

Métodos para Determinação da Pureza Genética de Sementes

IMUNOCROMATOGRAFIA PARA AVALIAÇÃO DE PRESENÇA ADVENTÍCIA DE OGM EM SEMENTES

LUIZ ARTUR COSTA DO VALLE¹

INTRODUÇÃO

A imunocromatografia é um método para detecção de proteínas específicas utilizando anticorpos. Os kits imunocromatográficos, usualmente chamados de “tiras de fluxo lateral”, tem grande aplicação na detecção de proteínas expressas em plantas geneticamente modificadas (GM) e que não estão presentes em plantas de cultivares convencionais. As tiras são de fácil utilização e exigem pouco treinamento. O aparecimento de duas linhas coloridas indica um resultado positivo, enquanto apenas a linha superior (controle) colorida indica um resultado negativo. São muito utilizadas para a avaliação de presença adventícia de sementes GM em lotes de sementes de cultivares convencionais. Nesse caso, são avaliadas subamostras de tamanho que não pode exceder o limite de sensibilidade do teste, que é maior ou menor em função do nível de expressão da proteína alvo nas sementes da planta GM. Por exemplo, se a sensibilidade do teste é de 1 semente GM em 1.000, cada subamostra não pode exceder 1.000 sementes. O número de subamostras a ser testado depende do grau de confiança desejado e do limite de presença adventícia considerado. Utilizando como exemplo a detecção de presença adventícia de soja RR em soja convencional, que popularizou o uso dessa tecnologia no Brasil, temos a seguinte situação: os kits tem sensibilidade de 1:1.000 e, para afirmar que um lote de sementes convencionais está livre de soja RR, a Instrução Normativa N° 42, de 1° de dezembro de 2006, estabelece um nível máximo de presença de OGM de 0,1% com um grau de confiança de 95%. Essa regulamentação

é necessária, pois a única forma de assegurar a ausência absoluta de OGM seria testar o lote de sementes inteiro, o que é impossível e implicaria na destruição do mesmo. No programa SeedCalc, disponível gratuitamente no sítio eletrônico da ISTA (International Seed Testing Association – <http://www.seedtest.org/en/content---1--1143.html>), na planilha “Qual Impurity Estimation”, verifica-se que para esse grau de confiança é necessário testar 3.000 sementes, nesse caso 3 subamostras de 1.000 sementes para maior economia (a sensibilidade do teste é 1:1.000), obtendo três resultados negativos, para afirmar que a presença de soja RR é inferior a 0,1%, o que pode ser considerado como resultado negativo de acordo com a IN 42/2006.

Outros formatos de teste podem ser utilizados para outros fins. Com esse mesmo kit, para testar grãos para o limite de 5%, por exemplo, com 95% de confiança, com a finalidade de verificar a necessidade de pagamento ou não de royalties, bastaria testar uma amostra de 60 sementes, pois o resultado negativo, de acordo com o programa SeedCalc, significaria que, se houver presença de sementes GM, esta seria em percentual inferior a 4,87%. Para a realização do teste, cada subamostra é triturada a seco, independentemente das outras. Adiciona-se a cada subamostra triturada o volume de água ou de tampão recomendado pelo fabricante e, após breve agitação e decantação, transfere-se 0,5 mL do sobrenadante para um tubo de microcentrifuga, no qual é colocada a tira. Desta forma, é utilizada uma tira para cada subamostra. Usualmente, após 5-10 minutos é feita a leitura do resultado. É importante mencionar que o teste para presença adventícia não é obrigatório para sementes de soja

¹Eng. Agr., D.Sc. em Fitopatologia. Fiscal Federal Agropecuário – LASO/LANAGRO/MG. Belo Horizonte/MG.e-mail: luiz.valle@agricultura.gov.br

ou milho, mas é obrigatório para sementes convencionais de algodão, conforme estabelecido pela Instrução Normativa 25, de 16.12.2005, que trata dos padrões de identidade e qualidade para produção e comercialização de sementes de grandes culturas. O uso das tiras para sementes de algodão convencional em atendimento à IN 25/2005 deve ser feito conforme os requisitos estabelecidos na Instrução Normativa 43, de 1º de dezembro de 2006, que estabelece quais são os kits autorizados para uso e a obrigatoriedade de testar para as proteínas CP4EPSPS, PAT/BAR e Cry1Ac, o que exige o uso de três kits diferentes. A soma da contaminação máxima (“upper bound”) estimada para cada uma das três proteínas no programa SeedCalc deve ser inferior a 1%, que é o limite estabelecido na IN 25/2005. Esse formato de teste precisa ser revisto por ser muito rigoroso, pois estabelece a soma de estimativas de máxima contaminação, e pela possibilidade de cultivares com mais de uma dessas proteínas.

Discute-se a necessidade de estabelecer limites para a presença adventícia de sementes GM em sementes convencionais de soja e milho, mas ainda não há regulamentação. Também não há regulamentação sobre a presença de um cultivar GM em outro, como já foi

detectado em algodão no LASO/LANAGRO/MG. A imunocromatografia também pode ser utilizada para avaliar a pureza genética de um cultivar GM, mas nesse caso, as sementes devem ser testadas individualmente, uma a uma, o que implica em um gasto considerável de tiras. Apesar disso, empresas multinacionais que conseguem as tiras a custo mais baixo no exterior podem optar por esse método. Por exemplo, utilizando a planilha “Qual Purity Estimation” do programa SeedCalc, para assegurar com 95% de confiança que a pureza genética da cultivar é superior a 99%, 300 sementes devem ser testadas individualmente, com todas sendo positivas para a proteína testada. Ou seja, seriam gastas 300 tiras. Testando 200 sementes e obtendo-se apenas resultados positivos, pode-se afirmar que a pureza é superior a 98,5%. Pela sua simplicidade e facilidade de adoção, a imunocromatografia é um dos métodos mais adequados para uso em laboratórios de sementes e, com a rápida expansão do cultivo de plantas GM, seu uso deve tornar-se mais disseminado. Avanços como tiras que detectam mais de uma proteína e métodos de quantificação a partir da intensidade da banda na tira estão disponíveis para atender à crescente demanda por análises na produção e comércio de sementes e de grãos.

DETECÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS (OGMS) – ABORDAGEM DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

NILSON CÉSAR CASTANHEIRA GUIMARÃES¹

INTRODUÇÃO

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, através da Coordenação Geral de Apoio Laboratorial da Secretaria de Defesa Agropecuária (CGAL/SDA), tem estabelecido ações estruturantes desde 2007, no sentido de implantar uma rede de laboratórios oficiais de análise de Organismos Geneticamente Modificados (OGMs), que atuará na realização de análises oficiais oriundas de ações fiscalizatórias e no apoio à rede de laboratórios credenciados através do provimento de ensaios interlaboratoriais, monitoramento de resultados e auditorias de sistema da qualidade e técnicas. As normas e legislações pertinentes são levadas em consideração quando das auditorias e análises de processos dos credenciados, bem como dos próprios laboratórios da rede. Atualmente, 3 laboratórios compõe a rede oficial de laboratórios para análise de OGM do MAPA, sendo localizados em Pedro Leopoldo-MG (LANAGRO-MG), Porto Alegre-RS (LANAGRO-RS) e Goiânia-GO (LANAGRO-GO), e já realizam análises laboratoriais e ações de auditoria na rede credenciada. Os laboratórios da rede oficial têm participado sistematicamente de ensaios de comparação interlaboratorial para análise de OGM em milho e soja com resultados satisfatórios.

No que tange as técnicas utilizadas, os laboratórios da rede têm se valido de análises imunocromatográficas através do uso de tiras de fluxo lateral, reação da polimerase

em cadeia (PCR) para detecção de OGM e PCR em tempo real para detecção e quantificação de OGM. Pode ser utilizado ELISA (ensaio imunocromatográfico baseado em reações de ligação antígeno-anticorpo) para detecção de OGM, porém nenhum dos laboratórios oficiais tem utilizado esta abordagem. É importante mencionar que o uso de ELISA e tiras imunocromatográficas propiciam uma possibilidade de análise do fenótipo, uma vez que a proteína alvo pode ser identificada, sendo esta produto da expressão do gene inserido. Já as técnicas de PCR e PCR em tempo real permitem a detecção do gene inserido já diretamente integrado no genótipo da espécie em questão, não dependendo estas detecções de maior ou menor expressão do gene alvo. Todas estas metodologias utilizadas, tanto nos laboratórios credenciados quanto nos oficiais, devem ser validadas, normalizadas por instituições competentes ou estabelecidas por legislação pertinente.

O MAPA tem também recebido visitas bianuais de missões da Comunidade Européia com o objetivo de avaliar toda a estrutura de fiscalização de OGM no Brasil no âmbito do Ministério. Nestas missões a área laboratorial também tem sido avaliada, e o contato bastante estreitado com pesquisadores do Laboratório de Referência da Comunidade Européia (CRL), que tem realizado intenso intercâmbio de informações com os técnicos do MAPA visando a harmonização das ações entre o Brasil e a Europa no que tange a análise de OGMs.

¹ Eng. Agr. M. Sc. Bioquímica e Biologia Molecular. Fiscal Federal Agropecuário – LANAGRO/MG. Pedro Leopoldo-MG. email: nilson.cesar@agricultura.gov.br

MÉTODOS ESTADÍSTICOS PARA DETERMINAR PUREZA GENÉTICA DE VARIEDADES DE PLANTAS

AMALIO SANTACRUZ VARELA¹

Las variedades de plantas son poblaciones con una estructura genética definida; sin embargo, al ser cultivadas para producción comercial o para producción de semilla se someten a fuerzas como el flujo de genes entre poblaciones, selección natural (y a veces artificial), mutación y deriva genética, que pueden provocar desviaciones en la estructura genética con respecto a la semilla que obtuvo el fitomejorador, con el consecuente sesgo sobre las características agronómicas de la variedad en cuestión. La Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV), a la cual están afiliados 65 miembros, entre países, grupos de países (e.g. Unión Europea), incluyendo también entre ellos México y Brasil, ha propuesto los exámenes de Distinción, Homogeneidad y Estabilidad (DHE) para la descripción y registro de las variedades vegetales. Existen guías detalladas para la realización de los exámenes DHE, elaboradas por grupos técnicos de la UPOV cuyo número corresponde hasta la fecha a 281 especies de plantas domesticadas, las cuales se encuentran disponibles públicamente en Internet (http://www.upov.int/es/publications/tg-rom/tg_index.html). De este examen pueden utilizarse específicamente las pruebas de distinción y de homogeneidad para determinar pureza genética. En el caso del examen de distinción se toman como base los descriptores reportados a la oficina de registros de variedades y sus valores se comparan estadísticamente con los lotes donde se sospecha que existe sesgo, utilizando principalmente la diferencia mínima significativa, la cual se basa en el estadístico t de Student, además de la prueba de χ^2 (chi-cuadrada) para verificar la posible existencia de desviaciones estadísticamente significativas con respecto a los registros de la descripción original de una

variedad. Con respecto a los exámenes de homogeneidad, es necesario tomar en cuenta el tipo de reproducción de la especie (propagación vegetativa, polización cruzada, autopolinización) y la estructura genética de cada variedad en particular (variedad sintética, variedad multilínea, híbrido de cruza simple, trilineal, de cruza doble, etc.) para establecer límites de tolerancia en cuanto a la variabilidad esperada y a partir de dichos límites determinar si una variedad conserva las características de la población original obtenida por el fitomejorador o bien ha perdido pureza genética. Existen dos estrategias para determinar la homogeneidad de una variedad como indicador de pérdida de pureza genética; la primera involucra al parámetro estadístico de desviación estándar y se utiliza preferentemente en donde el nivel de variación se espera que sea alto dentro de una variedad, como en aquellas de polinización abierta, las plantas no son muy similares y es difícil visualizar las plantas que no corresponden a la variedad, realizándose una comparación entre una población que presumiblemente ha perdido pureza genética y la población de referencia donde la variación (desviación estándar) esperada se expresa en plantas provenientes de la semilla resguardada por la Oficina de Registros de variedades; la segunda estrategia consiste en determinar la proporción de plantas “fuera de tipo”, es decir plantas muy atípicas o sin relación con la población original; se aplica preferentemente en casos donde todas las plantas de una variedad son muy similares, y en particular para variedades autógamas o de reproducción vegetativa, utilizando tamaños de muestra apropiados, los cuales están considerados en las guías de los exámenes DHE de la UPOV.

¹Eng. Agr., Dr., Profesor Investigador, Colegio de Postgraduados, Montecillo, MÉXICO, e-mail: asvarela@colpos.mx