

## Aferição dos métodos de avaliação da pureza genética através do peso de 500g e número de sementes em soja

Claudinei Andreoli<sup>1</sup>

Antônio Carlos Oliveira<sup>1</sup>

**RESUMO** - O uso de diferentes métodos para determinação da pureza varietal em sementes de soja tem ocasionado conflitos entre laboratórios e na comercialização interestadual de sementes de soja. O objetivo deste trabalho foi testar a aferição de dois métodos de análise de pureza, peso de 500 gramas e 1000 sementes, em dois lotes de soja. No experimento I, as amostras foram enviadas a 10 laboratórios, e no Experimento II, o ensaio foi conduzido em 07 laboratórios. Oito amostras constituídas de 998 gramas de sementes puras e duas gramas de sementes de outra cultivar foram preparadas pelos laboratórios. O número de sementes atípicas variou de 10 a 18 entre os laboratórios no Experimento I e de 11 a 13 sementes no Experimento II, sendo as amostras A1 e A2 de fácil identificação e as amostras B1 e B2 de maior dificuldade. Para o exame de 1000 sementes adotou-se a metodologia descrita na Regra para Análise de Sementes. Para comparar a eficiência dos métodos e dos laboratórios, calculou-se o desvio do número esperado de sementes em cada análise e efetuou-se a análise de variância. Houve uma grande variação entre os laboratórios e métodos e o desvio variou de 1,69 a 7,56 contaminantes na amostra. O método de 500 gramas, pela análise da diferença dos valores observados e esperados

(Obs-Esp)<sup>2</sup>, mostrou-se mais preciso e homogêneo na análise de pureza genética de soja, além de sua amostragem ser mais representativa do lote. Conclui-se, portanto, que os marcadores morfológicos na semente de soja para determinação da pureza genética não são eficiente e precisos, havendo necessidade de testar métodos bioquímicos e moleculares.

**Palavras-chaves:** mistura varietal, contaminante, marcador molecular.

### INTRODUÇÃO

Após a colheita e o processamento, uma amostra do lote de sementes é encaminhada ao laboratório para análise oficial. A determinação da pureza genética em soja ainda é, predominantemente, feita pela análise das características morfológicas da semente, tais como: coloração, tamanho e forma da semente, forma e coloração do hilo, cerosidade do tegumento, etc.

Para se determinar o número de sementes contaminantes na amostra, as Regras para Análises de Sementes (Brasil, 1980) preescrevia que se examinasse subamostras de 500 gramas. Entretanto, a partir do XX Congresso em 1989, a International Seed Testing Association - ISTA (1989) alterou a metodologia para teste de análi-

<sup>1</sup> Engº Agrº, Pesquisador Embrapa - Milho e Sorgo, Cx. Postal 151, 35701-970, Sete Lagoas, MG.



se de pureza genética, adotando-se 1000 sementes por subamostras. Com isso, a Subcomissão Estadual de Sementes de Soja da CESH/RS, aprovou e passou a adotar a metodologia prescrita pela ISTA (1989). Porém, os estados importadores de sementes de soja do Rio Grande não aceitaram esta nova metodologia, havendo necessidade de interferência da Coordenação Nacional do Laboratório Vegetal - CLVA/DAS/MAA, do qual promoveu um curso sobre metodologia para verificação de espécies e cultivares para responsáveis de laboratórios de sementes na DFAARA/São Paulo. O maior questionamento foi quanto ao cálculo dos padrões de laboratório para mistura varietal de sementes de soja. Neste curso, sugeriu-se a elaboração de um trabalho de aferição dos métodos de avaliação da pureza genética através do peso de 500 gramas e o número de sementes em soja, sob a coordenação do Laboratório de Semente da Embrapa Milho e Sorgo para validar o trabalho da ISTA e solucionar os possíveis questionamentos.

Assim, os objetivos do presente trabalho foram:

1. verificar a uniformidade entre os métodos de análises.
2. verificar a variação entre diferentes amostras, e
3. verificar a variação entre diferentes laboratórios.

## MATERIAL E MÉTODOS

Participaram do trabalho, 18 laboratórios; entretanto, somente dados de 10 laboratórios foram utilizados para a análise estatística, dos quais segue-se a lista abaixo:

1. Laboratório LASO/DFAARA - Goiânia, GO  
Luiza de Rezende Frafa
2. Laboratório do CLASPAR - LASO - Curitiba, PR  
Oswaldo de Castro Ohlson

3. Laboratório do FEPAGRO - Porto Alegre, RS  
Anna Maria R.T. Formoso
4. Laboratório da LASO/LARVE-Sul - Porto Alegre, RS  
Rosinha Maria Peroni Mesquita
5. Laboratório da Embrapa Milho e Sorgo - Sete Lagoas, MG  
Claudinei Andreoli
6. Laboratório LASO/DFAARA - Brasília, DF  
Maria Telza A. Bastos
7. Laboratório LASO/IAGRO - Brasília, DF  
Alan Portela Machinsky
8. Laboratório da APROSSUL - Dourados, MS  
Luiz Carlos Viecelli
9. Laboratório APASEM - Toledo, PR  
Arlete V.S. Colombo
10. Laboratório LASO/DFAARA - Belo Horizonte, MG  
Myrian A. G. Leal Alvisi
11. Laboratório da COAGRI/MS - Campo Grande, MS  
Paulo César Cardoso

Foi encaminhado aos laboratórios participantes, as metodologias do preparo de amostras e da avaliação da pureza genética para cada teste, descritos a seguir:

### Experimento 1.

Preparo das amostras - Em cada laboratório, preparou-se 08 amostras de sementes de soja, constituídas de 998 gramas de sementes puras e duas gramas de sementes de outra cultivar. Um

grupo de lotes foi composto de duas cultivares de fácil identificação (ex. FT Cristalina x IAC 8) e o outro de maior dificuldade para identificação (ex. FT Cristalina x Seriema). Cada laboratório selecionou as cultivares para o estudo de mistura, de acordo com a região. Os lotes A1, A2, B1 e B2 foram formados de quatro repetições de 1000 gramas, e foram uniformemente homogenizados e divididos em duas subamostras de 500 gramas.

Determinação da pureza genética pelo método do peso de 500 gramas - Cada subamostra de 500 gramas obtida dos lotes A1, A2, B1 e B2 foram examinadas para verificação de mistura por dois analistas pertencentes ao mesmo laboratório participante. No final de cada análise, anotou-se o número de sementes contaminantes encontrada na subamostra. Após o término de cada análise, reconstituiu-se o lote de 1000 gramas, homogenizou-se e dividiu-se em duas subamostras de 500 gramas para a próxima análise. Os dados encontrados foram tabulados e encaminhados para a Embrapa - Milho e Sorgo para serem analisados estatisticamente. As análises de cada subamostra foram repetidas três vezes por dois analistas.

Determinação da pureza genética pelo método de 1000 sementes - No final do teste de determinação da pureza genética pelo peso de 500 gramas, as oito amostras de 1000 gramas foram reconstituídas. Para a determinação da pureza genética, através do número de 1000 sementes, adotou-se a metodologia prescrita nas Regras de Análises de Sementes (Brasil, 1992). De cada amostra, tomou-se ao acaso, duas subamostras de 1000 sementes, que foram analisadas, em 10 repetições, de 100 sementes. O teste foi repetido três vezes por cada analista. Os dados foram tabulados e encaminhados para a Embrapa Milho e Sorgo para análise estatística.

Análise estatística - Como as amostras não continham o mesmo número de sementes contaminantes, os dados foram transformados em desvios (número de sementes observadas menos o número de sementes esperadas), que foram anali-

sados, utilizando-se o delineamento inteiramente causalizado em esquema fatorial com três repetições. A análise de variância e a comparação de médias dos desvios foram feitas pelo programa MSTAT na Embrapa - Milho e Sorgo.

## Experimento II

Preparo das amostras - Neste experimento, as amostras foram previamente preparadas pelo Laboratório de Análises de Sementes da Embrapa - Milho e Sorgo, e encaminhadas a 10 laboratórios participantes para determinação da pureza genética pelos dois métodos. Quatro amostras A1, A2, B1 e B2 de 500 gramas da cultivar BR 41 foram misturadas com as respectivas cultivares nas seguintes proporções:

Amostra A1	12 sementes de IAC 8
Amostra A2	14 sementes de IAC 8
Amostra B1	10 sementes de FT Cristalina
Amostra B2	12 sementes de FT Cristalina

Outras quatro amostras A1, A2, B1 e B2, contendo 1000 sementes foram misturadas com as mesmas cultivares acima com os respectivos níveis de contaminação:

Amostra A1	03 sementes de IAC 8
Amostra A2	04 sementes de IAC 8
Amostra B1	04 sementes de FT Cristalina
Amostra B2	03 sementes de FT Cristalina

A metodologia usada para a determinação da pureza genética deste experimento e a análise estatística foi a mesma utilizada no Experimento 1.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Experimento I

Os valores de F obtidos pela análise de variância para as variáveis laboratório, método de análise e amostra foram altamente significativos.



Os desvios médios do número de sementes obtidos pelo método do peso de 500 gramas e de 1000 sementes em dois lotes de soja examinados por 10 laboratórios estão apresentados na Tabela 1. O desvio médio geral de 3,65 sementes encontrado no trabalho foi considerado alto. Houve uma grande variabilidade entre os laboratórios para o número de mistura encontrada, variando de 1,69 sementes para o laboratório 5 e 7,6 sementes para o laboratório 10. Houve diferenças entre os métodos estudados dentro dos lotes. O método do peso de 500 gramas foi mais exato e preciso do que o método de 1000 sementes, tanto para o lote A, de fácil identificação, como para o lote B, de maior dificuldade. O número de sementes observadas apresentaram uma variação de 1,67 para o lote A quando examinada pelo peso de 500 gramas a 5,65 para o lote B pelo método de 1000 sementes (Tabela 1).

O laboratório 5 foi o mais homogêneo na determinação de pureza varietal de soja, apresentando pequena variação entre o número de sementes esperadas e observadas pelos dois métodos testados. O laboratório 10 não conseguiu identificar uma mistura do lote B pelo método de 1000 sementes, enquanto que o laboratório 2 e 6 teve dificuldade de examinar a mistura de 1000 sementes (Tabela 1).

De um modo geral, o lote B apresentou maior desvio do que o lote A, indicando que a precisão do método depende dos marcadores morfológicos da semente, ou seja quanto maior o polimorfismo do locus, mais fácil a identificação da mistura. Em outras palavras, as cultivares de soja com as características morfológicas mais semelhantes terão maior probabilidade de ocorrência de erro na determinação da pureza varietal, como ficou demonstrado no presente trabalho.

TABELA 1 - Desvio médio do número de sementes de soja pelo método do peso de 500 gramas e 1000 sementes em dois lotes analisados por 10 laboratórios oficiais, 1995.

Laboratório	Método				Média	
	Peso 500 gramas		1000 sementes			
	Lote A	Lote B	Lote A	Lote B		
01	3,75	2,33	3,75	1,25	2,77	d
02	0,50	1,50	7,25	6,00	3,81	c
03	1,00	2,33	4,50	4,25	3,02	cd
04	0,75	2,42	3,00	3,60	2,17	de
05	1,50	1,25	2,25	1,75	1,69	e
06	2,58	2,01	5,25	7,00	4,21	bc
07	1,42	4,25	1,75	11,50	4,73	bc
08	3,45	5,42	1,00	6,75	4,15	bc
09	0,92	0,92	4,75	2,50	2,27	de
10	0,83	13,0	3,75	13,00	7,65	a
Média	1,67 b	3,55 a	3,72 a	6,65 b	3,65	
Média de Método	2,61 b		4,65 a			

\* As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

## Experimento II

Neste experimento, o número de mistura em cada lote foi previamente preparado e continua, em média, 11 e 13 sementes contaminantes na amostra A e B, para o método de 500 gramas e 3,5 sementes para o método de 1000 sementes.

Os valores de F obtidos pela análise de variância para as variáveis laboratório, método de análise e amostra foram também altamente significativos, apesar dos valores dos desvios encontrados serem menores do que no Experimento I.

Os desvios médios do número de sementes obtidos pelo método de 500 gramas e de 1000 sementes em dois lotes de soja examinados por sete laboratórios estão apresentados na Tabela 2. O desvio médio foi de 0,57 sementes, valor este muito abaixo dos padrões de laboratório para mistura varietal em sementes de soja estabelecidos pelas Comissões Estaduais de Sementes.

Houve grande variação entre os laboratóri-

os na determinação de pureza varietal, desviando de 0,02 sementes, em média, para o laboratório 6 até 1,69 sementes para o laboratório 4. Neste experimento não houve diferença entre os métodos estudados, mas houve interação entre lotes e métodos. Novamente, os laboratórios tiveram maior dificuldade com o lote B, ou seja, as características das cultivares não eram tão distintas como no lote A. Em geral, os desvios foram sempre maiores para o lote B, independente do método utilizado.

O laboratório 6 foi o mais homogêneo do ensaio, conseguindo identificar todas as misturas nos dois lotes pelos dois métodos, enquanto que o laboratório 4 teve dificuldade de identificar as misturas pelo método de 1000 sementes, independente do lote (Tabela 2).

A Tabela 3 ilustra os cálculos usados para estimar os desvios de cada amostra dos níveis de contaminação esperada no Experimento II. Esta análise estatística foi usada para comparar a precisão de cada método e laboratório. Os resulta-

**TABELA 2 - Desvio médio do número de sementes de soja pelo método do peso de 500 gramas e 1000 sementes em dois lotes analisados por 07 laboratórios oficiais, 1995. Experimento II.**

Laboratório	Método				Média	
	Peso 500 gramas		1000 sementes			
	Lote A	Lote B	Lote A	Lote B		
01	0.00	0.50	0.00	0.08	0.15	de
02	0.17	1.67	0.58	0.67	0.77	b
03	0.00	0.33	0.08	0.50	0.23	d
04	0.00	0.17	3.25	3.33	1.69a	
05	0.00	1.33	0.00	0.33	0.42	c
06	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	c
07	0.00	2.83	0.00	0.25	0.77	b
Média	0.024 b	0.976 a	0.56 b	0.739 a	0.575	
Média de Método	0.50 b		0.65 b			

\*\* As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.



TABELA 3 - Comparação dos métodos para determinação de pureza genética em sementes de soja. Experimento II, 1995.

Laboratório (Obs-Esp) <sup>2</sup>	Método	
	Peso de 500 gramas	1000 Sementes
01	0.062	0.002
02	0.846	0.390
03	0.027	0.084
04	0.007	10.824
05	0.442	0.027
06	0.000	0.000
07	2.002	0.016
$\Sigma$ (Obs-Esp) <sup>2</sup>	3.388	11.34
$\sqrt{\text{média}}$	0.7	1.28

dos do Experimento I estão apresentados na Tabela 4, onde os altos valores de (Obs-Esp)<sup>2</sup> indica grande discrepância na mistura observada e a esperada da amostra entre os laboratórios. A última linha da Tabela 4 mostra a raiz quadrada da média dos laboratórios de  $\Sigma(\text{Obs-Esp})^2$ . Esta análise estatística representa o desvio médio do número de sementes observadas da atual contaminação. Estes dados indicam que o método do peso de 500 gramas foi três vezes mais preciso e exato do que o método de 1000 sementes. Esta discrepância diminuiu quando a contaminação da amostra foi previamente preparada (Experimento II, Tabela 2 e 3).

Além disso, o uso do método de peso de 500 gramas teve uma vantagem clara sobre o método de 1000 sementes devido ao tempo gasto, e a amostra ser mais representativa do lote.

Decisão de aceitar ou rejeitar um lote - A importância dos testes de aferição de uma metodologia é fomentar os legisladores a respeito da uniformidade e da variabilidade aceitável desta técnica.

A decisão de aceitar ou rejeitar um lote de sementes de soja, ou outra espécie qualquer, de-

pende da análise de pureza varietal do lote submetido ao LAS. Daí, a importância da uniformidade e precisão da metodologia a ser empregada, e não obstante, a conscientização do trabalho dos laboratoristas.

O conceito de lote rejeitado é para relacionar o número de sementes atípicas observadas numa amostra com os padrões estabelecidos de modo que leva em consideração os riscos de aceitar ou rejeitar erroneamente o lote de semente. Devemos ressaltar que a amostra de 1000 gramas encaminhada ao LAS, e a amostra de 500 gramas para a análise de pureza, representa somente uma pequena fração do lote e a decisão de aceitar ou rejeitar um lote pode-se cometer um erro.

Existe, de fato, dois tipos de erros que podem ser cometidos em qualquer decisão de aceitar ou rejeitar um lote baseado numa amostra. A relação entre estes dois tipos de erros se encontram na Tabela 5. Por exemplo, quando se rejeita um lote que estaria dentro do padrão, comete-se um erro do Tipo I. Neste caso, houve um erro do laboratório, que ao examinar a amostra encontrou valor acima do real. Por outro lado, quando se aceita um lote que estaria fora do padrão, comete-se

TABELA 4 - Comparação dos métodos para determinação de pureza genética em sementes de soja. Experimento I, 1995.

Laboratório (Obs-Esp) <sup>2</sup>	Método			
	Peso de 500 gramas		1000 sementes	
	Lote A	Lote B	Lote A	Lote B
01	14.06	5.43	14.06	1.56
02	0.25	2.25	52.56	36.00
03	1.00	5.43	20.25	18.06
04	0.56	5.86	9.00	6.25
05	2.25	1.56	5.06	3.06
06	6.66	4.04	27.56	49.00
07	2.01	18.06	3.06	132.25
08	11.90	29.37	1.00	45.56
09	0.85	0.85	22.56	6.25
10	0.69	169.0	14.06	169.00
$\Sigma$ (Obs-Esp) <sup>2</sup>	40.24	241.85	169.20	467.0
$\sqrt{\text{média}}$	2.0	4.91	4.11	6.8

um erro do Tipo II, e o agricultor corre o risco de semear sementes de baixa qualidade.

O número de sementes contaminadas (mistura) em cada subamostra variou de 10 a 16, dependendo da cultivar utilizada por cada laboratório no Experimento 1. P desvio representa o valor abaixo ou acima deste número, podendo ser posi-

tivo ou negativo. O valor do desvio positivo significa que o número de sementes encontrado naquela subamostra foi maior do que o esperado, portanto, rejeita-se o lote, cometendo erro do Tipo I. A recíproca significa que se o número de mistura é menor do que o esperado, portanto, aceita-se o lote, cometendo erro do Tipo II (Tabela 5).

TABELA 5 - Erro e risco na decisão de aceitar ou rejeitar um lote.

Decisão sobre o Lote	Qualidade do lote	
	BOM	RUIM
Aceita	Decisão correta	Erro Tipo II Risco do Agricultor
Rejeita	Erro Tipo I Risco do Produtor	Decisão correta

## CONCLUSÕES

- Nos dois experimentos houve uma tendência dos laboratórios de subestimar a pureza genética dos lotes, aumentando, assim, o risco para o agricultor, ou seja, o lote deveria ser rejeitado;
- houve uma grande variabilidade entre os laboratórios;
- houve dificuldade nos laboratórios para distinguir as cultivares de caracteres mais semelhantes. O que se traduz na necessidade de descritores de cultivares de soja mais precisos e distintos em relação as características morfológicas da semente. Os Laboratórios de Análise de Sementes do Ministério da Agricultura e do Abastecimento-MAA deveriam iniciar os testes com marcadores bioquímicos ou moleculares para a determinação de pureza genética em soja;
- o método do peso de 500 gramas foi mais preciso, constante, homogêneo e eficiente na determinação da mistura varietal em soja, além de sua amostra ser mais representativa do lote. Para uniformizar a decisão de aceitar ou rejeitar os lotes entre os laboratórios, deveria se adotar este método como oficial.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a colaboração dos laboratórios participantes, do qual sem eles não seria possível concretizar a realização deste trabalho. Estendemos também nossos agradecimentos à Chefia da Embrapa - Milho e Sorgo à Coordenação de Laboratório Vegetal - CLAV, MAA, Brasília, DF.

## REFERÊNCIAS

- BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNAD/LA-NARV, 1980. 188p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.
- ISTA. International Seed Testing Association. **International rules for seed testing. Seed Science and Technology**, Zürich. 21 Supplement. 1989.