

Detecção do evento transgênico MON89034 em amostras milho (*Zea mays*) pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).

Cícero Kommers¹, Matheus Oliveira¹, Nilo Ikuta¹, Vagner Lunge¹

¹Universidade Luterana do Brasil- ULBRA

E-mail: ciceromilhanok@Hotmail.com

INTRODUÇÃO

O Brasil é o 3º maior produtor de milho no mundo, cereal de grande importância no mercado tanto pelo consumo humano como no uso em rações de animais de produção (principalmente aves e suínos). Nos últimos anos houve um grande aumento de produtividade nas lavouras, em parte pela incorporação do uso de sementes transgênicas na agricultura. Como consequência, o número de cultivares de milho transgênicas disponibilizadas para plantio (253) ultrapassou o de convencionais (214) nesta última safra. Os grãos desta safra têm sido utilizados na elaboração de alimentos para consumo humano e animal. Entretanto, a legislação brasileira obriga que qualquer produto comercial que tenha mais do que 1% de organismos geneticamente modificados (OGM) deve ser devidamente rotulado para conhecimento do consumidor

OBJETIVO

Este estudo objetivou implementar uma técnica de PCR em tempo real para a detecção do evento genético MON89034 que está presente em diversas sementes transgênicas comerciais (aproximadamente 45%) e que estão sendo efetivamente plantadas na safra atual

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram obtidas quatro amostras de sementes transgênicas (Biogene, Pioneer, Agrocerec VT PRO e Agrocerec Yieldgard), uma de semente crioula, 12 amostras de milho-verde e 3 de milho enlatado no mercado. Em paralelo, foram desenhados iniciadores e sondas para a detecção do evento específico MON89034 (gene CRY 1 a.105) e de um gene HMG endógeno do milho. O DNA foi extraído pelo protocolo de absorção em sílica utilizando reagentes comerciais NewGene (Simbios Biotecnologia, Cachoeirinha, RS, Brasil) e após foi realizada a etapa de amplificação do DNA com os pares de iniciadores para os dois genes alvo (duplex). As amplificações foram realizadas em termociclador Step One Plus (Applied Biosystems) com as seguintes condições de amplificação: um ciclo inicial a 95°C por 3 minutos e 45 ciclos de 95°C durante 15 segundos, e 60°C durante 60 segundos

Primers	Sequencia 5' 3'	Tamanho do Amplicon
Cry1A.105 - F	TCAGAGGTCCAGGGTTTACAGG	133 Pb
Cry1A105-R	GTAGTAGAGGCATAGCGGGATTCTTG	
Cry1A105-P	AGACATTCTCGTCGCACAAGTGGAGGACC	
ZM1-F (hmg)	TTGGACTAGAAATCTCGTGCTGA	79 Pb
ZM1-R (hmg)	GCTACATAGGGAGCCTTGCTCT	
ZM1-P (hmg)	CAATCCACACAACGCACGCGTA	

Tabela 1: Primers e sondas utilizados no trabalho

RESULTADOS

A técnica de duplex PCR em tempo real permitiu a detecção do gene endógeno HMG e do evento transgênico MON89034 na mesma reação. Na análise das 20 amostras, todas as 4 sementes e as 13 amostras de milho-verde apresentaram resultados positivos para o gene endógeno HMG, enquanto as 3 amostras de milho enlatado apresentaram resultado negativo. Dez amostras foram positivas para o gene cry 1a.105, sendo uma semente (Agrocerec VT-PRO, que possuía o evento MON89034) e nove amostras milho verde comerciais. Dentre as 7 amostras com resultados negativos para o evento específico estão 3 tipos de sementes comerciais (que possuem outros eventos transgênicos), uma amostra de milho crioulo e 3 amostras de milho verde comercial (incluindo uma rotulada como orgânico)

Amostra	CT CRY 1a.105	CT HMG	Presença do Evento MON 89034
Semente de Milho	Indeterminado	32,5	Negativo
Semente de Milho	Indeterminado	27,4	Negativo
Semente de Milho	23,5	26,5	Positivo
Semente de Milho	Indeterminado	27,9	Negativo
Milho verde	29,0	30,8	Positivo
Milho verde	25,2	26,5	Positivo
Milho verde	24,4	26,7	Positivo
Milho verde	30,6	29,8	Positivo
Milho verde	Indeterminado	27,1	Negativo
Milho verde	35,0	36,9	Positivo
Milho verde	29,7	31,0	Positivo
Milho verde	28,4	30,0	Positivo
Milho verde	Indeterminado	35,7	Negativo
Milho verde	Indeterminado	32,7	Negativo
Milho verde	35,7	44,8	Positivo
Milho verde	29,2	30,6	Positivo
Milho verde	Indeterminado	31,0	Negativo
Milho enlatado	Indeterminado	Indeterminado	Negativo
Milho enlatado	Indeterminado	37,8	Negativo
Milho enlatado	Indeterminado	37,8	Negativo

Tabela 2: Resultados obtidos.

CONCLUSÃO

Até o presente momento é possível afirmar que as técnicas empregadas são capazes de definir a presença deste evento específico, tendo como perspectiva seu uso para análise de sementes, rações animais e produtos industrializados para consumo humano.

Referências

- BOOM, R.C.J.A. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.
- ANKLAM, E.; GADANI, F.; HEINZE, P.; PIJNENBURG, H.; EEDE, G.V.D. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. *European Food Research and Technology*, n.214, p. 3-26, 2002.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. MILHO. Disponível em : <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/milho> (Sem data). Acesso em 15 de fevereiro de 2014.
- CRUZ, J.C, FILHO, I.A.P, QUEIROZ, L.R. Quatrocentas e sessenta e sete cultivares de milho estão disponíveis no mercado de sementes do Brasil para a safra 2013/14. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/milho/cultivares/index.php> Acesso em 18 de fevereiro de 2014.
- BRASIL. Decreto n. 4680, de Abril de 2003. Regulamenta o direito à informação, assegurado pela Lei no 8.078, de 11 de setembro de 1990, quanto aos alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal que contenham ou sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados, sem prejuízo do cumprimento das demais normas aplicáveis.

Colaboradores: