

Área Científica **Sistemas Agrários: Produção e Sustentabilidade**

Código PTDC/AGR-GPL/121536/2010 **Início** 2012/03/01 **Termo** 2015/08/31

Título Implicações da inserção casual de transgenes em milho: efeitos em genes codificadores de proteínas e em genes regulatórios não codificadores de proteínas

Programa

FCT

Medida

Projetos de I&D em todos os Domínios Científicos

Instituição Líder Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P.

Investigador Responsável INIAV Eugénia Maria Antunes de Andrade

Orçamento Total 162 671,00€

Orçamento INIAV 97 475,00€

Parceria

INIAV	Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P.	Nacional
UTAD	Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro	Nacional
IPSantarém	Instituto Politécnico de Santarém	Nacional
ITQB	Instituto de Tecnologia Química e Biológica	Nacional

Equipa

Eugénia Maria Antunes de Andrade
Mónica Isabel Gomes Rodrigues
Ana Alexandra Chegão Pissarra Monteiro

Resumo

A resposta dos genomas à introdução de transgenes tem sido realçada, sobretudo, pela instabilidade associada à estrutura do inserto e às sequências flanqueantes (insertion-site mutations), menos pela instabilidade no número de insertos e sua localização no genoma (genome-wide mutations) e ainda menos pelos efeitos causados na estrutura e expressão de outros genes.

As consequências da existência de instabilidade fazem-se sentir a vários níveis, como:

a) na aprovação de novas variedades GM, segundo as leis Europeias, pela falta de Uniformidade, requisito para os testes Distingção, Homogeneidade e Estabilidade.

b) na sensibilidade e validade dos métodos de detecção e quantificação específicos do evento. São vários os métodos oficiais para diferentes OGM, baseados em PCR, que já foram publicados e validados. Elementos como o promotor 35S e o terminador do Vírus do Mosaico da Couve-flor e/ou o terminador nos de *Agrobacterium tumefaciens* são muito usados em métodos de rastreio, enquanto que na quantificação usam-se sequências "específicas do evento", como a sequência do ponto de união entre o transgene e o genoma hospedeiro ou uma sequência alterada pela introdução do transgene, como um gene funcional truncado ou uma alteração de um codão. A instabilidade destas sequências corrompe todos os processos oficiais de controlo de OGM assim como não garantem o cumprimento das regras de qualidade impostas pela Norma ISO17025 utilizada por todos os laboratórios da Rede Europeia de Laboratórios OGM (ENGL) uma vez que os CRMs e calibradores utilizados não mais permitem a obtenção de resultados precisos, exatos e o cálculo de incertezas.

c) na avaliação de risco feita ao abrigo da Directiva 2001/18/EC, que erradamente, assenta no princípio da "equivalência substancial".

Este, por permitir comparar a linha transgénica com qualquer variedade da espécie, pois somente algumas características entram no estudo, condiciona os resultados.

Pelo exposto, propomo-nos a analisar 3 milhos GM (MON 810, MON 863xMON 810 e MON 863xMON 810xNK603), todos contendo MON 810 como elemento comum e transformados por biolística. Selecionou-se ainda o milho DAS-98140, transformado pela *A. tumefaciens*, para o qual se sabe, pela nossa experiência na validação de métodos de quantificação, que tem um gene responsável pelo desenvolvimento de folhas truncado pela inserção do transgene. Para o evento MON 810, o único autorizado para cultivo em Portugal e com uso exponencial em todo o mundo, 2 CRM (anterior a 2006: linha masculina dadora do transgene vs produzido em 2008: linha feminina dadora de transgene) e as 5 variedades mais cultivadas em Portugal durante 3 anos consecutivos serão estudados. A diversificação dos materiais permitirá a avaliar a instabilidade em diferentes fundos genéticos e ao longo do tempo (insertion-site), avaliar o efeito do transgene em processos de regulação da expressão de genes endógenos (genome-wide) e concluir sobre os seus efeitos na sensibilidade dos métodos de detecção e quantificação específicos do evento. O projeto focar-se-á nos seguintes itens: a) comparação das cassetes de transformação com os insertos actuais e possível correlação com a técnica de transformação utilizada, com a presença de outros transgenes (duplos e triplos mutantes) e com a geração (F1 e F2); b) caracterização dos locais de inserção; c) localização citológica dos insertos no genoma, sua relação com a técnica de transformação e correlação com a esperada instabilidade; d) determinação do efeito da instabilidade nos métodos de detecção e quantificação.

O laboratório do INRB-LCMMP é especializado nos métodos analíticos sendo, frequentemente, participante em ensaios interlaboratoriais de validação e de proficiência. O IPS tem grande experiência na manipulação de milho GM, no âmbito da co-existência entre milho GM e convencional e na identificação de estados fenológicos. A UTAD, pelo Centro de Genética e Biotecnologia/Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia (CGB/IBB) obteve a classificação de Excelente e participou em muitos projectos relevantes na área agro-alimentar e em citologia de cereais. Assim, o conhecimento científico das equipas assegura a condução deste projecto onde se realça a inovação.

Até à data não se conhecem trabalhos sobre estabilidade genética em milhos GM contendo dois e três transgenes e recorrendo à hibridação de cromossomas com a cassette de transformação. A importância dos resultados esperados fez com que o JRC-IRMM aceitasse participar como consultor. Estão planeados reuniões para discussões científicas sobre o impacto da instabilidade dos transgenes na produção de materiais de referência, no desenvolvimento de métodos de detecção e quantificação a serem internacionalmente usados em sementes e alimentos e na de avaliação de risco e/ou na adequabilidade do "princípio da equivalência substancial".