

EFICIÊNCIA DE BIO E IMUNOENSAIO PARA DETECÇÃO DE SEMENTE DE SOJA GENETICAMENTE MODIFICADA TOLERANTE AO GLIFOSATO EM LOTES DE SEMENTES DE SOJA NÃO TRANSGÊNICA

EFFICIENCY OF BIO AND IMMUNOASSAYS ON THE DETECTION OF ROUNDUP READY® SOYBEANS INTO NON-GENETICALLY MODIFIED SEEDS

PÁDUA, G.P.¹; JESUS, A.M.S.²; FRONZA, V.³; ARANTES, N.E.⁴; ZITO, R. K.⁵

¹ Embrapa / EPAMIG, Uberaba, MG; e-mail: gppadua@hotmail.com

² EPAMIG, Uberaba, MG;

³ Embrapa Soja, Uberaba, MG;

⁴ N ARANTES Consultoria Agronômica, Uberaba, MG;

⁵ Embrapa Soja, Santo Antônio de Goiás, GO.

Resumo

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 espécie autógama. No caso específico das cultivares geneticamente modificadas (GM), 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. O objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência de dois métodos de detecção de misturas de semente GM em amostras de soja convencional, para avaliar lotes de sementes quanto aos limites exigidos pela legislação. Foram utilizadas amostras de semente da cultivar BRSMG 810C (convencional) e da cultivar BRSMG 850GRR. Foram avaliados dois tamanhos de amostras (200 e 400 sementes), com quatro níveis de contaminação (semente GM adicionada às amostras convencionais, para se obter 0%, 0,5%, 1% e 1,5%), e dois métodos de detecção: imunoenensaio de fluxo lateral e bioensaio (pré-embebição em solução de herbicida a 0,6% do equivalente ácido, na proporção de 2,5 vezes o peso do substrato, por 16 horas no escuro a 25°C). O método de bioensaio é eficiente na detecção da presença de GM em amostras de semente convencional de soja, desde que as mesmas apresentem alta qualidade fisiológica. Existe correlação significativa entre os valores obtidos pelo método de detecção por bioensaio e os níveis de contaminação estabelecidos ($r = 0,82$; $p \leq 0,0001$). O tamanho da amostra não influenciou a eficiência dos dois métodos na detecção da presença de sementes adventícias (GM).

Introdução

O Brasil é o terceiro país do mundo em área com produtos biotecnológicos, totalizando 15,8 milhões de hectares, divididos entre as três culturas, soja, milho e algodão, com eventos transgênicos já liberados no Brasil. Zito et al. (2011) relatam que o decréscimo da área de sementes convencionais deve-se, também, à dificuldade cada vez maior de produzir sementes convencionais isentas de sementes transgênicas. Essa dificuldade, aliada ao aumento da demanda por sementes de cultivares transgênicas, tem levado algumas empresas a optarem por produzir apenas sementes de soja tolerantes ao glifosato (RR). Segundo projeções para 2011/2012, a demanda por sementes transgênicas é ainda mais expressiva, sendo que, na média nacional a área semeada com grão modificado tende a atingir 80%.

Existem variados nichos comerciais no agronegócio, e a necessidade de meios que detectem as principais características de uma determinada cultivar se faz imperativa, tanto para a produção de sementes com pureza genética garantida, quanto para a certificação de produtos (Pereira et al., 2007). Pesquisas devem ser realizadas visando à validação dos métodos de detecção e a maior precisão quanto à presença adventícia nos lotes de sementes, que atendam aos limites exigidos pela Lei. Não há na literatura estudos realizados com porcentagem de misturas menor que 1%. Diante disso, o objetivo foi verificar a eficiência de

dois métodos de detecção de misturas de sementes GM contendo o gene Roundup Ready (RR) em amostras de sementes de soja não transgênica (convencional), para avaliar lotes de sementes quanto aos limites exigidos pela legislação.

Material e Métodos

A pesquisa foi realizada nos Laboratórios de Análise de Sementes e de Biologia Molecular da Epamig Triângulo e Alto Paranaíba (URETP), unidade em Uberaba, MG. 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 entre Embrapa/Epamig/Fundação Triângulo. 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%, 0,5%, 1% e 1,5% de contaminação), e dois métodos de detecção: imunoenensaio 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®*, com três repetições de 800 sementes/tratamento) e bioensaio (pré-embebição em solução do herbicida glifosato a 0,6% do equivalente ácido, proporção de 2,5 vezes o peso do substrato, por 16 horas no escuro a 25°C). Após esse período, as sementes foram colocadas para germinar em substrato umedecido com água destilada e mantidas em germinador a 25°C. Para avaliação das plântulas adotou-se a metodologia descrita por Tillmann e West (2004), classificadas em normais (tolerantes ao glifosato) e anormais (convencionais). Essa avaliação foi realizada no 5º dia, computando-se, ainda, a porcentagem de plântulas com raízes secundárias e o comprimento médio de plântulas.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 4 (2 tamanhos de amostra x 4 níveis de contaminação), com três repetições, totalizando 24 tratamentos. Os dados foram interpretados 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.

Resultados e Discussão

Os resultados da detecção de semente OGM nas sementes da cultivar convencional BRSMG 810C, sensível ao glifosato, em função do tamanho das amostras e da porcentagem de contaminação encontram-se na Tabela 1. O imunoenensaio de fluxo lateral, também conhecido como teste rápido com o uso de *kit Trait Test*, foi positivo e indicou a presença para a proteína alvo, nas amostras de sementes com os níveis de contaminação de 0,5%, 1,0% e 1,5%. Nas amostras sem nenhuma semente GM adicionada (0%) o resultado foi negativo, indicando a eficiência do teste.

O desenvolvimento de plântulas normais da cultivar convencional BRSMG 810C foi totalmente inibido, confirmado na ausência de contaminação (Tabela 2), concordando com os resultados de Tillmann e West (2004) e Pereira et al. (2009). À medida que se adicionaram sementes da cultivar 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. Assim, os dois métodos apresentaram a mesma eficiência.

Os resultados da avaliação do comprimento de plântulas são apresentados na Tabela 3 e a morfologia das plântulas foram ilustradas na Figura 1. Assim como ocorreu para o teste de germinação, a interação entre os fatores tamanho de amostra e nível de contaminação não foi significativa. Foram observadas variações nos comprimentos de plântulas, cuja ocorrência média foi de 2,93 cm (pequenas), 6,46 cm (intermediárias) a 9,45 cm (maiores). Outros estudos de bioensaios com soluções do herbicida glifosato, também citaram a redução do comprimento total de plântulas e redução da normalidade e da emissão de raízes secundárias.

Tabela 1. Resultados do teste de imunoenensaio de fluxo lateral, cultivar convencional BRSMG 810C, sensível ao glifosato, em função do tamanho das amostras e da porcentagem de contaminação de sementes da cultivar BRSMG 850GRR entre sementes da cultivar convencional.

Porcentagem de contaminação	Imunoenensaio de fluxo lateral	
	Tamanho 1 ^(*)	Tamanho 2
0	Negativo	Negativo
0,5	Positivo	Positivo
1,0	Positivo	Positivo
1,5	Positivo	Positivo

(*) Tam 1: 200 sementes; Tam 2: 400 sementes.

Tabela 2. Plântulas normais e anormais apresentadas no teste de germinação, com pré-embebição das sementes em papel umedecido com herbicida, cultivar BRSMG 810C (sensível), em função do tamanho das amostras e da porcentagem de contaminação de sementes da cv. BRSMG 850GRR entre sementes da cultivar convencional.

Contaminação (%)	Plântula Normal (%)			Plântula Anormal (%)		
	Tam 1 *	Tam 2	Média	Tam 1	Tam 2	Média
0	0,00	0,00	0,00c	91,33	90,50	90,92a
0,5	0,33	0,33	0,33bc	85,67	86,83	86,25b
1,0	0,67	0,67	0,67b	87,67	95,00	91,33a
1,5	1,50	1,17	1,33a	88,17	93,00	90,58a
Média	0,63A	0,54A	0,58	88,21B	91,33A	89,77
C.V. (%)			49,5			2,9

(*) Tam 1: 200 sementes; Tam 2: 400 sementes.

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 3. Comprimento de plântulas, pequenas, intermediárias e maiores, utilizando pré-embebição das sementes em papel umedecido com herbicida, cultivar BRSMG 810C (sensível), em função do tamanho das amostras e da porcentagem de contaminação de sementes da cultivar BRSMG 850GRR entre sementes da cultivar convencional.

Contami- nação (%)	Comprimento de Plântulas (cm)								
	Plântulas Pequenas			Plântulas Intermediárias			Plântulas Maiores		
	Tam 1	Tam 2	Média	Tam 1	Tam 2	Média	Tam 1	Tam 2	Média
0	2,90	3,07	2,98a	5,47	6,77	6,12b	9,13	11,00	10,07a
0,5	2,93	2,93	2,93a	5,87	6,27	6,07b	9,10	9,60	9,35a
1,0	2,93	2,83	2,93a	6,23	7,20	6,72ab	9,07	9,30	9,18a
1,5	2,73	3,13	2,88a	7,03	6,87	6,95a	8,87	9,50	9,18a
Média	2,9A	3,0A	2,93	6,2B	6,8A	6,46	9,0B	9,9A	9,45
C.V. (%)			7,1			7,1			6,9

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na presença do herbicida, as plântulas da cultivar BRSMG 810C (sensível), apresentaram diversas anormalidades observadas neste estudo e constatadas para outras cultivares não transgênicas por outros trabalhos. Redução no comprimento da raiz primária e seu engrossamento (Funguetto et al., 2004; Pereira et al., 2009), paralisação do desenvolvimento (Pereira et al., 2009), ausência de raízes secundárias (Funguetto et al., 2004; Pereira et al., 2009). Foi observado também nesta pesquisa o encurtamento e o afunilamento repentino do hipocótilo (Figura 1). A cultivar BRSMG 850GRR (tolerante) apresentou desenvolvimento de plântula normal, com todas as estruturas preservadas de hipocótilo, raiz primária e raízes secundárias (Figura 1).

Pela análise de correlação de Spearman, foi constatado que existe correlação elevada e significativa entre os valores obtidos pelo método de detecção por bioensaio e os níveis de contaminação estabelecidos ($r= 0,82$; $p\leq 0,0001$).

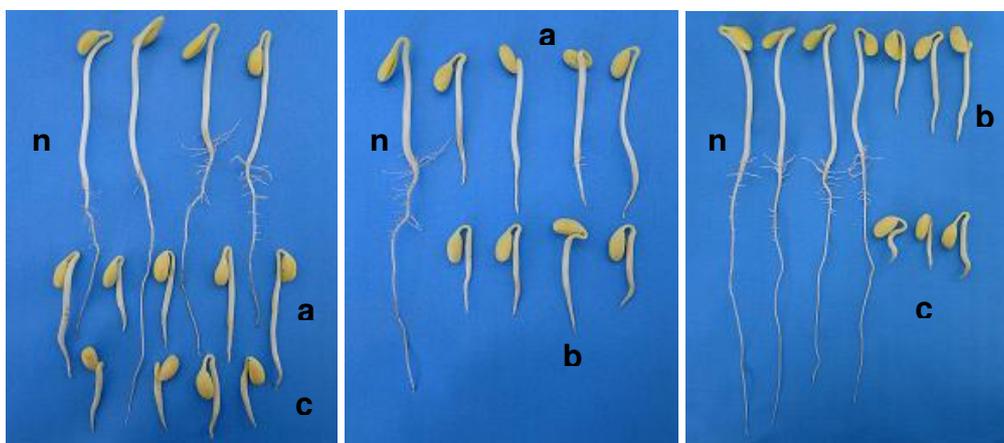


Figura 1. Bioensaio. Plântulas acima e da esquerda: n) normais - cultivar BRSMG 850GRR (tolerante). Plântulas da direita: a) anormais maiores (> 9 cm), b) anormais intermediárias (4 a 9 cm), c) anormais pequenas (< 4 cm) da cultivar BRSMG 810C, sensível ao glifosato.

Conclusões

- O método de bioensaio é eficiente na detecção da presença de sementes GM em amostras de semente convencional de soja, mesmo para contaminação inferior a 1,0%, desde que as mesmas apresentem alta qualidade fisiológica.
- O tamanho da amostra não influencia a eficiência dos dois métodos na detecção da presença de sementes adventícias (GM).

Referências

FUNGUETTO, C.I.; TILLMANN, M.A.A.; VILLELA, F.A; DODE, L.B. Detecção de sementes de soja geneticamente modificada tolerante ao herbicida glifosato. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n.1, p.130-138, 2004.

PEREIRA, W.A.; DEL GIÚDICE, M.P.; CARNEIRO, J.E.S.; DIAS, D.C.F.S.; BORÉM, A. Fluxo gênico em soja geneticamente modificada e método para sua detecção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.7, p.999-1006, 2007.

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.

ZITO, R.K.; ARANTES, N.E.; FRONZA, V.; SÁ, M.E.L.; PÁDUA, G.P.; ZANETTI, A.L.; JUHÁSZ, A.C.P. Soja em Minas Gerais. **Informe agropecuário**, Belo Horizonte: EPAMIG, v.3, n.25, p.16-21, 2011.