

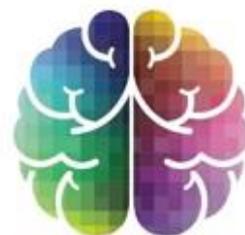


SALÃO DE INICIAÇÃO
CIENTÍFICA JÚNIOR
SALÃO DE INICIAÇÃO
CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA



EXPOULBRA
2015

MOSTRA DAS CIÊNCIAS
E INOVAÇÃO
FÓRUM DE PESQUISA
CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA



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

Carlos A. M. Oliveira¹, Nilo Ikuta² e Vagner R. Lunge²

¹ Acadêmico do curso Agronomia – ULBRA/Canoas – carlos_machado@icloud.com

² Laboratório de Diagnóstico Molecular – ULBRA/Canoas – vagner.lunge@gmail.com

RESUMO

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

PALAVRA-CHAVE: PCR; OGM; Cry gene;

INTRODUÇÃO

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

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

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

Tabela 1: Eventos transgênicos comercializados no Brasil

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

METODOLOGIA

Amostras

Dezoito sementes com cultivar conhecido foram gentilmente fornecidas por cooperativas, empresas produtoras de sementes e agropecuárias locais (Tabela 2).

Além disso, foram obtidas 50 amostras comerciais, incluindo grãos de milho a granel utilizados na formulação de rações (n=13), espigas de milho verde *in natura* (n=27), farinhas de milho (n=6) e latas de milho em conserva (n=4) (Tabela 3). Estas amostras eram de diferentes marcas e locais de produção do estado do Rio Grande do Sul.

Tabela 2: Descrição das sementes de milho com cultivar conhecido

Tipo	Cultivar	HMG	p-35S	Cry 1A.105	t-Nos
Convencional	AG 8025	Pos	Neg	Neg	Neg
	BM 911	Pos	Neg	Neg	Neg
	FORMULA	Pos	Neg	Neg	Neg
	CELERON	Pos	Neg	Neg	Neg
	STATUS	Pos	Neg	Neg	Neg
Transgênico	AG 5011	Pos	Pos	Neg	Neg
	BM 915 PRO	Pos	Pos	Pos	Pos
	BM 3066 PRO2	Pos	Pos	Pos	Pos
	SHS 7990 PRO2	Pos	Pos	Pos	Pos
	SHS 7915 PRO	Pos	Pos	Pos	Pos
	SHS 7920 PRO	Pos	Pos	Pos	Pos
	BM 3063 PRO2	Pos	Pos	Pos	Pos
	FORMULA TL	Pos	Pos	Neg	Pos
	CELERON TL	Pos	Pos	Neg	Pos
	STATUS VIP3	Pos	Pos	Neg	Pos
	STATUS VIP	Pos	Neg	Neg	Pos
	DKB 240 PRO	Pos	Pos	Pos	Pos
	2B647 PW	Pos	Pos	Pos	Pos

Tabela 3: Descrição das amostras de milho e produtos industrializados

	n	HMG	p-35S	Cry 1A.105	t-Nos	
Farinha de Milho	1	Pos	Neg	Neg	Neg	Convencional
	5	Pos	Pos	Pos	Pos	Transgênico
Grãos de Milho	2	Pos	Pos	Neg	Pos	Transgênico
	2	Pos	Pos	Pos	Pos	Transgênico
	1	Pos	Pos	Neg	Neg	Transgênico
	7	Pos	Neg	Neg	Neg	Convencional
	1	Pos	Neg	Neg	Pos	Transgênico
Milho em Conserva	3	Pos	Neg	Neg	Neg	Convencional
	1	Pos	Pos	Neg	Neg	Transgênico
Milho Verde	19	Pos	Pos	Pos	Pos	Transgênico
	3	Pos	Neg	Neg	Neg	Convencional
	1	Pos	Pos	Neg	Neg	Transgênico
	1	Pos	Neg	Neg	Pos	Transgênico
	3	Pos	Pos	Neg	Pos	Transgênico

Extração de DNA

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

Amplificação por PCR

Primers e sondas foram obtidos para a realização do estudo (Tabela 3), onde três regiões genéticas comuns a eventos de milho GM foram analisadas, promotor 35S derivado do vírus da couve-flor (CaMV), terminador t-NOS derivado do gene da nopalina sintase do plasmídeo de *Agrobacterium tumefaciens*, gene principal Cry 1A.105 do *B. thuringiensis* e o gene endógeno do milho HMG. Após, foi realizada a etapa de amplificação do DNA para os genes alvo por PCR em tempo real utilizando o equipamento StepOne Plus (Life Technologies) e com as seguintes condições de amplificação: um ciclo inicial a 95°C por 3 minutos e 45 ciclos de 95°C durante 15 segundos, e 60°C durante 60 segundos para o duplex *cry 1A.105 – hmg* e para os mastermix *p-35S e t-NOS*, utilizamos 40 ciclos com as mesmas condições..

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

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

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram a efetiva detecção dos alvos HMG, p-35S, Cry1A.105 e t-NOS em diferentes amostras de sementes transgênicas (Tabela 2). Em análises comparativas, o PCR em tempo real para o alvo p-35S demonstrou melhor desempenho analítico em comparação ao alvo t-NOS. Conforme esperado, Cry1A.105 foi efetivamente detectado nas cultivares que apresentavam este gene (BM 915 PRO, BM 3066 PRO2, SHS 7990 PRO2, SHS 7915 PRO, BM 3063 PRO2, DKB 240 PRO e 2B647 PW). As regiões promotora p-35S e terminadora t-NOS também foram detectadas apenas nas cultivares que possuíam estas inserções, conforme consulta ao RNC – Registro Nacional de Cultivares (MAPA). Todas cultivares apresentaram resultado positivo para o gene endógeno do milho HMG.

Após, as demais 50 amostras foram analisadas e apresentaram resultado positivo para o gene HMG. Em 14 amostras, nenhum dos alvos de milho OGM foi detectado, sendo consideradas convencionais. As outras 36 amostras apresentaram eventos transgênicos, sendo 26 para os três alvos, cinco para P35S e t-NOS, duas para t-NOS e três para P35S. A aplicação destas técnicas possibilitou detectar a ocorrência de transgênicos em 17 amostras de milho verde, cinco farinhas, seis grãos de milho e um milho em conserva. (Tabela 3)

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

CONCLUSÃO

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

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

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

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

Boom. R.; Sol. C.J.; Salimans. M.M.; Jansen. C.L.; Werheim-Van Dillen. P.M.; Van Der Noordaa J.; Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J Clin Microbiol. 1990 28(3):495-503.

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

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

MAPA. Ministério da Agricultura, Abastecimento e Pecuária. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/registros-autorizacoes/registro/registro-nacional-cultivares>> Acesso em 20/09/2015