

## FLUXO GÊNICO EM MILHO SOB DIFERENTES TAMANHOS DE AMOSTRAS E DISTÂNCIAS DE AMOSTRAGEM

NARJARA FONSECA CANTELMO<sup>1</sup>, RENZO GARCIA VON PINHO<sup>1</sup>,  
ÉDILA VILELA DE RESENDE VON PINHO<sup>1</sup>, RENATO BARBOSA CAMARGOS<sup>1</sup>,  
LUIZ PAULO MIRANDA PIRES<sup>1</sup> e IOLANDA VILELA VON PINHO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil - [nacantelomo@hotmail.com](mailto:nacantelomo@hotmail.com),  
[renzo@dag.ufla.br](mailto:renzo@dag.ufla.br), [edila@dag.ufla.br](mailto:edila@dag.ufla.br), [renato.ufla@hotmail.com](mailto:renato.ufla@hotmail.com),  
[luizpaulo\\_vortex@hotmail.com](mailto:luizpaulo_vortex@hotmail.com), [iolandavvp@hotmail.com](mailto:iolandavvp@hotmail.com)

---

*Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v.15, n.2, p. 328-334, 2016*

**RESUMO** - A preocupação a respeito do fluxo gênico entre lavouras de milho transgênicas e convencionais tem recebido cada vez mais atenção no âmbito técnico e político no Brasil. Diante disso, objetivou-se, com este trabalho, estimar o fluxo gênico em lavouras comerciais de milho, bem como estabelecer um tamanho de amostra adequado para estimar a taxa de contaminação por transgênicos nos campos convencionais de milho com o uso de amostragem sistemática. As coletas das amostras foram realizadas em campos de produção de grãos comerciais nos municípios de Itumirim e Madre de Deus, MG, na safra 2010/2011 e na cidade de Ingaí, MG, na safra 2011/2012. Foram coletadas amostras em cinco distâncias do campo convencional em relação ao campo de transgênicos: 5 m, 10 m, 20 m, 50 m e 100 m. Foram também coletados quatro diferentes tamanhos de amostra: 1 espiga, 5 espigas, 10 espigas e 15 espigas em quatro repetições. Após as coletas, retirou-se de cada amostra uma alíquota de 300 sementes para realização do PCR em tempo real para a estimativa do fluxo gênico. Não houve diferença significativa entre os diferentes tamanhos analisados nos três locais. Em Itumirim e em Madre de Deus, também não houve diferença entre as distâncias analisadas; já no campo do município de Ingaí, as amostras coletadas na distância de 10 m apresentaram maior taxa de contaminação. Em todos os campos, a contaminação média ficou abaixo de 1%.

**Palavras-chave:** *Zea may* L., transgênico, contaminação.

## ANALYSIS OF GENE FLOW IN MAIZE UNDER DIFFERENT SAMPLE SIZES AND SAMPLING DISTANCES

**ABSTRACT** – The concern about gene flow between transgenic and conventional maize farming has been received increasing attention in technical and political scope in Brazil. Thus, the objective of this work was to estimate the gene flow in commercial maize farms, as well as the establishment of an adequate sample size to estimate the contamination rate by transgenic in conventional maize fields, using systematic sampling. The samples collections were carried out in fields of grain commercial production in the Itumirim and Madre de Deus municipalities, both in Minas Gerais state, in 2010/2011 crop season and in Ingaí, also Minas Gerais state, in 2011/2012 crop season. Samples were collected at five distances between conventional and transgenic field: 5, 10, 20, 50 and 100 m. Four different sample sizes were also collected: 1, 5, 10 and 15 spikes, with four replications. After collection, a portion of 300 seeds of each sample was used in a real-time PCR for the gene flow estimation. There was no statistical difference among the different sample sizes analyzed at the three sites. In Itumirim and Madre de Deus also no statistical difference was observed among the distances analyzed; the samples collected in Ingaí field in a distance of 10 m had a higher rate of contamination by transgenics when compared to the other samples. The average contamination was below of 1% in all fields.

**Palavras-chave:** *Zea mays*, transgenic, contamination.

O fluxo gênico no milho é um fenômeno comum na natureza e, sob o ponto de vista evolutivo, constitui um processo migratório que contribui intensamente para a ampliação da variabilidade genética dessa espécie. Embora não tenha relação com o surgimento das plantas geneticamente modificadas, o fluxo gênico tem ganhado grande relevância técnica e política após o desenvolvimento destas plantas para cultivo em escala comercial, sobretudo em função das discussões sobre o risco de escape gênico dos eventos transgênicos para as cultivares não transgênicas (Schuster, 2013).

A fim de garantir a coexistência entre milho convencional e transgênico, o governo brasileiro, em 2007, estabeleceu por meio da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) que a distância entre uma lavoura de milho geneticamente modificada e outra de milho convencional deve ser igual ou superior a 100 m, com a alternativa de 20 m, desde que acrescida de uma bordadura com, pelo menos, 10 linhas de milho convencional com porte e ciclo similares aos do milho geneticamente modificado (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança, 2007).

Além disso, o Brasil passou a exigir, a partir de 2003, a rotulagem dos produtos que contenham mais de 1% de traços de transgênicos (Brasil, 2003). De modo semelhante, a União Europeia, em 2004, estabeleceu que o limite de traços transgênicos considerado em uma lavoura convencional seja de 0,9% (EUR-Lex, 2003).

No entanto, na legislação brasileira, ainda não há um protocolo de amostragem oficial, de modo que os produtores e as indústrias realizam de forma aleatória o processo de coleta de amostras para monitoramento de plantas geneticamente modificadas (Cobaiashi, 2012).

O desenvolvimento de um método para esse monitoramento faz-se necessário no Brasil e a amos-

tragem sistemática vem ganhando a atenção de vários pesquisadores por minimizar a subjetividade e, conseqüentemente, assegurar maior precisão nas estimativas obtidas (Sustar-Vozlic et al., 2010). Essa amostragem utiliza como critério a tomada de amostras em intervalos regulares de mesmo tamanho entre unidades de amostragem até se compor uma amostra de tamanho  $n$  de toda a extensão da localização física da área (Ferreira, 2005).

Diante do exposto, objetivou-se, com este trabalho, a determinação do fluxo gênico em milho utilizando a amostragem sistemática, bem como o estabelecimento de um tamanho de amostra adequado para estimar a taxa de contaminação por transgênicos em campos convencionais de milho.

### Material e Métodos

As amostras de milho foram coletadas em campos de produção de grãos nos municípios de Itumirim (21° 19' S e 44° 52' O) e Madre de Deus (21° 28' S e 44° 19' O) na safra 2010/2011 e no município de Ingaí (21° 24' S e 44° 55' O) na safra 2011/2012, todos localizados no Sul do estado de Minas Gerais.

Foi analisado o fluxo gênico entre híbridos convencionais e transgênicos com evento Herculex (TC1507), da empresa Dow AgroSciences, nas cidades de Madre de Deus e Itumirim. Já na cidade de Ingaí, foram utilizados um híbrido convencional e um transgênico, esse último possuindo o evento VT-Pro (MON89034), da empresa Monsanto. Sendo observado o ciclo dos híbridos transgênicos e convencionais, a fim de assegurar o sincronismo de florescimento entre eles.

As amostras foram coletadas em cinco distâncias (5 m, 10 m, 20 m, 50 m e 100 m) no campo convencional em relação ao campo transgênico. A exce-

ção ficou por conta da área experimental localizada na cidade de Ingaí, na qual foram coletadas amostras em apenas quatro distâncias, pois houve impossibilidade de realizar coleta na distância de 5 m devido à separação dos campos feita por meio de uma estrada de 10 m de largura. A distância máxima de amostragem escolhida nesse trabalho baseou-se na Resolução Normativa nº 4, da CTNBio, de 2007, que estabelece 100 m como padrão de isolamento para a garantia de coexistência (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança, 2007). Foram utilizados quatro tamanhos diferentes de amostras (1 espiga, 5 espigas, 10 espigas e 15 espigas) e quatro repetições cada.

Para a coleta dessas amostras, traçaram-se linhas de 100 m de extensão em cada uma das distâncias de amostragem analisadas. Como foram empregadas quatro repetições, a cada 25 m desta linha, a amostragem foi realizada aleatoriamente. Esse procedimento foi repetido nas cinco distâncias amostradas nos campos localizados nos municípios de Itumirim e Madre de Deus (Figura 1) e nas quatro distâncias de amostragem utilizadas no campo de Ingaí.

As espigas coletadas foram submetidas à secagem, a 35 °C, até atingirem o teor de água de 14%. A

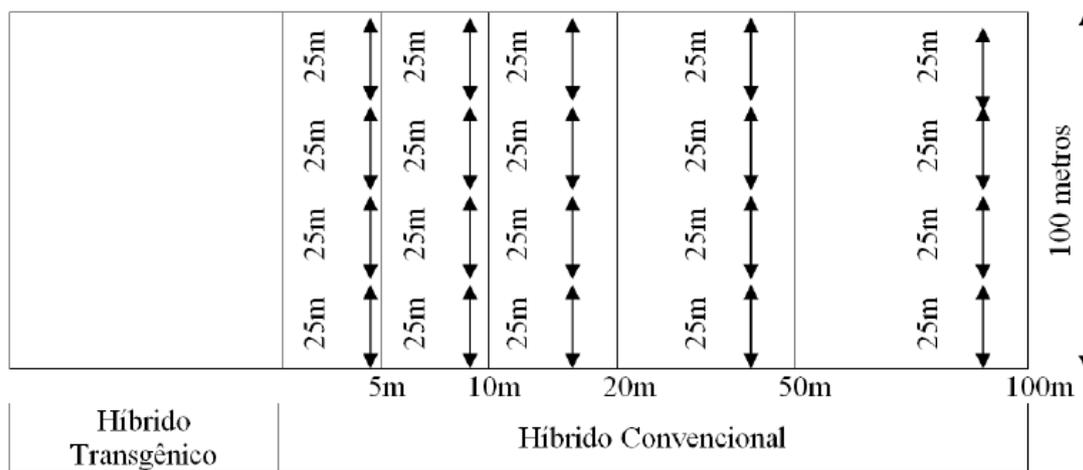
debulha foi realizada manualmente e os grãos foram acondicionados em sacos de papel e armazenados em câmara fria regulada a  $10 \pm 2$  °C e 75% UR  $\pm$  5.

Para a quantificação das taxas de contaminação com transgênicos, foi realizado o teste de PCR em tempo real no Laboratório Central do Setor de Sementes da Universidade Federal de Lavras (Ufla).

Após a debulha e a homogeneização dos grãos, amostrou-se uma alíquota de 300 grãos, conforme estudo prévio realizado por Nascimento et al. (2012), para a identificação de, no mínimo, 1% de contaminação. As sementes foram trituradas e procedeu-se à extração do DNA das amostras e do material de referência, utilizando o reagente PrepMan® (Applied Biosystem).

Como materiais de referência, foram utilizados os padrões de referência certificados, os quais correspondem a 0,0%, 0,1%, 0,5%, 1,0%, 2,0% e 5,0% (p/p) de milho MON89034 e 0,0%, 0,1%, 1,0% e 10,0% (p/p) de milho TC1507.

Após a extração do DNA, realizou-se a reação em triplicata das amostras empregando-se o kit TaqMan GMO Maize 35S Detection Kit para os alvos CaMV 35S (promotor) e zeína (referência endógena), para volume final de 25  $\mu$ L.



**Figura 1.** Croqui da amostragem realizada nos campos de Itumirim e de Madre de Deus, MG.

A reação foi então amplificada no equipamento ABI PRISM® 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems), com a utilização do ciclo de amplificação de 9 min a 95 °C e 40 ciclos de 20 seg a 95 °C; 1 min a 60 °C e 30 seg a 72 °C.

Os dados foram analisados por meio do software v.2.0.1, do sistema 7500 de PCR, em tempo real (Applied Biosystems), utilizado na quantificação absoluta pelo método do  $\Delta C_t$  (Threshold cycle). A porcentagem de plantas geneticamente modificadas de cada amostra foi, então, inferida a partir da curva dos padrões de referência.

Foi realizada análise de variância, posteriormente o teste de **médias de** Tukey, empregando-se o programa estatístico SAS (SAS Institute, 2000). O delineamento experimental considerado foi de blocos casualizados, em esquema fatorial 5x4 (cinco distâncias – 5 m, 10 m, 20 m,

50 m e 100 m e quatro tamanhos de amostra – 1 espiga, 5 espigas, 10 espigas e 15 espigas), com quatro repetições.

## Resultados e Discussão

Não houve diferença significativa para contaminação nas diferentes distâncias, nos diferentes tamanhos de amostra e na interação entre esses fatores nas amostras coletadas nos experimentos conduzidos em Itumirim e em Madre de Deus (Tabela 1 e 2). Um questionamento para se inferir a respeito da porcentagem de sementes contaminantes é com relação à preferência ou não do autopólen ou alopólen. No presente trabalho, o alopólen foi responsável por uma pequena fração das sementes produzidas nos campos de avaliação, corroborando com os resultados obtidos por Castro (2013).

**Tabela 1.** Estimativa de porcentagem média de fecundação cruzada detectada nas diferentes distâncias nos municípios de Itumirim, MG, Madre de Deus, MG, safra 2010/2011 e Ingaí, MG, safra 2011/2012.

Distâncias	% médias de contaminação		
	Itumirim	Madre de Deus	Ingaí
5	0,00 A	0,22 A	-
10	0,00 A	0,14 A	0,77 A
20	0,00 A	0,09 A	0,00 B
50	0,10 A	0,39 A	0,02 B
100	0,00 A	0,19 A	0,00 B

As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

**Tabela 2.** Estimativa de porcentagem média de contaminação detectada nos diferentes tamanhos de amostras nos municípios de Itumirim, MG, Madre de Deus, MG, safra 2010/2011 e Ingaí, MG, safra 2011/2012.

Tamanho de amostra (espigas)	% médias de contaminações		
	Itumirim	Madre de Deus	Ingaí
1	0,02 A	0,20 A	0,19 A
5	0,00 A	0,15 A	0,21 A
10	0,01 A	0,33 A	0,16 A
15	0,05 A	0,15 A	0,23 A

As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Além disso, supõe-se que, ao longo da amostragem realizada nesses locais, não tenham sido contemplados pontos com grande intensidade de fluxo gênico, pois a fecundação cruzada pode ocorrer de forma heterogênea e vir a produzir ilhas isoladas com altas taxas de contaminações (Kawashima et al., 2011).

Os resultados gerados no campo de Ingaí foram os mais consistentes quando comparadas aos observados com estudo do fluxo gênico em todo o mundo (Goggi et al., 2007; Kawashima et al., 2011). Nesse local, verificou-se que a frequência de pólen advindo da área transgênica para a convencional reduziu com o aumento da distância (Tabela 1). Resultado semelhante a esse é relatado por Riesgo et al. (2010), que estimaram a distância necessária entre milho transgênico e não transgênico para manter a fertilização cruzada abaixo do limiar preconizado pela União Europeia.

Em Ingaí, foi observada diferença significativa para contaminação em relação às distâncias de amostragem, mas não houve diferença significativa entre os diferentes tamanhos de amostras e também entre a interação desse efeito com as distâncias de amostragem (Tabela 1 e 2).

Em condições normais de vento, temperatura e umidade, espera-se que a contaminação em campos de milho convencional nas proximidades do campo transgênico se dê por poucos metros. Nascimento et al. (2012), visando a avaliar o fluxo gênico em milho, coletaram amostras de grãos em lavouras com milho convencional e transgênico e constataram que a contaminação em campos de milho convencional ocorreu nos primeiros metros, de modo semelhante ao observado em Ingaí (Tabela 1).

Na análise de variância conjunta, verificou-se interação significativa entre locais e as distâncias

avaliadas; não foi detectada significância para o fator tamanho de amostra e entre as interações presentes no modelo estatístico empregado (dados não apresentados). A variação observada no fluxo gênico entre esses locais pode ter sido influenciada pela velocidade e direção dos ventos, pressão de pólen entre os híbridos, tamanho dos campos convencionais em relação aos transgênicos e distâncias entre os campos, sendo esses fatores variáveis entre os locais e nos mesmos locais entre os anos (Hoyle & Cresswell, 2007; Galeano et al., 2010).

As contaminações médias em Itumirim, Madre de Deus e Ingaí foram de 0,02%, 0,21% e 0,20%, respectivamente. Sendo esses valores médios de contaminação bem abaixo do limite de 1% estabelecido pela legislação brasileira para rotulagem de alimentos (Brasil, 2003). No entanto, essa baixa magnitude de contaminação observada neste trabalho não permitiu a detecção de diferença significativa entre os diferentes tamanhos de amostras (Tabela 2), o que dificulta o estabelecimento de um tamanho padrão para amostragem em áreas comerciais de milho.

Ao realizar o desdobramento dos fatores distâncias e locais, percebe-se diferença significativa somente na distância de 10 m e no experimento conduzido em Ingaí, respectivamente (Tabela 3), mostrando que na distância e no local supracitados foi detectada maior taxa de fluxo gênico, o que inclusive pode ter sido favorecido pela presença de uma estrada situada entre os campos convencional e transgênico.

Ficou evidenciado, por este trabalho, que o fluxo gênico de um campo transgênico para o convencional na sua maioria ocorre nos primeiros 10 m do campo receptor, o que também é relatado por Viaud et al. (2008) e por Sustar-Vozlic et al. (2010). Isso está de acordo com o estabelecimento da norma de coexistência entre genótipos convencionais e transgênicos

**Tabela 3.** Desdobramento da fonte de variação interação distâncias por locais.

Local	Distâncias (m)				
	5	10	20	50	100
Itumirim	0,00 aA	0,00 bA	0,00 aA	0,10 aA	0,00 aA
Madre Deus	0,22 aA	0,14 bA	0,09 aA	0,39 aA	0,19 aA
Ingai		0,77 aA	0,00 aB	0,02 aB	0,00 aB

As médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

no Brasil e permite o atendimento das exigências de diversos mercados consumidores.

### Conclusões

As porcentagens médias de contaminações de eventos transgênicos em lavouras de milho convencional são muito baixas, sempre inferiores a 1%, independente da distância de amostragem, do local considerado e do tamanho de amostra.

Em função da baixa magnitude de fluxo gênico detectado neste trabalho, não é possível afirmar qual o tamanho de amostra adequado para a determinação do fluxo gênico.

### Agradecimentos

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelas bolsas concedidas aos autores.

### Referências

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**, Brasília, DF, 28 abr. 2003.

CASTRO, C. E. C. **Consequências da contaminação na produção de sementes de híbridos duplos de milho**. 2013. 78 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

COBAIASHI, D. M. **Avaliação da metodologia de detecção e quantificação por PCR em tempo real de organismos geneticamente modificados em alimentos**: aspectos de produção, processamento e amostragem. 2012. 87 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA. Resolução Normativa nº 4, de 16 de agosto de 2007. Dispõe sobre as distâncias mínimas entre cultivos comerciais de milho geneticamente modificado e não geneticamente modificado, visando à coexistência entre os sistemas de produção. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 ago. 2007. Seção 1, p. 19.

EUR-LEX. Regulation nº 1830, 2003 of the European Parliament and of the Council of 22nd September 2003 concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC. **Official Journal of the European Union**, p. 1-28, 2003.

FERREIRA, D. F. **Estatística básica**. Lavras: UFLA, 2005. 663 p.

- GALEANO, P.; DEBAT, C. M.; RUIBAL, F.; FRAGUAS, L. F.; GALVÁN, G. A. Cross-fertilization between genetically modified and non-genetically modified maize crops in Uruguay. **Environmental Biosafety Research**, v. 9, n. 3, p. 147-154, 2010. DOI: 10.1051/ebr/2011100.
- GOGGI, S. A.; LOPEZ-SANCHEZ, H.; CARAGEA, P.; WESTGATE, M.; ARITT, R.; CLARK, C. A. Gene flow in maize fields with different local pollen densities. **International Journal of Biometeorology**, Lisse, v. 51, n. 6, p. 493-503, 2007. DOI: 10.1007/s00484-007-0088-5.
- HOYLE, M.; CRESSWELL, J. E. The effect of wind direction on cross-pollination in wind-pollinated GM crops. **Ecological Applications**, Tempe, v. 17, n. 4, p. 1234-1243, 2007. DOI: 10.1890/06-0569.
- KAWASHIMA, S.; NOZAK, H.; HAMAZAKI, T.; SAKATA, S.; HAMA, T.; MATSUO, K.; NAGASAWA, A. Environmental effects on long-range outcrossing rates in maize. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 142, n. 3/4, p. 410-418, 2011. DOI: 10.1016/j.agee.2011.06.023.
- NASCIMENTO, V. E.; VON PINHO, E. V. R.; VON PINHO, R. G.; SOUZA, J. C.; NASCIMENTO JÚNIOR, A. D. do. Fluxo gênico em milho geneticamente modificado com resistência a insetos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 47, n. 6, p. 784-790, 2012. DOI: 10.1590/S0100-204X2012000600008.
- RIESGO, L.; AREAL, F. J.; SANVIDO, O.; RODRIGUEZ, E. C. Distances needed to limit cross-fertilization between GM and conventional maize in Europe. **Nature Biotechnology**, New York, v. 28, n. 8, p. 780-783, 2010. DOI: 10.1038/nbt0810-780.
- SAS INSTITUTE. **SAS software**: user's guide: version 8.2. Cary, 2000. 291 p.
- SCHUSTER, I. Fluxo gênico e coexistência de lavouras com espécies transgênicas e convencionais. **Informativo Abrates**, Brasília, DF, v. 23, p. 39-45, 2013.
- SUSTAR-VOZLIC, J.; ROSTOHAR, K.; BLEJEC, A.; KOZJAK, P.; ČERGAN, Z.; MEGLIČ, V. Development of sampling approaches for the determination of the presence of genetically modified organisms at the field level. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 396, n. 6, p. 2031-2041, 2010. DOI: 10.1007/s00216-009-3406-4.
- VIAUD, V.; MONOD, H.; LAVIGNE, C.; ANGEVIN, F.; ADAMCZYK, K. Spatial sensitivity of maize gene-flow to landscape pattern: a simulation approach. **Landscape Ecology**, Dordrecht, v. 23, n. 9, p. 1067-1079, 2008. DOI: 10.1007/s10980-008-9264-1.