

COMPARAÇÃO ENTRE BIO E IMUNOENSAIO PARA IDENTIFICAÇÃO DE SEMENTES DE SOJA GENETICAMENTE MODIFICADA TOLERANTE AO GLIFOSATO EM LOTES DE SEMENTES DE SOJA NÃO TRANSGÊNICA

PÁDUA, G.P.¹; JESUS, A.M.S.²; FRONZA, V.³; ARANTES, N.E.⁴; ZITO, R.K.³

¹Embrapa/EPAMIG, Caixa Postal 311, CEP 38001-970, Uberaba, MG, gpadua@epamiguberaba.com.br; ²EPAMIG; ³Embrapa Soja; ⁴Fundação Triângulo.

A produção de semente de soja livre de sementes de outras cultivares ou outras sementes, dentro dos limites estabelecidos pela legislação, é facilitada pelo fato da soja ser uma espécie autógama com cleistogamia, que proporciona uma baixa taxa de cruzamento natural. No entanto, no caso específico das cultivares modificadas geneticamente, a baixa taxa de fecundação cruzada que ainda pode existir é um dos pontos críticos de contaminação genética dos campos de sementes convencionais por transgênicos (ZANETTI, 2010).

O objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência de dois métodos de detecção de misturas de semente geneticamente modificada (GM) contendo o gene Roundup Ready (RR) em amostras de soja não-transgênica (convencional), para avaliar lotes de sementes quanto aos limites exigidos pela legislação.

Foram utilizadas amostras de sementes categoria genética da cultivar de soja BRSMG 810C (convencional) e da cultivar BRSMG 850GRR, provenientes do programa de melhoramento genético da parceria Embrapa/EPAMIG/Fundação Triângulo. Para a realização do experimento, visando à detecção de sementes GM em sementes convencionais, foram utilizados dois tamanhos de amostras (200 e 400 sementes), com quatro níveis de contaminação (semente GM adicionada às amostras convencionais para se obter 0,0%, 0,5%, 1% e 1,5% de contaminação), e dois métodos de detecção: imunoensaio de fluxo lateral (quatro subamostras de cada tratamento foram testadas para o nível máximo de até 0,1% de presença de OGM, com um grau de confiança de 95%. Foi utilizado o Trait Rur - Soy Crops & Soybean teastig® conduzido conforme as instruções recomendadas pelo fabricante, com três repetições de 800 sementes/tratamento) e bioensaio (pré-embebição em solução do herbicida glifosato a 0,6% do equivalente ácido, na proporção de 2,5 vezes o peso do

substrato, por 16 horas no escuro a 25°C).

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x4 (2 tamanhos de amostra x 4 níveis de contaminação), com três repetições, totalizando 24 tratamentos. Os dados foram interpretados estatisticamente por meio de análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Foi feita análise de correlação de Spearman e determinado o coeficiente de correlação (r), entre os métodos de detecção estudados. Para todas as análises estatísticas realizadas foi utilizado o software SAS.

Na Tabela 1 constam os resultados da qualidade inicial das cultivares utilizadas e a característica morfológica de cor do hilo. As cultivares BRSMG 810C (convencional) e BRSMG 850GRR (transgênica) apresentaram alta e boa qualidade fisiológica, respectivamente. O tamanho das sementes e da coloração de hilo foram semelhantes, para que a contaminação realizada ficasse imperceptível ao analista.

O imunoensaio de fluxo lateral, também conhecido como teste rápido com o uso de Kit Trait Test, foi 100% eficiente e indicou a presença para a proteína alvo, nas amostras de sementes com os níveis de contaminação de 0,5%, 1% e 1,5%. Nas amostras sem nenhuma semente GM adicionada (0%) o resultado foi negativo (Tabela 2).

O desenvolvimento de plântulas normais, com pré-embebição das sementes em papel umedecido com herbicida glifosato, da cultivar convencional BRSMG 810C foi totalmente inibido, segundo confirmado na ausência de contaminação (Tabela 3), concordando com os resultados de Tillmann e West (2004) e Pereira et al. (2009). À medida que se adicionaram sementes da cultivar GM (BRSMG 850GRR) nas amostras, constatou-se pequena porcentagem de plântulas normais, em proporção semelhante à contaminação

adicionada, indicando a existência de misturas e a possibilidade de detecção. A interação entre os fatores tamanho de amostra e níveis de contaminação não foi significativa, assim como o tamanho da amostra não influenciou a eficiência dos dois métodos na detecção da presença de sementes adventícias (GM).

Com exceção do comprimento de plântulas intermediário (4,0 a 9,0 cm), não foram observadas reduções nos comprimentos de plântulas, cujo comprimento médio foi de 6,28 cm (Tabela 4). Porém, na presença do herbicida, as plântulas da cultivar BRSMG 810C sensível ao glifosato, apresentaram diversas anormalidades observadas neste estudo e constatadas por outros trabalhos na literatura. De maneira geral, foi observado redução no comprimento da raiz primária e seu engrossamento, paralisação do desenvolvimento, ausência de raízes secundárias e encurtamento e afunilamento repentino do hipocótilo. A cultivar BRSMG 850GRR, tolerante ao glifosato, apresentou desenvolvimento de plântula normal, com todas as estruturas preservadas de hipocótilo, raiz primária e raízes secundárias.

Pela análise de correlação de Spearman, observou-se que existe correlação elevada e altamente significativa entre os métodos de detecção utilizados ($r=0,82$; $p\leq 0,0001$). Porém, esta correlação deveria ser igual a 1,0 ou próximo de 1,0 para proporcionar elevada eficiência do bioensaio. No presente estudo observou-se eficiência de 88,9%, visto que, de 18 amostras com contaminação variando de 0,5 a 1,5%, esta não foi detectada pelo método do bioensaio em duas (11,1%) amostras com 0,5% de contaminação com semente GM RR, sendo uma no tamanho de amostra de 200 sementes e outra no de 400 sementes.

O método de bioensaio é eficiente na detecção da presença de sementes GM RR em amostras de semente convencional de soja, embora não garanta eficiência de detecção em 100% dos casos. No entanto, se ambas as sementes apresentam alta qualidade fisiológica ou se a semente adventícia apresenta porcentagem de germinação semelhante ou superior às demais sementes do lote, a eficiência do bioensaio será mais próxima de 100%. Por outro lado, pode-se inferir que as sementes adventícias que não germinaram no teste de germinação também não germinariam no campo, o que aumentaria a segurança do resultado do bioensaio. O tamanho da amostra de 200 sementes e 400 sementes não influenciou a eficiência dos dois métodos na detecção da presença de sementes adventícias (GM).

Referências

PEREIRA, W.A.; LISBOA, S.P.; DIAS, D.C.F.S.; ALVARENGA, E.M.; BORÉM, A. Ajuste de metodologias para a identificação de cultivares de soja quanto à tolerância ao glifosato. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 4, p.133-144, 2009.

TILLMANN, M.A.A.; WEST, S.H. Identification of genetically modified soybean (*Glycine max* L. Merr.) seeds resistant to glyphosate. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 61, n. 3, p.336-341, 2004.

ZANETTI, A.L. **Fluxo gênico de soja geneticamente modificada, em semeaduras de verão e de inverno, com isolamentos de soja ou milho**. 2010. 28 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

Tabela 1. Porcentagem de germinação, peso de 100 sementes e coloração do hilo das sementes das cultivares de soja BRSMG 810C e BRSMG 850GRR.

Cultivar	Germinação	Peso de 100 sementes	Coloração do hilo
	%	g	
BRSMG 810C	92,0	16,4	Preta
BRSMG 850GRR	80,0	16,6	Preta

Tabela 2. Resultados do teste de imunoenensaio de fluxo lateral da cultivar BRSMG 810C, sensível ao glifosato, em função do tamanho das amostras e da porcentagem de contaminação com sementes da cultivar transgênica BRSMG 850GRR.

Porcentagem de contaminação	Imunoenensaio de fluxo lateral	
	Tamanho 1	Tamanho 2
	----- 200 sementes -----	----- 400 sementes -----
0,0	Negativo	Negativo
0,5	Positivo	Positivo
1,0	Positivo	Positivo
1,5	Positivo	Positivo

Tabela 3. Porcentagem de plântulas normais, anormais e infeccionadas apresentadas no teste de germinação (bioensaio), com pré-embebição, em papel umedecido com herbicida com glifosato, das sementes da cultivar BRSMG 810C, em função da porcentagem de contaminação com sementes da cultivar transgênica BRSMG 850GRR.

Porcentagem de contaminação	Plântulas Normais	Plântulas Anormais	Plântulas Infeccionadas
	----- % -----		
0,0	0,00c	90,92a	9,00ab
0,5	0,33bc	86,25b	13,33a
1,0	0,67b	91,33a	8,00b
1,5	1,33a	90,58a	8,08b
Média	0,58	89,77	9,60
C.V. (%)	49,50	2,90	27,80

Tabela 4. Comprimento de plântulas pequenas (< 4,0 cm), intermediárias (4,0 a 9,0 cm), maiores (> 9,0 cm) e comprimento médio, em bioensaio com pré-embebição, em papel umedecido com herbicida glifosato, das sementes da cultivar BRSMG 810C, em função da porcentagem de contaminação com sementes da cultivar transgênica BRSMG 850GRR.

Porcentagem de contaminação	Comprimento de plântulas			
	Pequenas	Intermediárias	Maiores	Médio
	----- cm -----			
0,0	2,98a	6,12b	10,07a	6,40a
0,5	2,93a	6,07b	9,35a	6,13a
1,0	2,93a	6,72ab	9,18a	6,25a
1,5	2,88a	6,95a	9,18a	6,33a
Média	2,93	6,46	9,45	6,28
C.V. (%)	7,1	7,1	6,9	5,2