

Detecção de Eventos Transgênicos de Milho Através do Teste de Tiras Imunocromatográficas

Micaela Sandim Nascimento¹, Iolanda Vilela Von Pinho², Narjara Fonseca Cantelmo³,
Édila Vilela de Rezende Von Pinho⁴ e Renzo Garcia Von Pinho⁵

^{1,2}Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. ¹micaelasandim@agronomia.ufla.br e ²iolandavvp@hotmail.com ^{3,4,5} Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. ³nacantelmo@hotmail.com, ⁴edila@dag.ufla.br e ⁵renzo@dag.ufla.br.

RESUMO – O crescimento do mercado de transgênicos no mundo demanda das empresas a utilização de métodos rápidos, de baixo custo e de simples manuseio para a detecção do(s) transgene(s) em sementes e grãos. O teste de tiras atende a esses requisitos desde que sejam considerados os fatores que podem interferir no resultado do mesmo, a exemplo do nível de expressão da proteína em sementes e grãos. O nível de expressão dessas proteínas pode ser influenciado pelo parental no qual o gene foi inserido. Objetivou-se neste trabalho avaliar a detecção da expressão da proteína do evento VT-Pro em lotes de grãos de milho contendo os níveis de contaminação de 0,2%, 0,4%, 1,0% e 1,6% e de 0,2%, 0,5%, 0,8% e 1,2% para os eventos RR e Herculex no endosperma, eixo embrionário e semente inteira. Concluiu-se que é possível avaliar a expressão de proteínas referente aos eventos VT-Pro, RR e Herculex quando da utilização de sementes inteiras em lotes de sementes com contaminação de 0,2%.

Palavras-chave: Transgenes, níveis de contaminação, níveis de expressão de proteínas.

Introdução

As últimas décadas foram de intensa revolução na agricultura mundial. A engenharia genética possibilitou, com a técnica do DNA recombinante, importantes avanços no melhoramento genético de várias culturas, devido à combinação de genes entre diferentes espécies de organismos, obtendo-se assim, as plantas geneticamente modificadas também chamadas de plantas transgênicas.

No ano de 2011 foram cultivados 160 milhões de hectares com transgênicos, com crescimento de 12 milhões de hectares em relação ao ano de 2010 (JAMES, 2012).

O cenário de crescimento da adoção da tecnologia não poderia ser diferente no Brasil, que é o segundo país do mundo em área plantada com OGM. Em 2011 foram cultivados no Brasil 30,3 milhões de hectares de lavouras transgênicas, com um crescimento de 20% em relação a 2010, concretizando seu lugar no ranking dos países que mais utilizam a tecnologia dos organismos geneticamente modificados, ficando atrás somente dos Estados Unidos, que cultivaram 69 milhões de hectares. Dos 30,3 milhões de hectares de lavouras OGM no Brasil, 9,91 milhões foram cultivados com milho OGM, o que correspondeu a 64,9% de toda área

plantada com milho no país (JAMES, 2012).

Com o crescimento do mercado de transgênicos, fazem-se necessárias metodologias rápidas e economicamente viáveis para a realização dos testes para a detecção de transgenes, tanto para a identificação de contaminação em sementes quanto em grãos para fins de comercialização. Uma das técnicas que tem sido mais utilizada para o diagnóstico da presença de transgenes é a imunocromatografia, que consiste em uma metodologia simples, não necessita de aparelhos específicos e de mão-de-obra especializada.

A tira imunocromatográfica é um método de detecção indireto pois por meio desta é identificada a proteína produzida pelo gene e não o gene em si, sendo também um teste qualitativo que identifica somente a presença ou ausência dessa proteína.

A detecção da proteína proveniente da transformação genética utilizando a tira imunocromatográfica é baseada em um complexo de anticorpos fixados à tira que são capazes de reconhecer essa proteína. A tira possui anticorpos específicos para a proteína, estes são acoplados a um reagente colorido e incorporados a tira, esse complexo anticorpo-corante se liga então às proteínas-alvo. Quando a tira entra em contato com o extrato que contenha a proteína, forma-se um complexo proteína-anticorpo. Este complexo colorido flui por capilaridade através da tira, que possui duas zonas de captura, uma específica para a proteína alvo e a outra específica para o anticorpo de detecção. O anticorpo de detecção, que não se liga à proteína continua fluindo em direção à parte superior da tira. A presença de apenas uma linha, linha de controle, na membrana indica um resultado negativo, enquanto o aparecimento de duas linhas indica que a amostra é positiva. Nesse teste, o resultado é observado rapidamente, dentro de 5 a 10 minutos (NASCIMENTO, 2010).

O teste de tiras apresenta vantagens desde que sejam considerados os fatores que podem interferir no resultado do mesmo, a exemplo do nível de expressão da proteína em sementes e grãos. 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. Assim o nível de expressão destas proteínas pode ser influenciado pelo parental no qual o gene foi inserido e por consequência influenciar na detecção do evento (INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION - ISTA, 2009).

Assim objetivou-se neste trabalho avaliar a detecção da expressão de proteínas do

evento VT-Pro em lotes de grãos de milho contendo os níveis de contaminação de 0,2%, 0,4%, 1,0% e 1,6% e de 0,2%, 0,5%, 0,8% e 1,2% respectivamente para os eventos RR e Herculex, no endosperma, eixo embrionário e semente inteira.

Material e Métodos

O trabalho foi realizado 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 análise de sementes transgênicas. Foram utilizadas sementes de cultivares comerciais de milho Genesis 2004 convencional, VT-Pro (MON89034), Round up Ready - RR (NK603) e Herculex (TC1507). Com a finalidade de simular diferentes níveis de contaminação, sementes transgênicas (VT-Pro, RR e Herculex) foram misturadas às sementes convencionais, nos níveis de 0,2%, 0,4%, 1,0% e 1,6%, para VT-Pro e 0,2%, 0,5%, 0,8% e 1,2%, para RR e Herculex. Estas proporções foram definidas a partir das especificações do kit comercial da marca Envirologix®, com limite de detecção de 1,0% para o evento VT-Pro e 0,5% para os eventos RR e Herculex.

Antes da realização do teste de tiras foram separados os tecidos das sementes a fim de se verificar o nível de expressão das proteínas nos tecidos. Foram separados o endosperma e o eixo embrionário das sementes de milho, após estas serem embebidas por 5 horas em água. O teste foi realizado em semente inteira, endosperma e eixo embrionário.

O teste foi realizado seguindo-se a metodologia descrita pelo fabricante. Foram utilizadas 500 sementes trituradas por 60 segundos. Foi adicionado ao milho triturado 1,5x seu peso de água, seguido da agitação da amostra. Foi pipetado 0,5 mL do sobrenadante o qual foi acondicionado no tubo de reação onde foi inserida a tira. Após 10 minutos foram analisados os resultados.

Para cada evento foi utilizado como controle positivo, sementes transgênicas, e como controle negativo, sementes convencionais.

Resultados e Discussão

A expressão da proteína para o evento MON89034, no nível de detecção de 1%, nível de detecção recomendado pelo fabricante, não foi observada apenas no eixo embrionário. Quando da utilização de eixos embrionários, a expressão da proteína foi observada em lotes de sementes de milho contendo 1,6% de contaminação (Tabela 1). Quando foram utilizadas

sementes inteiras, detectou-se a expressão da proteína em todos os níveis de contaminação. Assim infere-se que é possível detectar a expressão de proteínas relacionadas a esse gene em níveis inferiores aos sugeridos pela empresa. Também se pode sugerir que o transgene foi inserido no parental feminino, visto que foi necessário a junção das quantidades de proteínas produzidas pelo eixo embrionário e pelo endosperma, na semente inteira, para que houvesse a detecção do evento, em níveis abaixo do sugerido pela empresa, sendo a detecção no eixo embrionário observada em quantidade de contaminação superior ao recomendado pela empresa.

Os resultados de detecção de expressão de proteínas correspondentes aos eventos TC1507 e NK603 foram semelhantes entre si, com exceção da ausência de expressão da proteína nos níveis de contaminação 0,8% e 1,2%, no endosperma para o evento TC1507 (Tabela 2). Para o evento NK603, a partir do nível de contaminação de 0,8% foi observada a expressão da proteína em todos os tecidos (Tabela 3).

Por meio dos resultados obtidos infere-se que o transgene foi possivelmente inserido no parental masculino, uma vez que a menor expressão de proteínas foi observada no endosperma, havendo a necessidade de aumentar o nível de contaminação para a detecção da proteína, uma vez que o endosperma possui 1n do parental masculino e 2n do parental feminino.

Em ambos os eventos, mesmo em lotes com o menor nível de contaminação, de 0,2%, foi possível a detecção da expressão das proteínas quando da utilização de sementes inteiras. Provavelmente as empresas adotem os níveis de detecção apresentados no kit para maior segurança evitando-se de alguma forma resultados falsos negativos.

Conclusão

É possível avaliar a expressão de proteínas referente aos eventos VT-Pro, RR e Herculex quando da utilização de sementes inteiras com níveis de contaminação de 0,2%.

Literatura Citada

JAMES, CLIVE. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011. ISAAA Brief 43-2011: Status Global das Variedades Transgênicas/Biotecnológicas Comerciais: 2011. <<http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/43/highlights/pdf/Brief%2043%20-%20Highlights%20-%20Portuguese.pdf>>.

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.

NASCIMENTO, VIVIAN ELIAS. Fluxo gênico e métodos de detecção e quantificação de milho geneticamente modificado. 2011.117 p. (Doutorado – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG).

Tabela 1. Resultado do teste de tiras imunocromatográficas da proteína Cry2Ab – Evento MON89034 (VT-Pro)

Tecido	Nível de Contaminação			
	0,2%	0,4%	1,0%*	1,6%
Endosperma	-	-	+	+
Eixo Embrionário	-	-	-	+
Semente Inteira	+	+	+	+

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

Tabela 2. Resultado do teste de tiras imunocromatográficas da proteína Cry1F – Evento TC1507 (Herculex)

Tecido	Nível de Contaminação			
	0,2%	0,5%*	0,8%	1,2%
Endosperma	-	-	-	-
Eixo Embrionário	+	+	+	+
Semente Inteira	+	+	+	+

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

Tabela 3. Resultado do teste de tiras imunocromatográficas da proteína CP4EPSPS – Evento NK603 (Round up Ready)

Tecido	Nível de Contaminação			
	0,2%	0,5%*	0,8%	1,2%
Endosperma	-	-	+	+
Eixo Embrionário	+	+	+	+
Semente Inteira	+	+	+	+

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