



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

Flor Rivera López

**RELAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE
MILHO OGM E A FREQUÊNCIA DE FENÓTIPOS ANORMAIS NAS
VARIEDADES DE MILHO NATIVO, NA REGIÃO VALES CENTRAIS,
OAXACA, MÉXICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari

Florianópolis, Maio 2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da
Universidade Federal de Santa Catarina

L864r López, Flor Rivera

Relação entre a presença de proteínas recombinantes de milho OGM e a frequência de fenótipos anormais nas variedades de milho nativo, na região Vales Centrais, Oaxaca, México [dissertação] / Flor Rivera López ; orientador, Rubens Onofre Nodari. - Florianópolis, SC, 2011.

128 f.: grafs., tabs.; 30 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Curso de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

1. Recursos genéticos vegetais. 2. Milho - Oaxaca, Vale de (México). 3. Milho crioulo - Variedades. 4. Organismos transgênicos - Oaxaca, Vale de (México). 5. Fenótipo. I. Nodari, Rubens Onofre. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. III. Título.

CDU 631

Flor Rivera López

**Relação entre a presença de proteínas recombinantes de milho ogm e
a frequência de fenótipos anormais nas variedades de milho nativo,
na região vales centrais, oaxaca, México**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Ciências” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Florianópolis, 27 de maio de 2011.

Prof. Rubens Onofre Nodari, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari
Presidente e Orientador (CCA/UFSC)

Dr. Haroldo Tavares Elias
Membro (EPAGRI)

Dr. Claudio Martínez Debat
Membro (UDELAR)

Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra
Membro (CCA/UFSC)

Dedicatória

Às comunidades indígenas e camponesas ...

Que apesar de encontrar grandes adversidades, continuam lutando pelo direito a ter e oferecer uma alimentação saudável e justa, e assim criar um mundo melhor para todos nós.

Às comunidades indígenas e camponesas mexicanas ...

Que têm me mostrado que a unidade e o amor são maiores que a injustiça e a raiva, e que é com paciência e constância que se geram as verdadeiras mudanças.

Às comunidades indígenas e camponesas da Rede em Defesa do Milho ...

Que tem me oferecido uma sincera amizade e compromisso. Sem vocês este trabalho não poderia ter sido concebido, nem realizado. Obrigada por ter o carinho e a confiança de compartilhar comigo todo o seu trabalho, conhecimento e sentimentos.

Agradecimentos

- Ao Pão para o Mundo, CAPES, CNPq, University of Guelph, Ceccam e Genok pelo apoio financeiro para a realização do mestrado e do projeto.
- Ao Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Biologia, UNAM. Assim como aos laboratorios de Genética Molecular, Desarrollo y Evolución de Plantas e de Alelopatía do Instituto

de Ecologia UNAM, pela liberdade de uso dos equipamentos e assessoria técnica prestada.

- Ao Dr. René Van Acker por ter acreditado em mim e no meu projeto, ainda sem me conhecer, e ter feito possível a realização deste projeto.
- À Gisella Mann e Wolfgang Seiss pela constante motivação e apoio.
- À Odd-Gunnar Wikmark, Thomas Bohn e Terje Traavik, por acreditar no meu projeto e me apoiar para o concluir com êxito.
- Às Dra. Jenny Solange Sotuyo e Dra. Laura Valdelamar pela assessoria técnica, ajuda desinteressada e sobre todo pela amizade e bons momentos compartilhados no laboratório.
- Às comunidades de ORAB, porque sem vocês este trabalho não poderia ter sido feito. Agradeço também os ensinamentos de vida e o carinho recebido.
- À Aldo González por me encorajar a fazer o projeto, ainda em contra de muitas opiniões.
- Ao Ceccam, pela ajuda incondicional, facilitar minha estadia no Mexico e sobre todo pelos momentos divertidos.
- A Georgita Ruiz e Manuel Grosselet, pela amizade e ajuda prestada em Oaxaca.
- A Eneas e família, pela paciência e ajuda desinteressada para arrumar as amostras. E sobretudo pelos momentos divertidos.

- À Dra Rocio Cruz pela paciência, apoio e sobre todo por aceitar ficar até altas horas da noite só para me esperar terminar as análises.
- Ao Dr. Rubens Nodari pela orientação e todo o aprendizado recebido.
- Ao Dr. Jack Heinemann, pelo apoio incondicional e assessoria constante a pesar da distância. Mas sobre tudo pela sincera amizade.
- À Brigitta Kurenbach e Ao Leighton Turner, pelas suas contribuições e debates de madrugada.
- À Dra. Ana de Ita, pelas lições de ética, respeito e paixão pelo trabalho. Mas sobre todo pela amizade e paciência para me formar como a profissional que sou hoje.
- Ao Álvaro Salgado, pelas suas contribuições na realização deste texto, e pelo conhecimento transmitido sobre como trabalhar em comunidade. Assim como pelo apoio moral e a amizade.
- A Berna, por todo o apoio, paciência e eficiência para possibilitar minha vinda no Brasil. E continuar me apoiando durante minha estadia.
- À Alma Piñeyro-Nelson, pela sua continua disposição de compartilhar sua experiência e conhecimento, a sua transparência e franca amizade.
- À Sérgio Vela e Jorge Klimba pela ajuda na maceração de tantas e tantas amostras, sua assessoria técnica mas sobre todo por harmonizar e fazer meus dias no lab muito divertidos.

- À Caro e Edith, por ter me salvado na moida de amostras no ultimo minuto! e pelos momentos divertidos.
- A Nicole, Vinicius, Sarah, Joel, Denise e Leo pelas correções do portunhol no presente texto.
- Aos meus collegas do LFDGV, por assumir a missão impossível de tornar minha estadia no Lab divertida e agradável!
- Aos collegas da molecoulounge: Alison alias o “chefinho” o Vini alias “chatinho”, a maluquinha, Gustavo, Vane, Tiago, Paula, e Morgana pela ajuda, paciencia e assessoria sorridente. Obrigada mesmo!
- Ao super team OGM da UFSC : Sarah, Elena e o nosso agregado Fredrick, por ser os melhores parceiros que alguém pode ter, e se dispor com paciência a ser meu ECO de pensamento. Mas sobre todo pela amizade profunda que a gente tem!
- À Ari, Rodri, Cris, Joel, Nicole, Peggy, Domingas e Zamira, por ser meus companheiros de festa, compartilhar alegrias e também tristezas mesmo a distância.
- Ao Leo por ser minha maior companhia, tornando a minha vida no Brasil mais feliz. AMVMA.
- Aos amigos que se bem nem todos os nomes se encontram explicitados, tem me acompanhado sempre. Obrigada pelo carinho!
- À Familia López por simplesmente ser minha familia a quem amo muito.

- À meus pais e meus irmãos por ser a coluna da minha vida, e o meu maior exemplo de amor e perseverancia.
- À Deus por ser o Tudo.

Resumo

México é o centro de origem e diversidade do milho e, portanto, seu cultivo tem grande importância no país. Apresentando uma grande riqueza genética e representando o principal alimento e tem um valor cultural muito grande, o milho significa a “carne e o sangue” “o pai, a mãe e o filho”. Por isto quando Quist e Chapela comprovaram em 2001, a introgressão de DNA transgênico em variedades nativas (sinônimo de crioulas), a reação da sociedade em geral foi de forte preocupação. Assim desenvolveram-se pesquisas com a finalidade de conhecer a extensão e a intensidade do fluxo e introgressão de transgenes em variedades nativas. Um destes estudos foi o estudo realizado por organizações sociais, agricultores e indígenas pertencentes à Rede em Defesa do milho. Membros da Rede identificaram no ano 2005, deformações nas plantas do milho nunca antes constatadas e suspeitaram que estas anormalidades fossem causadas pela presença de transgenes. Assim, neste contexto, o presente estudo buscou verificar a existência de uma relação entre a presença de transgenes e a aparição de novos fenótipos anormais em milho em cinco comunidades na região de Vales Centrais de Oaxaca. Foi amostrado tecido foliar de 500 plantas de milho nativo com fenótipos anormais e 500 com fenótipos normais. A análise de detecção de proteínas recombinantes foi feita por Kits comerciais ELISA e comparou-se a frequência da presença de proteínas recombinantes entre plantas de fenótipos distintos. Obteve-se presença de pelo menos um transgene em 17,9% das plantas

amostradas, sendo a proteína Cry1Ab a de maior frequência entre as três proteínas testadas. Encontrou-se uma diferença estatisticamente significativa ao comparar-se a frequência de proteínas recombinantes em fenótipos anormais (117/500) com fenótipos normais (62/500). Ao testar os resultados de frequência de presença de proteínas recombinantes nos diferentes fenótipos, com o teste chi-quadrado e o teste de comparações emparelhadas encontrou-se uma diferença estatística significativa ($P < 0,001$). Com base nos resultados obtidos com os testes de proteínas, discute-se a pertinência de utilizar critérios de determinação de resultados positivos à presença de proteínas recombinantes, que se ajustem às características de variedades nativas. Sugere-se mais análises de modo a validar a relação entre a presença de transgenes e a maior proporção de fenótipos anormais.

Palavras-chaves: Organismos Geneticamente Modificados, contaminação genética, fluxo gênico, transgênicos, deformações.

Abstract

Mexico is the center of origin and diversity of maize; its cultivation, therefore, has great importance in the country. Maize in Mexico presents a great genetic richness, is the main staple food and has a great cultural value. For Mexicans maize means their "flesh and blood" and it is considered as "father, mother and child". Therefore, when Chapela e Quist in 2001, showed the DNA introgression of transgenes in landraces, the reaction in all sectors of society was one of great concern. Thus, surveys were developed aiming to ascertain the extent and intensity of transgene flow and introgression in the landraces. Among these efforts is the study conducted by social organizations, farmers and indigenous people belonging to the Network in Defense of Maize. In 2005 members of this network identified abnormalities on maize plants that have never verified seen before. They suspected that these abnormalities could be caused by the presence of transgenes. Bearing this in mind, this study aims to verify the existence of a relationship between the presence of transgenes and the appearance of new abnormal phenotypes. For this purpose, a sample of 500 plants with abnormal phenotypes and 500 with normal phenotype was collected in five communities of the Central Valley region in Oaxaca. Detection of recombinant proteins was done by ELISA commercial kits and the frequency of presence of recombinant proteins between plants of both phenotypes was compared. The presence of at least one transgene in 17.9% of the 1000 sampled plant was observed and Protein Cry1Ab showed to be most

frequent among the three tested proteins. When comparing the frequency of recombinant proteins in abnormal (117/500) and normal (62/500) phenotypes a statistically significant difference was found. The results of the recombinant proteins frequencies in different phenotypes, were then tested by chi-square test and pairwise comparisons, which showed statistical significance ($P < 0.001$). In this study we discuss the relevance of using specific criteria for determining positive results to the presence of recombinant proteins, that fit the characteristics of native varieties. This study is the first systematic approach to uncovering a relationship between the presence of transgenes and phenotypic abnormalities in Mexican maize landraces. Further analysis to validate this relationship is suggested.

Keywords: Genetic Modified Organisms, genetic contamination, gene flow, transgenics, malformations.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Plantas (A, B e C) infectadas com o fungo <i>Sclerophthora macrospora</i> . A doença míldio se expressa com estruturas foliares no pendão. Fotos: Flor Rivera Lopez.	26
Figura 2. Fenótipos anormais decorrentes de mutações genéticas no milho encontrados no presente estudo. A. <i>ts 2</i> , sementes no pendão; B. <i>ms 9</i> macho esterilidade; C. <i>id 1</i> crescimento indeterminado; D. <i>f 1</i> listra fina; E. <i>br 1</i> braquítico; F. <i>bz 2</i> bronze; G. <i>ts 3</i> sementes no pendão; H. <i>ts 1</i> sementes no pendão; I. <i>a 2</i> , sem antocianina; J. <i>py 1</i> , planta pigmea; K. <i>bz 1</i> , bronze; L. <i>ms 8</i> , macho esterilidade; M. <i>bd 1</i> , ramificações sem seda; N. <i>mu</i> , transposon mutator. Fonte: NEUFFER et al. (1997).	28
Figura 3. Exemplo de DNA de transferência (T-DNA) de uma planta transgênica de trigo resistente a herbicida glifosato Fonte: ZHOU et al. (2003).	34
Figura 4. Mapa do México com as localidades dos centros da origem-domesticação e os centros da diversificação primária do milho. Fonte: KATO (2009).	38
Figura 5. Distribuição do Teocintle no México. Fonte: SERRATOS et al. (1995).	39
Figura 6. Localização dos lugares de coleta das raças de milho (pontos amarelos) e teosintes (pontos vermelhos) no México (CONABIO, 2009). Fonte: KATO et al. (2009).	44
Figura 7. Provas de campo e detecção de milho transgênico no México. Fonte: SERRATOS (2010).	51
Figura 8. Tipos de ELISA com anticorpos marcados. Desenho: Leonardo K. Sampaio.	58
Figura 9. Localização das amostras	61
Figura 10. Etapas do projeto e responsabilidades dos participantes....	67
Figura 11. Fenótipos anormais não reportados pela literatura citada A. Espiga super alongada na forma de galo, saindo do mesmo nodo de outra espiga; B. Elongamento da espiga; C. Espigas cheias de folhas e com uma espiga com grãos saindo, com coloração bronze. D. Elongamento da espiga com folhas na ponta, pendão com inflorescencias lembrando à mutação de adherencia foliar ou esterilidade masculina; E. Elongamento de espiga com folhas enrugadas na ponta; F. Elongamento de espiga, coloração bronze e folhas na ponta como se fosse galo; G. Elongamento de espigas paralelas ao	

tronco, a maneira de troncos paralelos ou galos, com folhas estreitas e bicudas nas pontas das espigas; H. Espiga que não produz na ponta da espiga um primórdio de pendão e folhas aciculadas e compridas; I. Alongamento das espigas em forma de galos com alguns grãos na ponta expostos.	81
Figura 12. Valores de DO detectados na análise da proteína CP4EPSPS realizada em folhas de milho.	86
Figura 13. Valores de DO detectados na análise da proteína Cry1Ab realizada em folhas de milho.	87
Figura 14. Valores de DO detectados na análise da proteína Cry9c.	88
Figura 15. A. Placa de Elisa para a detecção da proteína Cry1Ab, correspondente as amostras 271- 315, onde as amostras dentro dos pocinhos 7D, E e F são classificadas como positivas, seguindo os critérios de Envirologix. B. Placa de Elisa para a detecção da proteína CP4EPSPS, correspondente as amostras 271- 315, onde as amostras dentro dos pocinhos 7D, E e F são classificadas como negativas, seguindo os critérios de Envirologix.	96
Figura 16. A. Placa de Elisa para a detecção da proteína Cry1Ab, correspondente as amostras 451- 495 B. Placa de Elisa para a detecção da proteína Cry9c, correspondente as amostras 451- 495, onde as amostras dentro dos pocinhos 1F e H coincidem em um resultado positivo. Em contraste com os pocinhos 6D e 12 F onde os resultados diferem.	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ensaios de milho transgênico aprovados oficialmente no México entre 1993-1999*	47
Tabela 2. Eventos de milho transgênico que podem ser detectados por meio da presença das proteínas: CRY1Ab, CRY9c e CP4EPSPS com os Kits Envirologix.	71
Tabela 3. Protocolos dos kits para detecção de proteína Envirologix... ..	75
Tabela 4. Número de plantas de fenótipos anormais com proteína recombinante detectada pelo método ELISA, com base nos critérios sugeridos pela empresa Envirologix.....	83
Tabela 5. Número de plantas com fenótipos normais com proteína recombinante detectada pelo método ELISA, com base nos critérios sugeridos pela empresa Envirologix.....	84
Tabela 6. Número e percentagem de plantas com proteínas recombinantes detectadas pelo método ELISA, com base nos critérios sugeridos pela empresa Envirologix, nas cinco comunidades amostradas.....	85
Tabela 7. Número de plantas com presença ou ausência de transgenes, agrupados por fenótipo (normal ou anormal) e teste do qui-quadrado.	89

Abreviações

DNA: Ácido desoxirribonucleico

RNA: Ácido ribonucleico

OGM: Organismo Geneticamente Modificado

Ac: Transposon ativador

Ds: Transposon dissociador

T-DNA: DNA de transferência

CaMV: Virus do mosaico da couveflor

NOS: Nopaline sintetase

D.O : Densidade Ótica

ELISA: Ensaio por imunoabsorção ligado às enzimas

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

ORAB: Organização de Agricultores Biológicos

OCDE: Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Econômico

CIMMYT: Centro Internacional para o Melhoramento do Milho e o Trigo

FAO: Organização para a Alimentação e a Agricultura

SAGARPA: Secretaria da Agricultura, Pecuária, Desenvolvimento Rural, Pesca e Alimentação.

CENAMI: Centro Nacional de Apoio às Missões Indígenas

CONABIO: Comissão Nacional para a Conservação da Biodiversidade

CINVESTAV: Centro de Pesquisas Avançadas

INIFAP: Instituto Nacional de Pesquisas Agroflorestais

CNBA: Comitê Nacional de Biossegurança Agrícola

TLCAN: Tratado de Livre Comércio da América do Norte.

LBOGM: Lei de Biossegurança dos Organismos Geneticamente Modificados

Sumario

1. Introdução	18
2. Revisão Bibliográfica	21
2.1 O milho	21
2.1.1 <i>Taxonomia</i>	21
2.1.2 <i>A planta</i>	21
2.1.3 <i>Ferramenta de pesquisa genética</i>	23
2.2 Possíveis causas de fenótipos anormais	25
2.2.1 <i>Causas patológicas</i>	25
2.2.2 <i>Causas não patológicas</i>	27
2.2.2.1 <i>Fatores ecológicos</i>	29
2.2.2.2 <i>Endogamia</i>	29
2.2.2.3 <i>Transposons</i>	31
2.2.2.4 <i>Transgenia</i>	33
2.2.2.5 <i>Acumulação de transgenes</i>	35
2.3 Importância do milho no México	37
2.3.1 <i>Centro da origem</i>	37
2.3.2 <i>Importância Socioeconômica</i>	39
2.3.3 <i>Importância Cultural</i>	41
2.3.4 <i>Riqueza genética</i>	42
2.4 <i>Milho transgênico no México</i>	45
2.4.1 <i>Primeiros experimentos</i>	45
2.4.2 <i>Fluxo transgênico com variedades nativas</i>	49
2.4.3 <i>Lei de Biosegurança e plantações experimentais</i>	52
2.5 <i>Técnicas de detecção de transgenes</i>	53
2.5.1 <i>Detecção de ácidos nucléicos</i>	54
2.5.1.1 <i>Reação em Cadeia da Polimerase, (PCR)</i>	54
2.5.1.2 <i>Southern Blot</i>	55
2.5.1.3 <i>Northern Blot</i>	56
2.5.2 <i>Detecção de proteínas</i>	56
2.5.2.1 <i>Western Blot</i>	56
2.5.2.2 <i>Ensaio por imunoabsorção ligado à enzimas (ELISA)</i> ..	57
3. Objetivos	59
3.1 <i>Objetivo geral</i>	59
3.2 <i>Objetivos específicos</i>	59
4. Área de Estudo	60
4.1 <i>Vales Centrais de Oaxaca</i>	60
4.1.1 <i>As comunidades</i>	61

4.1.2 A Organização de Agricultores Biológicos de Oaxaca	65
5. Material e Métodos	66
5.1 Enfoque participativo.....	66
5.2 Amostragem.....	69
5.3 Detecção de Proteínas.....	70
5.4 Análise Estatística.....	77
6. Resultados	79
6.1 Enfoque participativo.....	79
6.2 Fenótipos Anormais.....	80
6.3 Presença de Proteínas Recombinantes.....	82
6.3 Análise Estatística.....	88
6.3.1 <i>Teste Qui-quadrado</i>	88
6.3.2 <i>Teste de hipóteses em comparações emparelhadas</i>	91
7. Discussão	92
7.1 Critérios para determinar a presença de proteínas.....	92
7.2 Causas de fenótipos anormais.....	99
7.2.1 <i>Causas propostas pelos agricultores</i>	99
7.2.2 <i>Causas patológicas</i>	100
7.2.3 <i>Condições Ecológicas</i>	101
7.2.4 <i>Endogamia</i>	102
7.2.5 <i>Transposons e transgenia</i>	104
7.2.6 <i>Acumulação de Transgenes e Epigénese</i>	106
8. Considerações finais	111
9. Referencias	114

1. Introdução

Em 2001 Quist e Chapela mostraram introgressão de DNA transgênico em variedades nativas, termo utilizado na presente dissertação como sinônimo de variedade crioula do milho no México. Esta notícia impactou a sociedade científica mundial, a qual respondeu de diferentes maneiras. Algumas com preocupação e interesse científico para corroborar com os resultados (EZCURRA et al., 2002) e outras criticando o estudo (KAPLINSKY et al., 2002; METZ e FÜTTERER, 2002). No entanto, surgiu também uma preocupação por parte de todos os setores da sociedade, especialmente dos agricultores e povos indígenas do México, para quem o milho significa a essência da vida em si.

Desde 2001, muitos trabalhos para conhecer a situação e extensão do fluxo de transgenes foram executados no México (MERCER e WAINWRIGHT, 2008). Dentre eles foi realizado um biomonitoramento participativo por parte da Rede em Defesa do Milho, uma representação da sociedade civil e de organizações de agricultores e indígenas. Em 2003, através do biomonitoramento a Rede obteve os resultados da pesquisa efetuada em 33 comunidades indígenas de 9 estados do México, mostrando a presença de proteínas recombinantes, nas variedades nativas, por meio do uso de Kits de detecção ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay). As proteínas analisadas e encontradas nas variedades nativas no estudo da Rede foram: 1) Cry1A(b), que foi incorporada nas variedades comerciais do milho Bt; 2) CP4 EPSPS, proteína expressa na variedade Roundup Ready; e 3) Cry9c,

proteína incorporada no milho Starlink, variedade que não havia sido autorizada para consumo humano em nenhuma parte do mundo. É importante ressaltar que estas variedades transgênicas não estão autorizadas para o cultivo comercial no México.

A Rede em Defesa do Milho continuou a execução do biomonitoramento nos anos subsequentes nas comunidades indígenas no México, encontrando constantemente resultados positivos à presença de proteínas recombinantes nas variedades crioulas. Em 2005, agricultores indígenas de Oaxaca reportaram o surgimento de anormalidades nas plantas do milho nativo, depois de ter sido confirmada a presença de proteínas recombinantes no estado, e que nunca tinham sido encontradas nas comunidades até os anos recentes (QUIST e CHAPELA, 2001; EZCURRA et al., 2002; PIÑEYRO-NELSON et al., 2009). Não foi surpresa que os agricultores consideraram que as anormalidades eram decorrentes da presença de transgenes nas variedades nativas. A Rede em Defesa do Milho analisou as plantas com fenótipos anormais com o fim de detectar a presença de transgenes. Os resultados obtidos na análise mostraram presença de pelo menos uma proteína recombinante em 13 das 115 plantas anormais amostradas em 10 comunidades indígenas. Este valor corresponde a 11,30% das plantas anormais amostradas com presença de transgenes. Já no biomonitoramento realizado em 2003 pela Rede, 5,79% das plantas normais analisadas mostraram presença de pelo menos uma proteína recombinante. Os dois biomonitoramentos realizados pela Rede em Defesa do Milho, em 2003 e 2005, oferecem uma primeira aproximação para conhecer se a maior frequência de

transgenes está associada ou não às deformações. Pelo fato do estudo responder às necessidades das comunidades, não foi estabelecida uma análise sistemática e estatisticamente comparável que possa ser suficiente para que os dados sejam cientificamente conclusivos.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 O milho

2.1.1 Taxonomia

Família: Poaceae

Subfamília: Panicoideae

Tribo: Maydeae

Gênero: *Zea*¹

Espécie: *Zea mays* L. (OCDE, 2003)

2.1.2 A planta

O milho é uma planta monocotiledônea anual, pertencente ao grupo das gramíneas. Tem um colmo cilíndrico que pode variar entre 1 e 5 metros de altura, com nós compactos. Cada nó produz, dependendo de sua localização, alguma parte da planta. Assim, os nós que se encontram abaixo do solo produzem raízes, os que se encontram ao nível do solo, ou apenas superficialmente, produzem raízes adventícias ou perfilhos e os nós que se localizam por cima do solo criam as folhas, as quais podem ficar no estado de folha ou se desenvolver em inflorescências femininas, conhecidas como “bonecas”. A inflorescência masculina ou pendão é desenvolvido a partir da extensão do colmo (PATERNIANI e PINTO VIEGAS, 1987).

O pendão consiste em um eixo central e várias ramificações onde se encontram as espiguetas em pares. As espiguetas se encontram protegidas por duas brácteas ou glumas, que envolvem as flores. Cada flor contém três estames, nos quais se desenvolvem os

grãos de pólen. O pendão é posicionado perfeitamente para a dispersão de grande quantidade de pólen, pelo vento. A flor feminina ou espiga é formada por uma ráquis central, aonde se inserem as espiguetas em pares. Cada espigueta contém duas flores pistiladas, sendo uma fértil e outra abortiva. As flores, que se arranjam em fileiras paralelas, possuem um ovário único e um estilete extremamente comprido, com propriedades estigmáticas, conhecido como “barba”, aonde o pólen germina. Uma espiga pode produzir cerca de 400 a 1000 grãos em até 24 fileiras (PATERNIANI e PINTO VIEGAS, 1987; PIÑEYRO-NELSON, 2007; KATO et al., 2009; TURRENT et al., 2009).

O milho é uma planta monóica, pois contém os dois sexos na mesma planta, mas as inflorescências são unissexuais. Também é uma planta protândrica, onde as inflorescências masculinas maturam antes que as inflorescências femininas. A separação de sexos tem permitido identificar genes que intervêm na determinação de sexos (CANDELA e HAKE, 2008).

O fato de ser uma planta monóica e protândrica favorece a sua diversidade genética, pois facilita a recepção de alelos alheios e aproximadamente 5% dos grãos são autofecundados. O milho é uma planta de polinização aberta tendo assim uma grande propensão aos cruzamentos. Seus grãos de pólen são capazes de viajar de 100 a 1000 metros com ajuda do vento (PIÑEYRO-NELSON, 2007; TURRENT-FERNÁNDEZ et al., 2009). Adicionalmente, existem insetos que auxiliam na polinização das plantas. Também o homem acaba intervindo de maneira importante como polinizador, através do intercâmbio de sementes entre agricultores. Segundo Dyer et al. (2009), as trocas de

sementes podem aumentar consideravelmente a velocidade de dispersão e intercâmbio genético entre as diferentes variedades de milho.

O genoma do milho se encontra organizado em dez cromossomos ($2n=20$), com aproximadamente 2.4×10^9 pares de base e dez vezes maior que o do arroz. A explicação para isso é devido à presença de grandes quantidades de transposons, em particular de retrotransposons. O milho é alotetraplóide com regiões de cópias duplicadas no genoma. Portanto, os fenótipos mutantes de alguns genes ficam invisíveis, a não ser que a mutação ocorra em ambas as cópias. Isso pode ocorrer mesmo que em outros genes esteja ausente uma das cópias ou esteja funcionando de forma incorreta (HANLEY et al., 2000; CANDELA e HAKE, 2008).

2.1.3 Ferramenta de pesquisa genética

Várias são as características que fazem do milho uma boa ferramenta de pesquisa genética. Desde as vantagens práticas como a facilidade de intercruzamento, até a sua complexidade genética que permite entender diversos processos evolutivos e genéticos das plantas superiores. O milho foi utilizado nos estudos genéticos desde os tempos de Mendel, para corroborar os resultados obtidos com ervilhas. Também foi usado por Darwin para estudos sobre efeitos de endogamia. No entanto, foi na década de 1940 que a genética do milho tornou-se de grande interesse para avançar no conhecimento sobre a genética das plantas.

Bárbara McClintock descobriu a existência dos transposons no milho. Eles são pequenas sequências que têm capacidade de duplicar-se e translocar-se dentro dos cromossomos. Esta descoberta abriu inúmeras possibilidades para entender fenômenos genéticos. Os transposons têm sido essenciais para a compreensão da estrutura e evolução cromossômica. Uma vez iniciada a clonagem de alguns segmentos do genoma e de genes de milho, novos transposons foram descritos. Com isto, além de facilitar a clonagem de genes específicos em outras plantas, foi possível conhecer a presença de retrotransposons não só no milho, mas também em outras plantas, como por exemplo, o arroz. Adicionalmente, observou-se que estes elementos transponíveis ocupam um grande espaço nos genomas das plantas. Considera-se que entre sessenta e noventa por cento do tamanho do genoma do milho é formado por transposons e retrotransposons (BIÉMONT e VIEIRA, 2006; PRAY, 2008).

Os transposons são responsáveis pela expansão do genoma, uma vez que têm a “capacidade” de se duplicar e de distribuir estas cópias ao longo do genoma. Isto gerou grande curiosidade científica sobre o papel destes transposons no genoma. Inicialmente, os elementos transponíveis foram chamados de “DNA lixo”, pois não eram uma parte codificante do DNA. Também foram chamados “genes egoístas” (DAWKINS, 1989), pois ocupavam um grande espaço, utilizavam muita energia e não tinham uma função aparente. No entanto, podem se inserir em sequências codificantes e provocar mutações no genoma do organismo, particularmente quando se deslocam de um loco para outro.

Na atualidade, sabe-se que os transposons cumprem um papel regulatório essencial dentro do genoma das plantas. Entender os mecanismos regulatórios dos transposons pode esclarecer os mecanismos evolutivos das plantas. Isto tem promovido que uma ampla comunidade de pesquisadores se dediquem ao estudo do milho, gerando conhecimento da planta, o que facilita pesquisas posteriores. Por isto o milho torna-se um bom modelo de pesquisa genética (McCLINTOCK, 1961; McCLINTOCK, 1987; McCLINTOCK e HARBOR, 1993; FEDOROFF, 2000; HANLEY et al., 2000; BRENDDEL et al, 2002; BIÉMONT e VIEIRA, 2006; CANDELA e HAKE, 2008).

2.2 Possíveis causas de fenótipos anormais

2.2.1 Causas patológicas

O milho pode ser atacado por bactérias, vírus, helmintos ou fungos, sendo estes últimos os principais patógenos que afetam o seu cultivo. Dependendo do patógeno, podem provocar danos nas folhas, espigas ou grãos, pendão, colmo e raízes. Entretanto, a maioria causa podridões, manchas foliares, enrugamentos, acamamentos e são poucas as doenças que realmente levam a planta a ter variações morfológicas evidentes e extremas, como no caso da doença *ponca louca* (Figura 1), causada pelo fungo *Sclerophthora macrospora* (CIMMYT, 2004; REIS et al., 2004) .

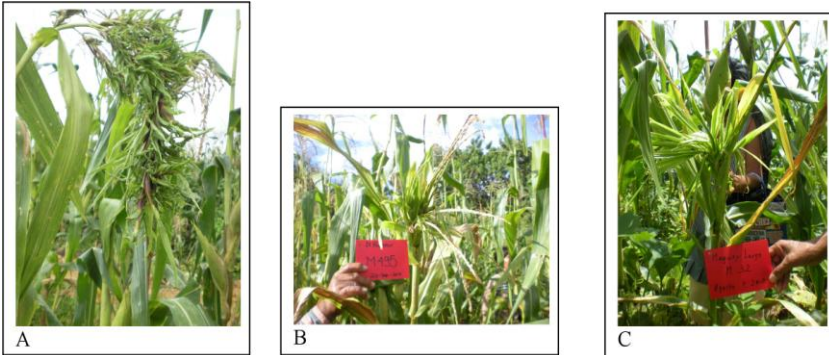


Figura 1. Plantas (A, B e C) infectadas com o fungo *Sclerophthora macrospora*. A doença míldio se expressa com estruturas foliares no pendão. Fotos: Flor Rivera Lopez.

Segundo os patologistas, é difícil diagnosticar uma doença infecciosa. Fatores ecológicos podem promover a infecção de certo patógeno e muitas das doenças podem ser causadas estritamente por estes fatores ecológicos, sem intervenção do patógeno (TUIE, 1969; REIS et al., 2004; AGRIOS, 2005). Os fatores climáticos mais importantes que envolvem a relação hospedeiro-patógeno são a disponibilidade hídrica e a temperatura. A água é fator determinante para a ocorrência de doenças parasitárias e a temperatura age como um catalisador, ou seja, retarda ou acelera o processo de reprodução dos patógenos. Em relação à água, o importante não é a precipitação pluvial, mas a permanência desta na superfície da planta, denominado molhamento na superfície dos órgãos verdes (REIS et al., 2004; AGRIOS, 2005).

2.2.2 Causas não patológicas

A maior parte das deformações descritas no milho não é causada por patógenos, elas são decorrentes de mutações genéticas e mudanças epigenéticas (Figura 2), (NEUFFER et al., 1997; CIMMYT, 2004; REIS et al., 2004; SEN et al., 2010).

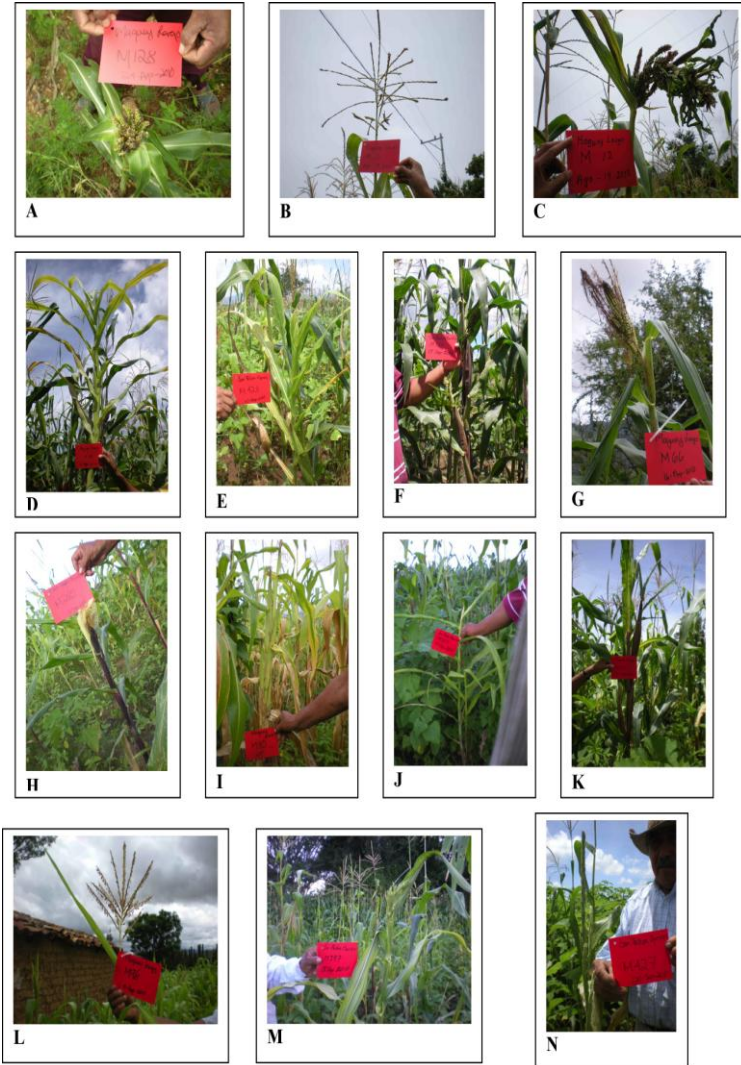


Figura 2. Fenótipos anormais decorrentes de mutações genéticas no milho encontrados no presente estudo. **A.** *ts 2*, sementes no pendão; **B.** *ms 9* macho esterilidade; **C.** *id 1* crescimento indeterminado; **D.** *f 1* listra fina; **E.** *br 1* braquitico; **F.** *bz 2* bronze; **G.** *ts 3* sementes no pendão; **H.** *ts 1* sementes no pendão; **I.** *a 2*, sem antocianina; **J.** *py 1*, planta pigmea; **K.** *bz 1*, bronze; **L.** *ms 8*, macho esterilidade; **M.** *bd 1*, ramificações sem seda; **N.** *mu*, transposon mutator. Fonte: NEUFFER et al. (1997).

2.2.2.1 Fatores ecológicos

Adicionalmente à disponibilidade hídrica e a temperatura, fatores ecológicos como a toxicidade no solo ou no ar, a falta de nutrientes, ou condições climáticas extremas durante um período de crescimento crítico da planta, podem ser também causas não patológicas de fenótipos anormais, ou de doenças nas plantas (AGRIOS, 2005). Os fatores ecológicos, mesmo que comumente não apareçam descritos na literatura como causadores únicos e independentes das mudanças fenotípicas, encontram-se envolvidos em todos os processos que são reconhecidos como possíveis causas de mutações genéticas, epigenéticas e fenotípicas (KAKUTANI et al., 1996; JACOBSEN e MEYEROWITZ, 1997; NEUFFER e WESSLER, 1997; RICHARDS, 1997; FINNEGAN et al., 1998; FEDOROFF, 2000; BIÉMONT e VIEIRA, 2006; CANDELA e HAKE, 2008).

2.2.2.2 Endogamia

A depressão endogâmica tem sido descrita como uma causa recorrente de fenótipos anormais em plantas, sobretudo, no caso de melhoramento para obtenção de cultivares híbridas. No milho a autofecundação para obter linhas melhoradas, é uma prática frequente (PATERNIANI e VIEIRA, 1987; SIMON et al., 2004).

Mutações em genes que participam nos eventos citológicos da meiose podem causar anomalias na fertilidade da planta. Quando uma planta alógama é submetida à autopolinização, vários genes, incluindo os que participam na meiose, aumentam a taxa de homozigose, o que

pode gerar depressão endogâmica, cujos sintomas são a queda no vigor e na produtividade. Além disso, a homozigose incrementa alelos recessivos deletérios que podem causar deformações fenotípicas. No entanto, com o avanço no conhecimento, a homozigose parece não ser a causa principal da depressão endogâmica (SIMON et al., 2004; RICCI et al., 2007; HALLAUER et al., 2010). Também foram encontradas outras causas, como mutagênese, além da homozigose, que são promovidas ou intensificadas pela endogamia.

Existe uma ampla evidência sobre o papel regulatório da metilação na citosina. Esta participa nos processos celulares tais como: o reparo do DNA, na transposição, transcrição e tem uma clara influência na expressão genética e fenotípica das plantas (KAKUTANI et al., 1996; RICHARDS, 1997; JACOBSEN e MEYEROWITZ, 1997; FINNEGAN et al., 1998; MARTIENSSEN, 1998). Kakutani et al, (1996) encontraram, através de mutantes de *Arabidopsis thaliana* com alterações para obter uma baixa metilação da citosina (hipometilação), um incremento no número de aberrações morfológicas ao realizar autopolinização repetida. Os autores descrevem uma grande diversidade de deformidades na folha e nas flores e observam uma maior frequência de deformações nas linhas autofecundadas e conseguem identificar que estas são causadas estritamente pela baixa metilação da citosina. Mais além, eles observam uma intensificação do problema na transmissão para as novas gerações. Assim, concluíram que os fenótipos anormais são causados por lesões herdáveis agravadas pelo processo endogâmico.

2.2.2.3 Transposons

A descoberta dos transposons por Barbara McClintock, ocorreu por meio de uma mutação nos grãos de milho, na qual variava a coloração deixando o grão variegado. McClintock denominou os primeiros transposons como *Ac* (ativador) e *Ds* (dissociador), e observou que a translocação dos transposons estava diretamente relacionada com as mutações do milho. A autora foi mais além e especulou que a causa das mutações não era a transposição *per se*, mas sim ao controle e processos regulatórios (McCLINTOCK, 1961; McCLINTOCK et al., 1981; McCLINTOCK, 1987; McCLINTOCK E HARBOR, 1993; NEUFFER e WESSLER, 1997; MARTIENSSEN, 1998; FEDOROFF, 2000; FEDOROFF, 2001). Esta hipótese de McClintock foi comprovada posteriormente por outras pesquisas.

Mesmo que os transposons podem se inserir dentro de um gene provocando mutações, são poucos os transposons que se encontram ativos. Ao contrário do que poderia ser esperado, a maior parte dos transposons encontra-se silenciada por eventos epigenéticos, como: a metilação do DNA, as mudanças na estrutura da cromatina ou os micro-RNAs. Isto permite uma estabilidade genética. Entretanto, existem fatores que podem quebrar tal estabilidade e assim gerar as mutações e mudanças fenotípicas no milho (FEDOROFF, 2000; BIÉMONT e VIEIRA, 2006; CANDELA e HAKE, 2008). Entre estes fatores se encontra o ambiente no qual a planta se desenvolve, sendo que estes fatores ambientais podem influir na regulação da expressão gênica da planta onde os transposons estão envolvidos.

Como exemplo de fator ambiental pode-se citar a falta de nutrientes em estágios chaves da planta. Fato que pode influenciar a expressão de vários genes, incluindo os transposons. Assim, o efeito da nutrição num fenótipo pode ser vista como uma desregulação fisiológica, mas também as mudanças na planta se encontram relacionadas com a expressão gênica associada aos transposons (BIÉMONT e VIEIRA, 2006). Outro fator a considerar na desestabilização da atividade dos transposons é o background genético individual que ao se encontrar com um background genético diferente pode interagir com outros transposons ou outros genes, incrementando a possibilidade de quebrar esta estabilidade e gerar variações morfológicas importantes, sendo que estas podem ser variações decorrentes de processos regulatórios e não estruturais (MATZKE e MATZKE, 1995; MATZKE e MATZKE, 1998; VAUCHERET et al., 1998; FEDOROFF, 2000; VAUCHERET e FAGARD, 2001; CANDELA e HAKE, 2008).

Sendo assim, um evento epigenético que afete os níveis de metilação, pode desencadear múltiplas mutações. Ativando transposons que estivessem silenciados por meio da metilação. Sendo estas mutações herdáveis e acumulativas através das gerações subsequentes. Os resultados destas mutações têm sido descritas majoritariamente como danosas às plantas (KAKUTANI et al., 1996; JACOBSEN e MEYEROWITZ, 1997; NEUFFER e WESSLER, 1997; RICHARDS, 1997; MARTIENSSEN, 1998; FEDOROFF, 2000; WALBOT, 2000; CANDELA e HAKE, 2008; MICHALAK, 2008; PRAY, 2008; NEUFFER

et al., 2009), mas também têm promovido a diversidade genética das plantas (BIÉMONT e VIEIRA, 2006).

2.2.2.4 *Transgenia*

Na revisão feita por Latham et al. (2006), a transformação genética das plantas pode ser considerado um fator mutagênico. Desde a inserção do transgene no genoma da planta, que rompe com a sequência de DNA endógena, até a transformação genética das plantas, é preciso (T-DNA) DNA de transferência que flanqueia o transgene, com a finalidade de possibilitar a transferência e incorporação dele no genoma receptor. Este T-DNA pode causar mutações inesperadas (Figura 3). Os autores citam estudos nos quais, em plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana*, arroz, batata, e cevada, transformadas por *Agrobacterium*, foi encontrada uma grande porcentagem de T-DNA inserido dentro de sequências codificantes ou sequências regulatórias conhecidas. Em *Arabidopsis thaliana* tem sido descrito como o T-DNA provoca deleções e rearranjos cromossômicos. Estas rupturas, sobretudo as deleções e rearranjos, podem resultar em plantas com fenótipos inesperados e potencialmente danosos. No entanto, segundo os autores, estes não são os únicos mecanismos pelos quais a inserção de transgenes pode influir nos fenótipos das plantas transgênicas. Sequências incluídas dentro do T-DNA, como os promotores, terminadores ou marcadores de resistência a antibiótico, podem alterar a expressão de genes vizinhos. Outro tipo de mutação descrito pelos autores são as mutações ao longo do genoma. Estas mutações não precisam ser inseridas na sequência do transgene ou em

sequências flanqueadoras do transgene. Mas podem ser provocadas pela infecção da *Agrobacterium*, ou pelo bombardeamento de partículas, ou ainda pelo uso de antibiótico como revelador da presença do transgene. Finalmente os autores concluíram, que a revisão feita por eles, só proporcionava uma aproximação sobre as consequências e implicações que podem ter a geração de plantas transgênicas e que existe uma grande incerteza sobre as futuras complicações que a transformação de plantas pode provocar. Uma das implicações destas mutações induzidas pela inserção dos transgenes nas plantas é a frequência de fenótipos anormais em cultivos comerciais básicos para a alimentação (FORBACH et al., 2003; LATHAM et al., 2006; ZOLLA et al., 2008).

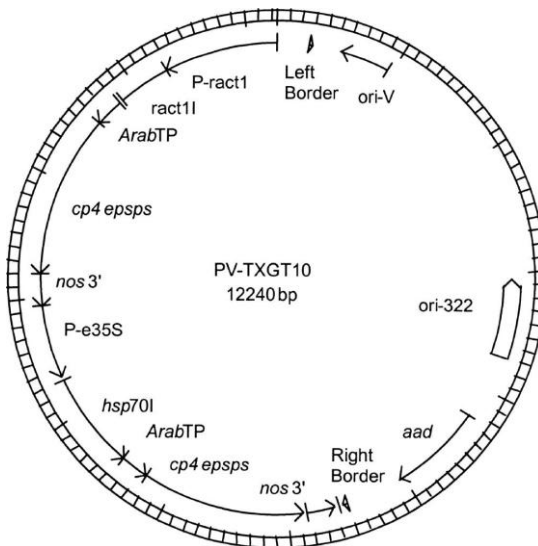


Figura 3. Exemplo de DNA de transferência (T-DNA) de uma planta transgênica de trigo resistente a herbicida glifosato Fonte: ZHOU et al. (2003).

2.2.2.5 Acumulação de transgenes

Diversos estudos têm encontrado uma relação direta entre o número de cópias de transgenes, a metilação e as mutações fenotípicas (LINNE et al., 1990; MATZKE e MATZKE, 1995; VAUCHERET e FAGARD, 2001). Linne et al. (1990), transformaram plantas mutantes RL01 de *Petunia hybrida* brancas, com o gene A1 do milho, cuja expressão é controlada pelo promotor CaMV 35S. Esta transformação provoca a produção de derivados de pelargodina e a geração de flores vermelhas. No entanto observou-se que as plantas transgênicas obtidas apresentaram uma variação da coloração em branca, variegada e vermelha com a finalidade de observar a relação entre o número de cópias integradas e o fenótipo na coloração das flores. Os autores estudaram o número das cópias do gene A1, o número de locos, a integridade do vetor de construção genética, e analisaram a metilação. Os resultados obtidos mostraram uma clara relação inversa entre o número de cópias do transgene, a estabilidade e a uniformidade da cor das pétalas, sendo encontrada uma pigmentação de pelagordina uniforme e contínua nas plantas com uma cópia íntegra única no genoma. Em contraste, plantas que apresentam mais de uma cópia, a pigmentação mostrou-se variável. Além disso, encontrou-se uma correlação entre a metilação do promotor CaMV 35S e a instabilidade na coloração floral pela pelagordina. As plantas com uma cópia só do transgene não se encontravam metiladas, enquanto que a maior parte das plantas com múltiplas cópias sofreram metilação.

Matzke et al. (1995), com base em estudos prévios, encontraram a ocorrência de silenciamento homólogo-dependente de genes em sistemas de plantas transgênicas e apontam que este fenômeno ocorria quando da inserção de duas ou mais cópias do transgene, ou quando existia um homólogo do transgene no genoma endógeno da planta receptora. Os autores decidiram utilizar diferentes locos transgênicos com o mesmo cassete de expressão, visando testar se o número de cópias do transgene e o grau de metilação, tinha relação com o silenciamento de genes homólogos. Para este estudo os autores utilizaram três locos transgênicos H_1 , H_2 e H_3 e um loco parcialmente homólogo e desvinculado K , em plantas de fumo. Eles observaram que ao fazer cruzamentos entre plantas K e plantas transgênicas de fumo que carregam os locos H , cada loco H apresentava diferentes efeitos na expressão e metilação do loco K . Os autores não constataram nenhum efeito de silenciamento por parte do loco H_1 , mas verificaram um forte silenciamento e indução completa de metilação por parte do loco H_2 e um silenciamento parcial por parte do loco H_3 . Quando observado mais profundamente, o loco H_1 continha uma única cópia íntegra do transgene, o loco H_2 tinha quatro cópias vinculadas e o H_3 tinha uma única cópia completa, mas com modificações. Adicionalmente, observou-se que o loco H_1 , não tinha sofrido metilação, o H_2 encontrava-se completamente metilado e o H_3 estava parcialmente metilado, corroborando assim a hipótese de que o número de cópias do transgene e a metilação têm uma forte influência no silenciamento de genes homólogos endógenos.

2.3 Importância do milho no México

2.3.1 Centro da origem

O tempo e a localidade precisa da origem e domesticação do milho ainda são desconhecidos. Já foram propostas diversas hipóteses sobre as relações filogenéticas do milho e o local ou locais da origem do cultivo. Existem três teorias nas quais a discussão sobre a origem e relações filogenéticas do milho é baseada. Asherson propôs, em 1895, que o Teosinte é o parente ancestral do milho (KATO et al., 2009). Posteriormente, Mangelsdorf e Reeves, em 1939, propuseram a teoria tripartite onde um milho ancestral, agora extinto, deu origem ao milho atual e onde o Teosinte é o resultado do cruzamento entre este milho ancestral e *Tripsacum* (PIÑEYRO-NELSON, 2007; KATO et al., 2009). Finalmente Anderson, propôs em 1945, a teoria “anfidiplóide”, na qual se postula que um milho primitivo foi originado no sudeste da Ásia, através da hibridação e duplicação genômica de duas espécies com cinco pares de cromossomos (KATO et al., 2009).

Em relação à localidade onde se origina o milho, predominam duas teorias: a teoria unicêntrica e a teoria multicêntrica. A teoria unicêntrica considera um evento único de domesticação e propõe que as populações de teosinte, *Zea mays spp parviglumis*, localizadas na bacia do Balsas, deram origem ao milho. Enquanto a teoria multicêntrica sugere que o processo de domesticação surgiu em diferentes locais e em diferentes momentos há 8.000 anos. Esta teoria é baseada num amplo estudo da morfologia dos cromossomos paquitênicos, no milho e no teosinte da América. Assim, esta teoria

propõe cinco localidades de origem: quatro no México e uma na Guatemala (Figura 4).



Figura 4. Mapa do México com as localidades dos centros da origem-domesticação e os centros da diversificação primária do milho. Fonte: KATO (2009).

Atualmente, o maior consenso é considerar que o Teosinte é o ancestral do milho (KATO et al., 2009) e o México é considerado centro da origem e diversidade do milho (Figura 5) devido à presença de parentais selvagens do grupo Teosinte co-habitando com o milho atual (SERRATOS et al., 1995).



Figura 5. Distribuição do Teocintle no México. Fonte: SERRATOS et al. (1995).

2.3.2 Importância Socioeconômica

O milho constitui, junto com o trigo e o arroz, um dos três principais cultivos alimentares do mundo, no que se refere à área plantada e à produção (FAO, 2011). O México ocupa o quarto lugar entre os principais países produtores do milho. Em 2010 o México produziu de 24 milhões de toneladas, aportando 3% da produção mundial. Também ocupa o quarto lugar no que se refere à área de cultivo que ocupa 7,3 milhões de ha, que significam 5% da superfície mundial colhida de milho (SAGARPA, 2010; FAO, 2011).

No México o milho é o cereal mais produzido, sendo que representa a principal fonte de energia na dieta alimentar dos mexicanos, além de ser utilizado para forragem e consumo animal, tendo um consumo anual aparente per capita de 253 kilogramas (SAGARPA, 2010). Atualmente mais da metade da superfície cultivada do país se encontra cultivada com milho. Aproximadamente 3,1 milhões de agricultores se dedicam no cultivo do milho, representando 40% da força trabalhadora agrícola do país (NADAL e WISE, 2004; De ITA, 2007; De ITA e NADAL, 2009). Destes, 85% são pequenos agricultores que têm propriedades menores que 5 hectares (De ITA, 2007), os quais plantam basicamente para fins de autoconsumo, usando sistemas que combinam técnicas agrícolas pré-hispânicas e modernas, utilizando alguns insumos industriais.

Apenas 14% do cultivo do milho é realizado em propriedades de grandes extensões e com sistemas industriais, principalmente nos estados de Sinaloa, Jalisco, Estado do México e Chiapas (KATO et al., 2009).

A importância socioeconômica do milho se fez muito evidente recentemente na chamada “crise da tortilla” em 2007, marcada por uma forte crise econômica decorrente das políticas comerciais advindas do Tratado de Livre Comercio da América do Norte, TLCAN. A crise foi provocada pelo aumento entre 42 e 67% do preço da tortilla, alimento feito de milho, base da dieta mexicana, provocando o colapso do poder aquisitivo dos assalariados (De ITA, 2007).

2.3.3 Importância Cultural

O milho além de ser a base alimentar e um eixo da economia no México, tem um valor cultural particular. Segundo o Popol-Vuh, que é o livro do conselho, livro sagrado Maya-Quiché, os deuses criadores decidiram criar o homem, fizeram tentativas com madeira mas por ser duro e frio demais, depois tentaram com o barro, mas era muito frágil. Finalmente pediram para o lince, o coiote, o papagaio e o corvo, que trouxeram para eles espigas de milho amarelo e branco. Moeram o milho e com a massa fizeram nove bebidas e com elas criaram a carne e o sangue do primeiro homem e da primeira mulher. Além do Popol Vuh, existem diversos mitos ou relatos nos quais o milho é o elemento chave para a criação da humanidade. Assim, o milho tem uma grande importância na cosmovisão e religiosidade dos povos indígenas (FLORESCANO, 2003; FLORESCANO, 2004; RIBEIRO, 2004; FLORESCANO, 2005). O ciclo agrícola anual corresponde ao ciclo ritual de cerimônias indígenas. O milho é considerado pelos povos indígenas como pai, mãe e filho. Pai porque é o provedor, mãe porque alimenta e cuida e filho porque precisa dos cuidados dos agricultores para crescer com sucesso (CENAMI, 2004). Portanto, a semente de milho é guardada e conservada como um grande tesouro, desde que foi considerada como o presente dos deuses, e a herança dos filhos.

Apesar de a própria semente ser conservada e multiplicada durante anos, o fluxo de sementes entre agricultores é frequente. A motivação deste fluxo pode ser a perda das sementes ou simplesmente a vontade do agricultor de experimentar uma nova semente. Seja para

aumentar o vigor das próprias sementes, diminuir o risco de perda total de coleta ou porque gostou da textura e sabor e quer aumentar a diversidade de pratos e sabores na sua mesa. Às vezes o intercâmbio acontece entre os agricultores da mesma comunidade e, outras vezes, eles adquirem sementes de agricultores de outras regiões. Algumas vezes provêm de regiões com condições ecológicas semelhantes e outras, com condições um pouco diferentes. As sementes adquiridas são adaptadas e melhoradas pelos agricultores até elas conseguirem produzir satisfatoriamente. A partir desse momento, são conservadas e multiplicadas, ano após ano. Esta prática cultural de intercâmbio de sementes promove e fortalece as alianças e relações sociais, mas também, acrescenta e mantém o conhecimento técnico agrícola tradicional dos agricultores, e é responsável da grande riqueza genética do cultivo (LOUETTE e SMALE, 1998; LOUETTE e SMALE, 2000; BELLON e BERTHAUD, 2004; BELLON e BERTHAUD, 2006; SALGADO, 2010).

2.3.4 Riqueza genética

A riqueza genética do milho no México é representada pelo número de raças do cultivo presentes no país. Por raça entende-se *“um grupo de indivíduos aparentados, com características comuns suficientes, que permitem ser reconhecidos como grupo”* (ANDERSON e CUTLER, 1942).

A primeira sistematização sobre o número de raças presentes no país foi feita por Wellhausen em 1952. Ele descreveu 25 diferentes raças de milho, com base nas características morfológicas. Após Wellhausen, seguiram outros esforços para classificar e identificar as

raças de milho, levando em consideração a relação e os processos culturais em torno do milho participando ativamente na diversificação do cultivo. Vários autores como Hernandez Xolocotzin, adicionam os fatores biológicos, tais como mutação, seleção e recombinação, também o fator cultural na classificação de presença de raças no país. No entanto, isto podia complicar uma classificação consensuada pela sociedade científica, que estuda a diversidade genética do milho. Atualmente com a ajuda das ferramentas moleculares, tem-se conseguido uma classificação que pode ser aceita e compartilhada pela sociedade científica. Assim, a classificação mais recentemente reconhecida é a feita por Sanchez (2000) quem através da análise com isoenzimas e características morfológicas, reconhece 59 de raças de milho no México. O cultivo ou presença destas raças é amplamente distribuído no país. Segundo Kato et al. (2009) o número de raças e a sua distribuição pode se incrementar, ao aumentar os esforços de coleta. Esta hipótese é decorrente dos resultados de um estudo recente que tinha como objetivo reconhecer as áreas mexicanas onde poderia ser plantado milho geneticamente modificado, sem danificar a riqueza genética das cultivares existentes. Neste estudo, elaborado pela Comissão Nacional para a Conservação da Biodiversidade (CONABIO, 2009) encontraram-se raças cultivadas em lugares onde não tinham sido reportadas anteriormente. Os autores descobriram que a ausência de registro devia-se mais às limitações nos esforços de coleta e não à ausência *per se*, pois em praticamente todos os lugares de coleta do estudo, encontrou-se pelo menos uma raça ainda sendo cultivada. Além disso, em várias localidades, pela dificuldade de acesso

ou recursos, não foram coletadas amostras e ficaram, portanto, sem registro ou informação. Portanto, é difícil assumir que alguma raça pode estar presente ou ausente nessas localidades, e Kato et al. (2009) recomendaram incrementar os locais de coleta e fazer uso do princípio da precaução (Figura 6).



Figura 6. Localização dos lugares de coleta das raças de milho (pontos amarelos) e teosintes (pontos vermelhos) no México (CONABIO, 2009). Fonte: KATO et al. (2009).

2.4 Milho transgênico no México

2.4.1 Primeiros experimentos

Os primeiros experimentos com milho transgênico tinham como objetivo principal criar variedades geneticamente modificadas que responderiam às necessidades específicas do México. Assim, o primeiro registro do milho transgênico no México, ocorreu em 1993, quando o Centro de Pesquisas Avançadas (CINVESTAV) realizou um experimento de 18 plantas, com um milho que continha o gene BAR, de *Streptomyces hygroscopicus*, e um gene de *Escherichia coli*.

Entretanto, esta pesquisa focada nas necessidades do México, foi adiada quando se deu a notícia da liberação comercial do milho transgênico nos Estados Unidos em 1996. As pesquisas realizadas pelas indústrias agrícolas focaram principalmente em avaliar a produtividade e adaptação das novas variedades no solo mexicano. E as pesquisas por parte de instituições de pesquisa nacionais foram focadas em avaliar as vantagens e limitações das variedades geneticamente modificadas a serem liberadas nos Estados Unidos, além de avaliar as possíveis consequências destas variedades para a diversidade genética do milho em cultivo, considerando que o México é centro de origem e de diversidade do milho.

Dessa forma, cientistas de diversas instituições tais como Instituto Nacional de Pesquisas Agroflorestais (INIFAP), o Centro Internacional do Melhoramento do Milho e Trigo (CIMMYT) e o Comitê Nacional de Biossegurança Agrícola (CNBA), decidiram realizar pesquisas sobre as consequências nas variedades nativas e no Teosinte.

Em 1995, estes cientistas se reuniram num Fórum chamado “*Fluxo gênico entre milho crioulo, convencional e teosinte: implicações para o milho transgênico*”, com a finalidade de discutir sobre essas consequências. Após o fórum e as discussões internas no CNBA, foi tomada a decisão de decretar uma moratória *de facto* para a plantação de milho transgênico tanto para plantação comercial quanto para plantação experimental. Esta moratória foi implementada em 1998 e na prática começou a funcionar em 1999. Entre 1993 e 1999 foram implementados oficialmente um total de 34 ensaios experimentais com milho transgênico (Tabela 1), em parcelas menores que dois ha (SERRATOS et al., 1995, 2004; SERRATOS, 2010).

Tabela 1. Ensaio de milho transgênico aprovados oficialmente no México entre 1993-1999*

Intuição	Superfície plantada	Característica do Evento	Data de aprovação
CINVESTAV	18 plantas	Gene BAR de <i>Streptomyces hygroscopicus</i> e um gene de <i>Escherichia coli</i> .	Abril-1993
CIMMYT	NI	Línagens tropicais transformadas, gene marcador (GUS)	03/mai/1994
CIMMYT	NI	Calos transgênicos putativos do milho tropical	03/mai/1994
CIMMYT	NI	Gene CryIA(b) e gene CryA(b) provenientes de <i>Bacillus thuringiensis</i> , para a resistência à lepidópteros	08/fev/1995
CIMMYT	0,0180 ha	Gene CryIA(b) para a resistência a <i>Diatraea spp.</i> e <i>Spodoptera frugiperda</i>	08/fev/1996
ASGROW MEXICANA S.A. DE C.V.	0,1 ha	Gene B73 e PAT que confere resistência a herbicidas a base de glufosinato de amônio	24/abr/1996
ASGROW MEXICANA S.A. DE C.V.	0,1 ha	Gene Bt que confere resistência a insetos lepidópteros	24/abr/1996
CIMMYT	NI	Gene CryIA(b) resistente a insetos tropicais	07/jun/1996
PIONEER	0,26 ha	Gene CryIA(b) que confere resistência ao "european corn borer"	13/set/1996
CIMMYT	0,0092 ha	Gene de Bt CryIA(b); CryIA(c); CryIB e CryAc que confere resistência a lepidópteros	22/nov/1996
CIMMYT	0,032 ha	Gene CryIA(b) que confere resistência a lepidópteros sob condições de seca	22/nov/1996
CIMMYT	0,0075 ha	Gene CryIA(b) e BAR que confere resistência a lepidópteros e	22/nov/1996

		herbicidas	
MYCOGEN MEXICANA S.A. DE C.V.	NI	Gene Bt que confere resistência à insetos	31/jan/1997
MONSANTO	0,25 ha	Gene CryIA(b) que confere resistência à lepidópteros	18/jul/1997
CIMMYT	0,0195 ha	Gene CryIA(b) que proporciona resistência à lepidópteros	19/jun/1997
ASGROW	1,235 ha	Gene que proporciona resistência a insetos	18/jul/1997
MONSANTO	0,25 ha	Gene que confere resistência ao herbicida glifosato	18/jul/1997
MONSANTO	0,1 ha	Gene CryIA(b) (Yieldgard) que confere resistência à lepidopteros	04/set/1997
HIBRIDOS PIONEER	1 ha	Gene CryIA(b) que confere resistência ao barrenador europeu	19/set/1997
MONSANTO	0,1 ha	Gene R. Ready que proporciona resistência a glifosato	26/mar/1998
CIMMYT	0,0041 ha	Gene CryIA(b) para fins de retrocruzamentos	29/jan/1998
CIMMYT	0,0041 ha	Gene CryIA(b) para fins de autopolinização	29/jan/1998
ASGROW MEXICANA	1 ha	Genes B73 e PAT que conferem resistência ao herbicida glufosinato de amônio	30/abr/1998
HIBRIDOS PIONEER	0,04 ha	Gene CryIA(b) resistente a insetos	14/jul/1998
CIMMYT	0,0195 ha	Gen CryIA(b) para fins de retrocruzamentos	10/jan/1999
CIMMYT	0,0195 ha	Gen CryIA(b) para fins de autopolinização	10/jan/1999

* Os dados no quadro estão baseados pelo tipo de variedade geneticamente modificada testada por instituição e por ano.

Fonte: Adaptado de Cibogem (2010) disponível em : <http://www.cibogem.gob.mx/OGMs/Documents/Permisos-Ensayos-OGM-1988-2005.pdf>

2.4.2 Fluxo transgênico com variedades nativas

Em 2001 Quist e Chapela (2001) apresentaram os resultados da sua pesquisa, mostrando introgressão de DNA transgênico nas variedades nativas do milho, na Serra Juárez de Oaxaca. A partir da publicação do artigo, um forte debate foi iniciado entorno da existência ou não de fluxo transgênico no México, sendo que existia desde 1998 uma moratória que proibia a plantação do milho transgênico e os experimentos anteriores à moratória, foram poucos. Assim, o artigo recebeu críticas que tentaram desacreditar o estudo (KAPLINSKY et al., 2002; METZ e FÜTTERER, 2002) mas também promoveu vários estudos para corroborar e conhecer a extensão e a intensidade deste fluxo transgênico no México (MERCER e WAINWRIGHT, 2008). Assim, Ezcurra et al. (2002), como parte do Ministério do Meio Ambiente, amostraram parcelas da mesma região onde foram coletadas as amostras do estudo do Quist e Chapela. Adicionalmente coletaram amostras de um armazém de grãos federal (DICONSA) e de Puebla, outra região próxima, onde também se conservam variedades nativas de milho. O estudo de Ezcurra et al. (2002), não só corroborou o resultado da introgressão de transgenes em variedades nativas, mas também constatou porcentagens de presença de transgenes entre 0 a 35%, sendo as localidades de Puebla e o armazém DICONSA, as que apresentaram os maiores valores de frequência (contaminação) por transgenes. No entanto, esses níveis altos de “contaminação” transgênica não foram encontrados em estudos subsequentes (SERRATOS et al., 2007; MERCER e WAINWRIGHT, 2008; DYER et al.,

2009; PIÑEYRO-NELSON et al., 2009), com exceção de um estudo independente realizado pelas organizações civis e camponesas da Rede em Defesa do milho, onde foram encontradas porcentagens entre 2 a 33%. Mesmo sendo um dos estudos mais amplos em relação ao número de comunidades e estados amostrados, este estudo não foi publicado em nenhuma revista científica e, por acordo com as comunidades, não foram divulgados como informação pública às localidades exatas de coleta. Portanto, este estudo é citado como um estudo duvidoso em termos de precisão (MERCER e WAINWRIGHT, 2008). O que já é consenso é a inegável presença de transgenes dentro de variedades nativas, em localidades onde geralmente é cultivada a própria semente ano após ano e onde, portanto, a probabilidade de contaminação seria muito baixa levando em conta, a moratória para a plantação de variedades transgênicas de milho, tanto experimental quanto comercialmente no México (Figura 7). Assim, mesmo que ainda não existem dados precisos sobre a magnitude e difusão da contaminação atual, sabe-se que pelas práticas culturais e dinâmica do milho no México, a ampliação da contaminação seria potencializada rapidamente (DYER et al., 2009; SERRATOS, 2010). Mas além, ainda com uma moratoria *de facto* para plantios comercial e experimental de milho transgênico no México, a presença de transgenes está espalhada pelo território Mexicano. Portanto, é evidente que a coexistência sem contaminação entre as variedades transgênicas e as não transgênicas não é possível, e que ao retirar a moratória este problema vai ser agravado, com o aumento da presença de transgenes nas variedades nativas, acompanhado de todos os possíveis riscos que as variedades

transgênicas podem carregar, dentre os quais está a possibilidade dos agricultores a serem processados legalmente por ter nas suas parcelas, uma tecnologia pela qual não pagaram o direito ao uso, mesmo que a mesma tenha vindo pelo ar, tal como aconteceu nos Estados Unidos e no Canadá (MAURO e MCLACHLAN, 2008; KNISPEL et al., 2008).

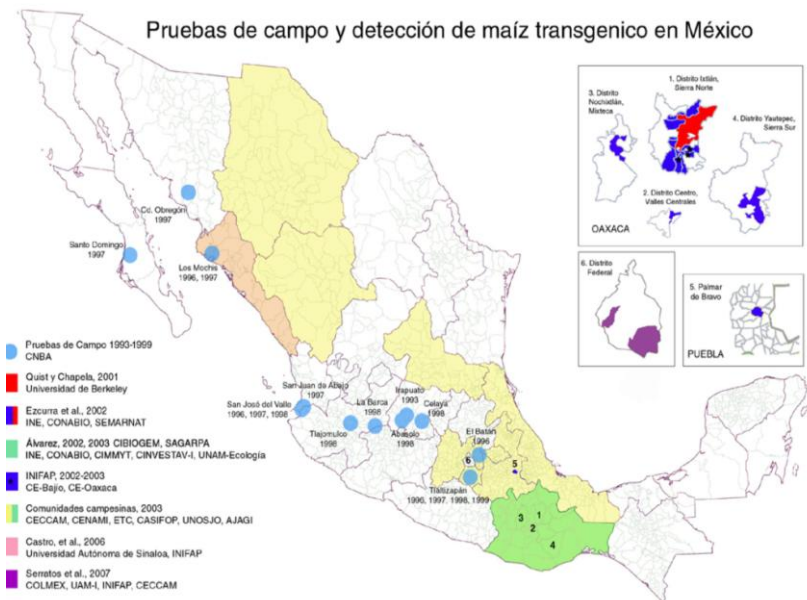


Figura 7. Provas de campo e detecção de milho transgênico no México. Fonte: SERRATOS (2010).

No entanto, o estudo de Ortiz e colaboradores (Ortiz-Garcia et al., 2005), no qual é descrito a ausência de transgenes nas amostras que foram coletadas em algumas das localidades e que demonstraram ser positivas para transgenes no estudo de Ezcurra et al. (2002), foi amplamente utilizado pelos promotores da tecnologia para pressionar

e expressar a falta de argumentos científicos para não permitir as plantações experimentais no México, desde que a Lei de Biossegurança para a regulação dos Organismos Geneticamente Modificados (LBOGM) já tinha sido aprovada (SERRATOS, 2010).

2.4.3 Lei de Biossegurança e plantações experimentais

A Lei de Biossegurança dos Organismos Geneticamente Modificados (LBOGM) do México foi aprovada no ano 2005. Nesse mesmo ano a Secretaria de Agricultura decidiu eliminar a moratória *de facto* e aprovar ensaios experimentais com milho transgênico no norte do país. Entretanto, o Greenpeace e o Colégio do México, apoiados por um grande número de organizações civis e cientistas, interpuseram um processo legal, contra a aprovação das plantações experimentais, pois estas plantações infringiam a LBOGM. Os argumentos mais fortes do proceso legal consistiam: (i) na falta de uma consulta pública sobre a aprovação das parcelas experimentais; (ii) na ausência da delimitação das áreas livres de variedades ou raças de milho que poderiam ser afetadas e, principalmente e (iii) na ausência do Regulamento da lei, que tinha que conter um regimento de proteção especial para o milho. Todos os argumentos eram legalmente válidos e a aprovação das plantações era ilegal. Em Novembro de 2005, foram rejeitadas as solicitações de plantações experimentais, e processados os autores destas aprovações. No entanto, as pressões por parte da indústria biotecnológica não diminuíram. Pelo contrário, se intensificaram e pesou a constante demanda de grupos sociais e dos cientistas que aportavam constantemente argumentos científicos para ser restaurada

a moratória *de facto*. Em 2008, ao ser publicado o regulamento da LBOGM, se oficializa o término da moratória e são aceitas novamente solicitações para realizar estudos experimentais.

É relevante mencionar que a CONABIO realizou um estudo para determinar a localização de raças de milho que poderiam estar em risco. No entanto, em 2009 iniciaram-se as primeiras experimentações com milho transgênico desde a eliminação da moratória no norte do país, mesmo com a recomendação da CONABIO de que todo o território nacional deveria ser decretado como território livre de transgênicos (KATO et al., 2009; ACEVEDO et al., 2011).

2.5 Técnicas de detecção de transgenes

Existem diversas técnicas de detecção de transgênicos, as quais podem ser divididas em dois grupos: aquelas que detectam ácidos nucleicos, seja DNA ou RNA, e as que detectam proteínas. Entre as que detectam DNA, a técnica mais utilizada e reconhecida na detecção de transgenes é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Isto se deve à sua alta sensibilidade e que não requer uma capacidade técnica muito alta. Embora apresente algumas limitações, entre elas os iniciadores que podem se ligar a sequências que não são o alvo, o eu proporcionaria resultados do tipo “falso positivo”. Adicionalmente, a técnica é sensível à mudanças pós-transformação das sequências originais, de tal maneira que não poderia reconhecer a sequência de interesse caso isso ocorresse (MULLIS, 1990; AHMED, 2002; PIÑEYRO-NELSON, 2007; Van den BULCKE et al., 2007;

<https://bat.genok.org/bat>). Em relação à detecção de proteínas, a técnica mais popular é o Ensaio por Imunoabsorção ligado às enzimas (ELISA). É uma técnica relativamente simples, de custo médio e de alta sensibilidade. Além disso, é capaz de oferecer informação por evento específico relativamente rápido, pois detecta proteínas específicas (ENGVALL e PERLMANN, 1972; AHMED, 2002; PIÑEYRO-NELSON, 2007; Van den BULCKE et al., 2007; <https://bat.genok.org/bat>).

2.5.1 Detecção de ácidos nucléicos

2.5.1.1 Reação em Cadeia da Polimerase, (PCR)

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), criada por Kary Mullis (MULLIS, 1990), permite determinar a presença ou ausência de sequências genéticas que têm sido introduzidas em um OGM, ao gerar milhões de cópias de uma sequência de interesse. Isto é possível por meio da amplificação das sequências de interesse através do uso de iniciadores complementares, que são sequências curtas de DNA que se ligam à sequência de interesse (ex: partes do transgene) e que provocam o início da reação e a ação de uma polimerase termoestável, geralmente *Taq* polimerase, que é oriunda da bactéria *Thermus aquaticus*, que promove a extensão da cadeia iniciada pelos iniciadores. Algumas das sequências exógenas mais analisadas são os promotores e terminadores, que são comumente utilizados na transformação genética das plantas. O promotor 35S (CaMV) do vírus do mosaico da couveflor e o terminador (tNOS) da Nopalina Sintetase, são os mais usados na transformação do milho OGM (PIÑEYRO-NELSON, 2007). Mas também é possível, amplificar sequências por

evento específico se a sequência do evento é conhecida, ou por meio de algumas variantes de PCR, como a PRC quantitativa denominada de PCR tempo real, o que permite conhecer o número de cópias do transgene que nos interessa, ou mesmo através da PCR inversa ou PCR-TAIL, que por sua vez permite conhecer as sequências flanqueantes da nossa sequência de interesse.

2.5.1.2 Southern Blot

Esta técnica foi desenvolvida por Edwin Southern em 1975 e permite identificar uma sequência específica conhecida através de uma hibridação DNA-DNA. Nesta técnica o DNA é digerido pela ação de enzimas de restrição e posteriormente separado pelo peso molecular por electroforese, num gel de agarose. Este gel de agarose é banhado numa solução alcalina com fim de desnaturar o DNA. O DNA então desnaturado é fixado em membrana de nitrocelulose. Esta membrana que já tem o DNA fixado é exposta numa sonda marcada com a sequência de DNA complementar ao que está sendo procurando. Se o DNA da membrana hibridiza com a sequência da sonda então a sequência procurada está na amostra testada. A visualização deste processo se dá através de um método similar aos raios X. Esta técnica é utilizada para conhecer a presença de um evento específico, assim como o número de cópias de um transgene e o das sequências promotoras e terminadoras (PIÑEYRO-NELSON, 2007; <https://bat.genok.org/bat>).

2.5.1.3 Northern Blot

O Northern blot compartilha o princípio da técnica de Southern blot. Mas a hibridação neste caso é entre sequências de DNA e RNA complementares. Com essa técnica pode-se identificar uma família de moléculas de RNA derivadas de uma sequência específica, no caso de um transgene. Adicionalmente pode-se determinar a quantidade de RNA mensageiro de um transcrito em particular; assim como estimar qualitativamente a expressão de um transgene (ALWINE et al., 1977; PIÑEYRO-NELSON, 2007; <https://bat.genok.org/bat>).

2.5.2 Detecção de proteínas

2.5.2.1 Western Blot

O Western blot, compartilha o princípio técnico do Southern e do Northern blot, mas a diferença é que agora a hibridização é entre proteínas. A técnica consiste em fixar a proteína da amostra e testá-la em membrana de nitrocelulose. Posteriormente, as proteínas alvo são detectadas por anticorpos específicos. Este primeiro anticorpo específico é encontrado por outro anticorpo marcado por uma etiqueta fluorescente e, assim, poderá ser visualizado. Desta forma, o Western blot permite determinar se a proteína recombinante procurada está sendo expressa, bem como o nível de expressão (PIÑEYRO-NELSON, 2007; <https://bat.genok.org/bat>).

2.5.2.2 Ensaio por imunoabsorção ligado à enzimas (ELISA)

O método ELISA foi desenvolvido por Eva Engvall e Peter Perlmann em 1972 e tem uma função semelhante ao Western Blot, pois com esta técnica é possível detectar se a proteína alvo está sendo expressa e qual é o nível de sua expressão. Esta técnica é baseada no uso de anticorpos marcados com uma enzima (conjugados). Estes conjugados apresentam uma atividade imunológica ao encontrar o antígeno procurado, mas também tem uma atividade enzimática que na presença de um substrato específico produzirá cor, evidenciando a presença da proteína procurada, que pode ser quantificada através de um espectrofotômetro. Existem distintos tipos de ELISA, que podem ser divididos em diretos, indiretos e sandwiches (Figura 8). O teste mais utilizado na detecção de transgenes é o tipo sandwiche duplo ou DAS-ELISA. Este imunoensaio pode produzir dados tanto qualitativos quanto quantitativos sobre a presença de proteínas recombinantes específicas. A proteína de interesse (antígeno) é reconhecida e “presa” entre dois anticorpos específicos: o capturador e o detector. O capturador, como o seu nome indica, será o encarregado de reconhecer e capturar a proteína antígeno. O detector se grudará ao antígeno previamente capturado realizando um efeito tipo “sandwiche”. O detector encontra-se unido a uma enzima a qual, em caso da presença da proteína recombinante específica, lhe confere a capacidade de expressar coloração num substrato determinado. Assim, com este método pode-se obter dados qualitativos de presença ou ausência que podem ser atribuído a simples observação da cor. Ou ainda, obter um resultado

quantitativo ao medir a densidade óptica num espectrofotômetro, desde que a intensidade da coloração esteja correlacionada à concentração da proteína recombinante. Este método não requer capacidade técnica sofisticada, é altamente sensível e pode ser encontrado em diversos formatos. Por exemplo, a formatação em tiras reativas pode ser levada ao campo e proporciona um resultado imediato (ENGVALL e PERLMANN, 1972; AHMED, 2002; PIÑEYRO-NELSON, 2007; Van den BULCKE et al., 2007; DYER et al., 2009; PIÑEYRO-NELSON et al., 2009).

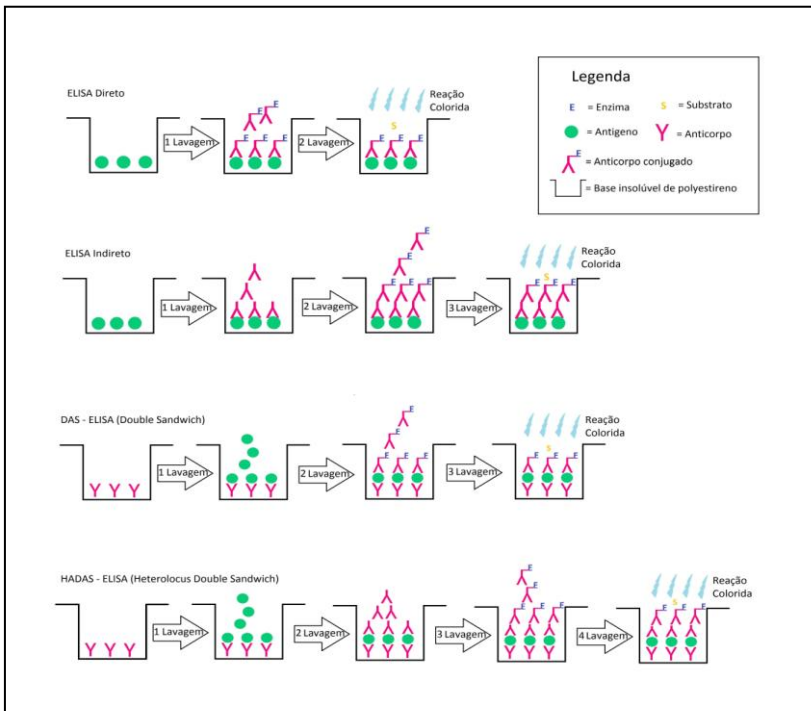


Figura 8. Tipos de ELISA com anticorpos marcados. Desenho: Leonardo K. Sampaio.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar se existe uma ou não relação entre o fluxo e introgressão de transgenes e o aparecimento de fenótipos anormais nas plantas de milho nativo tradicional mexicano.

3.2 Objetivos específicos

1. Analisar se a frequência de plantas com algum tipo de deformação é maior nas plantas com transgenes do que as plantas sem presença de transgenes;
2. Avaliar se a frequência de fenótipos anormais é maior na presença de mais de uma proteína recombinante;
3. Contribuir para o fortalecimento de um processo participativo com as organizações indígenas de agricultores para a valorização das variedades tradicionais do milho e as possíveis consequências dos cultivos geneticamente modificados.

4. Área de Estudo

4.1 Vales Centrais de Oaxaca

O estudo foi realizado em cinco comunidades do distrito de Ocotlán nos Vales Centrais de Oaxaca. O distrito tem um clima semi-árido, semi-úmido, com temperatura média de 18 a 22°C. Apresenta uma precipitação média anual de 600 mm e se localiza em uma altitude entre 1400 e 1700 m. Em razão de que a maior parte da superfície é destinada a lavouras agrícolas, a mata original na zona é escassa. Os moradores são majoritariamente do grupo indígena zapoteca (<http://www.cdi.gob.mx>). Embora exista uma grande influência do urbano em razão da proximidade da capital do estado e do grande êxodo migratório aos Estados Unidos, na região tem sido mantidos os costumes e tradições indígenas e, em muitas comunidades, uma porcentagem importante de moradores ainda fala a língua indígena zapoteca. Assim, apesar de terem incorporado alguns aspectos da agricultura moderna e ter experimentado sementes "modernas", os agricultores ainda conservam com grande zelo as variedades nativas de milho, já que, na cosmovisão indígena, o milho é como a própria base da vida. Por isso os agricultores da região são considerados como camponeses semi-tradicionais (TOLEDO et al., 2002).

Oaxaca é o Estado com a maior diversidade biológica e cultural do México e detém mais de 12.500 espécies de flora e fauna. Nele moram 16 grupos indígenas. É considerado centro de diversificação e domesticação de alguns dos principais cultivos mexicanos como tomate, feijão, pimenta, abóbora, abacate e milho (ORDÓNEZ e

RODRÍGUEZ, 2009). Especificamente para o milho, na teoria multicêntrica da origem é considerado como um dos possíveis centros de origem e diversificação, conseqüentemente, um dos locais de maior diversidade do cultivo (KATO et al., 2009).

4.1.1 As comunidades

As comunidades participantes no projeto foram Santa Lucia Ocotlán, San Pedro Mártir, San Felipe Apostol, Maguey Largo e El Porvenir (Figura 9).

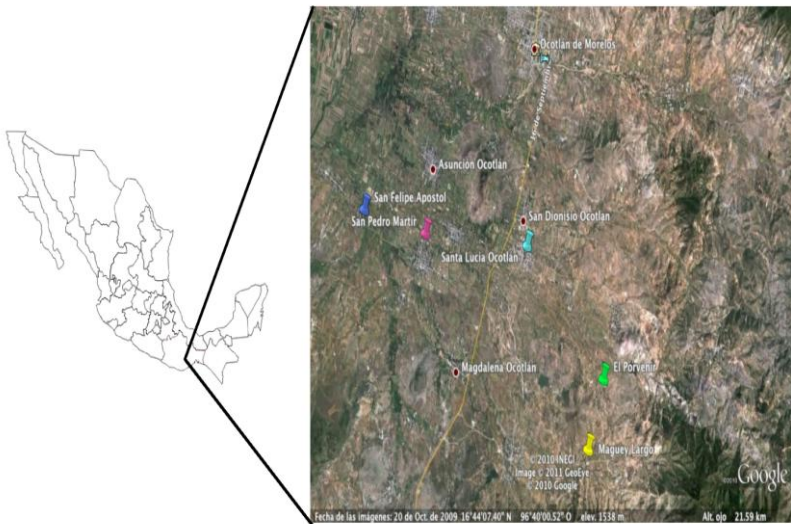


Figura 9. Localização das comunidades amostradas

- **Santa Lucia Ocotlán:** Tem uma extensão total de 12,76 km² e uma população de 3580 habitantes do grupo indígena zapoteco. Praticamente todo o território da comunidade está destinado à agricultura e criação de gado. Localiza-se próxima à rodoviária que leva ao centro comercial do distrito de Ocotlán, no Município de Ocotlán de Morelos. Isto provoca uma grande influência na comunidade, em particular na sua agricultura, na qual muitos agricultores ainda mantêm as próprias sementes para consumo, porém plantam e experimentam constantemente sementes “modernas” com fins comerciais.
- **San Pedro Mártir:** Tem uma superfície de 14,03 km², semelhante à Santa Lucia. A maior parte da superfície é de planícies semi-desérticas dedicadas principalmente à agricultura. Tem uma população de 1781 habitantes. Na comunidade existe um êxodo migratório para os Estados Unidos, que se torna importante do ponto de vista ecológico, uma vez que migram visando encontrar oportunidades de trabalho em fazendas estadunidenses e também acabam trazendo variedades americanas para a sua terra natal. Apesar da grande influência que a comunidade sofre com outras culturas, San Pedro Martir conserva o maior número de variedades nativas comparativamente as demais quatro comunidades amostradas e mantém mais fortemente os costumes indígenas e sua língua.

- **San Felipe Apostol:** É uma comunidade pequena, com 243 habitantes. Desenvolveu-se com base na produção e venda de cana-de-açúcar, a qual foi muito importante até os anos 40, segundo os moradores. Mas, quando a venda e produção de cana diminuíram consideravelmente, houve uma migração importante dos moradores aos Estados Unidos em busca de uma alternativa econômica. Isto deixou a comunidade com poucos habitantes. A maioria são idosos, mulheres e crianças. Nesta comunidade a população é mais mestiça que indígena, mas também conservam as sementes de milho nativo, abóbora e feijão para autoconsumo.
- **Maguey Largo:** A comunidade forma parte do município de San José del Progreso e tem 755 habitantes. É um povoado pequeno dedicado principalmente à agricultura de subsistência. A maior parte dos agricultores da comunidade é considerada camponês semitradicional. Embora tenham adotado algumas sementes e técnicas modernas, muitos deles voltaram a utilizar técnicas tradicionais, sem uso de agrotóxicos no seu sistema agrícola e conservando as sementes nativas. Comparativamente aos lotes de San Pedro Mártir, Santa Lucia e San Felipe Apostol, que estão em planícies, os lotes dos agricultores de Maguey Largo encontram-se no início da encosta dos morros, com certa inclinação, fazendo com que os agricultores tenham adotado técnicas

agroecológicas para a captação de água e controle da erosão de solos. Embora também exista a migração dos moradores de Maguey Largo, esta não é tão importante como nas comunidades de Santa Lucia, San Pedro Mártir e San Felipe Apostol, pois ocorre geralmente para realizar trabalho temporário na cidade de Oaxaca.

- **El Porvenir:** A comunidade pertence ao município de San José do Progreso e tem uma população de 463 habitantes, com mistura entre população mestiça e zapoteca. Não existem muitos dados oficiais sobre a localidade. Na comunidade se pratica principalmente a agricultura de subsistência, que segundo a classificação proposta por Toledo (2002), pode ser considerada semitradicional. De acordo com os moradores, a comunidade foi formada por várias famílias que vieram de distintas comunidades dos arredores em busca de terras para se sustentar. Portanto, as sementes de milho presentes provêm de distintas comunidades dos vales centrais. Além disso, os agricultores adaptaram as sementes convencionais ou híbridas às condições do local, chamando estas variedades como “híbridos acrioulados” (INAFED, 2009; <http://mexico.pueblosamerica.com/oaxaca>).

4.1.2 A Organização de Agricultores Biológicos de Oaxaca

A Organização de Agricultores Biológicos de Oaxaca (ORAB) é uma organização formada por grupos agricultores tradicionais, principalmente dos indígenas Zapoteca e Mixteca. Tem influência principalmente em duas regiões de Oaxaca: os Vales Centrais de Oaxaca, habitada principalmente por Zapotecos, e a Mixteca baixa, que como seu nome indica, a maior parte dos moradores são do grupo indígena Mixteco.

A ORAB tem como objetivo principal promover a agricultura ecológica e conservar as variedades nativas dos cultivares da região. Com este fim, a organização realiza constantemente oficinas de capacitação sobre as técnicas agroecológicas e as suas vantagens. Adicionalmente, promove e valoriza a conservação, uso e multiplicação de variedades nativas dos principais cultivares da região. Também realiza um trabalho de recuperação do conhecimento tradicional sobre o uso das plantas medicinais e desde o ano 2003 tem participado ativamente na rede em Defesa do milho.

A ORAB foi parte do diagnóstico participativo para conhecer se as suas variedades nativas se encontravam contaminadas com milho transgênico. A partir dos resultados positivos à presença de proteínas transgênicas nas variedades nativas da região, a ORAB tem realizado vários encontros para difundir a informação sobre a situação atual do fluxo transgênico em Oaxaca e as suas consequências. Adicionalmente, tem participado em campanhas para declarar Oaxaca um estado livre de transgênicos.

5. Material e Métodos

5.1 Enfoque participativo

Em janeiro 2010 foi realizada uma primeira reunião com a ORAB, objetivando planejar o desenvolvimento do projeto em forma de parceria. Nesta primeira reunião se delimitaram as responsabilidades de cada parte (ORAB e UFSC). Desta forma, ficou sobre a responsabilidade da UFSC a capacitação, amostragem e análise de amostras. A socialização da problemática do milho transgênico, assim como a organização comunitária para a observação constante de fenótipos anormais e o registro de condições climáticas, ficaram de responsabilidade da ORAB (Figura 10).

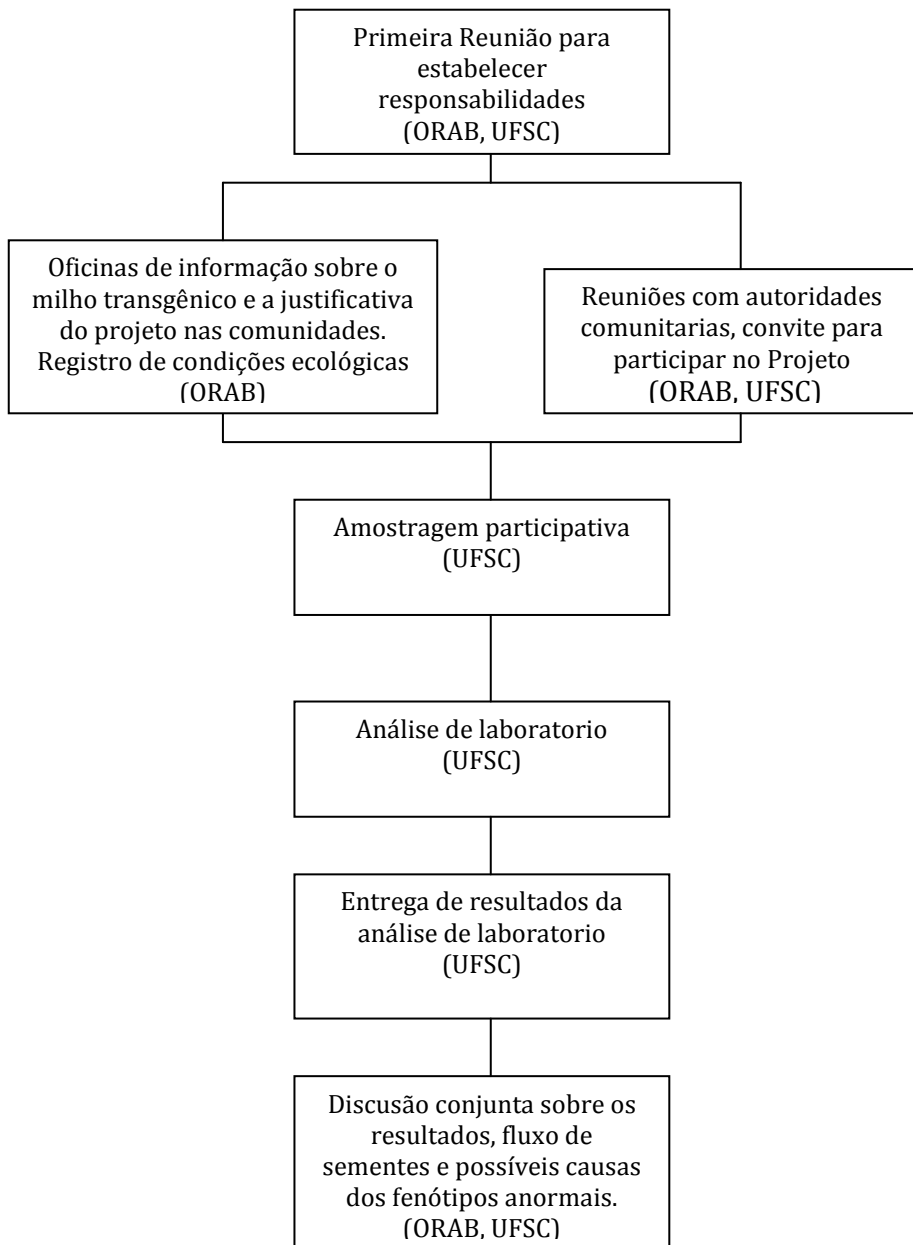


Figura 10. Etapas do projeto e responsabilidades dos participantes.

A amostragem foi realizada com prévio consentimento e conhecimento das autoridades comunitárias. Desta maneira, as autoridades promoveram o envolvimento de toda a comunidade, mesmo que nem todas as parcelas fossem amostradas. Assim, as autoridades, em conjunto com os agricultores e o pesquisador, acordaram sobre a coleta do material dentro das comunidades, bem como na participação nas discussões sobre a origem e início da observação da presença dos fenótipos anormais (também denominadas de deformações).

Anteriormente à coleta, os proprietários das parcelas amostradas foram entrevistados sobre a procedência da semente, o manejo do cultivo e sobre as possíveis causas das deformações, bem como sobre a possível natureza do fluxo transgênico, uma vez que nesta região não é permitida a plantação comercial, nem experimental. A finalidade desta entrevista foi o de compreender a perspectiva dos agricultores e promover o intercâmbio entre o conhecimento tradicional e o científico. Durante a amostragem, a coleta do material foi realizada juntamente com as autoridades comunitárias e proprietários das parcelas.

Após a análise de detecção de proteína, foi realizada uma reunião na comunidade de San Pedro Mártir, na qual estiveram presentes os agricultores participantes deste projeto com a finalidade de discutir os resultados obtidos. Os participantes desenharam mapas com a distribuição das parcelas nas comunidades, incluindo a presença de corpos de água, outras barreiras biológicas e os tipos de variedades

plantadas ao redor das parcelas amostradas. Discutiram-se ainda os períodos e os motivos pelos quais decidiram incorporar sementes novas, as formas de conservar, selecionar e multiplicar as próprias sementes, entre outros aspectos.

5.2 Amostragem

Foram amostrados tecidos foliares de 1000 plantas, sendo 500 de plantas com fenótipos normais e 500 com fenótipos anormais (Tabela 4), em cinco comunidades dos Vales Centrais de Oaxaca, México: Maguey Largo, El Porvenir, Santa Lucia, San Pedro Mártir e San Felipe Apostol (descritas no tem 4). Os agricultores que participaram do projeto são associados da ORAB e, portanto, as lavouras amostradas foram plantadas com variedades nativas e cultivadas com métodos agroecológicos. Todas as variedades amostradas foram identificadas pelos agricultores como variedades nativas, tipo: “bolita”, “tablita” e “guixobe”; de cores branca, amarela, vermelha e preta.

Durante a coleta, foram reconhecidas junto com os proprietários, aquelas plantas com algum tipo de deformação (ou fenótipo anormal) nunca visto anteriormente e cuja presença foi observada após a entrada do milho transgênico. É relevante mencionar que a liberação comercial do milho transgênico nos Estados Unidos ocorreu a partir de 1996 (MITCHELL e KUCHLER, 2006). Uma vez localizadas as plantas com fenótipos anormais, foram identificadas com etiqueta plástica contendo o nome da comunidade, número da amostra e data de coleta. Para o registro, foram fotografadas as plantas para comparação *a posteriori* com a descrição na bibliografia. A coleta

consistiu em uma folha (a mais sadia) por planta. Para cada planta com fenótipo anormal, foi coletada a folha de uma planta com fenótipo normal escolhida aleatoriamente, buscando, sempre que possível, que fossem da mesma parcela. Em doze de trinta e nove parcelas onde foram coletadas plantas com fenótipos anormais, não foram coletadas plantas com fenótipos normais, em razão do acordo feito com os agricultores de amostrar todas as parcelas cadastradas entre os participantes no projeto. Mesmo nestes casos, as parcelas cadastradas com presença de fenótipos anormais, encontravam-se próximas àquelas que não apresentaram deformações e que foram plantadas com as mesmas variedades e em condições semelhantes.

As folhas coletadas foram embaladas de forma individual em papel pardo e rotuladas com os dados do agricultor, comunidade, número de amostra e data de coleta. As amostras foram colocadas em sacolas plásticas dentro de caixas térmicas para serem transportadas sob baixas temperaturas e conservadas temporariamente em geladeira (4-8°C). Posteriormente, foram levadas e armazenadas a -70°C (Ultra-freezer Revco) no laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Biologia, UNAM, México.

5.3 Detecção de Proteínas

Para a detecção das proteínas CRY1Ab, CP4EPS5 e CRY9c foram utilizados Kits ELISA comerciais (Enviologyx, Portland Maine, EUA). Na Tabela 2 encontram-se os eventos transgênicos que podem ser detectados pelos kits.

Tabela 2. Eventos de milho transgênico que podem ser detectados por meio da presença das proteínas: CRY1Ab, CRY9c e CP4EPSPs com os Kits Envirologix.

Proteína	Evento	Nome comercial	Detentor da tecnologia
Cry1A (b)	Bt 11	Yieldgard™	Syngenta
Cry1A (b)	Mon 810	Yieldgard™	Monsanto
Cry1A (b)	Bt 176	Naturgard™Knockout™	Syngenta
Cry 9c	CBH351	Starlink™	Bayer (antes Aventis cropsience)
CP4 EPSPS	NK603	Roundup Ready®	Monsanto

Fonte: CDB, Biosafety Clearing House (2010). Disponível em: <http://bch.cbd.int/database/organisms>

- *Preparação e extração das amostras*

Tampão de lavagem:

Cada kit forneceu uma embalagem com tampão salino PBST em pó (tampão fosfato salino 0,05% pH 7,4 - Tween 20) que foi diluído em 1 L de água destilada e misturado em agitador orbital por aproximadamente 5 min.

Tampão de extração:

Usou-se o tampão de extração 20X fornecido no kit para detecção da proteína Cry9c. Foram realizadas as diluições em água

destilada para obter um tampão em concentração 1X, agitando em agitador orbital por aproximadamente 5 min.

Preparo das Amostras:

Para a preparação das amostras, os protocolos incluídos nos kits recomendam um pedaço de tecido de folha de milho de 5-10 mm de diâmetro por 0,25 ml de tampão de extração. Neste estudo, um 1 ml de tampão de extração foram usados para cada 4 quadrados de aproximadamente 5 mm de tecido foliar de cada uma das amostras. Este procedimento foi adotado porque os protocolos dos kits alertam sobre um erro comum de pipetagem, quando partículas de folha são colocadas dentro dos pocinhos, gerando falsos positivos. Assim, considerou-se que um volume maior, todavia respeitando-se as proporções da concentração recomendada, evitaria o risco de pipetar alguma partícula de folha do fundo do microtubo. A assepsia do material foi realizada utilizando-se álcool a cada corte de cada uma das amostras. Estes quadrados de tecido foliar foram colocados em microtubos de 1,5 mL, onde foram moídos com o tampão de extração e a solução mantida sob baixas temperaturas para evitar a desnaturação das proteínas. Foram testadas simultaneamente três proteínas (CRY1Ab, CRY9c e CP4EPSPS).

Os controles se constituíram de 1) branco: tampão de extração; 2) negativo: tecido foliar de milho previamente diagnosticado como negativo, fornecido pela pesquisadora Alma Piñeyro-Nelson, seguindo o mesmo protocolo de extração utilizado nas amostras testadas; 3) positivos: foram fornecidos pelos kits. Para os Kits de

detecção das proteínas CRY1Ab e CRY9c, tratam-se de calibradores que foram utilizados diretamente. Já no caso do controle positivo para a proteína Cp4EPSPS, foram fornecidos nos Kits 2 gramas de grão de milho moído. Para tanto, estas foram colocadas em 5 mL de tampão de extração 1X, agitadas em vortex por 5 min, posteriormente em descanso por mais 10 min e retirou-se o sobrenadante, que foi usado como controle.

- *Testes de ELISA*

Os protocolos utilizados nos testes ELISA seguiram as indicações do fabricante (Tabela 3). No entanto, para um maior rigor, o número de lavagens das placas foi aumentado de 3 para 5 passos de lavagens. Para a detecção da proteína CRY9c, utilizou-se o protocolo de “Alta Sensibilidade”, o qual prevê um maior tempo de incubação com enzima conjugada. Apesar de este protocolo ter sido recomendado para análise de grãos, optou-se pelo mesmo visto a grande probabilidade das amostras serem homizigotas, contendo então apenas uma e não duas sequências do transgene. Exatamente por isso, considerou-se que o milho nativo, possivelmente contaminado por fluxo transgênico, poderia produzir e, portanto, apresentar menores concentrações de proteína recombinante, comparativamente a um homozigoto para o transgene.

A organização das amostras nas placas de ELISA para a análise foi realizada de tal maneira para permitir 45 plantas com fenótipos anormais e 45 plantas com fenótipos normais. Este procedimento teve

a finalidade de evitar dúvidas sobre a possível influência dos controles positivos nos resultados dos poços contíguos e que estes “falsos positivos” pudessem favorecer a frequência de algum dos fenótipos analisados, o que impediria o bom discernimento no teste das hipóteses. Nas primeiras seis placas (amostras M e N 1-270) foram colocadas as amostras do fenótipo anormal do lado dos controles positivos, enquanto nas cinco placas seguintes (amostras M e N 271-500) foram colocadas no lado oposto aos controles positivos. Na última placa, foram analisadas as amostras 496-500 e repetições de alguns positivos e alguns negativos para corroborar os resultados obtidos nas placas anteriores, sendo que desta vez, as amostras foram analisadas em duplicatas.

Tabela 3. Protocolos dos kits para detecção de proteína Envirologix.

Roundup Ready® Cp4 EPSPS	Bt Cry 1Ab	Starlink™ Cry 9c
1.- Adicionar 50µL de enzima conjugada 2.- Adicionar 50µL dos controles e as amostras	1. Adicionar 50µL de enzima conjugada 2.- Adicionar 50µL dos controles e as amostras	1. Adicionar 100µL dos controles e as amostras
Agitar por 30 s		
Incubar por 45 min	Incubar por 120 min	Incubar por 30 min
Lavar a placa 5 vezes a pressão com tampão de lavagem PBST.		
Adicionar 100µL de substrato	Adicionar 100µL de substrato	Adicionar 100µL de enzima conjugada
Agitar por 30 s		
Incubar por 15 min	Incubar por 30 min	Incubar por 120 min
		Lavar a placa 5 vezes a pressão com tampão de lavagem PBST
		Adicionar 100µL de substrato
		Agitar por 30 s
Incubar por 30 min		
Registrar os resultados		
Adicionar 100µL da solução stop (ácido hidroclorídrico)		
Ler num leitor de microplacas ELISA à 450 nm com referencia à 620nm		

Disponível em: www.envirologix.com

- *Determinação dos resultados positivos*

Os kits oferecem um resultado qualitativo ao mostrar uma reação colorida, que oferece um resultado preliminar. As placas foram fotografadas quando a reação colorida ficou azul. Subsequentemente, com a adição da solução *stop*, a reação tornou-se amarela.

Com a finalidade de dar maior consistência a estes resultados visuais, a reação colorida amarela foi quantificada medindo-se a sua densidade ótica (DO). Assim, as placas foram lidas num leitor de placas ELISA (Bio Rad) com um filtro de 450nm tendo como filtro de referência o de 620 nm.

Os valores das leituras de todas as placas fornecidas pelo leitor foram normalizadas subtraindo o valor médio dos controles branco a cada uma das densidades óticas. Após a normalização, verificou-se a média dos brancos para que não ultrapassasse o valor de 0,2 DO, e que a média dos controles positivos fosse superior a 0,2 DO e pelo menos 3 vezes maior que a média dos controles negativos. Além disso, verificou-se o coeficiente de variação (CV) para que não ultrapassasse o valor de 15%.

Presença da proteína CP4PSPS

Segundo o protocolo utilizado, uma amostra pode ser considerada como positiva à presença da proteína CP4EPSPS quando apresentar um valor igual ou superior a 1,0 em relação aos controles

positivos. Ou seja: Valor da DO da amostra / Valor médio da DO dos controles positivos ≥ 1 .

Presença da proteína Bt (CRY1Ab)

O protocolo do Kit recomenda considerar como resultado positivo, aqueles valores que sejam significativamente superiores ao valor dos controles negativos. Portanto, a fim de padronizar os resultados de todas as placas, consideraram-se como resultados positivos para a presença da proteína Cry1Ab, os valores superiores em 7,5% à média do valor da DO dos controles positivos. Este valor corroborou com os resultados visuais e em todos os casos foi superior em pelo menos 3 vezes em relação ao valor da média dos negativos.

Presença da Protéina CRY9c

O teste utilizou três calibradores positivos para diferentes concentrações da proteína CRY9c: 0,2 , 0,8 e 2,5%. Foram considerados os valores superiores ao valor de DO do calibrador positivo de menor concentração como resultados positivos à presença da proteína Cry9c.

5.4 Análise Estatística

Os resultados das frequências observadas foram testados com o teste qui-quadrado para a totalidade das plantas amostradas e também por comunidade. Foi utilizado o programa estatístico SYSTAT 11 (Inc, 2004, Version 11. Systat Standard Version. SPSS, Chicago), considerando as seguintes hipóteses:

- *Hipóteses da nulidade*: Não existe relação entre a presença de transgenes e os fenótipos anormais nas plantas de milho nativo.
- *Hipótese alternativa*: Existe relação entre a presença de transgenes e os fenótipos anormais nas plantas de milho nativo.

Com o fim de corroborar a significância estatística das diferenças entre as proporções, realizou-se também o teste de hipóteses em comparações emparelhadas.

6. Resultados

6.1 Enfoque participativo

Em todas as comunidades, as autoridades comunitárias aceitaram a coleta de material e, com exceção da comunidade de Santa Lúcia, incentivaram os agricultores a participar no projeto e a preservar as sementes nativas.

Nas entrevistas efetuadas surgiram algumas possíveis causas das deformações como: 1) a plantação contínua de sorgo não nativo, já que as datas do plantio das novas variedades de sorgo coincidem com a aparição de fenótipos anormais; 2) o uso de uma semeadora mecânica, na qual não existe um proceso de seleção de semente e podem ser plantadas sementes “ineficientes”, além da possibilidade de utilizar sementes do usuário anterior da semeadora; 3) a maior parte dos entrevistados considerou que o desenvolvimento de fenótipos anormais era por causa da presença de transgenes, encontrados desde 2001 em Oaxaca. Entre as possíveis fontes de fluxo transgênico destacaram-se o uso de sementes híbridas ou melhoradas das quais se desconhece a procedência e a experimentação de sementes trazidas pelos imigrantes dos Estados Unidos.

Todas as plantas amostradas para o presente estudo proveem de sementes de milho nativo que vêm sendo conservadas e passadas por gerações de agricultores por um período entre 25 e 150 anos. No entanto, os fenótipos anormais amostrados neste trabalho, surgiram há 5 e 6 anos atrás, sendo que nenhum dos registros são datados há mais de 12 anos.

6.2 Fenótipos Anormais

No presente estudo se encontraram fenótipos anormais que ainda não foram descritos na literatura consultada e reconhecida internacionalmente (NEUFFER et al., 1997; CIMMYT, 2004; REIS et al., 2004; SEN et al., 2010; <http://www.maizegdb.org/rescuemuphenotype.php>) e que são descritos na Figura 11.



Figura 11. Fenótipos anormais não reportados pela literatura citada A. Espiga super alongada na forma de galo, saindo do mesmo nodo de outra espiga; B. Elongamento da espiga; C. Espigas cheias de folhas e com uma espiga com grãos saindo, com coloração bronze. D. Elongamento da espiga com folhas na ponta, pendão com inflorescências lembrando à mutação de aderência foliar ou esterilidade masculina; E. Elongamento de espiga com folhas enrugadas na ponta; F. Elongamento de espiga, coloração bronze e folhas na ponta como se fosse galo; G. Elongamento de espigas paralelas ao tronco, a maneira de troncos paralelos ou galos, com folhas estreitas e bicudas nas pontas das espigas; H. Espiga que não produz na ponta da espiga um primórdio de pendão e folhas aciculadas e compridas; I. Elongamento das espigas em forma de galos com alguns grãos na ponta expostos.

6.3 Presença de Proteínas Recombinantes

Todas as placas de ELISA, com a exceção das placas RR 316-360 e CRY1Ab 91-135 cumpriram com os critérios gerais de avaliação propostos pelo fabricante dos Kits. A média dos controles negativos foi inferior a 0,2 DO e a média dos controles positivos foi maior que 0,2 DO e, pelo menos 3 vezes, superior à média dos controles negativos. No entanto, algumas das placas do CP4EPS e todas as placas de CRY9c apresentaram Coeficientes de Variação superiores a 15%, valor limite recomendado pelo fabricante (Envirologix) para garantir a validade dos resultados obtidos. Foi discutido junto ao serviço técnico de Envirologix sobre a avaliação dos dados obtidos nas placas de Roundup Ready e Starlink. Após a revisão do serviço técnico as placas de Roundup Ready, com exceção da placa RR 316-360, foram consideradas corretas e válidas sendo que estavam dentro dos intervalos de valores admissíveis.

No caso da proteína CRY9c observou-se que o protocolo de alta sensibilidade utilizado não foi adequado. Segundo o fabricante isso ocorreu devido ao fato de que a enzima peroxidase endógena do milho, diante de um maior tempo de incubação, poderia se ligar ao anticorpo inespecificamente, ou poderia gerar falsos positivos. Portanto, os resultados obtidos neste trabalho para a presença da proteína CRY9c foram desconsiderados em sua totalidade.

A proteína detectada em maior frequência foi a CRY1Ab, tendo sido detectada em todas as plantas que apresentaram presença de alguma proteína recombinante.

A proteína CP4EPSPS, expressa no evento Roundup Ready, foi detectada em 4/1000 amostras (0,4%), apenas em plantas com fenótipos anormais (4/500 ou 0,8%) e juntamente com presença da proteína Cry1Ab (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4. Número de plantas de fenótipos anormais com proteína recombinante detectada pelo método ELISA, com base nos critérios sugeridos pela empresa Envirológix.

Comunidades	Fenótipos anormais								
	n	Star-Link	Cry1 Ab	RR		Star /Cry	Star /RR	Cry /RR	Star /Cry /RR
Maguey Largo	150	0	13	0		0	0	0	0
El Porvenir	57	0	16	1		0	0	1	0
Santa Lucia	59	0	35	2		0	0	2	0
San Pedro Martir	184	0	44	1		0	0	1	0
San Felipe Apostol	50	0	9	0		0	0	0	0
Total	500	0	117	4		0	0	4	0

n = Número amostral; Star = StarLink; Cry = Cry1Ab; RR = Roundup Ready

Tabela 5. Número de plantas com fenótipos normais com proteína recombinante detectada pelo método ELISA, com base nos critérios sugeridos pela empresa Envirologix.

Comunidades	Fenótipos normais								
	n	Star-Link	Cry 1AB	RR		Star /Cry	Star /RR	Cry /RR	Star /Cry /RR
Maguey Largo	150	0	2	0		0	0	0	0
El Porvenir	57	0	8	0		0	0	0	0
Santa Lucia	59	0	17	0		0	0	0	0
San Pedro Martir	184	0	21	0		0	0	0	0
San Felipe Apostol	50	0	14	0		0	0	0	0
Total:	500	0	62	0		0	0	0	0

n = Número amostral; Star = StarLink; Cry = Cry1Ab; RR = Roundup Ready

Os resultados demonstraram a presença de proteínas recombinantes em 178 das 1000 plantas amostradas, significando uma porcentagem de “contaminação” por transgenes de 17,8% do universo amostral.

Uma maior frequência na presença de proteínas recombinantes foi observada quando 117/500 (23,4%) das plantas tinham algum tipo de fenótipo anormal. Enquanto que para as plantas com fenótipos normais, foram observadas proteínas recombinantes em 62/500 plantas (12,4%), praticamente 53% a menos que nas plantas com fenótipos anormais. Além disso, a comunidade Santa Lúcia mostrou a maior porcentagem de fluxo transgênico nas plantas amostradas, 52/118 (44,06%) e também a maior porcentagem na

presença de transgenes em fenótipos anormais, comparando com as demais comunidades estudadas (Tabela 6).

Tabela 6. Número e percentagem de plantas com proteínas recombinantes detectadas pelo método ELISA, com base nos critérios sugeridos pela empresa Envirológix, nas cinco comunidades amostradas.

Comunidades	Fenótipos Anormais				Fenótipos Normais		
	Plantas positivas	n	Porcentagem		Plantas positivas	n	Porcentagem
Maguey Largo	13	150	8,70		2	150	1,33
El Porvenir	16	57	28,07		8	57	14,03
Santa Lucia	35	59	59,32		17	59	28,81
San Pedro Martir	44	184	23,91		21	184	11,41
San Felipe Apostol	9	50	18,00		14	50	28,00
Total	117	500	23,40		62	500	12,40

n = Número amostral

Ao comparar as leituras de DO por proteína também pode ser observado que as mesmas são maiores nas plantas que apresentaram fenótipos anormais (Figuras 12, 13 e 14).

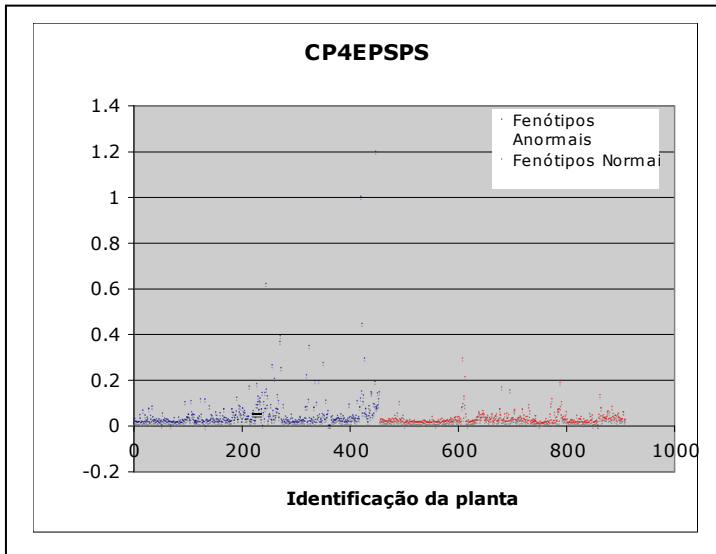


Figura 12. Valores de DO detectados na análise da proteína CP4EPSPS realizada em folhas de milho.

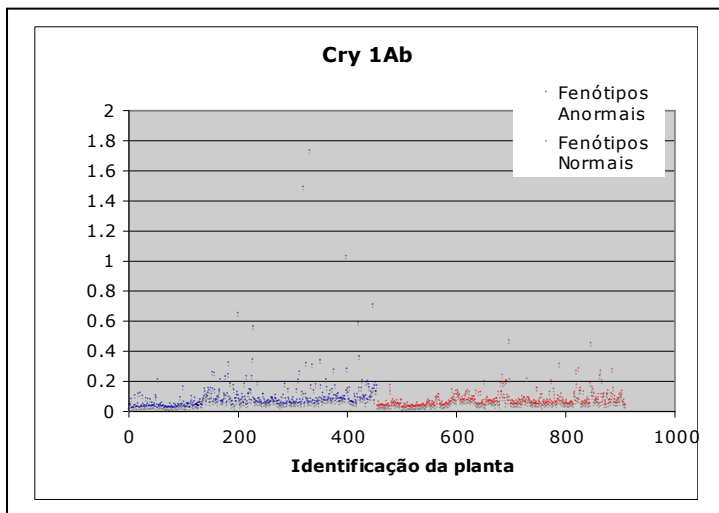


Figura 13. Valores de DO detectados na análise da proteína Cry1Ab realizada em folhas de milho.

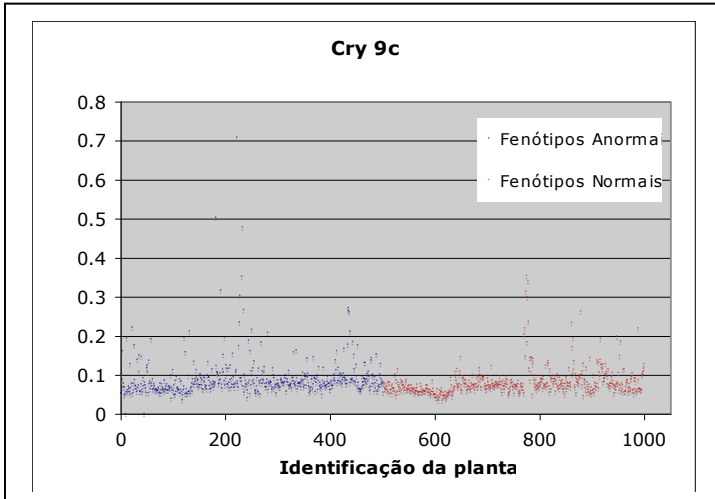


Figura 14. Valores de DO detectados na análise da proteína Cry9c realizada em folhas de milho.

6.3 Análise Estatística

6.3.1 Teste Qui-quadrado

Todas as comparações feitas entre o número de plantas com presença transgenes e o número de plantas com ausência transgenes agrupadas pelo fenótipo normal verso as de fenótipo anormal, produziram desvios estatísticos significativos para todas as comunidades estudadas (Tabela 7).

Tabela 7. Número de plantas com presença ou ausência de transgenes, agrupados por fenótipo (normal ou anormal) e teste do qui-quadrado.

Categoria	Fenótipos		χ^2	P	Interpretação do resultado
	Normais	Anormais			
Comunidade Maguey Largo (n= 300)					
Plantas com presença de transgenes	2	13	8,491	0,004	Sendo P inferior a $\alpha=0,05$, rejeita-se a hipótese de nulidade e se aceita que existe uma relação entre a presença de transgenes e os fenótipos anormais na comunidade Maguey Largo
Plantas com ausência de transgenes	148	137			
Comunidade El Porvenir (n=114)					
Plantas com presença de transgenes	8	16	3,378	0,066	Sendo P superior a $\alpha=0,05$, se aceita a hipótese de nulidade e, portanto, que não existe uma relação entre a presença de transgenes e os fenótipos anormais na comunidade El Porvenir
Plantas com ausência de transgenes	49	41			
Comunidade Santa Lúcia (n=118)					
Plantas com presença de transgenes	17	35	11,140	0,001	Sendo P inferior a $\alpha=0,05$, se rejeita a hipótese de nulidade e se aceita que existe uma relação entre a presença de transgenes e os fenótipos anormais na comunidade Santa Lúcia
Plantas com ausência de transgenes	42	24			

Comunidade San Pedro Mártir (n=368)					Sendo P inferior a $\alpha=0,05$, se rejeita a hipótese de nulidade e se aceita que existe uma relação entre a presença de transgenes e os fenótipos anormais na comunidade San Pedro Martir
Plantas com presença de transgenes	21	44	9,88	0,002	
Plantas com ausência de transgenes	163	140			
Comunidade San Felipe Apostol (n=100)					Sendo P é superior ao α se aceita a hipótese de nulidade e, portanto, que não existe uma relação entre a presença de transgenes e os fenótipos anormais na comunidade San Felipe Apostol
Plantas com presença de transgenes	14	9	1,412	0,235	
Plantas com ausência de transgenes	36	41			
Total (n=1000)					Sendo P inferior à $\alpha= 0,01$ a diferença entre os dois grupos é muito significativa e, portanto, se conclui que existe relação entre a presença de transgenes e o desenvolvimento de fenótipos anormais em plantas de milho nativo.
Plantas com presença de transgenes	62	117	20,584	0,001	
Plantas com ausência de transgenes	438	383			

6.3.2 Teste de hipóteses em comparações emparelhadas

Para confirmar os resultados do teste de χ^2 , foi realizada a análise estatística de comparações emparelhadas (STEEL e TORRIE, 1981).

Comunidade	Fenótipos anormais	Fenótipos normais	Diferenças
Maguey Largo	13	2	11
El Porvenir	16	8	8
Santa Lucia	35	17	18
San Pedro Martir	44	21	23
San Felipe Apostol	9	14	-5
Totais	117	62	55

$N = 5$;

$d = 55/5 = 11$

$$SD^2 = \frac{11^2 + 8^2 + 18^2 + 23^2 + (-5)^2 - 55^2/5}{5-1} = 33.5$$

$$t = 11 / \sqrt{33.5/5} = 4.2496$$

$$t_{0.01}(4) = 3.747$$

Sendo o valor de t calculado maior que o t tabelado, pode-se concluir que a diferença é estatisticamente significativa e, portanto, é também possível rejeitar a hipótese da nulidade. Este resultado corroborou com os resultados obtidos pelo teste de qui-quadrado.

Assim, a existência de uma relação entre a presença de transgenes e a aparição de fenótipos anormais em plantas de milho

nativo no México pode ser inferida, ou pelo menos, ser levantada como hipótese de trabalho em estudos futuros.

7. Discussão

7.1 Critérios para determinar a presença de proteínas recombinantes com kits Envirologix

A técnica de ELISA tem sido uma das mais utilizadas na detecção de transgenes no mundo inteiro, devido a sua sensibilidade, precisão e facilidade técnica (Ahmed, 2002; Van den Bulcke et al., 2007). Os testes comerciais são elaborados considerando as variedades convencionais ou híbridas, sendo que estas são plantadas em maior superfície no mundo.

Diferentemente das variedades nativas, as sementes de variedades convencionais geralmente não são guardadas, multiplicadas ou conservadas pelos agricultores. Portanto, apesar da sensibilidade da prova, os critérios para determinar a presença de proteína poderiam não ser os mais apropriados para determinação de reações positivas em variedades nativas. Nessas, a priori, é desconhecida a geração na qual ocorreu transferência (fluxo gênico), o tempo da introgressão do transgene no genoma das variedades nativas e as possíveis mudanças na expressão do transgene ou mesmo de rearranjos decorrentes das interações genéticas e ecológicas ocorridas através das gerações.

Heinemann e Traavik (2004) alertaram sobre as dificuldades e limitações atuais para determinar presença de transgenes em cultivares onde pode ter ocorrido fluxo gênico acidental em plantas ou da presença do transgene ou suas proteínas expressas nos alimentos. Isso devido aos limites de detecção e à legislação em vários países que preveem uma determinada porcentagem de contaminação com transgenes para estes alimentos serem etiquetados, bem como a capacidade das técnicas e as estratégias de amostragem necessárias para atingir esses limites.

Pineyro-Nelson et al. (2009) sugeriram considerar critérios especiais ao testar variedades nativas. Em razão dos critérios consensuados internacionalmente, como os utilizados pela empresa Genetic ID (GID - uma empresa que certifica a presença de sequências transgênicas comerciais em grandes volumes), por exemplo, podem não ser suficientes para detectar todos os resultados positivos nestas variedades nativas. A empresa realiza as análises com ajuda da técnica PCR e utiliza como critério de determinação de um resultado positivo a intensidade da banda resultante da PCR. Sendo este um valor semiquantitativo, pode desconsiderar resultados que mostrem uma amplificação em baixa intensidade da sequência procurada.

Os referidos autores (PINEYRO-NELSON et al., 2009) enviaram amostras (dez positivas e dez amostras negativas) de milho nativo à GID que haviam sido previamente testadas em dois laboratórios independentes, obtendo resultados tanto positivos como negativos, pelas técnicas de PCR e Southern Blot. As amostras negativas enviadas foram consideradas como negativas. Mas nove das dez amostras

positivas enviadas foram consideradas abaixo do nível de detecção pela empresa GID, demonstrando as limitações do método e dos critérios da empresa GID na detecção de transgenes em variedades nativas.

Os resultados do presente estudo sugerem que os critérios utilizados pela Envirologix para classificar os resultados como positivos podem apresentar as mesmas limitações que os critérios utilizados pela empresa GID. Consequentemente, se a concentração de proteínas recombinantes em variedades nativas de milho for pequena haverá baixo nível de detecção pelo critério estabelecido pela Envirologix. Assim, os resultados aqui obtidos podem ser considerados conservadores, pois, mesmo diante da presença da proteína a quantidade não atende os referidos requisitos.

Por exemplo, para determinar a presença da proteína CP4 EPSPS se considera o *Positive Control Ratio Value (PCRVR)* como referência. Se for avaliado tecido foliar na análise de detecção o critério para determinar um resultado positivo à presença da proteína na amostra, segundo a empresa Envirologix, é um PCRVR igual ou maior que 1,0. Se o material a ser testado for grãos, então o PCRVR deve ser igual ou maior a 0,25. Isto é embasado pelo fato de que o tecido foliar expressa maior quantidade de proteína CP4EPSPS que os grãos e que o controle positivo utilizado na prova é grão moído. Desta forma, no presente estudo analisaram-se amostras de tecido foliar, sendo utilizado o critério de $PCRVR \geq 1,0$.

Dyer et al. (2009) realizam um diagnóstico de detecção de proteínas recombinantes em variedades nativas de milho e consideraram como resultados positivos, os valores superiores à média

dos valores de densidade óptica mais cinco vezes o desvio padrão do valor dos controles negativos. Se forem considerados no presente estudo tanto o critério utilizado por Dyer et al. (2009) quanto que não há diferenças significativas entre marcas de kits (Envirologix e Agdia), a presença da proteína CP4EPSPS reportada neste estudo seria de 48/1000 amostras e não de 4/1000 que são aceitas pelo critério estabelecido pela Envirologix.

Além disso, se é considerado o mesmo critério proposto pela Envirologix para análise de amostras de folhas agora em grãos, ou seja, um PCRV igual ou maior à 0,25, o número de amostras com resultado positivo à presença de CP4EPSPS no presente trabalho seria de 29/1000 e não 4/1000 como reportado neste estudo.

Ao comparar os resultados visuais nas placas e os resultados de leitura das placas das diferentes proteínas testadas, por exemplo, as placas das amostras 271 – 315 para proteína Cry1Ab e CP4EPSPS (Figura 15), observou-se que, 27 das 29 amostras também resultaram positivas à presença de Cry1Ab, ainda que a coloração obtida seja pálida.

Considerando que as variedades analisadas neste estudo foram nativas, as quais são conservadas e multiplicadas ano após ano pelos próprios agricultores, não é possível precisar sobre o início do fluxo de transgenes, nem do tempo de introgressão nas variedades nativas. Mais além, sem estudos moleculares mais profundos, é difícil inferir sobre o número de cópias do transgene presente e se estas cópias têm sofrido algum tipo de mudança decorrente das interações genéticas. Assim, algumas destas cópias podem ter sofrido

silenciamento, diminuindo então a concentração da proteína expressa (LINNE et al., 1990; MATZKE e MATZKE, 1995; VAUCHERET e FAGARD, 2001). Nem mesmo pode-se inferir neste momento sobre possíveis rearranjos que podem ter ocorrido após o fluxo gênico.

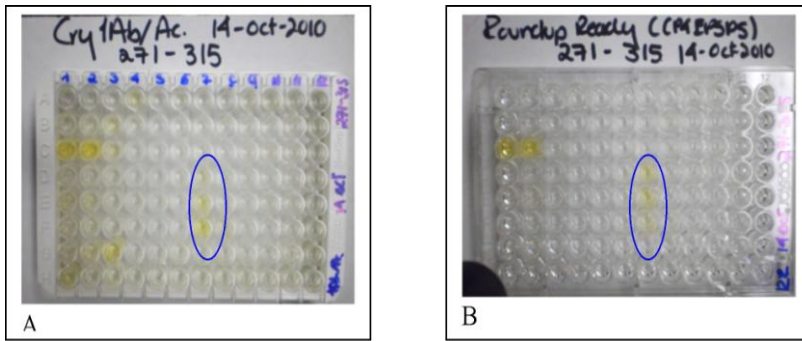


Figura 15. A. Placa de Elisa para a detecção da proteína Cry1Ab, correspondente as amostras 271- 315, onde as amostras dentro dos pocinhos 7D, E e F são classificadas como positivas, seguindo os critérios de Envirologix. B. Placa de Elisa para a detecção da proteína CP4EPSPS, correspondente as amostras 271-315, onde as amostras dentro dos pocinhos 7D, E e F são classificadas como negativas, seguindo os critérios de Envirologix.

Neste sentido, é plenamente possível questionar se as amostras que foram desconsideradas pelos critérios estabelecidos pela Envirologix e utilizados no presente trabalho, realmente são falsos positivos, ou se são positivos de fato, mas com uma baixa concentração de proteína. Desta forma, os resultados aqui encontrados podem ser tomados como conservadores.

Adicionalmente, no caso de determinação de resultados positivos à proteína Cry9c expressada pela variedade Starlink, o serviço técnico de Envirologix considerou inapropriado o uso do protocolo de alta sensibilidade para a detecção desta proteína em tecido foliar. Consequentemente foram desconsiderados todos os resultados possivelmente positivos obtidos no presente estudo. Segundo os técnicos da referida empresa, ao expor as amostras de folha a um maior tempo de incubação com o conjugado enzimático, pode resultar um falso resultado. Isto é devido à existência de uma enzima peroxidase endógena do milho, que pode se ligar inespecificamente ao anticorpo da proteína Cry. Consequentemente, todos os resultados positivos poderiam ser resultado de dita ligação inespecífica e não da presença da proteína recombinante. Entretanto, o tempo de incubação com a enzima conjugada proposto no protocolo de alta sensibilidade para a detecção da proteína Cry9c é o mesmo proposto pela Envirologix para detecção da proteína Cry1Ab (que também é uma proteína da família Cry). Desta forma, não há clareza se realmente o tempo de incubação aplicado na detecção da Cry9c foi excessivo. Alternativamente, por tratar-se de uma proteína expressa por uma variedade não permitida para consumo humano, a Envirologix restringe ainda mais os critérios de determinação de positivos desta proteína.

Similarmente, se for considerado como apropriado o protocolo de alta sensibilidade, seriam 16 amostras que mostraram um resultado positivo à presença da proteína Cry9c, das quais seis são também positivas para Cry1Ab. Neste caso, sendo as duas proteínas Cry, poderia ser hipotetizado que os testes não são suficientemente eficientes para

diferenciar as duas proteínas da família Cry. No entanto, a comparação das fotografias e das leituras de ambas as proteínas (Figura 16), revela que existem coincidências em muitas das amostras. Por outro lado, existem diferenças entre as amostras, em razão de que algumas amostras são positivas para Cry1Ab e não são para Cry9c e vice-versa, sugerindo que as provas efetivamente são suscetíveis para diferenciar reações específicas. Além disso, caso seja utilizado o critério de classificação de positivos para grão em RR, outras duas amostras seriam positivas para as três proteínas testadas.

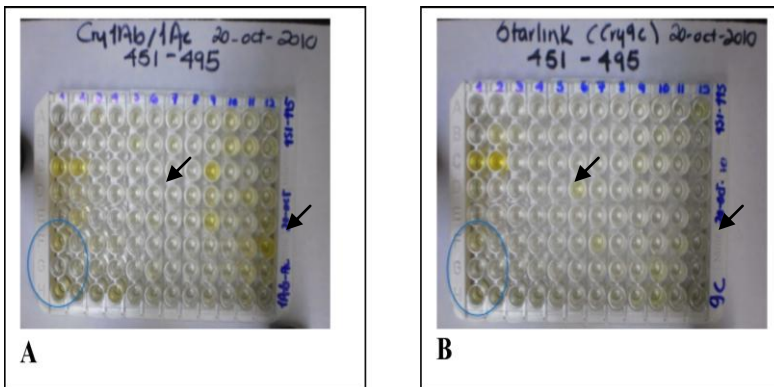


Figura 16. A. Placa de Elisa para a detecção da proteína Cry1Ab, correspondente as amostras 451- 495 B. Placa de Elisa para a detecção da proteína Cry9c, correspondente as amostras 451- 495, onde as amostras dentro dos pocinhos 1F e H coincidem em um resultado positivo. Em contraste com os pocinhos 6D e 12 F onde os resultados diferem.

7.2 Causas de fenótipos anormais

7.2.1. Causas propostas pelos agricultores

Discutiram-se junto com os agricultores as possíveis causas dos fenótipos anormais encontrados em suas comunidades, assim como, a possível fonte ou origem da contaminação de transgenes. Mapas de todas as comunidades participantes foram construídos e analisados. Nos mapas foram identificadas as parcelas amostradas, as variedades nelas plantadas e as variedades plantadas nas parcelas vizinhas, com a finalidade de verificar se existia algum padrão que pudesse explicar a fonte de contaminação e o desenvolvimento dos fenótipos anormais. Nenhum padrão comum a todas as cinco comunidades foi identificado.

Durante a amostragem postularam-se por parte dos agricultores algumas hipóteses sobre a causa dos fenótipos anormais, entre as mais freqüentes encontraram-se: (i) a possibilidade de cruzamento recente com uma variedade convencional de sorgo e (ii) o uso da semeadora mecânica, que resultaria em mistura de sementes. No entanto, na reunião de discussão e entrega dos resultados; concluiu-se que o cruzamento com o sorgo híbrido não poderia ser uma causa dos fenótipos anormais, pois em algumas das comunidades havia plantios de sorgo não nativo há mais de 25 anos e nunca foi observado o desenvolvimento dos fenótipos reportados neste trabalho. Além disso, existem estudos onde se tentou hibridizar o milho com o sorgo sem obter resultados favoráveis, mesmo em condições forçadas de polinização (BERNARD e JEWELL, 1985; DHALIWAL e KING, 1978; HESLOP-HARRISON et al., 1985). Outro fato destacado por alguns

agricultores foi o uso de uma semeadora mecânica, embasado no pressuposto que a seleção da semente não é efetuada corretamente, pois se misturam e são plantadas junto com os grãos que se encontram no meio da espiga com aqueles grãos dos extremos da espiga. Segundo o conhecimento tradicional, isto pode trazer algumas deformações ou pelo menos o “encanamento” das plantas. Neste caso, plantas só se desenvolveriam vegetativamente, não produzindo grãos. Entretanto, amostraram-se duas parcelas da mesma comunidade, nas quais foi utilizada a semeadora e em uma delas, uma grande quantidade de plantas com distintas deformações foi encontrada, enquanto na outra, apenas poucas deformações foram encontradas, evidenciando uma baixa probabilidade de a semeadora mecânica ser uma das causas das deformações.

Foram discutidas junto com os agricultores outras causas possíveis, como o efeito das condições ecológicas e a endogamia, o que será abordado nos próximos itens.

7.2.2 Causas patológicas

Ainda que alguns fenótipos anormais decorrentes de doenças provocadas por vírus, bactérias, insetos e fungos ou certas condições ambientais como problemas de nutrientes no solo, excesso ou falta de água (AGRIOS, 2005; CIMMYT, 2004; REIS et al., 2004) foram encontrados na área de estudo. Estes não foram amostrados, visto que a maioria destas deformações foi considerada comum, não atendendo aos pressupostos do presente estudo. Como citado anteriormente, na amostragem foram procuradas aberrações morfológicas totalmente

novas para os agricultores da região. O único fenótipo anormal amostrado registrado como uma doença, que não foi considerado comum, foi o fenótipo denominado de “ponta loca” (ou “crazy top”), doença provocada por um fungo chamado *Sclerophthora macrospore*, onde são encontradas estruturas foliares semelhantes à estrutura de um primórdio de espiga em cada “grão” do pendão (Reis *et al.*, 2004; Cimmyt, 2004; <http://cropdisease.cropsci.illinois.edu/corn/index.html>). Em contraste, a maior parte de fenótipos anormais amostrados correspondem à mutações genéticas (NEUFFER e WESSLER, 1997). Alguns destes fenótipos amostrados ainda não foram reportados na literatura, o que gera a probabilidade de serem mutações totalmente novas no milho (Figuras 2 e 11).

7.2.3 Condições Ecológicas

A maior parte das parcelas amostradas é de tamanho pequeno (<1 ha) e encontram-se muito próximas umas das outras, em relevo de planície. Na região (Figura 9) há condições climatológicas mais ou menos semelhantes. As comunidades que poderiam ter alguma diferença seriam Maguey Largo e El Porvenir, já que estas comunidades se encontram numa altitude maior que as outras três e as parcelas apresentam um pouco de declive, o que poderia diminuir a permanência da umidade no solo, comparada com as comunidades que se encontram em planície e que podem sofrer alagamento. No entanto, não foram observadas diferenças nas frequências de deformações ao comparar as comunidades El Porvenir e Maguey Largo com as demais

comunidades. Por isto, supõe-se que as condições ecológicas, ainda que possam ter um papel importante, podem não ser chave no desenvolvimento das deformações amostradas neste estudo. No entanto, estudos específicos deveriam ser realizados para validar esta hipótese.

Adicionalmente, foi considerada a possibilidade de que certa variedade nativa fosse mais susceptível a certas condições ecológicas. Entretanto, esta hipótese foi descartada junto com os agricultores, pois nenhuma variedade mostrou um padrão de maior susceptibilidade que outra. Além disso, o intercâmbio de sementes intra e entre comunidades e o fato de muitas parcelas terem sido plantadas com a mesma variedade em condições semelhantes e com resultados diferentes, diminui esta possibilidade de que umas variedades seriam mais susceptíveis que outras em termos de produção de fenótipos anormais.

7.2.4 Endogamia

A possibilidade da depressão endogâmica por homozigose causar fenótipos anormais também foi discutida junto com os agricultores. Segundo as entrevistas anteriores à coleta, algumas sementes tinham sido conservadas por 25 anos e outras até por 150 anos. Mas seguindo a rota da origem das diferentes sementes e os intercâmbios de semente entre as famílias e entre as comunidades amostradas, chegou-se a conclusão de que a maioria das sementes tinha mais de 100 anos de conservação. Assim, a possibilidade de

depressão endogâmica existe, embora provavelmente as variedades encontram-se em equilíbrio de endogamia, considerando o tempo de conservação e multiplicação das sementes (MIRANDA-FILHO, 2009, comunicação pessoal). Este equilíbrio as vezes tem sido quebrado pela presença de variedades híbridas, plantadas nas proximidades das parcelas amostradas, considerando que estas se encontram na região desde os anos 80's, quando promovida sua disseminação por meio de programas governamentais. Mais além, os agricultores informaram que na presença das variedades híbridas sempre ocorreram plantas deformadas, embora em baixa frequência. E os fenótipos anormais decorrentes da presença de variedades híbridas já são conhecidos pelos agricultores desde crianças, em contraste com os fenótipos anormais descritos neste estudo, os quais começaram a ser vistos há aproximadamente 5 ou 6 anos (portanto, desde 2005 ou 2006) e são anomalias totalmente novas e em uma alta frequência comparativamente as demais anomalias já amplamente conhecidas. Portanto, segundo os agricultores, a presença de transgenes na região é considerada a causa principal dos fenótipos anormais e não a endogamia.

Entretanto, as mudanças epigenéticas causadas pela entrada de transgenes podem ser acumuladas em progênies endogâmicas e autopolinizadas, provocando as deformações. KAKUTANI *et al.* (1996) observaram aberrações fenotípicas em mutantes de *Arabidopsis thaliana* com um gene de milho em decorrência de uma baixa metilação, alterando processos regulatórios de silenciamento por metilação. Esses efeitos podem ser herdáveis e intensificadas no passar

das gerações, predominantemente em progênies autopolinizadas. Por outro lado, Matske *et al.* (1995) concluíram que o processo de silenciamento é frequente em sistemas transgênicos pois os transgenes são reconhecidos como DNA estranho, além de promover o silenciamento pela inserção de mais de uma cópia do transgene ou pela presença de um gene homólogo do transgene no genoma receptor.

Considerando que: (i) no processo de transformação da planta muitas vezes são incorporadas várias cópias do transgene (revisão feita por LATHAM *et al.*, 2006); (ii) na ocorrência de fluxo de transgenes entre as variedades geneticamente modificadas e nas variedades nativas, as várias cópias do transgene são transferidas; (iii) na introgressão e constante fluxo de transgenes, existe a possibilidade de acumulação de cópias de transgenes e de diversos tipos de transgenes; (iv) a sequência no milho transgênico na qual está inserido o transgene, ao existir cruzamento com o milho nativo, pode encontrar-se com uma sequência homóloga e (v) que as práticas culturais de conservação e multiplicação das próprias sementes dos agricultores favorecem a depressão endogâmica, pode inferir-se que o silenciamento de transgenes e de genes homólogos endógenos das variedades nativas, pode acontecer de maneira frequente. Mais além, que estas modificações potenciais, podem ser herdáveis e cumulativas, aumentando a frequência também de aberrações morfológicas.

7.2.5 Transposons e transgenia

Os transposons conformam a maior parte do genoma do milho

e podem contribuir para o desenvolvimento de mutações (BIÉMONT e VIEIRA, 2006; CANDELA e HAKE, 2008; PRAY, 2008). Um fator a considerar na desestabilização da atividade dos transposons é o ambiente genético individual, o qual ao encontrar com um ambiente genético diferente pode interagir com outros transposons ou outros genes, quebrando a estabilidade. Isso pode gerar variações morfológicas importantes, pois podem ser variações decorrentes de processos regulatórios e não estruturais (CANDELA e HAKE, 2008; FEDOROFF, 2000).

Vaucheret e Fagard (2001) observaram o comportamento do silenciamento na transcrição e na pós-transcrição, mostrando como os transgenes sofrem o mesmo processo de silenciamento transcricional que os transposons, desde que os transgenes se mimetizem em forma de transposons.

Segundo Latham *et al.*, (2006), o processo de transgenia em si, pode ser um fator indutor de mutações, desde que a inserção do transgene rompa a sequência de DNA endógena da planta hospedeira, gerando fenótipos inesperados e indesejados. Considerando que os backgrounds genéticos das variedades transgênicas e das variedades nativas são diferentes que os milhos transgênicos já trazem um elemento indutor de mutações devido ao processo de inserção, que no fluxo transgênico os transgenes teriam que interagir com os genes da variedade hospedeira e que os mesmos seriam inseridos em locos inespecíficos do genoma do hospedeiro, é razoável postular que a presença de transgenes poderia provocar a diversidade de fenótipos anormais novos encontrados no presente estudo. Por outro lado,

Cummings (2001a, b) adverte sobre a intensificação de variação somaclonal no processo de obtenção de variedades geneticamente modificadas, admitindo-se variação somaclonal como a variação fenotípica de plantas regeneradas de cultura de tecidos que apresenta grande frequência de caracteres herdáveis. Este tipo de variação está associado com a duplicação de retrotransposons nas células nucleares e que se inserem nos genes estruturais provocando mutações e rearranjos cromossômicos. Por isto Cummings (2001) propôs realizar estudos mais profundos sobre a transposição e estabilidade dos cultivos geneticamente modificados e sugeriu uma moratória ao uso e distribuição dos cultivos geneticamente modificados até a realização de mais estudos sobre a estabilidade genética destes cultivos.

Adicionalmente, os métodos de inserção de transgenes são inespecíficos quanto ao número de cópias do transgene e ao loco onde esse transgene é inserido, como constatado por diversos pesquisadores. O número de cópias e a localização do transgene são relevantes para o desenvolvimento de aberrações fenotípicas (KAKUTANI et al., 1996; LINNE et al., 1990; MATZKE e MATZKE, 1995; MICHALAK, 2008; VAUCHERET e FAGARD, 2001).

7.2.6 Acumulação de Transgenes e Epigénese

Os níveis de expressão do transgene em plantas geralmente são imprevisíveis e variável dependendo do número de cópias e do local de inserção. Esta instabilidade na expressão do transgene pode ser verificada desde a primeira geração, apresentar variação fenotípica que pode ser herdável de maneira não Mendeliana e ainda pode não ter

expressão alguma. A instabilidade genética é bastante comum em cultivos geneticamente modificados e tem se observado que a não expressão não se deve a ausência do transgene e sim a sua desativação, sendo esta desativação geralmente associada a múltiplas cópias do transgene. No entanto, também pode existir desativação em cultivos com uma única cópia, mas isto é pouco frequente (FINNEGAN e McELROY, 1994; MATZKE e MATZKE, 1995; KAKUTANI et al., 1996; VAUCHERET e FAGARD, 2001).

Kato (2004) e Turrent et al. (2009) expuseram a preocupação sobre o uso de eventos transgênicos estaqueados, aqueles que contém mais de um tipo de transgene. Isto poderia estar provocando a acumulação de cópias de transgenes iguais ou distintos no milho nativo mexicano, com as possibilidades de fluxos gênicos anuais durante certo período de tempo. No âmbito da citogenética é reconhecido que a duplicação de segmentos cromossômicos ou de cromossomas completos, frequentemente, induz aberrações cromossômicas e fenotípicas nos indivíduos. Como já mencionado nos parágrafos anteriores, na transformação genética das plantas, o número de cópias inseridas, a sua localização no cromossomo e o arranjo local, eu podem estar acompanhados de rearranjos, são desconhecidos e pode variar entre os distintos eventos de transformação genética. Portanto, os autores alertam sobre o risco de ocorrência de fenótipos aberrantes nas variedades nativas provocado pelo fluxo de transgenes, mesmo quando esta possibilidade for em longo prazo, já que atualmente se desconhece os possíveis efeitos da acumulação de transgenes no milho.

Kato (2004) alertou sobre a possibilidade destas cópias se localizarem em diferentes cromossomos nas células transformadas, fato que pode estar formando duplicações em série. Explicou ainda como muitas das cópias repetidas podem ser desativadas por mecanismos que existem para controlar o DNA exógeno, tal como o silenciamento dos transgenes e genes endógenos homólogos (MATZKE e MATZKE, 1995). Ainda previu que as cópias de transgenes inativos ao não expressarem-se e não estando sob pressão de seleção, favoreceria a sua manutenção e dispersão para as demais populações.

A partir dos anos 1980s casos de silenciamento envolvendo interações genéticas entre transgene/transgene ou transgene/gene endógeno começaram a serem publicados. Nestes estudos existia uma característica comum: todos os casos encontravam-se associados a múltiplas cópias de sequências homólogas, as quais podiam ser sequências codificantes ou promotores ou ambas (MATZKE e MATZKE, 1995). Existem diferentes modos ou tipos de silenciamento homólogo-dependente que podem ocorrer na transcrição ou na pós-transcrição (MATZKE e MATZKE, 1995; VAUCHERET e FAGGARD, 2001). O primeiro é denominado como inativação *Cis* e consiste no silenciamento de múltiplas cópias ligadas de transgenes, geralmente através da metilação. O segundo tipo é chamado inativação *trans* no qual o silenciamento pode ocorrer em uma sequência homóloga que se encontra em outra molécula de DNA e geralmente está relacionado com a paramutação. Paramutação é descrita como um fenômeno onde um alelo debilita a atividade de outro alelo mais suscetível e esta debilitação pode ser passada para várias gerações seguintes. O terceiro

tipo de silenciamento homólogo-dependente é a co-supressão, o qual requer um silenciamento coordenado, entre o transgene e o gene homólogo, ou entre dois locos de transgenes (MATZKE e MATZKE, 1995). O silenciamento por co-supressão geralmente encontra-se associado ao silenciamento pós-transcricional, pois quando a acumulação de transcritos de RNA chegar a um limite é desencadeado este silenciamento. Por esta causa, tem sido admitido que este tipo de silenciamento é um mecanismo de defesa da planta, desde que mais do 90% dos vírus que atacam as plantas tem um genoma de RNA (FINNEGAN e McELROY, 1994; MATZKE e MATZKE, 1995, VANCE e VAUCHERET, 2001).

No caso das populações de milho nativo do México, a velocidade de dispersão seria de acordo com a intensidade do intercâmbio de sementes entre os agricultores (DYER et al., 2009), fato que pode promover a acumulação de grandes quantidades de DNA exógeno em forma de transgenes, bem como de distintos tipos de transgenes nas plantas de milho nativo, até chegar num nível que, conseqüentemente, possa causar efeitos fenotípicos não desejados. Este limite seria alcançado dependendo da constituição genética das populações de milho nativo e o grau de fluxo de transgenes seguido da introgressão, podendo causar tanto a diminuição do rendimento destas variedades nativas como também causar danos significativos à diversidade genética em cultivo (KATO, 2004; TURRENT et al., 2009; TURRENT-FERNÁNDEZ et al., 2009).

O resultado mais agravante obtido no presente estudo dói a detecção de alta porcentagem de presença de proteínas

recombinantes de milho transgênico em milho nativo (17,9% em média), quando seguidos estritamente os padrões estabelecidos pela Envirologix. No entanto estes valores podem ser maiores (ex: 18,8%) quando os padrões da Envirologix são relaxados o suficiente para evitar falsos positivos. Neste sentido, relaxando-se os critérios da Envirologix, pode-se observar que 33/188 amostras positivas (17,55%) contém mais de uma proteína recombinante, o que concordaria com a hipótese proposta por Kato (2004) e Turrent et al. (2009) sobre a influência de eventos estaqueados (ou piramidados) e o número de cópias de transgenes no desenvolvimento de aberrações morfológicas. Assim esta hipótese estaria tendo maior suporte.

8. Considerações finais

A primeira contribuição deste estudo foi a constatação acompanhada do registro de fenótipos anormais de milho em seu centro de origem e diversidade, até então não constatados ou registrados, que começaram a aparecer coincidentemente a partir da liberação comercial e cultivo de milho transgênico no mundo, em particular nos Estados Unidos.

O presente estudo constitui a primeira aproximação sistemática e estatisticamente significativa sobre a relação entre a presença de transgenes e a frequência de fenótipos anormais em plantas de milho nativo mexicano, corroborando com as hipóteses levantadas e inicialmente avaliadas pela Rede em Defesa do Milho em 2005.

Neste estudo, os testes de hipóteses mostraram uma diferença estatística significativa demonstrando a existência de relação entre a presença de proteínas recombinantes de milho transgênico e o desenvolvimento de fenótipos anormais em plantas de milho nativo na região dos Vales Centrais de Oaxaca.

No entanto, considerando as limitações da técnica ELISA e dos padrões de determinação de positivos em análises de fluxo transgênico em variedades nativas, são necessários estudos posteriores envolvendo análises genéticas, baseadas em sequências de DNA, as quais validariam todos os resultados obtidos até agora. Em particular aqueles determinados como “falsos positivos” pelos critérios estabelecidos pela empresa Envirologix, o que permitirá chegar a conclusões mais contundentes.

Sugere-se também, estudos moleculares adicionais que possam dirimir se existe ou não influência direta dos transgenes ou de sua quantidade na aparição de fenótipos anormais. Os dados aqui obtidos sugerem que, mesmo existindo vários fatores que possam desencadear o desenvolvimento de fenótipos anormais em plantas nativas de milho e que não puderam ser esclarecidos neste estudo. Os estudos poderiam concentra-se nas possíveis causas tais como alteração na estrutura cromossômica, mudança regulatória via epigenese intensificada ou não pela depressão endogâmica, ou como proposto por Kato (2004) e Turrent et al. (2009), um nível determinado de acumulação de transgenes (piramidação de transgenes). Existe também conhecimento sobre a biologia e genética do milho que permite levantar a hipótese da presença de transgenes como fator promotor ou catalisador do desenvolvimento das aberrações morfológicas aqui detectadas.

Consequentemente seria recomendado também uma análise via PCR por evento específico, múltiplex com a finalidade de detectar com maior acurácia a presença de transgenes e a real frequência dos mesmos, em particular de fenótipos anormais em amostras que contenham mais de um evento transgênico ou não. Além disso, seria necessária a quantificação (via PCR tempo real) para permitir conhecer o número de cópias das sequências transgênicas presentes nas variedades nativas. A localização destas cópias nos cromossomas poderia também contribuir na elucidação da relação encontrada no presente estudo..

Os resultados do presente estudo também servem como ferramentas de análise para a tomada de decisões de biossegurança. É necessário aplicar o princípio da precaução disposto no Protocolo de Cartagena para a liberação comercial ou experimental em grandes extensões de variedades de milho transgênico no México, considerando que o fluxo de transgenes se apresenta em alta percentagem.

Até 2008, existia no México uma moratória de fato à plantação de milho transgênico, tanto comercial quanto experimental. Adicionalmente, as práticas culturais no México, intensificam a dispersão e acumulação de transgenes, mesmo de forma totalmente involuntária e inconsciente, incrementando a possibilidade de desenvolvimento de anormalidades nas variedades nativas. Isso se revela como um risco à conservação da riqueza genética do milho no centro de origem e diversidade. Por outro lado, os resultados alertam tanto sobre as perdas econômicas que estas deformações podem causar ao tornar as plantas completamente improdutivas, visto que o milho é considerado um dos principais alimentos do mundo, como também o aumento da erosão genética.

Finalmente, a alta frequência de transgenes constatadas nas diversas variedades nativas de milho em cinco comunidades mexicanas, maior de que aquelas encontradas por outros estudos, se constitui em um dramático alerta sobre a necessidade de revisão de critérios de tomada de decisão bem como em mecanismos de proteção a diversidade genética e cultural, herdada gratuitamente do esforço de centenas ou milhares de gerações de agricultores.

9. Referencias

ACEVEDO, F.; HUERTA, E.; BURGEFF, C., KOLEFF, P., E SARUKHÁN, J. Is transgenic maize what Mexico really needs? **Nature Biotechnology**, v. 29, n.1, p. 23-24, 2011.

AGRIOS, G. N. *Plant pathology*. Boston: Elsevier Academic Press. 922pp, Amsterdam, 2005

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

ALWINE, J. C.; KEMP, D. J.; STARK, G. R. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n.12, p. 5350, 1977.

ANDERSON. E.; CUTLER H.C. Races of Zea Mays: I. Their Recognition and Classification. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 29, n.2, p. 69-88, 1942.

BELLON, M. R.; BERTHAUD, J. Transgenic maize and the evolution of landrace diversity in Mexico. The importance of farmers' behavior. **Plant Physiology**, v.134, n.3, p.883, 2004.

BELLON, M. R.; BERTHAUD, J. Traditional Mexican agricultural systems and the potential impacts of transgenic varieties on maize diversity. **Agriculture and Human Values**, v.23, n.1, p. 3-14, 2006.

BERNARD, S.; JEWELL, D. C. Crossing maize with sorghum, *Tripsacum* and millet: The products and their level of development following pollination. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, v. 70, n.5, p. 474-483, 1985.

BIÉMONT, C.; VIEIRA, C. Genetics: Junk DNA as an evolutionary force. **Nature**, v.443, n.7111, p.521-524, 2006.

BRENDEL, V.; KURTZ, S.; WALBOT, V. Comparative genomics of arabidopsis and maize: Prospects and limitations. **Genome Biol**, v.3, n.3, p.1005-1, 2002.

CANDELA, H.; HAKE, S. The art and design of genetic screens: Maize. **Nature Reviews Genetics**, v.9, n.3, p. 192-203, 2008.

CUMMINS, J.a. GM Crops may face genetic meltdown. **Institute of Science in Society Report**. 2001 Disponível em: <http://www.issis.org.uk/meltdown.php>. Acessado em 15/06/2011.

CUMMINS, J.b. GM Crops may all be unstable. Institute of Science in Society Report. 2001 Disponível em: <http://www.issis.org.uk/unstable.php>. Acessado 15/06/2011.

DAWKINS, R. The Selfish Gene. Oxford University Press. 352pp, Oxford. 1976.

DE ITA, A. Catorce años de TLCAN y la crisis de la tortilla. **Special Report for Programa De Las Americas**. 2007. Disponível em: <http://www.ircamericas.org/esp/4722>

DE ITA, A.; NADAL, A. La contaminación legal del maíz en México. **Barcelona, España: Biodiversidad, Sustento y Culturas**, v.6, p.11-16, 2009.

DHALIWAL, S.; KING, P. J. Direct pollination of zea mays ovules in vitro with Z. Mays, Z. Mexicana and sorghum bicolor pollen. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, v. 53, n.1, p. 43-46, 1978.

DYER, G. A.; SERRATOS-HERNÁNDEZ, J. A.; PERALES, H. R.; GEPTS, P.; PIÑEYRO-NELSON, A.; CHÁVEZ, A.; SALINAS-ARREORTUA, N.; YÚNEZ-NAUDE, A.; TAYLOR, E.; ALVAREZ-BUYLLA, E. R. Dispersal of transgenes through maize seed systems in Mexico. **Plos One**, v.4, n.5, e5734, p. 1-9, 2009.

ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-Linked immunosorbent assay, ELISA. **The Journal of Immunology**, v.109, n.1, p.129, 1972.

EZCURRA, E.; ORTIZ, S.; SOBERON-MAINERO, J. **Evidence of gene flow from transgenic maize to local varieties in Mexico**. In: Lmos and the environment: An international conference. OCDE, p.289-295, 2002.

FAO. El Estado Mundial de la Agricultura y la Alimentación. Roma. ISBN 978-92-5-306768-8. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/013/i2050s/i2050s00.pdf> Consultado em 05/02/2011.

FEDOROFF, N. Transposons and genome evolution in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n.13, p. 7002, 2000.

FEDOROFF, N. How jumping genes were discovered. **Nature Structural e Molecular Biology**, v.8, n.4, p. 300-301, 2001.

FINNEGAN, E.J.; MC ELROY, D. Transgene inactivation: plants fight back!. **Nature Biotechnology**, v. 12, p. 883-888, 1994.

FINNEGAN, E.J.; GINGER, R.K.; PEACOCK, W.J.; DENNIS, E.S. DNA methylation in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v.49, n.1, p.223-247, 1998.

FLORESCANO, E. **Metáfora del grano y la mazorca**. IN: La palabra y el hombre, n. 127, p. 7-26, Xalapa, Universidad Veracruzana, julio-septiembre 2003.

FLORESCANO, E. Quetzalcóatl y los mitos fundadores de mesoamérica, p.386, **Taurus**, México, 2004.

FLORESCANO, E. La diosa madre y los orígenes de la patria. **La Palabra y El Hombre**, v.7, n. 133, p. 7-35, 2005.

FORBACH, A.; SCHUBERT, D.; LECHTENBERG, B.; GILS, M. A comprehensive characterization of single-copy T-DNA insertions in

the arabidopsis thaliana genome. **Plant Mol. Biol**, v.52, p.161-176, 2003.

HALLAUER, A. R.; CARENA, M. J.; MIRANDA FILHO, J. B. Quantitative genetics in maize breeding. 500pp, New York; London: Springer, 2010.

HANLEY, S.; EDWARDS, D.; STEVENSON, D.; HAINES, S.; HEGARTY, M.; SCHUCH, W.; EDWARDS, K.J. Identification of transposon-tagged genes by the random sequencing of mutator-tagged DNA fragments from zea mays. **The Plant Journal**, v.23, n.4, p. 557-566, 2000.

HERNÁNDEZ, J.A. Bioseguridad y dispersión de maíz transgénico en México. **Ciencias**, v. 92, n. 092, p. 2010.

HESLOP-HARRISON, Y.; REGER, B.J.; HESLOP-HARRISON, J. Wide hybridization: Pollination of zea mays L. By sorghum bicolor (L.) Moench. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, v. 70, n.3, p. 252-258, 1985.

INAFED. Enciclopedia de los Municipios de México: OAXACA. Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal, Gobierno del Estado de Oaxaca. Disponivel em: <http://www.e-local.gob.mx/work/templates/enciclo/oaxaca/municipios/20393a.htm>. Pesquisado 03/02/2011.

JACOBSEN, S.E.; MEYEROWITZ, E.M. Hypermethylated SUPERMAN epigenetic alleles in arabidopsis. **Science**, v.277, n.5329, p. 1100. 1997.

KAKUTANI, T.; JEDDELOH, J.A.; FLOWERS, S.K.; MUNAKATA, K.; RICHARDS, E.J. Developmental abnormalities and epimutations associated with DNA hypomethylation mutations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.93, n.22, p. 12406, 1996.

KAPLINSKY, N.; BRAUN, D.; LISCH, D.; HAY, A.; HAKE, S.; FREELING, M. Maize transgene results in Mexico are artefacts. **Nature**, v.416, n.6881, p. 601, 2002.

KATO-YAMAKAKE, T.A. Variedades transgénicas y el maíz nativo en México. **Agricultura, Sociedad y Desarrollo**, v.1, n. 2, p. 101-109, 2004.

KATO-YAMAKAKE, T.A. Teorías sobre el origen del maíz. IN: KATO, T.A.; MAPES, C.; MERA, L.M.; SERRATOS, J.A.; BYE R.A. Origen y diversificación del maíz: una revisión analítica. **Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad**. México, p.119, 2009.

KATO, T.A.; MAPES, C., MERA, L.M.; SERRATOS, J.A.; BYE R.A. Origen y diversificación del maíz: una revisión analítica. **Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad**. México, p.119, 2009.

KNISPEL, A.L.; MCLACHLAN S.M.; VAN ACKER R.C.; FRIESEN L.F. Gene Flow and Multiple Herbicide Resistance in Escaped Canola Populations. **Weed Science**, v. 56, n. 1, p. 72-80, 2008.

LATHAM, J.R.; WILSON, A.K.; STEINBRECHER, R.A. The mutational consequences of plant transformation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, p. 1-7, 2006.

LINNE, F.; HEIDMANN, I.; SAEDLER, H.; MEYER, P. Epigenetic changes in the expression of the maize A1 gene in *inpetunia hybrida*: Role of numbers of integrated gene copies and state of methylation. **Molecular and General Genetics**, v.222, n.2, p. 329-336, 1990.

LOUETTE, D.; SMALE, M. Farmers' seed selection practices and maize variety characteristics in a traditionally-based Mexican community. CIMMYT Economics Working Paper n. 98-04. Mexico, D.F.: CIMMYT. 1998.

LOUETTE, D.; SMALE, M. Farmers' seed selection practices and traditional maize varieties in Cuzalapa, México. **Euphytica**, v.113, n.1, p.25-41, 2000.

MARTIENSSEN, R. Transposons, DNA methylation and gene control. **Trends in Genetics: TIG**, v.14, n.7, p. 263, 1998.

MATZKE, A. J. M.; MATZKE, M. A. Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. **Current Opinion in Plant Biology**, v.1, n.2, p. 142-148, 1998.

MATZKE, M. A.; MATZKE, A. J. M. How and why do plants inactivate homologous (trans) genes? **Plant Physiology**, v.107, n.3, p. 679, 1995.

MAURO, I. J.; MCLACHLAN, S. M. Farmer Knowledge and Risk Analysis: Postrelease Evaluation of Herbicide-Tolerant Canola in Western Canada. **Risk Analysis**, n.28, 463–476, 2008.

MCCLINTOCK, B. Some parallels between gene control systems in maize and in bacteria. **The American Naturalist**, v.95, n.884, p. 265-277, 1961.

MCCLINTOCK, B. **Chromosome constitutions of mexican and guatemalan races of maize**, p.395-406, IN: Genes Cells and Organisms. Edited by Moore JA. New York: Garland Publishing, Inc, 1987.

MCCLINTOCK, B.; HARBOR, C.S. The significance of responses of the genome to challenge. **Physiology or Medicine**, v.6, n.180, p.1981-1990, 1993.

MCCLINTOCK, B.; KATO, T.A.; BLUMENSCHNEIN, A. Chromosome constitution of races of maize, pp 521, **Colegio De Postgraduados**, Chapingo, Mexico, 1981.

MERA OVANDO, L.M. Aspectos socioeconómicos y culturales. IN: KATO, T.A., MAPES, C., MERA, L.M., SERRATOS, J.A., BYE R.A. Origen

y diversificación del maíz: una revisión analítica. **Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad**. México, pp 119, 2009.

MERA OVANDO, L.M. Diversificación y distribución reciente del maíz en México. In: KATO, T.A., MAPES, C., MERA, L.M., SERRATOS, J.A., BYE R.A. Origen y diversificación del maíz: una revisión analítica. **Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad**. México, pp 119, 2009.

MERCER, K.L.; WAINWRIGHT, J.D. Gene flow from transgenic maize to landraces in México: An analysis. **Agriculture, Ecosystems e Environment**, v. 123, n.1, p. 109-115, 2008.

METZ, M.; FÜTTERER, J. Suspect evidence of transgenic contamination. **Nature**, v.416, n.6881, p. 600-601, 2002.

MICHALAK, P. Epigenetic, transposon and small RNA determinants of hybrid dysfunctions. **Heredity**, v. 102, n.1, p. 45-50, 2008.

MITCHELL, E.G.; KUCHLER, F. The first decade of genetically engineered crops in the United States. Economic Reseach Service, **USDA**, 2006. Disponible em: www.ers.usda.gov

MULLIS, K.B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**, v.262, n.4, p. 56-65, 1990.

NADAL, A.; WISE, T.A. The environmental costs of agricultural trade liberalization: Mexico-US maize trade under NAFTA. **Development**, v.6, n.4, 2004.

NEUFFER, M. G.; WESSLER, S. R. Mutants of maize. 468pp, Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.

NEUFFER, M.G.; JOHAL, G.; CHANG, M.T.; HAKE, S. Mutagenesis-- The key to genetic analysis. **Handbook of Maize**, p.63-84, 2009.

ORDÓÑEZ, M. DE.J.; RODRÍGUEZ, P. Oaxaca, el estado con mayor diversidad biológica y cultural en México, y sus productores rurales. **Ciencias**, v.91, n.091, p.54-64, 2009.

ORTIZ-GARCIA, S.; EZCURRA, E.; SCHOEL, B.; ACEVEDO, F.; SOBERON, J.; SNOW, A.A. Absence of detectable transgenes in local landraces of maize in Oaxaca, Mexico (2003--2004). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.102, n.35, p. 12338, 2005.

PATERNIANI, E; PINTO VIEGAS, G. (Eds). Melhoramento e Produção de Milho. 2da. Ed. 650pp, Fundação Cargill. Campinas, S.P; Brasil, 1987.

PIÑEYRO-NELSON, A.A. Restricciones analíticas de las técnicas de biomonitorio de organismos genéticamente modificados de uso agrícola: Estudio de caso de muestras de maíz procedentes de la sierra norte de Oaxaca. Thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Ecología, 2007.

PIÑEYRO-NELSON, A.; VAN HEERWAARDEN, J.; PERALES, H.R.; SERRATOS-HERNÁNDEZ, J. A.; RANGEL, A.; HUFFORD, M.B; GEPTS, P.; GRAY-ARROYO, A.; RIVERA-BUSTAMANTE, R.; ÁLVAREZ-BUYLLA, E. R. Transgenes in Mexican maize: Molecular evidence and methodological considerations for GMO detection in landrace populations. **Molecular Ecology**, v.18, n.4, p. 750-761, 2009.

PRAY, L. Transposons, or jumping genes: Not junk DNA. **Nature Education**, v.1, n.1, 2008.

QUIST, D.; CHAPELA, I. H. Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico. **Nature**, v.414, n.6863, p.541-543, 2001.

REIS, E. M.; CASA, R. T.; BRESOLIN, A. C. R. Manual de diagnose e controle de doenças do milho. 141pp, Graphel, Lages, 2004
RIBEIRO, S. El día en que muera el sol. **Revista Biodiversidad**, julho, p. 29-36, 2004.

RICCI, G. C.; SILVA, N.; PAGLIARINI, M. S.; SCAPIM, C. A. Microsporogenesis in inbred line of popcorn (*zea mays* L.). **Genetics and Molecular Research**, v.6, n.4, p. 1013-1018, 2007.

RICHARDS, E. J. DNA methylation and plant development. *Trends in Genetics*, v.13, n.8, p. 319-323, 1997.

SALGADO A. (ed.). El maíz en la vida de los Pueblos: Sus amenazas y riesgos, desde la sabiduría indígena y el saber campesino, *Cenamí* ; México, DF, 2003.

SAGARPA. Estudio de Gran Visión y Factibilidad Financiera para el Desarrollo de Infraestructura de Almacenamiento y Distribución de Granos y Oleaginosas para el Mediano y Largo Plazo a Nivel Nacional: Informe. *Disponível em:* http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios_promercado/GRANOS.pdf Acessado em 05/02/2011.

SÁNCHEZ, J.J.; RUÍZ CORRAL, J.A. **Distribución del Teocintle en México**. SERRATOS, J. A.; WILLCOX, M.C.; CASTILLO, F(Eds). IN: Flujo genético entre maíz criollo, maíz mejorado y teocintle: Implicaciones para el maíz transgénico. 138pp. Programa Maíz, CIMMYT, México, 1995.

SEN, T.Z., HARPER, L.C., SCHAEFFER, M.L., ANDORF, C.M., SEIGFRIED, T., CAMPBELL, D.A., LAWRENCE, C.J. Choosing a genome browser for a Model Organism Database: surveying the Maize community. *MaizeGDB*. http://www.maizegdb.org/cgi-bin/imagebrowser_phenotypes.cgi Acessado em 08/03/2011.

SERRATOS, J.A. *Bioseguridad y Conservación de Cultivos Originarios de México*. *Disponível em:* http://www.unionccs.net/images/library/file/Agricultura_y_alimentacion/Bioseguridad_y_conservacion_J_A_Serratos.pdf Acessado 08/02/2011.

SERRATOS, J. A.; WILLCOX, M.C.; CASTILLO, F(Eds). Flujo genético entre maíz criollo, maíz mejorado y teocintle: Implicaciones para el maíz transgénico. 138pp. Programa Maíz, CIMMYT, México, 1995.

SERRATOS-HERNÁNDEZ, J. A.; GÓMEZ-OLIVARES, J. L.; SALINAS-ARREORTUA, N.; BUENDÍA-RODRÍGUEZ, E.; ISLAS-GUTIÉRREZ, F.; DE-ITA, A. Transgenic proteins in maize in the soil conservation area of Federal District, Mexico. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v.5, n.5, p. 247-252, 2007.

SERRATOS-HERNÁNDEZ, J.A.; ISLAS-GUTIÉRREZ, F.; BUENDÍA-RODRÍGUEZ, E.; BERTHAUD, J. Gene flow scenarios with transgenic maize in Mexico. **Environmental Biosafety Research**, v.3, n.03, p. 149-157, 2004.

SIMON, G. A.; SCAPIM, C.A.; PACHECO, C.A.P.; PINTO, R.J.B.; BRACCINI, A.L.; TONET, A. Depressão por endogamia em populações de milho-pipoca. **Bragantia**, v.63, n.1, p. 55-62, 2004.

STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H. PRINCIPLES AND PROCEDURES OF STATISTICS: A BIOMETRICAL APPROACH. NEW YORK: MC-GRAW HILL, 1981. 633p.

TABA, S. (ed.). Enfermedades del maíz: Una guía para su identificación en el campo. 118pp, México, CIMMYT, 2004.

TOLEDO, V.; ALARCÓN-CHAIRES, P.; EBARÓN, L. La modernización rural de México: Un análisis socioecológico. 132pp, Universidad Nacional Autónoma de México, México, 2002.

TUITE, J. Plant pathological methods. Fungi and bacteria. 239 pp, Burgess Publishing Company, Minneapolis, Minn, USA, 1969.

TURRENT, A.; SERRATOS, J.A.; MEJÍA, H.; ESPINOSA, A. Liberación comercial de maíz transgénico y acumulación de transgenes en las razas de maíz mexicano. **Revista Fitotecnia Mexicana**, v. 32, n. 4, p. 257-263, 2009.

TURRENT-FERNÁNDEZ, A.; SERRATOS-HERNÁNDEZ, J.A.; MEJÍA-ANDRADE, H.; ESPINOSA-CALDERÓN, A. Propuesta de cotejo de impacto de la acumulación de transgenes en el maíz (zea mays L.) Nativo mexicano. **Agrociencia**, v.43, n.3, p. 257-265, 2009.

VAN DEN BULCKE, M.; DE SCHRIJVER, A.; DE BERNARDI, D.; DEVOS, Y.; MBONGOMBELLA, G.; CASI, A.L.; MOENS, W.; SNEYERS, M. Detection of genetically modified plant products by protein strip testing: An evaluation of real-life samples. **European Food Research and Technology**, v.225, n.1, p. 49-57, 2007.

VANCE, V.; VAUCHERET, H. RNA silencing in plants - defense and counterdefense. **Plant Pathology**, v. 292, p.2277-2280, 2001.

VAUCHERET, H.; FAGARD, M. Transcriptional gene silencing in plants: Targets, inducers and regulators. **Trends in Genetics**, v.17, n.1, p. 29-35, 2001.

VAUCHERET, H.; BÉCLIN, C.; ELMAYAN, T.; FEUERBACH, F.; GODON, C.; MOREL, J. B.; MOURRAIN, P.; PALAUQUI, J.C.; VERNHETTES, S. Transgene-Induced gene silencing in plants. **The Plant Journal**, v.16, n.6, p. 651-659, 1998.

WALBOT, V. Saturation mutagenesis using maize transposons. **Current Opinion in Plant Biology**, v.3, n.2, p. 103-107, 2000.

WELLHAUSEN, E. J.; ROBERTS, L. M.; HERNANDEZ X.; E.; MANGELSDORF, P. C. Races of maize in Mexico. Their origin, characteristics and distribution. 223pp, *Bussey Institution, Harvard University*. 1952.

ZOLLA, L.; RINALDUCCI, S.; ANTONIOLI, P.; RIGHETTI, P. G. Proteomics as a complementary tool for identifying unintended side effects occurring in transgenic maize seeds as a result of genetic modifications. **Journal of Proteome Research**, v.7, n.5, p. 1850-1861, 2008.