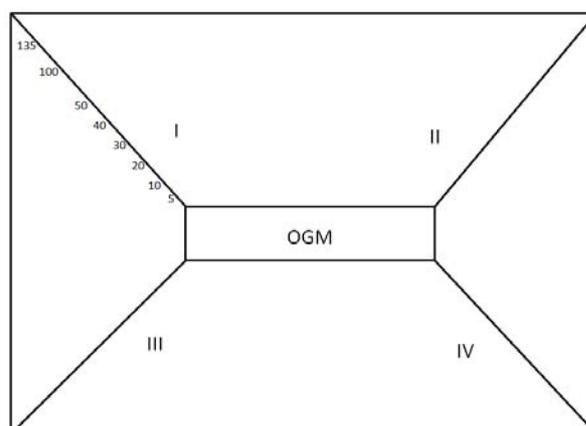


Figura 1 Croqui do experimento de identificação de fluxo gênico entre milho transgênico MON810 e convencional, no município de Itumirim, MG.

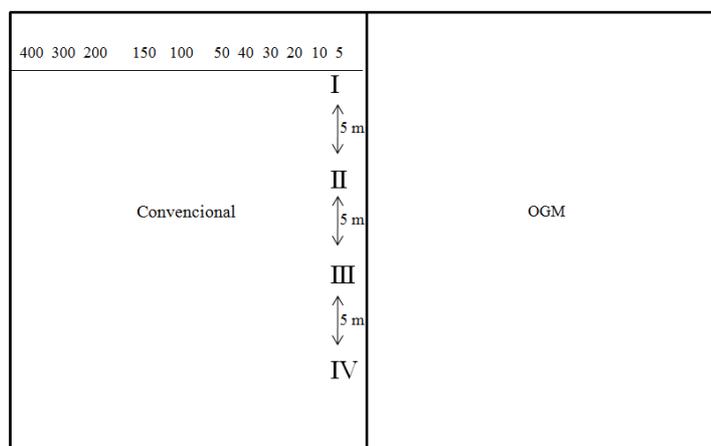


Figura 2 Croqui de identificação de fluxo gênico entre milho transgênico e convencional, nas áreas comerciais de monitoramento do Bt11.

2.2 Extração de DNA

Após a homogeneização dos grãos, foi retirada uma amostra aleatória de aproximadamente 300 sementes. Esse tamanho de amostra foi definido com base em um estudo previamente realizado, no qual foi observado que, para a detecção de 1% de contaminação proveniente de milho geneticamente modificado, pelo teste de tiras e PCR convencional, é necessário um tamanho de amostra de 300 sementes. Como as análises deste estudo foram realizadas pela técnica de PCR em tempo real, que apresenta sensibilidade de 0,01%, optou-se pelo mesmo tamanho de amostra utilizado nos testes anteriores.

As sementes foram trituradas em liquidificador até obtenção de um pó fino e, em seguida, procedeu-se à extração do DNA das amostras a serem analisadas e de amostras as quais foram utilizadas como material de referência utilizando o reagente PrepMan®, conforme recomendações do fabricante.

Como material de referência para a determinação do percentual de OGMs nas amostras, foram utilizados os padrões de referência certificados (CRM), ERM – BF412 e BF13a, produzidos pelo *Institute for Reference Materials and Measurement* (IRMM). Foram utilizadas amostras com 0,1%, 0,5%, 1,0%, 2,0% e 5,0% (p/p) de milho Bt11 e MON810.

Ressalta-se que a utilização de materiais de referência padrão com concentrações de OGM conhecidas é essencial para a validação dos resultados e cada OGM avaliado requer um material de referência específico.

2.3 Quantificação de OGMs por meio da técnica de PCR em tempo real (RTq-PCR)

As reações de RTq-PCR quantitativo foram efetuadas no equipamento ABI PRISM® 7500 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems). As amostras foram amplificadas utilizando-se *TaqMan GMO Maize 35S Detection*

Kit para os alvos CaMV 35S (promotor) e zeína (referência endógena). As condições de termociclagem foram: 9 minutos a 95°C e 40 ciclos de 20 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C e 30 segundos a 72°C, em um volume final de 25 µL. Todas as amostras foram processadas em triplicata. O sistema TaqMan utilizado nesta pesquisa para a quantificação de eventos específicos pela técnica de PCR em tempo real é considerado altamente preciso e reprodutível.

Os dados foram processados por meio do software v.2.0.1, do sistema 7500 de PCR em tempo real (Applied Biosystems), utilizado a quantificação absoluta pelo método do ΔCt (*Threshold cycle*). Em seguida, os resultados foram exportados para *GMO Analysis Macro v1.7.2*, desenvolvido pela *Applied Biosystems*, para o cálculo das porcentagens de OGMs nas amostras analisadas. Foram considerados: Ct (aumento exponencial do produto de PCR) do gene 35S e controle endógeno (zeína), $\Delta Ct = Ct$ (amostra) – Ct (controle endógeno).

O cálculo da eficiência da PCR em tempo real foi realizado de acordo com a seguinte estimador:

$$\text{Eficiência} = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$$

em que slope é o 'a' da equação $y = ax + b$

Segundo os critérios de aceitação do European Network of GMO Laboratories - ENGL (2008) o slope deve estar entre: $-3,1 \geq a \geq -3,6$, ou seja, eficiência entre $90\% \geq ef \geq 110\%$ e $R^2 \geq 0,98$.

A análise dos dados de porcentagem OGM detectado foi realizada utilizando o software Sigma Plot® versão 10.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Safra 2008/2009

No município de Itumirim, a maior taxa de fecundação cruzada proveniente do milho transgênico MON810, 13,32%, ocorreu na distância de 5 metros na direção III. Pode-se observar que nas direções I e II praticamente não ocorreu fecundação cruzada, o que pode ser explicado pela declividade da área na qual o experimento foi instalado. Contaminação superior a 1% ocorreu somente até a distância de 20 metros da fonte de pólen. A partir de 100 metros da fonte de pólen das plantas transgênicas não foi observada contaminação genética (Tabela 2).

Tabela 2 Estimativa de porcentagem média de fecundação cruzada detectada nas diferentes distâncias e direções amostradas no município de Itumirim-MG, safra 2008/09

| Distância | | % OGM | Desvio padrão* |
|-----------|-----|-------|----------------|
| 5 | I | 0,00 | 0,00 |
| | II | 0,12 | 0,50 |
| | III | 13,32 | 0,19 |
| | IV | 0,06 | 0,01 |
| 10 | I | 0,01 | 0,14 |
| | II | 0,01 | 0,05 |
| | III | 3,06 | 0,04 |
| | IV | 0,00 | 0,00 |
| 20 | I | 0,06 | 0,13 |
| | II | 0,00 | 0,05 |
| | III | 2,76 | 0,32 |
| | IV | 0,03 | 0,30 |
| 30 | I | 0,00 | 0,00 |
| | II | 0,00 | 0,00 |
| | III | 0,15 | 0,05 |
| | IV | 0,03 | 0,05 |
| 40 | I | 0,00 | 0,00 |
| | II | 0,06 | 0,12 |
| | III | 0,00 | 0,00 |
| | IV | 0,24 | 0,20 |
| 50 | I | 0,00 | 0,00 |
| | II | 0,00 | 0,00 |
| | III | 0,04 | 0,08 |
| | IV | 0,00 | 0,00 |
| 100 | I | 0,00 | 0,00 |
| | II | 0,00 | 0,00 |
| | III | 0,00 | 0,00 |
| | IV | 0,00 | 0,00 |
| 135 | I | 0,00 | 0,00 |
| | II | 0,00 | 0,00 |
| | III | 0,00 | 0,00 |
| | IV | 0,00 | 0,00 |

$R^2=0.98867$

Eficiência reação =

102%

*Desvio padrão aceitável $\leq 0,5$

O valor de fecundação cruzada observado aos cinco metros foi estatisticamente superior ao observado nas demais distâncias e não houve diferença estatística nos valores observados entre as distâncias de 10 e 20 metros e 40, 50 e 100 metros (Figura 3).

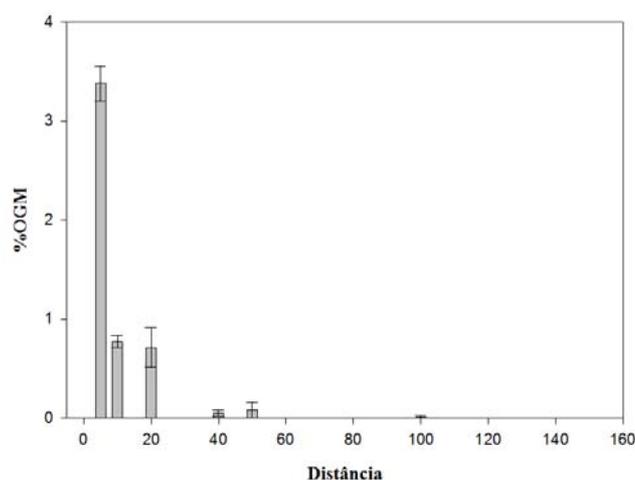


Figura 3 Porcentagem média de fecundação cruzada detectada nas diferentes distâncias, no município de Itumirim, MG, safra 2008/2009

Em Tupaciguara, MG, a porcentagem de fecundação cruzada nos 5 metros da fonte de pólen de plantas transgênicas foi 0,30 (Figura 4). Deve ser ressaltado que essa área também apresentava declividade, tendo a cultivar Maximus TL sido cultivada em área inferior em relação ao híbrido convencional, AG 7088. Observa-se que, a 50 metros de distância, ocorreu fecundação cruzada de 0,20% e uma pequena porcentagem (0,04%) foi verificada aos 400 metros. Não houve diferença significativa entre os valores de fecundação cruzada observados nas distâncias avaliadas.

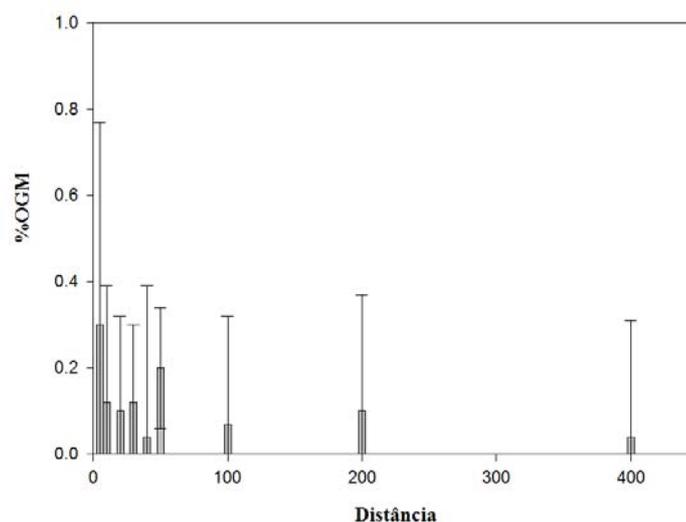


Figura 4 Porcentagem média de fecundação cruzada detectada nas diferentes distâncias no município de Tupaciguara, MG, safra 2008/2009

De acordo com Luna (2001), Borém e Ramalho (2002), declividade, direção do vento e sincronismo de florescimento entre os genótipos envolvidos podem influenciar a incidência de fecundação cruzada. Dessa forma, todos esses fatores devem ser levados em consideração quando da avaliação do fluxo gênico em milho.

Em Itapetininga, SP, em todas as distâncias amostradas até 50 metros, a fecundação cruzada foi superior a 10% (Figura 5). Na distância de 100 metros, observou-se contaminação inferior a 1% (0,5%). O valor de fecundação cruzada observada aos cinco metros foi estatisticamente superior aos observados nas demais distâncias. Entre as distâncias de 20, 30 e 40 metros não ocorreu diferença estatística nos valores de fecundação cruzada, assim como entre as distâncias 50 e 60 metros.

Esse alto nível de fecundação cruzada pode ter ocorrido por diversos fatores, como direção do vento, topografia plana e a utilização de isolinhas, já que, nesse campo, os híbridos utilizados foram Maximus e Maximus TL, garantindo o sincronismo de florescimento entre os materiais avaliados.

Ressalta-se que, pela legislação vigente, visando à coexistência entre os sistemas de cultivos, a distância entre as lavouras convencional e transgênica deve ser igual ou superior a 100 metros ou, alternativamente, 20 metros, desde que acrescida de bordadura com, no mínimo, dez fileiras de plantas de milho convencional de porte e ciclo vegetativo similar ao milho transgênico. Sendo assim, por meio dos resultados obtidos nesta área, questiona-se se os 20 metros com as 10 fileiras de bordadura seriam suficientes para evitar contaminações superiores a 1%, uma vez que a fecundação cruzada foi de 38,3%.

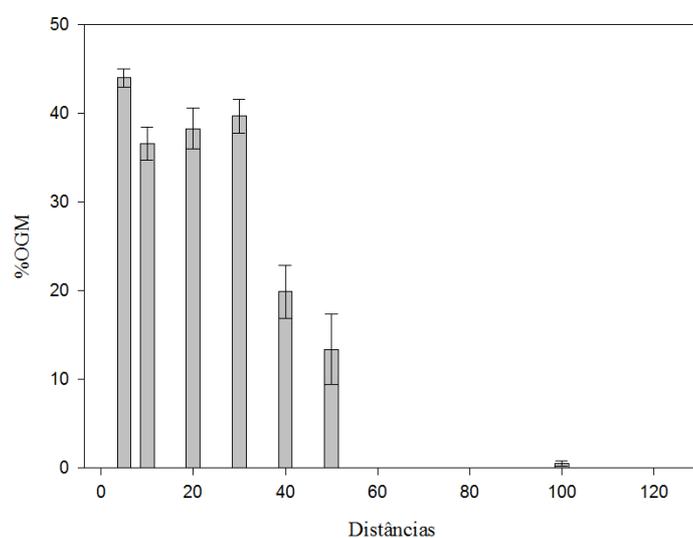


Figura 5 Porcentagem média de fecundação cruzada detectada nas diferentes distâncias, no município de Itapetininga, MG, safra 2008/2009

3.2 Safrinha 2009

Na localidade de Pedrinhas, SP, pode-se observar que a fecundação cruzada foi inferior a 1%, em todas as distâncias avaliadas, não diferindo estatisticamente nestas (Figura 6). Deve-se levar em consideração que, nessa área, as plantas de milho transgênicas floresceram sete dias antes do milho convencional, o que pode explicar o baixo nível de fecundação cruzada. É importante ressaltar também que um pendão de milho pode liberar pólen por mais de uma semana, podendo ocorrer polinização efetiva entre 2 e 14 dias. No entanto, as condições climáticas influenciam a viabilidade de grãos de pólen. O pólen pode permanecer viável por até 24 horas, entretanto, sua viabilidade pode ser reduzida em poucas horas, quando submetido à baixa umidade e a altas temperaturas (MAGALHÃES; DURÃES; PAIVA, 1995). Em Pedrinhas, SP, o clima ameno é úmido, com variação de temperatura entre 9,2°C e 26,1°C.

Alvim (2008), estudando a viabilidade e conservação de grãos de pólen, observou que o poder germinativo do grão pólen varia com a umidade relativa do ar, com a temperatura e reduz com a dessecação e com o armazenamento.

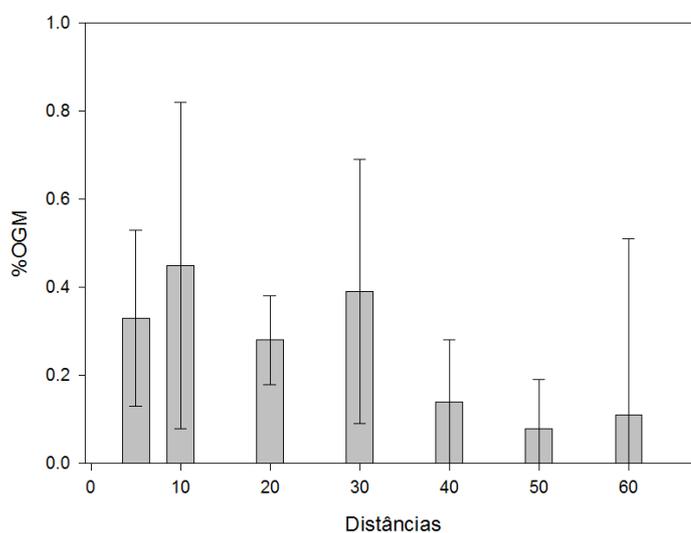


Figura 6 Porcentagem média de fecundação cruzada detectada nas diferentes distâncias, no município de Pedrinhas, SP, safrinha 2009

Em Assaí, contaminação superior a 1% ocorreu somente até a distância de 5 metros (Figura 7). Esta área também apresentava declividade e o milho transgênico se encontrava abaixo do milho convencional, o que pode ter contribuído com o baixo percentual de fecundação cruzada.

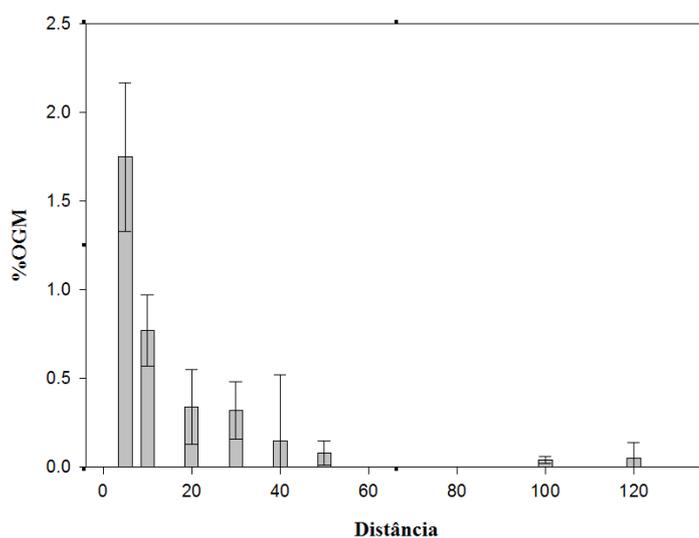


Figura 7 Porcentagem média de fecundação cruzada detectada nas diferentes distâncias, no município Assaí, PR, safrinha 2009

Em Paracatu, MG, constatou-se que contaminação superior a 2% ocorreu até a distância de 10 metros (Figura 8). Em Assaí e Paracatu, nas distâncias de 5 e 10 metros, houve diferença significativa nos valores de fecundação cruzada e estes valores observados nas demais distâncias não difeririam estatisticamente entre si. Nesse campo, foi possível coletar amostras até a distância de 150 metros. Observa-se que a contaminação na distância de 100 e 150 metros da fonte de pólen de plantas transgênicas foi de 0,10 e 0,05.

De forma geral, os resultados do monitoramento comercial do Bt11 no primeiro ano de avaliação foram semelhantes, com exceção das áreas de Itapetininga, SP e Tupaciguara, MG.

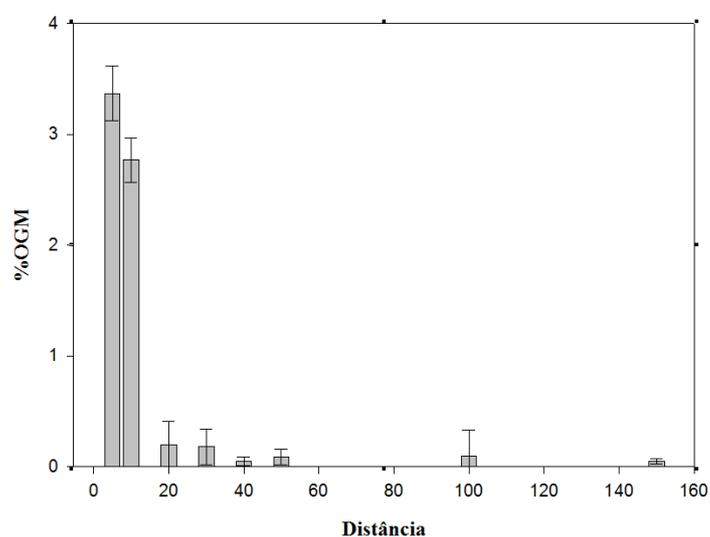


Figura 8 Porcentagem média de fecundação cruzada detectada nas diferentes distâncias, no município Paracatu, MG, safrinha 2009

Ressalta-se que somente nos município de Itapetininga, SP e Itumirim, MG foram cultivadas a cultivar transgênica e sua versão convencional, sendo este um importante fator para a coincidência do florescimento e a ocorrência do fluxo gênico.

3.3 Safra 2009/2010

Na safra verão de 2009 foi instalado, no município de Itumirim, MG, o experimento de avaliação de fluxo gênico, no mesmo local e nas mesmas condições da safra anterior. Observa-se que, novamente, a topografia do local influenciou a incidência de fecundação cruzada, nas diferentes direções avaliadas. Contaminações superiores a 1% ocorreram somente até a distância de 20 metros e contaminação de 0,5% foi observada na distância de 30 metros

(Tabela 3). Entre 5 e 10 metros não houve diferença estatística nos valores de fecundação cruzada. No entanto, o valor observado aos cinco metros foi estatisticamente superior aos observados nas distâncias acima de 20 metros da área com transgênico. Houve diferença significativa também nos valores de fecundação cruzada observados entre 30 e 50 metros (Figura 9).

Tabela 3 Estimativa de porcentagem média de fecundação cruzada detectada, nas diferentes distâncias e direções amostradas, no município de Itumirim, MG, safra 2009/10

| Distância | | % OGM | Desvio padrão* |
|-----------|-----|-------|----------------|
| 5 | I | 1,94 | 0,12 |
| | II | 0,00 | 0,00 |
| | III | 0,96 | 0,05 |
| | IV | 0,20 | 0,47 |
| 10 | I | 0,02 | 0,44 |
| | II | 0,00 | 0,00 |
| | III | 2,63 | 0,11 |
| | IV | 0,00 | 0,00 |
| 20 | I | 0,03 | 0,11 |
| | II | 0,00 | 0,00 |
| | III | 1,67 | 0,43 |
| | IV | 0,00 | 0,00 |
| 30 | I | 0,00 | 0,00 |
| | II | 0,00 | 0,00 |
| | III | 0,50 | 0,08 |
| | IV | 0,00 | 0,00 |
| 40 | I | 0,00 | 0,00 |
| | II | 0,00 | 0,00 |
| | III | 0,00 | 0,00 |
| | IV | 0,00 | 0,00 |
| 50 | I | 0,00 | 0,00 |
| | II | 0,00 | 0,00 |
| | III | 0,04 | 0,08 |
| | IV | 0,00 | 0,00 |

TABELA 3 , continua.

| Distância | | % OGM | Desvio padrão* |
|-----------|-----|-------|----------------|
| 100 | I | 0,00 | 0,00 |
| | II | 0,00 | 0,00 |
| | III | 0,00 | 0,00 |
| | IV | 0,00 | 0,00 |
| 135 | I | 0,00 | 0,00 |
| | II | 0,00 | 0,00 |
| | III | 0,00 | 0,00 |
| | IV | 0,00 | 0,00 |

$R^2=0.9922$

Eficiência reação = 99%

*Desvio padrão aceitável $\leq 0,5$

Segundo Aragão (2004), a taxa de fecundação cruzada pode ser afetada por vários fatores e, entre eles, a densidade e o tamanho da população doadora de pólen. Dessa maneira, observa-se que em Itumirim, MG, onde a área cultivada com transgênicos foi apenas um quadrado central com 1.000 m², ocorreram menores taxas de fecundação cruzada nas distâncias maiores, em comparação com as áreas comerciais de monitoramento.

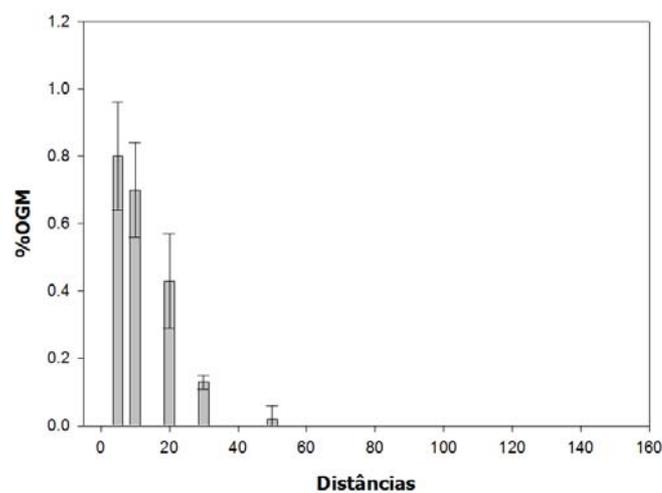


Figura 9 Porcentagem média de fecundação cruzada detectada nas diferentes distâncias, no município Itumirim, MG, safra 2009/2010

Os resultados obtidos nas safras 2008 e 2009, na área de Itumirim, MG, são apresentados na Figura 10. Embora o resultado encontrado na distância de 5 metros na safra de 2008 seja bem superior, de maneira geral, observaram-se resultados semelhantes em ambas as safras, nas demais distâncias. Observa-se também que o fluxo gênico ocorreu, predominantemente, até cerca de 50 metros da fonte.

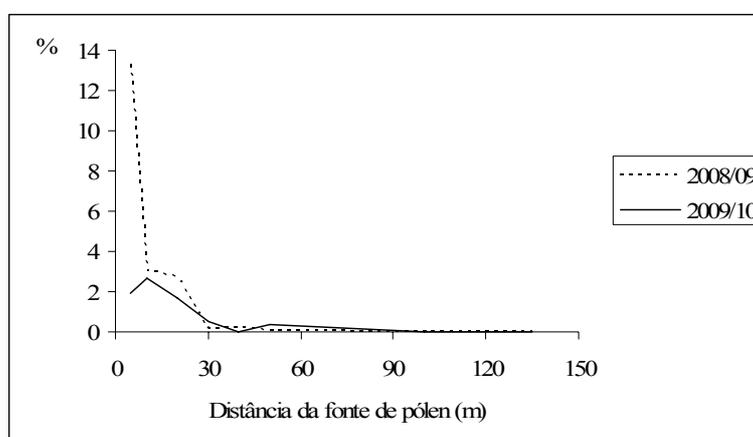


Figura 10 Estimativa da porcentagem de OGM detectado em diferentes distâncias, no município de Itumirim, MG, nas safras 2008/09 e 2009/10

Em Uberlândia, MG, a área avaliada com milho convencional correspondeu a uma faixa de refúgio, com cultivo de transgênico nas duas direções. Dessa forma, foram observadas contaminações superiores a 1% até a distância de 50 metros da fonte transgênica (Figura 11). Houve diferença estatística nos valores de fecundação cruzada entre todas as distâncias avaliadas. Como relatado em outros trabalhos, foram verificadas contaminações maiores nas distâncias de 50 metros, quando comparadas com distâncias menores como 20 e 30 metros. Isso pode ocorrer também devido a efeitos ambientais, amostragem e movimento do ar sobre a área de cultivo (BANNERT, 2006) e, nesse caso, também à maior pressão de pólen transgênico vindo das duas direções. Luna et al. (2001) também observaram, no México, maior fecundação cruzada nos 200 metros que nos 100 metros da fonte de pólen.

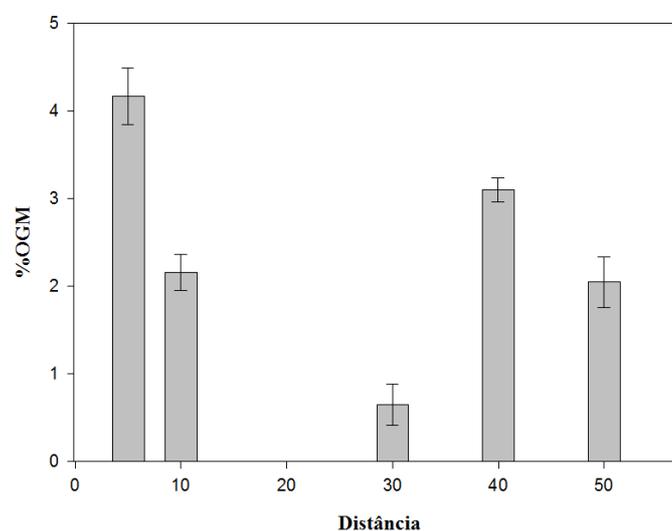


Figura 11 Porcentagem média de fecundação cruzada detectada nas diferentes distâncias, no município Uberlândia, MG, safra 2009/10.

Observou-se que, na segunda safra, 2009/10, após a liberação dos eventos de milho transgênico no Brasil, houve redução na área cultivada com milho convencional, o que dificultou a avaliação nas distâncias superiores a 100 metros de distância da fonte com milho transgênico. Do mesmo modo como ocorreu em Uberlândia, MG, em Ponta Grossa, PR, foi utilizada a área de refúgio para coleta das amostras. Assim, nesses locais, ocorreram maiores taxas de fecundação cruzada, uma vez que há fonte de contaminação em ambos os lados e também maior pressão de pólen dos transgênicos.

Em Ponta Grossa, ocorreu contaminação superior a 1% somente até a distância de 5 metros e 0,29% de contaminação foi observada na distância de 100 metros (Figura 12). Houve diferença estatística significativa somente nos valores de fecundação cruzada aos cinco metros de distância.

Os resultados apresentados estão de acordo com os de vários estudos realizados em outros países, onde se observa que, a partir dos 5 metros, ocorre rápido decréscimo na taxa de polinização cruzada (JONES; BROOKS, 1950; RAYNOR; OGDEN; HAYES, 1972; LUNA et al., 2001; HENRY et al., 2003; MA; SUBEDI; REID, 2004).

Embora, nos EUA, Jemison e Vayda (2001), estudando o fluxo gênico de milho resistente a herbicidas, tenham constatado, na distância de 100 metros, contaminação variando de 0,7% a 1,4%, observa-se que os resultados encontrados nesse estudo estão muito próximo aos de outros, como os de MATSUO et al. (2004), com 0,23% nos 100 metros e 0,06% em 200 metros de distância e os de Byrne e Fromherz (2003), com 0,05% em 183 metros.

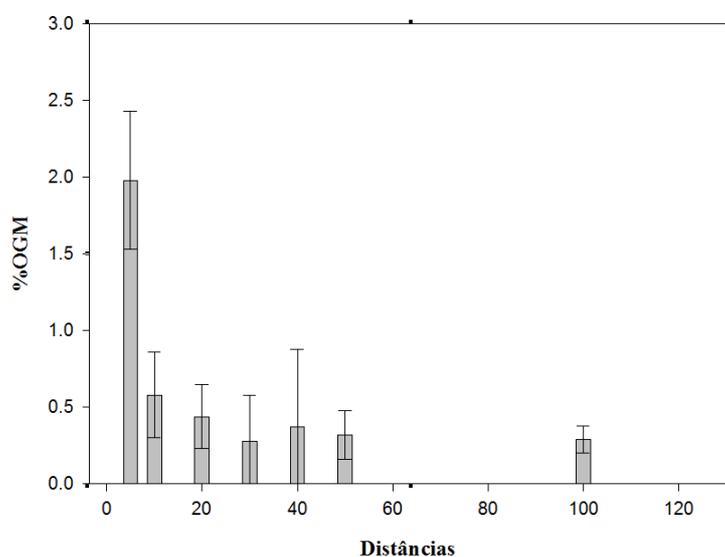


Figura 12 Porcentagem média fecundação cruzada detectada nas diferentes distâncias, no município Ponta Grossa, PR, safra 2009/10

Considerando-se os resultados observados nas nove áreas avaliadas, verificou-se que 82% de contaminação genética proveniente do milho geneticamente modificado ocorreram nos primeiros 30 metros e que, na maioria dos casos, uma pequena porcentagem desta foi observada aos 100 metros de distância (Tabela 4). Easthan e Sweet (2002) estudaram o fluxo gênico em sete campos no Canadá contendo o gene Bt, tendo observado que 89% do pólen foi depositado nos primeiros 5 metros. Nas distâncias de 50 metros e 100 metros, os resultados encontrados por estes autores foram semelhantes aos encontrados nesta pesquisa.

Tabela 4 Estimativa da porcentagem cumulativa de fecundação cruzada por pólen a várias distâncias, em nove campos contendo milho Bt. UFLA, Lavras, MG, 2010

| Campo | Porcentagem cumulativa de fecundação cruzada | | | | | | |
|-----------------------|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| | 5 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 100 |
| Itumirim, MG, 2008/09 | 65 | 80 | 94 | 95 | 96 | 100 | 100 |
| Tupaciguara, MG | 28 | 40 | 50 | 61 | 65 | 83 | 89 |
| Itapetininga, SP | 23 | 42 | 62 | 83 | 93 | 99 | 100 |
| Pedrinhas, SP | 19 | 44 | 60 | 82 | 90 | 95 | 100 |
| Assaí, PR | 50 | 72 | 81 | 90 | 94 | 97 | 100 |
| Paracatu, MG | 52 | 90 | 93 | 95 | 96 | 97 | 99 |
| Itumirim, MG 2009/10 | 40 | 73 | 93 | 99 | 99 | 100 | 100 |
| Uberlândia, MG | 35 | 53 | 53 | 58 | 83 | 100 | 100 |
| Ponta Grossa, PR | 46 | 60 | 70 | 76 | 92 | 99 | 100 |
| Média | 40 | 62 | 73 | 82 | 90 | 97 | 99 |

Outro aspecto refere-se ao isolamento adotado nesta pesquisa em todas as áreas avaliadas. Nos diferentes isolamentos avaliados existia uma barreira vegetal, constituída pelas plantas das cultivares convencionais, a qual, de alguma forma, restringe a fecundação cruzada a partir das plantas transgênicas. Assim,

levando-se em consideração a Resolução Normativa nº 4 da CTNBio, que estabelece as normas de coexistência, a taxa de fecundação cruzada aos 20 metros de isolamento representa um dos sistemas propostos no país. Ao mesmo tempo, também está prevista a possibilidade de isolamento a distância de 100 metros, sem qualquer barreira vegetal. No entanto, a instalação de experimentos para a avaliação de fecundação cruzada, considerando o isolamento sem barreira vegetal, em diferentes distâncias, torna-se, muitas vezes, inviável. Neste contexto, ao considerar os isolamentos entre 20 e 30 metros, apenas na área de Itapetininga foi observado valor de fecundação cruzada superior a 1%.

Outro questionamento refere-se à comercialização de grãos isentos de qualquer traço do transgênico para atender a mercados específicos, ou seja, o limite zero. Neste caso, o padrão tolerado torna-se mais rígido em relação ao adotado para a rotulagem de produtos. No entanto, com o aumento de áreas transgênicas de milho no país e considerando a possibilidade de contaminações genética e varietal nesta espécie, a produção de grãos e sementes sem qualquer traço de transgênicos torna-se cada vez mais difícil.

Observa-se que, na prática, é difícil evitar que ocorra fluxo gênico entre plantas sexualmente compatíveis que estejam em áreas próximas e florescendo ao mesmo tempo, principalmente alógamas, como o milho, polinizadas pelo vento. Embora, em muitos casos, a transferência gênica em plantios comerciais seja irrelevante, em campos experimentais dos programas de melhoramento e de produção de sementes essas distâncias devem ser consideradas, no sentido de evitar a introgressão não-intencional de genes em determinadas linhagens (ARAGÃO, 2004). Observa-se, cada vez mais, a necessidade de estabelecimento de padrões oficiais para a mistura de OGM em sementes e grãos convencionais de milho, para justificar inclusive a adoção de coexistência.

4 CONCLUSÃO

A 100 metros de isolamento ocorrem níveis de fecundação cruzada inferiores a 1%.

Em média, 82% da fecundação cruzada ocorrem nos primeiros 30 metros.

REFERÊNCIAS

- ALVIM, P. O. **Viabilidade e conservação de grãos de pólen de milho**. 2008. 59 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- ARAGÃO, F. J. L. Organismos geneticamente modificados: impacto do fluxo gênico. In: MIR, L. (Org.). **Genômica**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2004. v. 1, p. 767-783.
- BANNERT, M. **Simulation of transgenic pollen dispersal by use of different grain colour maize**. 2006. Dissertation (PhD) - Institute of Plant Sciences Group Agronomy and Plant Breeding, Buwal.
- BORÉM, A.; RAMALHO, M. A. P. Escape gênico e impacto ambiental. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 5, n. 28, p. 44-47, 2002.
- BRASIL. Decreto nº 4.680, de 24 de abril de 2003. Regulamenta o direito à informação, assegurado pela Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990, quanto aos alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal que contenham ou sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados, sem prejuízo do cumprimento das demais normas aplicáveis. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 25 abr. 2003. Republicado em 28 abr. 2003.
- BYRNE, P. F.; FROMHERZ, S. Can GM and non-GM crops coexist? Setting a precedent in Boulder County, Colorado, USA. **Food, Agriculture and Environment**, [s.l.], v. 1, p. 258-261, 2003.
- EASTHAM, K.; SWEET, J. **Genetically modified organisms (GMOs): the significance of gene flow through pollen transfer**. Copenhagen: [s.n], 2002. (European Environment Agency, n. 28).

EUROPEAN NETWORK OF GMO LABORATORIES (ENGLAND).
Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing. [S.l.]: CRL-GMFF, Oct. 2008.

HENRY, C. et al. **Farm scale evaluations of GM crops:** monitoring gene flow from GM crops to non-GM equivalent crops in the vicinity -Part I. Forage maize. [S.l.]: Central Science Laboratory Sand Hutton, Centre for Ecology and Hydrology Dorchester, 25 S, 2003. DEFRA report.

JAMES, C. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops.** Ithaca, 2009. (ISAAA Brief, n. 41).

JEMISON, J. M.; VAYDA, M. E. Cross pollination from genetically engineered corn: Wind transport and seed source. **AgBioForum**, Columbia, v. 4, n. 2, p. 87-92, 2001.

JONES, M.; BROOKS, J. Effectiveness of distance and border rows in preventing outcrossing in corn. **Oklahoma Agricultural Experiment Station Technical Bulletin**, Oklahoma, v. 38, p. 1-18, 1950.

LUNA, V. S. et al. Maize pollen longevity and distance isolation requirements for effective pollen control. **Crop Science**, Madison, v. 41, p. 1.551-1.557, 2001.

MA, B. L.; SUBEDI, K. D.; REID, L. M. Extent of crossfertilization in maize by pollen from neighbouring transgenic hybrids. **Crop Science**, Madison, v. 44, p. 1.273-1.282, 2004.

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M; PAIVA, E. **Fisiologia da planta de milho.** Sete Lagoas: Embrapa, 1995. (Circular técnica, 20).

MANN, C. C. Crop scientists seek a new revolution. **Science**, Washington, DC, v. 283, p. 310-314, 1999.

MATSUO, K. et al. Pollen dispersal and outcrossing in *Zea mays* populations: a simple identification of hybrids detected by xenia using conventional corn in simulation of transgene dispersion of GM corn. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE BIOSAFETY OF GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS, 8., 2004, Montpellier. **Proceedings...** [S.l.: s.n.], 2004. p. 282.

RAMALHO, M. A. P.; SILVA, N. O. Fluxo gênico em plantas. In: MIR, L. (Org.). **Genômica**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2004. v. 1, p. 863-884.

RAYNOR, G. S.; OGDEN, E. C.; HAYES, J. V. Dispersion and deposition of corn pollen from experimental sources. **Agronomie Journal**, Madison, v. 64, n. 4, p. 420-426, July/Aug. 1972.

CAPÍTULO 4
DETECÇÃO DE MILHO GENETICAMENTE MODIFICADO COM
RESISTÊNCIA A INSETOS

RESUMO

Atualmente, diversos transgênicos de milho foram aprovados para a comercialização no Brasil. Contudo, para a certificação da pureza genética de sementes e grãos e para atender à legislação vigente, é necessária a avaliação de métodos rápidos e seguros para a detecção e a identificação de transgênicos. A legislação brasileira estabelece um limite de rotulagem para produtos apresentando OGMs acima de 1%. Diante disso, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a sensibilidade do teste de tiras de fluxo lateral na detecção dos eventos Bt11 e MON810, com resistência a insetos, em diferentes tecidos da semente de milho e a especificidade e a sensibilidade da técnica de PCR na detecção desses eventos. A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório Central de Sementes da UFLA. Para o teste de tiras, sementes transgênicas foram misturadas às sementes convencionais nos níveis de 0,2%, 0,4% e 0,8%, para Bt11 e 0,4%, 0,8% e 1,6%, para MON810. Essas proporções foram definidas a partir das especificações do kit comercial adquirido da marca Gehaka®, com limite de detecção de 0,4% e 0,8%, para os eventos Bt11 e MON810. Foram utilizadas sementes inteiras, o endosperma e o eixo embrionário destas. Para a técnica de PCR, sementes transgênicas (MON810 e Bt11) foram misturadas às sementes convencionais nos níveis de 20%, 10%, 5%, 2%, 1% e 0,5%, para ambos os eventos. As sementes foram trituradas e, em seguida, foi realizada a extração do DNA. Para a detecção dos eventos transgênicos, utilizaram-se *primers* específicos para os eventos MON810 e Bt11 e a zeína como controle endógeno. Para o teste de tiras, verificou-se que a sensibilidade do teste variou para ambos os eventos e metodologias utilizadas. O teste foi positivo para o evento Bt11 apenas no nível de 0,8%, diferente do limite de detecção de 0,4% indicado pelo fabricante. Na PCR multiplex, os *primers* utilizados mostraram-se específicos para os diferentes eventos avaliados. Verificou-se que a presença desses eventos foi detectada em amostras com uma semente transgênica em 100 sementes convencionais. Assim, essa técnica mostrou ser eficiente para detectar contaminações acima de 1%, principalmente para o Bt11.

Palavras-chave: Teste de tiras. PCR. Transgênico.

ABSTRACT

Currently, several transgenic maize events have been approved in Brazil. However, to certify the genetic purity of seeds and grains and with the current legislation, necessitated the development of reliable and sensitive methods for genetically modified organism (GMO) detection. The Brazilian regulations established a 1% labeling threshold for contamination of unmodified foods with GM food products. In this work, was evaluate the sensitivity of strips test for detection of events MON810 and Bt11, in different tissues of maize seed and the sensitivity and specificity of PCR in detecting these events. The analysis was performed at the Central Laboratory of Seeds of the Federal University of Lavras. To evaluate the sensitivity of the strip tests for detection of GMOs, transgenic seeds were mixed with conventional seeds at the levels of 0.2, 0.4 and 0.8 percent for the event Bt11, and 0.4, 0.8 and 1.6 percent for the event MON810. The detection limit of the commercial kit purchased is 0.4 and 0.8 percent for Bt11 and MON810 events. We used whole grain, the endosperm and the embryo axis. In order to assess the sensitivity of multiplex PCR, transgenic seeds were mixed with conventional seeds at levels of 0.5, 1, 2, 5, 10 and 20 percent, for both events. Specific primers were used for detection of Bt11, MON810 and zein gene, as endogenous control. In strip tests, the presence of Bt11 and MON810 were not detected at levels of 0.4 and 0.8 percent, as specified by the manufacturers. By the PCR technique it was observed specificity for the different events and sensitivity of 1 percent for the events Bt11 and MON810.

Keywords: Strip test. PCR. Transgenic.

1 INTRODUÇÃO

Em 2009, foram cultivados, no Brasil, 21,4 milhões de hectares com lavouras transgênicas, sendo considerada a segunda área em nível mundial (JAMES, 2010). Nesse mesmo ano foram cultivados no país 5 milhões de hectares com milho transgênico, o que representou aumento de 400% em relação ao ano de 2008.

Frente a este cenário de crescimento de lavouras geneticamente modificadas, a rotulagem e a rastreabilidade desses produtos são questões atuais consideradas para o comércio e a regulamentação. Nesse sentido, os testes para a detecção de organismos geneticamente modificados (OGMs) em plantas e alimentos são ferramentas essenciais para agricultores, produtores de alimentos, varejistas e órgãos reguladores. Isso ocorre porque, em praticamente todo o mundo, as leis e as exigências dos consumidores fazem com que o conteúdo de OGM em alimentos seja verificado antes que estes sejam importados ou colocados no mercado. Além do aspecto legal, a certificação da pureza genética em sementes e grãos é fundamental em programas de controle de qualidade.

Diversos métodos foram desenvolvidos para detectar e identificar eventos específicos de modificação genética. Compreender o funcionamento dos testes diagnósticos permite reduzir o número de resultados falso-positivos e falso-negativos que possam ocorrer durante a realização dos testes em lotes de sementes e grãos. De maneira geral, estes métodos podem ser classificados em duas categorias. A primeira categoria inclui métodos que requerem a amplificação de um segmento de DNA com subsequente detecção direta ou indireta do produto final e a segunda inclui métodos que envolvem a detecção de proteína com o emprego de anticorpos marcados (AHMED, 2002).

A técnica de PCR, que consiste na amplificação seletiva de sequências específicas da molécula de DNA, é o principal método utilizado na detecção e

quantificação de OGMs. Nesse caso, a PCR amplifica um segmento da construção gênica inserida na planta. Embora o método tenha algumas limitações, alta sensibilidade, especificidade, capacidade de detectar uma ampla série de eventos e de distinguir as variedades geneticamente modificadas que apresentam diferentes construções gênicas explicam a sua escolha para a realização de análises de detecção de OGMs e seus derivados.

Apesar de os métodos imunológicos e PCR diferirem quanto à sensibilidade, à velocidade e ao custo por análise, observa-se grande concordância entre os resultados obtidos com os dois tipos de metodologia. Contudo, a robustez do método, a necessidade de resposta qualitativa rápida, a velocidade de execução, os limites legais e o treinamento de pessoal podem definir a escolha em favor de métodos imunológicos rápidos, principalmente daqueles em configuração mais simples, a exemplo do método de tiras. No entanto, há a necessidade de avaliar fatores que possam interferir nos resultados das análises. Sabe-se que há níveis diferentes de expressão de proteínas em sementes em função do evento biotecnológico e que esses níveis variam também nas estruturas das sementes.

Em milho, os tecidos das sementes têm diferentes níveis de ploidia. O embrião é $2n$, sendo metade proveniente do pai e metade da mãe; o endosperma é $3n$, em que $2n$ é proveniente da mãe e $1n$ do pai, e o tegumento é $2n$, tecido materno derivado do óvulo. Sendo assim, essa diferença pode influenciar na detecção do evento, em função do parental no qual o evento foi introduzido (INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION - ISTA, 2009).

Diante disso, o objetivo, neste trabalho, foi avaliar a sensibilidade do teste de tiras na detecção dos eventos Bt11 e MON810, com resistência a insetos, em diferentes tecidos da semente de milho e também avaliar a especificidade e a sensibilidade da técnica de PCR multiplex na detecção dos eventos de milho transgênico MON810 e Bt11.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de condução do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório Central de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG.

2.2 Teste de tiras de fluxo lateral

Foram utilizadas sementes de cultivares comerciais de milho DKB 390 convencional, Yieldgard (MON810) e Maximus TL (Bt11).

Com a finalidade de simular diferentes níveis de contaminação, sementes transgênicas (Yieldgard e TL) foram misturadas às sementes convencionais, nos níveis de 0,2%, 0,4% e 0,8%, para Bt11 e 0,4%, 0,8% e 1,6%, para MON810. Estas proporções foram definidas a partir das especificações do kit comercial da marca Gehaka®, com limite de detecção de 0,4% e 0,8%, para os eventos Bt11 e MON810, respectivamente. Neste teste foram avaliadas três metodologias distintas.

Na primeira metodologia foram utilizados sementes inteiras, endosperma e eixo embrionário, utilizando 500 sementes (equivalente a 160 g, recomendados pelo kit). Os materiais foram triturados, durante 30 segundos, em liquidificador e, posteriormente, adicionados 200 ml de tampão diluído para amostra. Para proceder ao teste, 0,5 ml do extrato triturado foram pipetados e colocados em um tubo de 1,5 ml, na presença da tira, contendo os anticorpos.

Em uma segunda metodologia, foram utilizados sementes inteiras, endosperma e eixo embrionário, utilizando-se 500 sementes (equivalente a 160 g). Depois de separados os endospermas e o eixo embrionário das sementes,

estes foram triturados e pesados. Utilizou-se o peso do eixo embrionário como referência para todos os outros tratamentos. Posteriormente, foi adicionado tampão para amostra, diluído proporcionalmente ao peso do eixo embrionário. Para proceder ao teste, 0,5ml do extrato triturado foram pipetados e colocados em um tubo de 1,5ml, na presença da tira.

Em outra metodologia, foram utilizadas sementes inteiras, endosperma e eixo embrionário, utilizando-se 500 sementes (equivalente a 160 g). Os materiais foram triturados durante 30 segundos em liquidificador e, posteriormente, adicionado tampão para amostra, diluído proporcionalmente ao peso de cada material. Para proceder ao teste, 0,5 ml do extrato triturado foram pipetados e colocados em um tubo de 1,5ml, na presença da tira.

As leituras das tiras foram realizadas após 10 minutos. Para cada metodologia foi realizado um teste como controle positivo, com sementes transgênicas, e um teste controle negativo, com sementes convencionais.

2.3 PCR multiplex

Para a avaliação da especificidade da técnica na detecção dos eventos MON810 e Bt11, como controle negativo foram utilizadas sementes de híbridos comerciais de milho DKB 390 convencional e 2B587 (evento Herculex).

Com a finalidade simular diferentes níveis de contaminação, sementes transgênicas (MON810 e Bt11) foram misturadas às sementes convencionais, nos níveis de 1 em 5 (20%), 1 em 10 (10%), 1 em 20 (5%), 1 em 50 (2%), 1 em 100 (1%) e 1 em 200 (0,5%), para ambos os eventos.

Sementes de cada amostra foram trituradas em moinho refrigerado e, em seguida, foi realizada a extração do DNA.

Para a extração, foram adicionados, a 50 mg da amostra macerada, 620 µL do tampão de extração CTAB 2% (CTAB 2%; 1M Tris-HCl pH 7,5; 0,5mM

de EDTA pH 8,0; 5M NaCl) com adição de 2% de β -mercaptoetanol e incubado a 65°C, por 60 minutos. Ao final deste período, foram adicionados 350 μ L mL⁻¹ de mistura clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), que foram levemente agitados por 5 minutos, para a obtenção de uma emulsão que, posteriormente, foi centrifugada a 14.000 rpm, por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e o procedimento anterior foi repetido. Em seguida, foi adicionado isopropanol gelado, na proporção de 1:1 e centrifugou-se, a 14.000 rpm, por 6 minutos e, posteriormente, lavou-se com etanol 70%. Após a secagem à temperatura ambiente, o DNA foi ressuspensionado em 50mL de água ultrapura pH 8,0 (10mM de Tris-HCl e 1mM de EDTA). Ao final da extração, adicionaram-se 2 μ L de RNase, seguida de incubação, a 37°C, por duas horas. A quantificação do DNA foi avaliada pela medida da absorbância a 260 nm em espectrofotômetro (NanoVue-GE Healthcare) e em gel de agarose 0,8%.

Para a detecção qualitativa do evento transgênico foi realizada a PCR utilizando *primers* específicos para os eventos MON810 e Bt11 e o gene zeína como controle endógeno (Tabela 1).

As reações de PCR consistiram de 100 ng de DNA, 0,2 μ M de cada *primer*, 0,2 μ M de dNTP, 50mM MgCl₂ e 2,5 U da enzima Taq polimerase, em um volume total de 25 μ L. As amplificações foram realizadas com uma etapa de desnaturação inicial de 95°C, por 5 minutos, seguida por 39 ciclos de 95°C, por 20 segundos; 58°C, por 30 segundos e 72°C, por 30 segundos, além de uma etapa final de 72°C, por 5 minutos.

Tabela 1 Relação dos *primers* utilizados no sistema PCR. UFLA, Lavras, MG, 2010

| <i>Primers</i> | Nome | Sequência | Pares de base |
|----------------|-----------------------|--|---------------|
| MON810 milho | HS01-cry CR01 | AGT TTC CTT TTT GTT GCT CTC CT GAT GTT TGG GTT GTT GTC CAT | 197 |
| Bt11 milho | BT11 1-5 CRYIA 1-3 | CCA TTT TTC AGC TAG GAA GTT C TCG TTG ATG TTK GGG TTG TTG TCC | 110 |
| Zeína milho | Zel 1-5' Zel 1-3' | CCT CAG TCG CAC ATA TCT ACT ATA CT CTA GAA TGC AGC ACC AAC AAA | 508 |

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Teste de tiras

Pelos resultados apresentados nas Tabelas 2, 3 e 4 é possível observar que a sensibilidade do teste de tiras foi diferente para ambos os eventos, tratamentos e metodologias utilizadas.

De acordo com as especificações do fabricante, considerando o limite de detecção do kit utilizado, 0,8% para o MON 810 e 0,4% para o Bt11, pela Metodologia I, não foi possível detectar o evento em sementes inteiras e eixos embrionários para MON810 e em nenhum dos materiais utilizados para o Bt11. O teste foi positivo para endosperma no limite de 0,8% para MON810, o que permite inferir que o gene, provavelmente, foi introduzido no parental feminino. Ressalta-se que as sementes de milho são constituídas, em maior parte, pelo tecido endospermático.

Observa-se também que, nesta metodologia, o teste só foi positivo para o evento Bt11 no nível de 0,8%, o que compromete a detecção de 0,4% indicada pelo fabricante. Neste caso, o resultado seria falso-negativo.

Tabela 2 Resultados dos testes de tiras utilizando a Metodologia I. UFLA, Lavras, MG, 2010

| Tratamento | Mon810: | | | Bt11: | | |
|----------------|---------|-------|------|-------|-------|------|
| | 1,6% | 0,8%* | 0,4% | 0,8% | 0,4%* | 0,2% |
| S. Inteira | + | - | - | + | - | - |
| Endosperma | + | + | - | + | - | - |
| E. embrionário | - | - | - | + | - | - |

*Limite de detecção para o evento, de acordo com as especificações técnicas do kit.

Nas metodologias II e III (Tabela 3 e 4), observa-se que todos os testes foram positivos quando da utilização do eixo embrionário em todos os tratamentos. Na primeira metodologia, os eixos embrionários foram retirados de 160 g de sementes, obtendo-se, aproximadamente, 24 g desse material. Aos 24 g foram adicionados 200 ml de tampão, propiciando a diluição da amostra, comprometendo a detecção da proteína. No entanto, deve ser ressaltado que, no teste de tiras, trabalha-se com sementes inteiras e que, nas metodologias II e III, houve a detecção dos eventos MON810 e Bt11, com 1,6% e 0,8% de contaminação, respectivamente, coincidindo com os resultados observados quando da utilização da metodologia I.

Tabela 3 Resultados dos testes de tiras utilizando a Metodologia II. UFLA, Lavras, MG, 2010

| Tratamento | Mon810: | | | Bt11: 0,8% | 0,4%* | 0,2% |
|----------------|---------|-------|------|------------|-------|------|
| | 1,6% | 0,8%* | 0,4% | | | |
| S. Inteira | + | - | - | + | - | - |
| Endosperma | + | + | - | + | + | - |
| E. embrionário | + | + | + | + | + | + |

*Limite de detecção para o evento de acordo com as especificações técnicas do kit.

Tabela 4 Resultados dos testes de tiras utilizando a Metodologia III. UFLA, Lavras, MG, 2010

| Tratamento | Mon810: | | | Bt11: 0,8% | 0,4%* | 0,2% |
|----------------|---------|-------|------|------------|-------|------|
| | 1,6% | 0,8%* | 0,4% | | | |
| S. Inteira | + | - | - | + | - | - |
| Endosperma | + | + | + | + | + | - |
| E. embrionário | + | + | + | + | + | + |

*Limite de detecção para o evento de acordo com as especificações técnicas do kit.

Os resultados observados na metodologia III só diferiram da metodologia II no teste para o MON810 no nível de 0,4%, que foi positivo também para o endosperma (Figura 1). Isso provavelmente ocorreu porque grande parte da amostra é descartada na metodologia II, aumentando a probabilidade de obtenção de resultados falso-negativos. Sendo assim, pode-se afirmar que, na metodologia III, foi observada maior eficiência para a detecção dos eventos nas diferentes partes da semente e que a quantidade de tampão adicionado às amostras pode influenciar nos resultados. No entanto, quando da utilização de sementes inteiras, não houve variação de resultados entre as metodologias utilizadas.

Ensaio de validação e otimização de técnicas de detecção são aspectos importantes para a padronização das metodologias disponíveis. Segundo Ahmed (2002), entre os fatores que afetam a otimização e a validação de técnicas de detecção de OGMs estão sensibilidade dos kits, tempo de incubação, método utilizado e escolha dos limites de tolerância de detecção para testes qualitativos, especificidade, reprodutibilidade e confiabilidade da detecção.



Figura 1 Resultado do teste de tiras para MON810, nível de 0,8%, metodologia III. Amostra convencional, controle negativo e amostra de MON810, controle positivo

3.2 PCR multiplex

O rendimento do DNA extraído variou de 300 a 1.500 ng/ μ L, para as amostras de milho. Ocorreu amplificação do gene zeína para todas as amostras de milho avaliadas, indicando boa eficiência do *primer* utilizado como controle endógeno e condições favoráveis para a análise.

Os *primers* utilizados mostraram-se específicos para os diferentes eventos avaliados na PCR multiplex. Como se observa na Figura 2, apesar de os eventos Bt11 e MON810 possuírem o mesmo gene truncado *CryIAb*, estes apresentaram diferentes padrões de banda e ausência para o evento Herculex, que apresenta o gene *CryIf*.

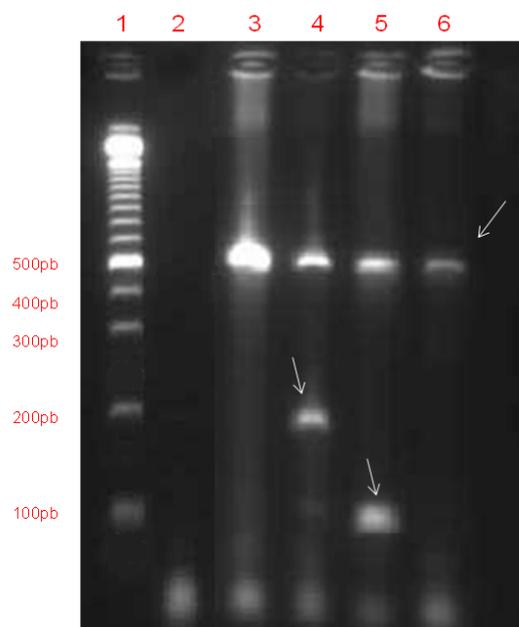


Figura 2 Resultado de especificidade da PCR multiplex para os eventos Bt11, MON810 e gene zeína. Linhas 1-6: padrão de DNA de 100 pb, controle negativo, amostra de milho convencional, MON810, Bt11 e Herculex

Pelos padrões de banda observados para o Bt11 (Figura 3) e MON810 (Figura 4), verificou-se que a presença desses eventos foi detectada na amostra com 1%, embora para o evento MON810, nesse nível, tenha sido detectado com um padrão de banda de baixa intensidade.

Huang e Pan (2004), avaliando a eficiência da PCR para os eventos MON810 e NK603, conseguiram um limite de detecção de 0,5% para ambos os eventos. Essa diferença nos resultados pode ser atribuída, entre outros fatores, à metodologia utilizada no processo de extração do DNA e à qualidade do DNA extraído, sendo este considerado o principal fator para o sucesso na detecção de OGM. A presença de quantidade elevada de impurezas associadas ao DNA isolado a partir de sementes contribui para a redução na concentração de DNA extraído. As sementes são estruturas de multiplicação vegetal, com tecido de reserva rico em carboidratos, lipídios e proteínas. Essas substâncias, muitas vezes, dificultam o isolamento do DNA, exigindo maior número de lavagens com solvente orgânico, clorofórmio-álcool isolamílico. Esse procedimento implica, também, em redução na quantidade total de DNA isolado, pois parte dessas moléculas não se separa de outros compostos orgânicos e é, conseqüentemente, descartada.

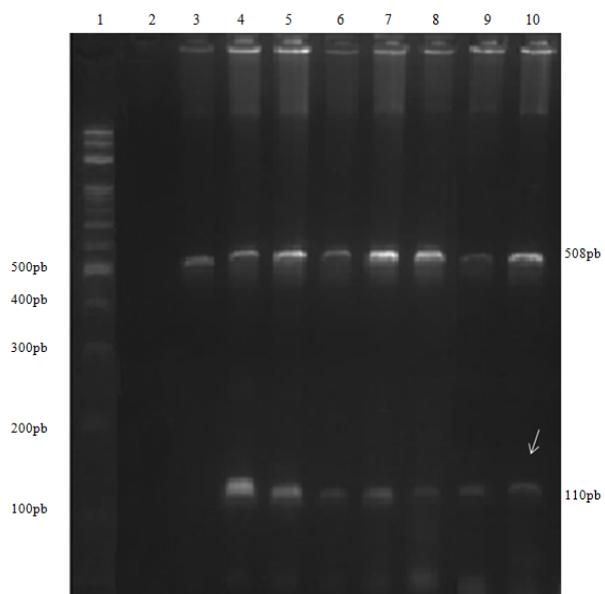


Figura 3 Resultado de sensibilidade da PCR para o evento Bt11. Linhas 1-11: padrão de DNA de 100 pb, controle negativo, amostra de milho convencional, amostra de Bt11, 20%, 10%, 5%, 2%, 1% e 0,5% de contaminação com milho transgênico Bt11

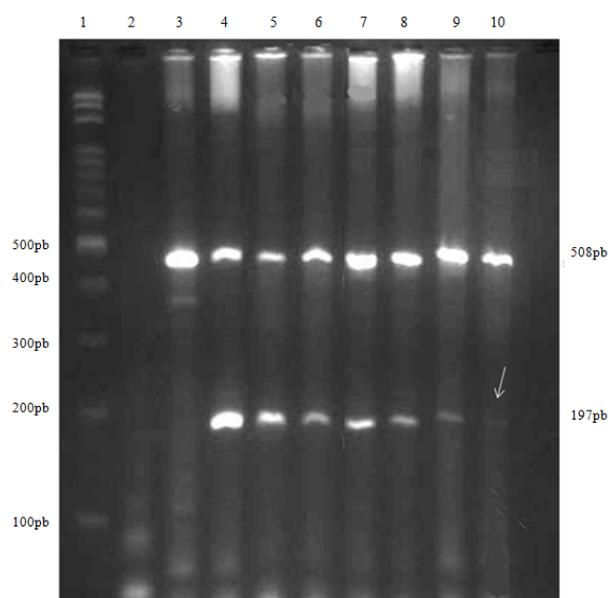


Figura 4 Resultado de sensibilidade da PCR para o evento MON810. Linhas 1-10: padrão de DNA de 100 pb, controle negativo, amostra de milho convencional, amostra de milho MON810, 20%, 10%, 5%, 2%, 1%, e 0,5% de contaminação com milho transgênico MON810

Ramos et al. (2006) avaliaram a sensibilidade da técnica de microssatélites para detectar a presença de sementes de milho de outros genótipos em lotes de linhagens de milho. Nesse estudo também foi detectada a presença de contaminantes na amostra com até 1% de mistura.

Outro fator a ser considerado é que, normalmente, quando se utilizam dois pares de *primers* nas reações (PCR multiplex), pode ocorrer uma interação entre os 4 *primers* formando dímeros e, conseqüentemente, ocorre um decréscimo na eficiência da PCR (HUANG; PAN, 2004).

A diferença na sensibilidade de detecção encontrada para os diferentes eventos pode ser explicada pelos níveis de expressão dessas proteínas nas sementes. Em milho, os tecidos das sementes têm diferentes níveis de ploidia.

Sendo assim, essa diferença pode influenciar na detecção do evento, dependendo do parental em que o mesmo foi introduzido. Outra hipótese é a construção do cassete, no qual, normalmente, o DNA exógeno é integrado no genoma ao acaso. Entretanto, alguns eventos já têm a integração direcionada desses genes no genoma vegetal, ou seja, a proteína é mais expressa no tecido de interesse.

A detecção de organismos geneticamente modificados em alimentos, ingredientes e aditivos é necessária por duas razões principais. Em primeiro lugar, porque foi considerado, em muitos países, incluindo o Brasil, na União Europeia e no Japão, que os consumidores podem decidir se querem ou não consumir esses alimentos, o que levou à adoção de legislação impondo a rotulagem dos alimentos contendo OGM na sua composição. Em segundo lugar, se existe legislação, é necessário implementar as medidas que garantam que a mesma seja cumprida.

Assim, por meio da técnica PCR, observou-se especificidade para diferenciar os eventos MON810 e Bt11, e sensibilidade para detectar contaminações acima de 1%, sendo este o limite exigido pela legislação brasileira para a rotulagem de alimentos ou ingredientes de alimento com transgênicos.

4 CONCLUSÃO

É possível, pela técnica de PCR, detectar os eventos Bt11 e MON810 em amostras com 1% de contaminação.

No teste de tiras, os eventos Bt11 e MON810 não são detectados nos níveis de 0,4% e 0,8%, como especificado pelo fabricante.

A quantidade de tampão adicionada à amostra influencia os resultados do teste de tiras.

REFERÊNCIAS

AHMED, F. E. Detection of genetically modified organisms in foods. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 20, n. 5, p. 215-223, 2002.

BRASIL. Decreto nº 4.680, de 24 de abril de 2003. Regulamenta o direito à informação, assegurado pela Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990, quanto aos alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal que contenham ou sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados, sem prejuízo do cumprimento das demais normas aplicáveis. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 25 abr. 2003. Republicado em 28 abr. 2003.

HUANG, H. Y.; PAN, T. M. Detection of Genetically Modified Maize MON810 and NK603 by Multiplex and Real-Time Polymerase Chain Reaction Methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 72, p. 3.264-3.268, 2004.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. **Position Paper on ISTA's view regarding the units for the reporting of quantitative results on presence of seeds with specified traits in conventional seed lots**. Switzerland, 2009. p. 4. Document 08-2009.

JAMES, C. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops**. Ithaca, 2009. (ISAAA Brief, n. 41).

RAMOS, N. P. et al. Sensibilidade dos microssatélites para determinar a pureza varietal em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 28, n. 1, p. 99-105, 2006.