MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA "ELISEU MACIEL"

DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE SEMENTES DE SOJA GENETICAMENTE MODIFICADA RESISTENTE AO GLIFOSATO EM SISTEMA HIDROPONICO

CARLA MEDIANEIRA BERTAGNOLLI

Tese apresentada à Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel", Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação da Prof[a]. Maria Ângela André Tillmann, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

PELOTAS
Rio Grande do Sul
Fevereiro de 2005

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA "ELISEU MACIEL"

DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE SEMENTES DE SOJA GENETICAMENTE MODIFICADA RESISTENTE AO GLIFOSATO EM SISTEMA HIDROPONICO

CARLA MEDIANEIRA BERTAGNOLLI

Tese apresentada à Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel", Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação da Prof[a]. Maria Ângela André Tillmann, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

PELOTAS
Rio Grande do Sul
Fevereiro de 2005

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

B536d Bertagnolli, Carla Medianeira
Detecção e quantificação de sementes de soja geneticamente modificada resistente ao glifosato em sistema hidroponico / Carla Medianeira Bertagnolli ; orientador Maria Ângela André Tillmann . – Pelotas, 2005. – 73 f. Tese (Doutorado). Ciência e Tecnologia de Sementes. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas,. Pelotas, 2005.

1. Glycine max 2. Transgênicos 3. Hidroponia 4. Soja I. Tillmann, Maria Ângela André (orientador) II .Título.

CDD 633.34

CARLA MEDIANEIRA BERTAGNOLLI
Engenheira Agrônoma

DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE SEMENTES DE SOJA GENETICAMENTE MODIFICADA RESISTENTE AO GLIFOSATO EM SISTEMA HIDROPONICO

Tese apresentada à Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel", Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação da Prof[a]. Maria Ângela André Tillmann, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Francisco Amaral Villela - UFPel

Prof[a]. Dra. Luciana Bicca Dode – UCPel

Prof. Dr. Nilson Lemos de Menezes - UFSM

Prof. Dr. Paulo Dejalma Zimmer - UFPel

Prof[a]. Dra Maria Ângela André Tillmann – UFPel (Orientadora)

Aos meus pais Neiva e Jelso e ao meu irmão Tiago,
pelo amor, incentivo e compreensão .

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela força e segurança, guiando meus passos em todos os momentos da minha vida;

A minha orientadora e grande amiga Maria Ângela André Tillmann, pela confiança depositada, dedicação incondicional e valorosa orientação;

Ao professor Francisco Amaral Villela, pela co-orientação, ensinamentos e confiança;

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes pelos conhecimentos transmitidos;

Ao professor Fernando Carvalho, pela cessão do Laboratório de Di-Haplóides e Hidroponia, para a realização deste trabalho;

Ao Sr. Ivo Carraro, diretor da COODETEC, pelo fornecimento das sementes;

Aos amigos e funcionários do Laboratório Didático de Análise de Sementes: Sílvio, Maria Alice e Irene pela colaboração na condução das análises.

Aos grandes amigos e colegas de curso Benta, Cristina, Sabrina, Fernanda, Sofiati, João Batista, Denise, Helen, Cleonice e Carol, pelos momentos de descontração, palavras amigas e exemplos de dedicação ao trabalho;

À Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, pela oportunidade de realização do curso;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos;

À todas as pessoas, que direta ou indiretamente, contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho, meu sincero agradecimento.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL..... viii
SUMMARY GENERAL..... ix
1. INTRODUÇÃO GERAL..... 01

2. PROTOCOLO DE DETECÇÃO DE SEMENTES DE SOJA GENETICAMENTE MODIFICADA RESISTENTE AO GLIFOSATO EM SISTEMA HIDROPONICO
RESUMO 11
SUMMARY..... 12
INTRODUÇÃO..... 13
MATERIAL E METODOS..... 16
RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 22
CONCLUSÕES 34
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 35

3. CARACTERIZAÇÃO DE PLANTULAS E QUANTIFICAÇÃO DE SEMENTES DE SOJA GENETICAMENTE MODIFICADA RESISTENTE AO GLIFOSATO EM SISTEMA HIDROPONICO
RESUMO 39
SUMMARY 40
INTRODUÇÃO 41
MATERIAL E METODOS 44
RESULTADOS E DISCUSSÃO 48
CONCLUSÕES 57
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS..... 58

4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 61

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PROGRAMA de PÓS-GRADUAÇÃO em CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE SEMENTES

Título: Detecção e quantificação de sementes de soja geneticamente modificada resistente ao glifosato em sistema hidropônico.

Autora: Carla Medianeira Bertagnolli
Orientador: Maria Ângela André Tillmann

Resumo geral – Este trabalho objetivou estabelecer um protocolo de detecção de sementes de soja geneticamente modificada (GM) resistente ao glifosato, caracterizar os sintomas em plântulas tratadas com glifosato, e verificar a eficiência do cultivo hidropônico na detecção e quantificação de misturas de sementes de soja GM em amostras convencionais. Foram realizados cinco ensaios para estabelecer o protocolo de detecção, utilizando solução nutritiva e solução herbicida nas concentrações de 0,0; 0,12; 0,24; 0,36 e 0,48 % do equivalente ácido do glifosato e os períodos que as sementes permaneceram em contato com a solução herbicida foram 24; 16; 8; 4 e 1 hora. Os parâmetros avaliados foram porcentagem de plântulas normais, comprimento de plântula, comprimento de raiz e parte aérea e número de raízes secundárias. No segundo estudo foram testadas amostras de sementes convencionais contaminadas com 0; 1; 3 e 5% (em número) de sementes de soja GM.O protocolo recomendado consiste na permanência das sementes em contato com a solução herbicida a 0,12% do equivalente ácido do glifosato, por quatro horas, seguido da transferência das sementes para solução nutritiva até completar cinco dias. Os parâmetros que melhor permitem a diferenciação das cultivares GM e não-GM são o comprimento de plântula e a presença de raízes secundárias. O cultivo hidropônico permite 100% de acertos na detecção de soja GM, independente da porcentagem de contaminantes na amostra e apresenta exatidão na quantificação da presença de até 1% de sementes de soja GM, sendo sua precisão condicionada ao percentual de mistura presente na amostra.

Palavras-Chave: *Glycine max,* trangênicos, hidroponia

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PROGRAMA de PÓS-GRADUAÇÃO em CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE SEMENTES

Title: Detection and quantification of genetically modified soybean seeds resistant to glyphosate in hydroponics system.

Author: Carla Medianeira Bertagnolli
Adviser: Prof[a]. Dra Maria Ângela André Tillmann

Summary general - This work aimed at to establish a detection protocol to genetically modified (GM) soybean seeds resistant to the glyphosate, characterize the symptoms of the seedlings, and verify the efficiency of the hidroponic cultivation in the detection and quantification of GM soybean seeds mixtures in conventional seeds samples. Five assays were performed to establish the detection protocol, using nutrient solution and herbicide solution in the concentrations of 0,0; 0,12; 0,24; 0,36 and 0,48% of the equivalent acid of the glyphosate and the periods that the seeds stayed in contact with the herbicide solution ware 24; 16; 8; 4 and 1 hour. The evaluated parameters were normal seedlings, seedling, root and hypocotyls length, and number of secondary roots. In the second study conventional seeds samples were tested added with 0; 1; 3 and 5% of GM soybean seeds. The recommended protocol consist in the seeds permanence in contact with herbicide solution to 0,12% of the e a of glyphosate, for four hours, followed by the transfer of the seeds for nutrient solution until completing five days. The parameters that best allow the differentiation of cultivar GM and non-GM are the seedling length and the presence of secondary roots. The hydroponics cultivation allows 100% of corrects results in the GM soybean detection, independent of the percentage of the contaminants in the sample and it presents accuracy in the quantification of the presence of up to 1% GM soybean seeds being its precision conditioned to the perceptual of present mixture in the sample.

Key-word: *Glycine Max*, transgenics, hidroponics

1. INTRODUÇÃO GERAL

Desde o início da agricultura, melhoristas e agricultores têm manipulado os genes das espécies, através do melhoramento de plantas, selecionando novos genótipos e suas características de interesse.

No século XX, novas tecnologias foram incorporadas ao melhoramento genético e contribuíram para reduzir o tempo necessário na obtenção de novas variedades, bem como gerar novas fontes de variabilidade genética. A indução à mutação por tratamentos físicos e químicos e mais recentemente, a transformação genética de plantas que, utilizando modernas ferramentas advindas da biologia molecular, cultura de tecidos e transferência de genes representam instrumentos poderosos na introdução de novas características em plantas (Brasileiro & Carneiro, 1998).

A transformação genética é um processo relativamente novo e complexo que consiste na introdução controlada de um gene, ou fragmento de DNA (ácido desoxirribonucléico), no genoma de uma planta ou animal e sua posterior expressão, conferindo a estes uma nova característica. Este processo também é conhecido como engenharia genética, transformação genética ou biotecnologia e os produtos oriundos desta técnica são chamados organismos geneticamente modificados (OGM), geneticamente modificados (GM) ou transgênicos (Huffman, 2004).

Os primeiros estudos relativos à engenharia genética surgiram após Watson & Crick elucidarem a estrutura do DNA em 1953 e da descoberta da capacidade de recombinação do DNA por Cocken & Boyer em 1973, revelando a similaridade do processo genético entre os organismos, isto é, que um gene pode ser transferido entre as espécies (Aragão & Ribeiro, 1998).

Para obtenção de uma planta transgênica, o gene responsável pela característica de interesse deve ser identificado, isolado dos demais genes do genoma, clonado e introduzido em vetores para transformação de plantas. Este gene pode ser oriundo de uma planta ou outro organismo

(bactéria, fungo, vírus, animais) ou ainda, ser sintetizado em laboratório (Brasileiro & Carneiro, 1998).

Um eficiente vetor é a bactéria de solo *Agrobacterium tumefaciens,* que transfere naturalmente parte do seu genoma às células vegetais, no momento da infecção. Outras técnicas permitem a introdução do DNA exógeno em células vegetais, por meio de mecanismos físicos ou químicos. Na eletroporação de protoplastos, por exemplo, aplica-se um pulso de alta voltagem a uma solução contendo DNA e protoplastos em suspensão, o choque elétrico faz com que poros se abram temporariamente na membrana plasmática, permitindo a passagem do DNA. Já no bombardeamento de partículas ou biobalística, o DNA é colocado na superfície de micropartículas e por uma espécie de canhão (gene gun), estas são impulsionadas em alta velocidade no genoma da célula (Aragão, 2003).

A regeneração das células que contém esse DNA exógeno dará origem a plantas transgênicas. As plantas transformadas são inicialmente testadas em laboratório por meio de análise de hibridização do DNA para confirmar a introdução do DNA exógeno ao genoma da planta. Logo após, as plantas são avaliadas em casa de vegetação tendo como controle o genótipo original não transgênico. A etapa final das análises é o teste de desempenho no campo, que permite verificar a estabilidade da característica introduzida (Aragão & Brasileiro, 2002).

Após essas análises, é realizada a seleção das plantas através da introdução no programa de melhoramento, o lançamento das cultivares e a produção comercial das sementes.

A engenharia genética constitui um método de reconhecida importância no melhoramento de plantas, graças a ela foram obtidas plantas resistentes a viroses como batata e feijão, tomate de amadurecimento tardio, cultivos resistentes a insetos, como algodão e milho e culturas resistente a herbicida: algodão, soja, arroz e alface.

A soja resistente ao herbicida glifosato foi uma das primeiras aplicações da engenharia genética na agricultura, pois propicia ao agricultor o uso deste herbicida na lavoura de soja durante o desenvolvimento da cultura (Dellanay et al., 1995), em função da

eficiência e viabilidade econômica (Correia & Rezende, 2004), desde que ela seja utilizada em conjunto com outros métodos de controle existentes, como parte de um manejo integrado (Bertram & Pedersen, 2004). Devido a isto, os agricultores têm prontamente integrado nas suas práticas de produção, cultivos resistente ao glifosato.

A soja resistente ao glifosato é a espécie GM mais cultivada em todo mundo, com o aumento aproximadamente de 13% na área plantada anualmente, alcançando 41,1 milhões de hectares (55% da soja mundial).

No Brasil, a soja tem grande importância econômica, o seu cultivo ocupa 21 milhões de hectares, sendo a espécie de maior extensão em cultivo (CONAB, 2004), na safra 2003/2004 foi aprovado o primeiro cultivo de soja resistente ao glifosato o qual atingiu 2,785 milhões de hectares, totalizando uma produção de 4,1 milhões de toneladas.

O glifosato é um herbicida sistêmico de ação total, usado no controle de plantas daninhas mono e dicotiledôneas, facilmente translocável, motivo pelo qual provoca a morte do sistema radicular e estruturas reprodutivas de plantas perenes como rizomas, bulbos e tubérculos (Kruse et al., 2000), em alguns países há registro deste produto para eliminar plantas daninhas em ambientes aquáticos (Vidal, 1997).

Este herbicida pertence ao grupo dos organofosforados, o seu ingrediente ativo é o ácido Glyphosate N-(Fosfometil) Glicina e seu modo de ação se dá pela inibição competitiva da enzima 5enolpiruvilshiquimato-3fosfato sintase (EPSPS) (Mousdale & Goggins, 1991; Cobb, 1992; Trezzi et al.,2001; Amarante Junior et al., 2002).

O seu amplo espectro de ação aliado à baixa ação residual no solo (Cobb, 1992) faz do glifosato um dos herbicidas mais vendidos no mundo (Trezzi et al., 2001). Em contato com o solo, liga-se fortemente aos colóides ficando indisponível para a absorção pelas plantas, perdendo sua ação herbicida, sendo degradado pelos microorganismos do solo (Amarante Junior et al., 2002).

A enzima EPSPS é específica no metabolismo dos aminoácidos aromáticos: fenilalanina, tirosina e triptofano (Mousdale & Goggins, 1991; Cobb, 1992; Trezzi et al., 2001). Com a inibição desta enzima, a planta

não produz os aminoácidos para a síntese de proteínas (Padgette et al., 1995) e alguns metabólitos secundários: alcalóides, cumarinas, flavanóides, lignina, ácidos benzóicos, vitaminas (K e E) e hormônios (Trezzi et al., 2001; Amarante Junior et al., 2002), acumulando um composto intermediário, o shiquimato (Vidal, 1997) o qual provoca um colapso no metabolismo intermediário dos tecidos vegetais. Os sintomas de sua ação sobre as plantas incluem clorose dos meristemas, necrose e morte em dias ou semanas (Amarante Junior et al., 2002).

Na soja transgênica Roundup Ready™ (RR™), a resistência ao glifosato foi obtida através da técnica de biobalística, pela inserção no genoma dessas plantas do gene CP4-EPSPS, oriundo da bactérea *Agrobacterium* sp cepa CP4, que confere tolerância ao herbicida por codificar uma variante da enzima EPSPS insensível a este inibidor (Padgette et al., 1995).

A soja apresenta dupla expressão da enzima EPSPS, uma original da espécie e outra da *Agrobacterium* sp, que não é afetada pelo herbicida (Kleba, 1998), além de seqüências gênicas de petúnia (CTP), do vírus do mosaico da couve flor (Promotor E35S) e da bactéria *Agrobacterium tumefaciens (*Terminador-NOS 3') que são reguladores do funcionamento do gene exógeno (Padgette et al., 1995).

A produtividade, morfologia e constituição das cultivares de soja resistente ao glifosato permanecem iguais às das linhagens suscetíveis correspondentes. Variedades de soja com resistência incorporada após serem tratadas com glifosato, nas doses comerciais, não apresentaram sintomas de fitotoxicidade, redução da produtividade ou qualidade do produto, viabilizando, desta maneira, o seu uso comercial (Padgette et al.,1995; Delanay et al., 1995; Clemente et al., 2000; Elmore et al., 2001).

Em um período de oito anos, a área global cultivada com OGMs cresceu quarenta vezes, de 1,7 milhões de hectares em 1996 para 67,7 milhões de hectares em 2003 (James, 2003). Com o aumento destes cultivos, a presença adventícia de sementes de variedades GM em lotes de sementes convencionais, tornou-se um problema para o comércio internacional de sementes e sua detecção constitui-se um importante

desafio, levando pesquisadores a desenvolver estratégias e métodos para analises de sementes GM.

Em geral, o procedimento de análise de organismos GM consiste de três passos distintos: detecção, identificação e quantificação (Bonfini et al., 2001; Nordic Concil of Ministers, 2004).

A detecção tem como objetivo determinar se um produto ou organismo é ou não GM, não informa qual tipo de OGM está presente e nem em que quantidade, apenas confirma a presença do OGM. De acordo com a Nordic Concil of Ministers (2004) são exemplos, disto os testes onde elementos comuns a diversos OGM são detectados, como o promotor 35S (porção genética do vírus da couve flor), que pode estar presente em diversas plantas transformadas.

Na identificação de OGM são utilizados testes específicos para identificar uma determinada característica ou evento. Os eventos são as modificações genéticas propriamente ditas (gene CP4-EPSPS inserido na soja), este teste identifica a presença de uma seqüência específica de DNA, que mede a interação entre a planta hospedeira e o DNA inserido. Como o lugar onde o gene é inserido na planta é exclusivo, este teste identificará o OGM em questão.

A quantificação visa determinar o conteúdo (%) de OGM presente na amostra, e é muito importante para fins de rotulagem de alimentos e fiscalização por parte do governo.

Ainda não há nenhum método padronizado para detectar, identificar e quantificar sementes de plântulas transgênicas, a Associação Internacional de Análise de Sementes - ISTA, publicou um documento posicionando-se na questão dos OGMs, estabelecendo estratégias para o desenvolvimento de testes para análise de sementes geneticamente modificadas: inclusão de um capítulo nas Regras Internacionais de Sementes sobre detecção, identificação e quantificação de sementes GM, organização de testes de proficiência e promoção de troca de experiência entre laboratórios.

Os resultados obtidos pelo primeiro teste de proficiência realizado pela ISTA, para determinar a habilidade dos laboratórios em detectar a presença de sementes de espécies GM em amostras de sementes de

milho convencionais, mostrou que 69,8% dos participantes foram capazes de identificar todas as amostras corretamente (ISTA, 2003a). O segundo teste de proficiência teve como objetivo checar a habilidade dos participantes em detectar e quantificar a presença de milho GM em amostras convencionais, 47 laboratórios fizeram parte do teste qualitativo e 85% apresentaram resultados corretos para todas as amostras; 13 laboratórios participaram dos testes semiquantitativos (as amostras tinham que ser classificadas em mistura superior ou inferior a 1%), um laboratório classificou certo todas as amostras, enquanto 11 reportaram de um a cinco resultados errados. O teste quantitativo era para estimar a porcentagem de sementes de milho GM na amostra ou determinar quais amostras apresentavam porcentagem de mistura superior ou inferior a 1%; participaram do teste 19 laboratórios dos quais apenas quatro classificaram corretamente as amostras (ISTA, 2003b).

Nas avaliações de detecção e quantificação de sementes de plantas GM em lotes de sementes convencionais, uma das maiores fontes de erro, além da amostragem das sementes, são os procedimentos de identificação utilizados, que de acordo com Huffman (2004) ainda não há teste que apresentam total exatidão nos resultados, isso pode ser comprovado com os resultados apresentados nos testes de proficiência da ISTA.

Embora muitas pesquisas já tenham sido conduzidas com objetivo de detectar culturas GM, ainda não há nenhum método padronizado. Além disso, é valido lembrar, que as questões mais importantes na busca da padronização são exatidão e reprodutibilidade dos testes (ISTA, 2001).

Existe um interesse por parte dos produtores de sementes não-GM, em verificar se há mistura com sementes GM e se o nível de contaminação está entre limite tolerância estabelecido pela legislação (Mumm & Walters, 2001). Estes limites consideram a possibilidade de mistura entre material GM e convencional ao longo da produção agrícola, transporte ou processamento (Bonfini et al., 2001).

Os OGMs podem ser identificados pela detecção direta do DNA exógeno, utilizando a técnica da PCR (Polymerase Chain Reaction) ou por métodos imunológicos para detectara proteína resultante.

Dos métodos baseados em proteínas, o mais sensível é o denominado ELISA (Enzime Linked Immunosorbent Assay), que detecta proteínas especificas contidas nas sementes de plantas GM (Aragão & Ribeiro, 1998). A técnica de ELISA utiliza anticorpos que reagem à proteína codificada por um gene exógeno em uma planta transgênica. Este método é eficiente tanto para detecção quanto para quantificação, entretanto, o conteúdo de proteína pode variar consideravelmente e a quantificação, neste caso não pode ser considerada exata (Gutormson et al., 2000).

Outro método é o teste de tira de fluxo lateral, também chamado de "kit", é um método que pode ser concluído em apenas 10 a 20 minutos, não requer laboratório, sendo geralmente utilizados em campos de produção e em unidades de beneficiamento de sementes, onde é necessário determinar rapidamente a presença de sementes de plantas geneticamente modificadas. A desvantagem deste tipo de teste é que ele não pode quantificar o conteúdo de OGM presente na amostra.

O PCR é realizado em laboratório, requer mais tempo (2 a 3 dias), equipamentos sofisticados e são mais caros que os métodos baseados em proteínas. Por outro lado são mais sensíveis, se comparados com o da técnica de ELISA e o teste de tira de fluxo lateral, podendo detectar baixos níveis de OGMs (Gutormson, 2000). Ele detecta presença de seqüências especificas de DNA no genoma das sementes através do uso de "primers" que são pequenos pedaços do DNA, específico para o DNA que é analisado (Aragão & Ribeiro, 1998).

Os métodos usados para análise de OGM podem ser divididos em qualitativos e quantitativos. Os métodos qualitativos são usados para detecção e identificação de organismos transgênicos. A detecção de OGMs é normalmente o primeiro passo na análise do conteúdo de OGM. Para este propósito são usadas freqüentemente técnicas de seleção de um elemento genético comum em um grupo de plantas GM, por exemplo, o promotor 35S. Uma vez detectada a presença da transgenia, é importante detectar o OGM específico presente, para isto se utiliza no teste de PCR primers específicos para o evento em questão (Bonfini et al, 2001).

Dois testes principais são usados para quantificação do conteúdo de OGM: PCR competitivo e PCR em tempo real.

Em testes utilizando PCR competitivo, a seqüência alvo a ser analisada é amplificada junto com outra seqüência alvo de concentração conhecida. Os dois alvos competem pelos nucleotídeos disponíveis, primers e DNA polimerase na reação. Devido à quantidade relativa dos produtos finais presentes no final da reação, é possível calcular o conteúdo de OGM presente na amostra.

Outra análise é baseada na técnica de PCR em tempo real e é extremamente precisa devido à perfeita complementaridade entre os *primers* usados na reação de PCR, e as seqüências alvo de DNA que estão sendo amplificadas. A fluorescência liberada durante a reação é lida pelo sistema de detecção e os dados gerados são analisados eletronicamente. A quantificação de uma determinada amostra é feita com base na comparação da sua curva de amplificação com as de padrões certificados contendo quantidades conhecidas de OGMs.

Os procedimentos utilizados para determinação ou quantificação de OGMs são onerosos, demandam equipamentos e pessoal altamente tecnificado, levando a procura de novas alternativas que envolvam testes práticos, eficazes, de baixo custo e fácil execução pelos laboratórios, simplificando sua adoção na rotina de identificação de sementes GM (Ayala et al., 2002). Em laboratórios de analise de sementes, são utilizados procedimentos mais simples, como o teste de resistência a herbicida, conduzido junto com o teste de germinação, chamado de bioensaio (Ayala et al., 2002).

Os bioensaios consistem em expor as sementes durante a germinação em meio contendo solução herbicida (Lilge et al., 2003). Como a análise é baseada na caracterização fenotípica das plântulas, Gutormson et al. (2000) e Lübeck (2004) sugerem o uso de amostras para comparação de sementes de plantas GM e não-GM com objetivo de assegurar a precisão do teste e um limite de confiabilidade para o laboratório. Estas devem ser expostas as mesmas condições das sementes a serem testadas, a garantia da ação do herbicida são os sintomas exibidos pelas amostras de comparação não-GM.

O analista deve lançar mão destas amostras sempre que surgem dúvidas quanto à caracterização dos sintomas. A amostra de comparação também pode ser utilizada para detectar falhas na condução do teste: a falta de desenvolvimento da amostra GM pode ser atribuída à concentração muito alta do herbicida no substrato, uso do herbicida errado, amostra semeada com equipamento contaminado por outro herbicida, amostra não viável ou condições não ideais para execução do teste. Por outro lado, se a amostra não GM estiver se desenvolvendo normalmente, as causas podem ser relacionadas ao herbicida que pode não ter sido aplicado no teste, utilizado em concentração muito baixa, solução preparada de forma inadequada ou o prazo de validade do ingrediente ativo do produto ter vencido.

Em certos casos, as sementes podem estar deterioradas ou mortas e a avaliação dos sintomas se torna difícil. Gutormson et al. (2000) recomendam o uso do substrato umedecido com água para verificar se os sintomas de anormalidade apresentados pelas plântulas são devido à ação do herbicida ou relativos ao processo de deterioração das sementes.

Os bioensaios são práticos, eficientes, de baixo custo e podem ser implantados em análises de rotina de um laboratório de análise de sementes. Podem ser conduzidos da seguinte maneira: pré-embebição em substrato com herbicida, embebição em substrato umedecido com herbicida, imersão das sementes em solução herbicida, pulverização de plântulas em laboratório e em casa de vegetação.

O sistema hidropônico é uma técnica que, semelhante aos bioensaios tem sua avaliação baseada na caracterização morfológica das plântulas. Como o tamanho das raízes e a presença de raízes secundárias são parâmetros muito utilizados na detecção de soja GM e não-GM o sistema hidropônico pode ser utilizado para diferenciar esses genótipos, já que este minimiza possíveis danos no sistema radicular das plântulas (Martinez, 1997).

O sistema hidropônico, também chamado de hidroponia é uma técnica que permite o cultivo de plantas sem solo, sendo a nutrição feita a partir do uso de solução que contém nutrientes essenciais ao crescimento e desenvolvimento (Martinez, 1997).

A hidroponia desenvolveu-se juntamente com a química, e foi inicialmente utilizada em estudos específicos de nutrição e fisiologia de plantas. Porém, esta técnica somente foi chamada de hidroponia, em 1935, pelo então professor e pesquisador de nutrição de plantas, da Universidade da Califórnia, Dr. William Frederick Gericke que, como tantos outros pesquisadores de nutrição de plantas, usava esta técnica em laboratório para observar sintomas de deficiência e toxidez de nutrientes e substâncias fitotóxicas em plantas (Martinez,1997).

O sistema hidropônico apresenta diversas vantagens: permite melhor controle das variáveis não experimentais, o que aumenta a precisão da avaliação (Spehar, 1994), a rapidez e a não destruição das plântulas, o que possibilita cultivar as plântulas selecionadas para avanço de geração e futuro teste de progênie (Camargo, 1981; Spehar & Makita, 1994).

Atualmente, o sistema hidropônico é usado com sucesso, em ensaios para selecionar variedades tolerantes a alumínio (Camargo, 1981; Spehar & Makita, 1994, Menosso et al., 2000; Camargo et al., 2000) em programas de melhoramento. O sistema hidropônico também foi utilizado por Siqueira et al. (1999) em estudos para avaliar os efeitos fitotóxicos do glifosato em explantes de soja e na simulação de soja resistente ao glifosato.

Uma alternativa para a detecção e quantificação de sementes de soja GM vem a ser a adequação do protocolo em sistema hidropônico desenvolvido por Camargo (1981), utilizado na seleção de genótipos tolerantes ao alumínio, para testes com soja GM resistente ao glifosato.

Os objetivos deste trabalho foram, estabelecer um protocolo de detecção de sementes de soja GM resistente ao glifosato, caracterizar os sintomas em plântulas de soja GM e não-GM e verificar a eficiência do cultivo hidropônico na detecção e quantificação de misturas de sementes de soja GM em amostras de sementes convencionais.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PROGRAMA de PÓS-GRADUAÇÃO em CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE SEMENTES

Título: Protocolo de detecção de sementes de soja geneticamente modificada resistente ao glifosato em sistema hidropônico.

Autora: Carla Medianeira Bertagnolli
Orientadora: Maria Ângela André Tillmann

Resumo - Os objetivos deste estudo foram verificar a eficiência do sistema hidropônico na detecção de cultivares de soja GM resistente ao glifosato e convencionais e estabelecer um protocolo de detecção em sistema hidropônico. Foram utilizadas amostras de sementes de dois genótipos geneticamente modificados e os respectivos parentais não geneticamente modificados (não-GM). Foram realizados cinco ensaios para estabelecer o protocolo de detecção; nos ensaios I e II foi realizada a pré-germinação das sementes, seguida da colocação das plântulas em recipientes contendo solução nutritiva, com posterior transferência para solução herbicida (as concentrações utilizadas foram 0; 0,12; 0,24; 0,36; 0,48 % do equivalente ácido do glifosato), e finalmente, as plântulas retornaram para a solução nutritiva. Nos ensaios III, IV e V, as sementes foram colocadas diretamente em recipientes contendo solução herbicida e depois foram transferidas para solução nutritiva. Os parâmetros avaliados foram porcentagem de plântulas normais, comprimento de plântula, comprimento de raiz e de parte aérea e número de raízes secundárias. O protocolo de detecção de sementes de soja GM em sistema hidropônico recomendado é a permanência das sementes em contato com a solução do herbicida na concentração de 0,12% do equivalente ácido do glifosato por quatro horas, seguido da transferência das sementes para a solução nutritiva até completar cinco dias, utilizando como parâmetro de avaliação o comprimento de plântulas e a presença de raízes secundarias das plântulas de soja GM. O cultivo hidropônico permite a detecção de sementes de soja resistente ao glifosato em 5 dias, após tratamento com solução de glifosato.

Palavras-Chave: *Glycine max,* trangênicos, hidroponia

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PROGRAMA de PÓS-GRADUAÇÃO em CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE SEMENTES

Title: Protocol of detection of genetically modified soybean seeds resistant to glyphosate in hydroponics system.

Author: Carla Medianeira Bertagnolli
Adviser: Prof[a]. Dra Mara Ângela André Tillmann

Summary - The objectives of this work were to verify the efficiency of the hydroponics cultivation in the detection of genetically modified (GM) soybean seeds and to establish a detection protocol in hydroponics system**.** Seeds sample of the two genotypes one genetically modified and the respective parental not genetically modified (non-GM) were used. Five assays were performed to establish the detection protocol, in the assays I and II the seeds pre-germination was performed and later the seedlings were placed in recipients contend nutrient solution and then transferred to herbicide solution, (the used concentrations were 0; 0,12; 0,24; 0,36; 0,48% of the equivalent acid of the glyphosate), and finally, the seedlings came back to the nutrient solution. In the assays III, IV and V the seeds were placed directly in recipients contends herbicide solution and after the seeds were transferred nutrient solution. The evaluated parameters were percentage of normal seedlings, seedling, root and hypocotyls length and number of secondary roots. The recommended protocol consist in the seeds permanence in contact with herbicide solution to 0,12% of the equivalent acid of glyphosate, for four hours, followed by the transfer of the seeds for nutrient solution until completing five days, using as evaluation parameter the seedling length and the presence of secondary roots. The hydroponics cultivation allows the separation of GM soybean seeds resistant to the glyphosate, in five day, after treatment with glyphosate solution.

Key words: *Glycine max*, transgenic, hydroponics

INTRODUÇÃO

A soja resistente ao herbicida glifosato é uma das maiores aplicações da engenharia genética na agricultura, pois representa uma nova alternativa no controle pós-emergente de plantas invasoras, a partir do uso de um herbicida de ação total (Padgette et al., 1995). A soja transformada possibilita o uso do glifosato em pós-semeadura, que facilita o manejo das plantas daninhas, reduz despesas com tratos culturais e diminui agressões ao meio ambiente. Devido a esse fato, os produtores têm rapidamente adotado esta tecnologia nas suas práticas culturais. Prova disso é que do cultivo atualmente de 76 milhões de hectares de soja globalmente, 41,4 milhões de hectares são de variedade resistente a herbicidas (James, 2003).

O cultivo e o comércio de organismos geneticamente modificados vêm crescendo significativamente em todo o mundo, no entanto, a utilização da biotecnologia na agricultura é vista de forma diferente nas distintas regiões. Variedades transformadas que são aprovadas em um país e usadas comumente na agricultura comercial são proibidas em outros países (Mumm & Walters, 2001). Isto significa que na comercialização de lotes de sementes convencionais, produzidos em países, onde as variedades GM são utilizadas, para países onde as variedades transgênicas são proibidas ou reguladas rigidamente, a presença adventícia de sementes de variedades GM é inevitável (Le Buanec, 2003).

Atualmente, numerosos métodos analíticos são usados, ou estão sendo desenvolvidos para a detecção de sementes de plantas GM. Os critérios levados em conta na avaliação do desempenho de cada teste são exatidão, precisão, sensibilidade, especificidade, repetibilidade das operações e reprodutibilidade dos resultados (Bertheau et al., 2002).

Os métodos baseados na PCR e em proteínas são onerosos, necessitam de equipamentos sofisticados e pessoal altamente qualificado para a realização dos testes (Della Vecchia et al.,1998). Em laboratórios de analise de sementes, são utilizados procedimentos mais simples,

como o teste de resistência a herbicida conduzido junto com o teste de germinação, chamados de bioensaios (Ayala et al., 2002).

A utilização de bioensaios se adapta melhor aos cultivos GM, com a característica de resistência a um determinado herbicida. Diversos ensaios foram conduzidos para detectar sementes de soja resistente ao glifosato: Goggi & Stahr (1997), Bevilaqua et al. (2000), Nascimento et al. (2000), Torres et al. (2003), Cunha (2004), Funguetto et al. (2004), Tillmann & West (2004) e Miranda (2004). Sementes de arroz resistente ao glufosinato de amônio foram detectadas em bioensaios por Magalhães et al. (2000) e Lilge et al. (2003). Utilizando bioensaios Nagata et al. (2000) e Nascimento et al. (2001) identificaram sementes de alface resistente ao glifosato e Savoy et al. (2001) testou bioensaios para avaliar algodão resistente ao mesmo herbicida. Além do mais, Pfeilstetter et al. (2000) relatam o uso de bioensaios na detecção de sementes de canola tolerante ao phosphinothricin.

Os bioensaios são eficientes na detecção de soja resistente ao glifosato. No entanto, segundo Gutormson et al. (2000), uma das limitações desta metodologia é o tempo necessário para obter resultados, geralmente, de sete a dez dias. Os procedimentos para condução dos bioensaios têm sido aprimorados, procurando reduzir o tempo para informar os resultados, sem perder a eficiência do teste (Funguetto et al., 2004).

A avaliação dos bioensaios é baseada na caracterização fenotípica dos sintomas apresentados pelas plântulas e o sistema hidropônico é uma técnica também muito utilizada para observar sintomas de deficiência e toxidez de nutrientes e substâncias fitotoxicas em plântulas (Delhaize & Ryan, 1995.).

O tamanho das plântulas e a presença de raízes secundárias são parâmetros muito importantes, utilizados com sucesso na detecção de sementes de soja GM e não-GM (Goggi & Stahr, 1997; Cunha, 2004; Funguetto et al., 2004; Tillmann & West, 2004; Miranda, 2004). Portanto, o sistema hidropônico pode se constituir numa alternativa para diferenciar esses genótipos, principalmente por esta técnica minimizar possíveis danos ao sistema radicular das plântulas, facilitando a avaliação e

permitindo a obtenção de resultados mais precisos (Martinez, 1997). Além disso, o cultivo hidropônico já foi utilizado por Siqueira et al. (1999) em estudos para avaliar os efeitos fitotóxicos do glifosato em explantes de soja e na simulação de soja resistente ao glifosato.

O sistema hidropônico apresenta diversas vantagens: permite melhor controle das variáveis não experimentais, o que aumenta a precisão da avaliação (Spehar, 1994), rapidez e a não destruição das plântulas, possibilitando o cultivo de plântulas selecionadas para avanço de geração e futuro teste de progênie (Camargo, 1981; Spehar & Makita, 1994).

Uma alternativa para a detecção de sementes de soja GM seria adequar a metodologia do sistema hidropônico desenvolvido por Camargo (1981), utilizado na seleção genótipos tolerantes ao alumínio, para testes com soja GM resistente ao glifosato.

Os objetivos deste estudo foram verificar a eficiência do sistema hidropônico na detecção de cultivares de soja GM resistente ao glifosato e convencionais e estabelecer um protocolo de detecção em sistema hidropônico.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Di-Haplóides e Hidroponia da Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel” da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

Foram utilizados dois genótipos de soja geneticamente modificada (GM) para a resistência ao glifosato, CD 213 RR e CD 214 RR e os respectivos parentais não geneticamente modificados (não-GM), OC 14 e CD 201.

A caracterização inicial dos lotes consistiu na determinação do grau de umidade e teste de germinação, segundo as Regras para Análise de Sementes, Brasil (1992). O herbicida utilizado foi o produto comercial Roundup® original contendo 480gL^{-1} de sal de isopropilamina N-(fosfometil) glicina, 360gL^{-1} do equivalente ácido (e.a.) de N-(fosfometil) glicina e 648gL^{-1} de ingredientes inertes.

Na condução do experimento foi utilizado um sistema hidropônico constituído de vasilhas plásticas de 5,0 litros de capacidade, que foram previamente preenchidas com solução nutritiva. Sobre as vasilhas foram adaptadas telas de barbante coladas a um isopor (Figura 1), de modo que funcionassem como suporte para as sementes e/ou plântulas, para que fossem mantidas úmidas e as raízes ficassem em contato com a solução, tendo um adequado suprimento de água e nutrientes.

As vasilhas de plástico contendo solução nutritiva juntamente com as telas adaptadas foram colocadas em banho-maria, em um tanque de metal de 2,00m x 1,50m x 0,50m, cuja temperatura foi mantida a 25 °C, através de um sistema elétrico de aquecimento, e com iluminação permanente (Figura 2). Para suprir o meio de oxigênio necessário ao desenvolvimento do sistema radicular, as vasilhas foram ligadas a um sistema de arejamento (mangueiras conectadas a um compressor de ar).

Também foram utilizadas, vasilhas de plástico preenchidas com solução herbicida nas quais foram adaptadas telas de barbante e, colocadas em banho-maria, no tanque de metal, a 25 °C e com iluminação permanente. O sistema de arejamento permaneceu desligado,

Figura 1. Vasilha de plástico com capacidade para 5 L, com tampa adaptada a uma tela de barbante colada a um isopor, preenchida com solução nutritiva.

Figura 2. Tanque de metal de 2,00m x 1,50m x 0,50m, com sistema elétrico de aquecimento, iluminação permanente e sistema de arejamento.

a fim de evitar a formação de espuma devido aos ingredientes detergentes contidos na formulação do glifosato.

Para estabelecer o protocolo de detecção de sementes de soja resistente ao glifosato em cultivo hidropônico foram realizados cinco ensaios (Tabela 1), adequando a metodologia descrita por Camargo (1981).

Em todos os ensaios, as sementes de cada genótipo foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 20% (produto comercial) por 10 minutos e lavadas com água destilada, para retirar o excesso do produto. Nos ensaios I e II, após a desinfestação, foi realizada a pré-germinação das sementes. Nos ensaios III, IV e V, após a desinfestação as sementes foram colocadas diretamente em contato com a solução herbicida.

Ensaio I - As sementes após a desinfestação foram colocadas para pré-germinar por um período de 48 horas. As plântulas cujas raízes primárias apresentavam tamanho uniforme (± 2 cm) foram colocadas com o auxílio de uma pinça sobre o topo de telas, de modo que cada tela tivesse 50 sementes. As telas foram adaptadas sobre vasilhas de plástico contendo solução nutritiva, mantidas em um tanque em banho-maria. Após a permanência de ficarem por 24 horas em contato com solução nutritiva, as telas com as plântulas foram transferidas para outra vasilha de plástico contendo solução de herbicida, onde permaneceram por mais 24 horas. Após este período, as telas contendo as plântulas retornaram para solução nutritiva, permanecendo por 72 horas. As avaliações foram realizadas no sétimo dia, após o início da execução do ensaio.

Ensaio II - As sementes após a desinfestação foram colocadas para pré-germinar por um período de 24 horas. As plântulas cujas raízes primárias apresentavam tamanho uniforme (± 1 cm) foram colocadas com o auxílio de uma pinça sobre o topo de telas, de modo que cada tela tivesse 50 sementes. As telas foram adaptadas sobre vasilhas de plástico contendo solução nutritiva, mantidas em um tanque em banho-maria. Depois de ficarem por 8 horas em contato com solução nutritiva, as telas

com as plântulas foram transferidas para outra vasilha de plástico contendo solução de herbicida, onde permaneceram por mais 16 horas. Após este período, as telas contendo as plântulas foram transferidas novamente para as vasilhas de plástico contendo a solução nutritiva, permanecendo por mais cinco dias (120 horas). As plântulas foram avaliadas no sétimo dia após o início do ensaio.

Ensaio III - As sementes das cultivares estudadas, após a desinfestação, foram colocadas com o auxílio de uma pinça sobre o topo de telas, de modo que cada tela tivesse 50 sementes. As telas foram adaptadas sobre vasilhas de plástico contendo solução herbicida mantidas em um tanque em banho-maria por 8 horas. Após completar o período em contato com a solução herbicida, as telas contendo as sementes foram transferidas para vasilhas contendo solução nutritiva até completar seis dias (136 horas). A avaliação foi realizada no sexto dia.

Ensaio IV - As sementes das cultivares testadas, após a desinfestação, foram colocadas com o auxílio de uma pinça sobre o topo de telas, de modo que cada tela tivesse 50 sementes. As telas foram adaptadas sobre vasilhas de plástico contendo solução herbicida mantidas em um tanque em banho-maria por 4 horas. Após completar o período em contato com a solução herbicida, as telas com as sementes foram transferidas para vasilhas contendo solução nutritiva, onde permaneceram até completar cinco dias (116 horas). As avaliações foram realizadas no quinto dia após o inicio do ensaio.

Ensaio V - As sementes das cultivares testadas, após a desinfestação, foram colocadas com o auxílio de uma pinça sobre o topo de telas, de modo que cada tela tivesse 50 sementes. As telas foram adaptadas sobre vasilhas de plástico contendo solução herbicida mantidas em um tanque em banho-maria por 1 hora. Após completar o período em contato com a solução herbicida, as telas contendo as sementes foram transferidas para vasilhas contendo solução nutritiva até completar 119

horas, quando foram realizadas as avaliações, no quinto dia após inicio do ensaio.

TABELA 1. Ensaios utilizados para estabelecer o protocolo de detecção de sementes de soja resistente ao glifosato, período de duração (horas) de cada etapa, e tempo (dias) necessário para completar o teste.

Ensaios	Pré-Germinação	Sol. Nutritiva	Sol.Herbicida[1]	Sol. Nutritiva	Tempo
I	48 h	24 h	24 h	72 h	7 dias
II	24 h	8 h	16 h	120 h	7 dias
III	X	X	8 h	136 h	6 dias
IV	X	X	4 h	116 h	5 dias
V	X	X	1 h	119 h	5 dias

[1] 0,0; 0,12; 0,24; 0,36; 0,48 % do equivalente ácido do glifosato.

Pré-Germinação - Nos ensaios I e II, as sementes foram colocadas para germinar em rolos de papel germitest umedecido com uma quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o peso do papel. Logo após foram mantidas em germinador regulado a temperatura de 25ºC, período necessário para a protrusão da raiz primária.

Solução Nutritiva - A concentração da solução nutritiva utilizada, proposta por Moore et al. (1976): Ca $(NO_3)_2$ 4 mM; KNO_3 4mM; $(NH_4)_2SO_4$ 0,435 mM; KH_2PO_4 0,5mM; $MnSO_4$ 2 µM; $CuSO_4$ 0,3 µM; $ZnSO_4$,8µM; NaCl 30µM; Fe-CYDTA 10µM; Na_2MoO_4 0,10µM e H_3BO_3 10µM. O pH da solução foi previamente ajustado para 4,0 com H_2SO_4 1N.

Solução Herbicida - As concentrações utilizadas nos ensaios foram estabelecidas em experimentos preliminares. As concentrações utilizadas foram: 0,0; 0,12; 0,24; 0,36; 0,48 % do equivalente ácido ($360L^{-1}$) do glifosato.

Avaliações

A avaliação foi realizada quando as plântulas originadas das sementes de soja GM apresentavam características morfológicas que as diferenciavam das plântulas do genótipo convencional.

Os parâmetros avaliados foram porcentagem de plântulas normais, comprimento total de plântula, da raiz primária e da parte aérea, além do número de raízes secundárias.

Foram consideradas plântulas normais àquelas que apresentavam comprimento total mínimo de 3 cm e presença de raízes secundárias desenvolvidas. As médias da germinação foram expressas em porcentagem.

O comprimento das plântulas foi medido com o auxílio de uma régua de escala centimetrada, e o resultado expresso em centímetros.

Procedimento Estatístico

Os resultados foram analisados segundo o delineamento inteiramente casualizado com três repetições de 50 sementes. Os dados médios das avaliações foram apresentados graficamente. Na execução das análises foi utilizado o Sistema de Análise estatística para Windows - WinStat Versão 2.0 (Machado & Conceição, 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ensaios para seleção do Protocolo de Detecção de Sementes de Soja GM:

Para a seleção do protocolo de detecção de sementes de soja GM foram avaliados os parâmetros de porcentagem de germinação, comprimento total de plântula, parte aérea e raiz primária e número de raízes secundárias.

Os resultados de germinação obtidos nos ensaios I, II, III e IV indicaram que o cultivo hidropônico permite a detecção de sementes de soja resistente ao glifosato, empregando-se as concentrações testadas (Figura 3).

As sementes das cultivares CD 214 RR e CD 213 RR resistentes ao glifosato, após permanecerem em contato com a solução herbicida (mesmo na mais alta concentração) produziram plântulas normais bem desenvolvidas e apresentaram raízes secundárias.

Por outro lado, verificou-se que mesmo a menor concentração da solução herbicida utilizada foi capaz de inibir a germinação completa das sementes das cultivares não-GM (OC 14 e CD 201), que apenas iniciaram o processo germinativo não atingindo comprimento suficiente para serem consideradas plântulas normais.

As sementes das cultivares GM contêm o gene CP4-EPSPS, oriundo da bactéria *Agrobacterium* sp cepa CP4, que confere resistência ao herbicida por codificar uma variante da enzima EPSPS insensível a este inibidor, permitindo o desenvolvimento de plântulas normais (Padgette et al., 1995; Dellanay et al. 1995; Elmore et al., 2001).

O ensaio V não permitiu a separação das cultivares GM das não-GM (Figura 3). As plântulas não-GM foram consideradas normais, apresentaram-se bem desenvolvidas e com raízes secundárias. Neste ensaio as sementes testadas ficaram em contato com a solução herbicida somente durante uma hora correspondendo à parte da fase I do processo de germinação (Bewley & Black, 1994). Mesmo na presença da concentração mais alta, 0,48% do e.a. do glifosato, as sementes de soja

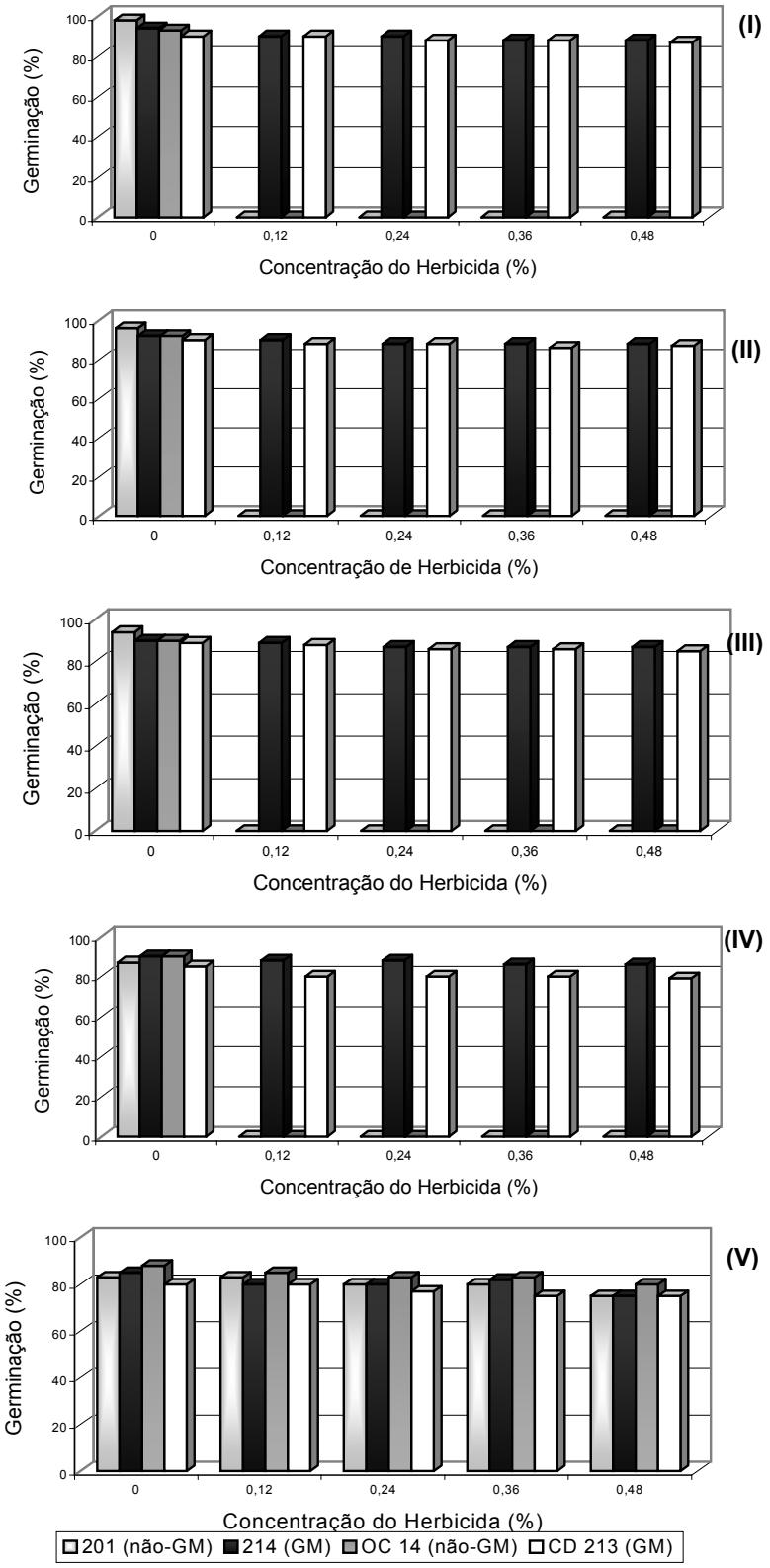

Figura 3. Porcentagens de germinação de sementes de soja GM e não-GM, obtidas nos ensaios (I), (II), (III), (IV) e (V) utilizando o cultivo hidropônico.

não-GM não foram afetadas pela ação do herbicida. Este resultado indica que, possivelmente o tempo de contato da semente com a solução herbicida foi insuficiente para a ação do produto. Funguetto et al. (2004) utilizando imersão de sementes de soja em solução herbicida, por período de uma hora, mesmo utilizando solução em alta concentração, também não conseguiu separar sementes de soja GM das não-GM. Entretanto, Tillmann & West (2004) relataram que a imersão das sementes de soja por 1 hora a uma temperatura de 30º C, permitiu diferenciar as cultivares GM das não-GM, em todas as concentrações de glifosato estudadas. As plântulas GM foram resistentes a todas as concentrações de herbicida, apesar destas cultivares apresentarem redução no tamanho das plântulas. É importante salientar que neste caso as sementes foram submetidas a estresse de temperatura na embebição, o que possivelmente pode ter incrementado o efeito fitotóxico do herbicida.

Na Figura 3 observa-se ainda que, exceto no ensaio V, todas as concentrações testadas foram suficientes para que as sementes de soja não-GM produzissem plântulas anormais, permitindo, desta maneira a diferenciação das cultivares. A formulação da solução herbicida utilizada nos bioensaios é uma das principais questões na execução deste tipo de teste. Segundo Gutormson (2000), a concentração da solução herbicida utilizada nos bioensaios deve permitir a plântula não-GM expressar sintomas de toxicidade: inibição do desenvolvimento da raiz primária e da emissão de raízes secundárias, além de reduzir o comprimento do hipocótilo (Goggi & Stahr, 1997; Tillmann & West, 2004; Funguetto et al. 2004).

Vários autores estudaram a utilização dos bioensaios na detecção de sementes de soja resistente ao glifosato, utilizando diferentes procedimentos de condução. Goggi & Stahr (1997), Torres et al. (2003), Tillmann & West (2004), Funguetto et al. (2004), Cunha (2004) e Miranda (2004) observaram que os métodos baseados na germinação das sementes, em meio contendo solução herbicida foram eficientes na detecção de soja transgênica, independentemente da metodologia utilizada. Os resultados obtidos neste trabalho concordam com os alcançados pelos autores citados acima, e evidenciam a eficiência do

cultivo hidropônico, utilizado como um procedimento alternativo na detecção de soja transgênica.

O cultivo hidropônico foi utilizado por Siqueira et al. (1998) para avaliar graus de tolerância ao glifosato de diversos genótipos de soja, através do cultivo de explantes, o qual mostrou-se adequado para testar o efeito do glifosato em sementes de soja, em razão da rapidez na obtenção de resultados finais e, devido a sua grande reprodutibilidade.

Um dos critérios levados em conta na avaliação do desempenho dos testes para detecção de sementes de organismos GM é a reprodutibilidade dos resultados e tempo de execução (Bertheau et al., 2002).

Uma das principais limitações dos bioensaios é o tempo necessário para a alcançar os resultados (Lübeck, 2004), que geralmente é de sete dias. Baseado neste fato, elegeu-se o ensaio IV, como o protocolo de detecção de sementes de soja resistente ao glifosato. No ensaio IV, as sementes ficaram em contato com a solução herbicida durante quatro horas e no quinto dia após o inicio do teste foi possível à diferenciação das cultivares GM e não-GM.

Os outros parâmetros avaliados comprimento total de plântula, comprimento de parte aérea , comprimento de raiz primária e número de raízes secundárias, apresentaram comportamento semelhante nos ensaios I, II, III e IV. Baseado nesta informação serão apresentados neste artigo os dados referentes ao Ensaio IV.

Detecção de Sementes de Soja GM em Cultivo Hidropônico

Porcentagem de Germinação:

Todos os genótipos apresentaram um percentual de plântulas normais igual ou maior a 80% quando foi utilizada a concentração zero de herbicida (Figura 4), confirmando que não havia diferenças na qualidade fisiológica entre as sementes de soja GM e não-GM. Os lotes apresentaram graus de umidade similares, entre 12,8 e 13,1 %, o que

permitiu inferir que este parâmetro não interferiu nos parâmetros avaliados.

As sementes das cultivares não-GM iniciaram o processo de germinação quando expostas as diferentes concentrações de herbicida, no entanto a ação do herbicida inibiu o desenvolvimento de plântulas normais destas cultivares. Duke & Hoagland (1981) relatam que na presença de glifosato, sementes de soja não-GM iniciaram o processo de germinação, mas subseqüentemente o desenvolvimento torna-se insignificante até parar completamente, produzindo plântulas anormais.

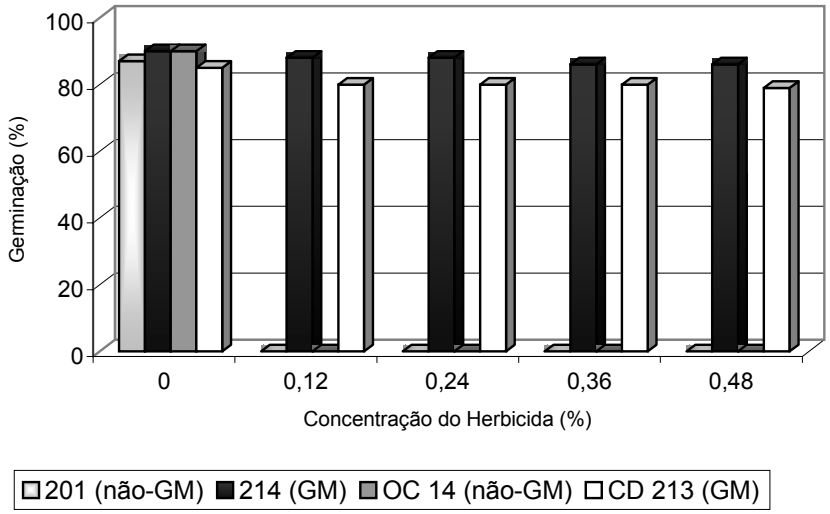

Figura 4. Porcentagem de germinação de sementes de soja GM e não-GM, após 4 horas em contato com solução contendo diferentes concentrações de herbicida. obtida em sistema hidropônico

As cultivares GM apresentaram uma alta porcentagem de germinação, mesmo na mais alta concentração estudada (0,48%). Resultados semelhantes foram observados por Goggi & Stahr (1997) ao testarem sementes de soja GM pré-embebidas em solução de Roundup por 18 h. Os autores constataram que após sete dias as plântulas, oriundas de sementes de soja GM, apresentavam-se completamente desenvolvidas e foram classificadas como normais. Tillmann & West (2004), também em estudos com soja transgênica pré-embebida em

solução com herbicida, encontraram que a germinação das sementes de soja GM não foi reduzida até a concentração de 1,5% do e a (equivalente ácido) do glifosato. Outros autores também constataram que a porcentagem de germinação das sementes de soja resistente ao glifosato não foi afetada pela exposição em solução de herbicida (Bevilaqua et al. 2000; Torres et al., 2003, Cunha, 2004, Funguetto et al., 2004; Miranda, 2004), possibilitando desta maneira a separação de genótipos GM dos não-GM.

O cultivo hidropônico, com o uso de solução de herbicida, mostrou-se um método eficiente na detecção de sementes de soja das cultivares GM das não-GM, utilizando como parâmetro a porcentagem de germinação.

Comprimento de Plântulas

Em relação ao comprimento total das plântulas (Figura 5), pode-se afirmar que o herbicida afeta o crescimento das cultivares não-GM (OC-14 e CD 201) de maneira mais significante que o crescimento das GM (CD 213 RR e CD 214 RR).

O decréscimo no tamanho das plântulas normais das cultivares resistente ao glifosato ocorreu proporcionalmente ao aumento da concentração da solução herbicida. Esses dados concordam com relatos de Tillmann & West (2004) e Funguetto et al. (2004), que verificaram redução do comprimento total de plântulas de soja da cultivar GM tratadas com glifosato em relação à testemunha.

Independentemente da concentração de herbicida utilizada, as cultivares convencionais tiveram acentuada redução no comprimento total, se comparadas com a concentração testemunha. A redução no comprimento pode ser atribuída a privação de aminoácidos aromáticos, provocada pelo glifosato, que compromete a biosíntese de enzimas envolvidas na produção de carboidratos e lipídeos (Siqueira et al., 1998).

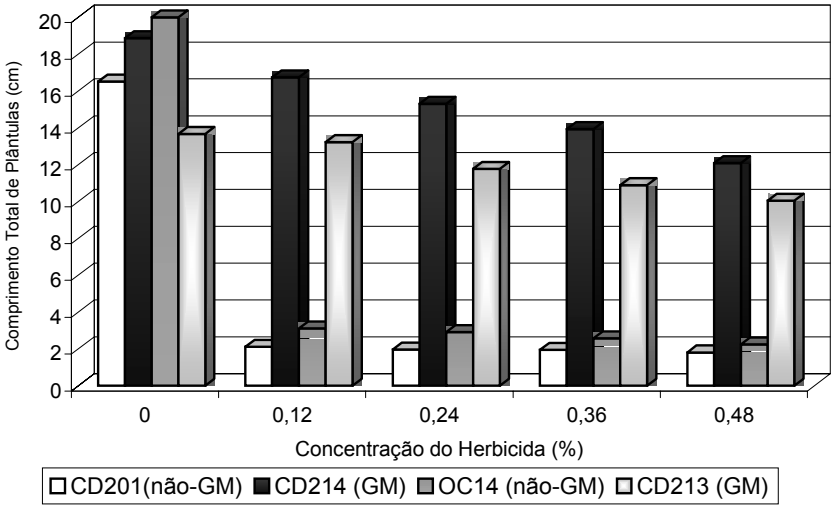

Figura 5. Comprimento total de plântulas de soja GM e não-GM, após 4 horas em contato com solução contendo diferentes concentrações de herbicida obtidas em sistema hidropônicas.

Apesar do herbicida afetar o crescimento das plântulas de todos os genótipos estudados, foi possível separar as cultivares GM das convencionais, utilizando como parâmetro o comprimento total de plântulas. Daniell et al. (1998), ao compararem plantas transformadas que possuíam o gene de resistência ao glifosato com plantas não transformadas, observaram que as plantas controle (não-GM) eram extremamente sensíveis ao glifosato, enquanto as plantas transgênicas sobreviveram a altas concentrações do herbicida.

Uma evidente distinção entre o comprimento de parte aérea das plântulas de soja GM e não GM foi verificada em todas as concentrações utilizadas devido à ação do glifosato, como se observa na Figura 6. As cultivares CD 212 RR E CD 213 RR suportam concentrações do herbicida, que são letais a genótipos não-GM. Estes dados concordam com resultados obtidos por Siqueira et al. (1999) em um estudo que simulou soja resistente ao glifosato por meio de cultivo de explantes em sistema hidropônico. Estes autores relataram que os tratamentos com glifosato reduziram a massa seca e o comprimento da parte aérea de plântulas de

soja. No entanto, os explantes que receberam aminoácidos aromáticos via solução nutritiva, não apresentaram sintomas visuais típicos de fitotoxicidade, a massa seca e comprimento de parte aérea das plântulas não foi reduzido, tanto quanto seus constituintes bioquímicos não foram afetados.

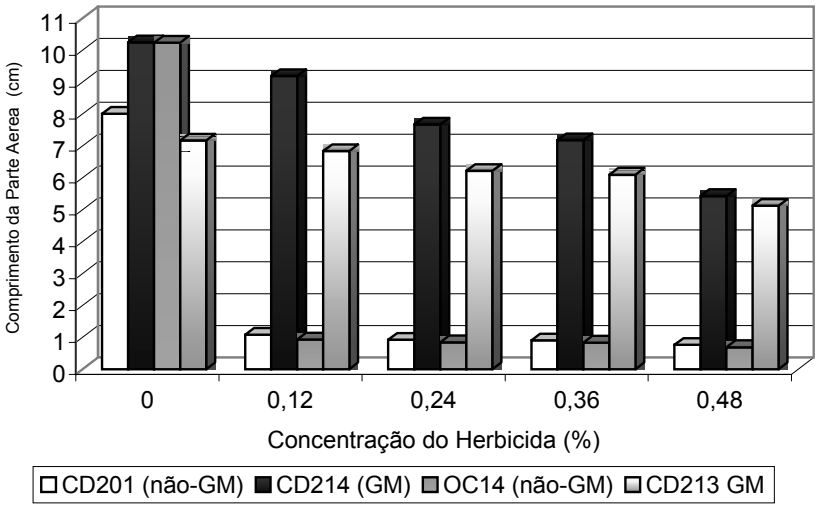

Figura 6. Comprimento de parte aérea de plântulas de soja GM e não-GM, após 4 horas em contato com solução contendo diferentes concentrações de herbicida obtidas em sistema hidropônico,

O comprimento da raiz primária tem sido utilizado com sucesso na diferenciação fenotípica de cultivares de soja resistentes e suscetíveis ao glifosato (Goggi & Sthar, 1997; Tillmann & West ,2004 Cunha, 2004; Funguetto et al., 2004;). Na Figura 7 observa-se que as cultivares de soja não-GM apresentaram uma redução drástica no comprimento de raiz primária quando foram expostas as diferentes concentrações de herbicida, se comparadas com a testemunha. Tal fato pode ser explicado

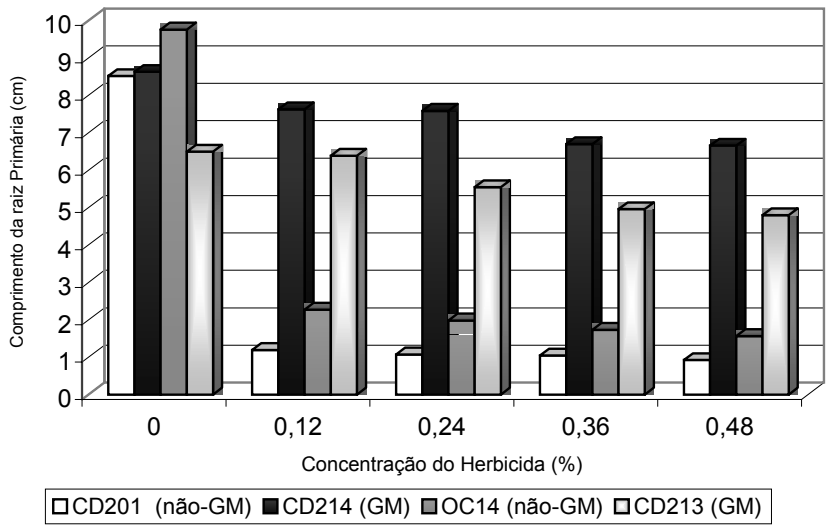

Figura 7. Comprimento de raiz primária de plântulas de soja GM e não-GM, após 4 horas em contato com solução contendo diferentes concentrações de herbicida, obtidas em sistema hidropônico.

pela interrupção do processo de mitose e ruptura dos plastídios, como efeito indireto e secundário do glifosato, que desta maneira reduz a matéria seca das plântulas (Mousdale & Coggins, 1991).

Em relação ao comprimento das plântulas, Funguetto et al. (2004) e Cunha (2004) relataram que a redução no sistema radicular das plântulas não-GM foi mais drástica do que a do comprimento da parte aérea. Estes autores utilizaram em seus ensaios a metodologia do substrato de papel umedecido com solução herbicida. No presente trabalho o herbicida afetou o comprimento da parte aérea e da raiz primária de forma semelhante nos genótipos avaliados (Figuras 6 e 7). Este efeito pode ser atribuído ao cultivo hidropônico, que possivelmente produziu maiores efeitos de fitotoxicidade nos genótipos não-GM, já que as plântulas provenientes de sementes de soja não-GM apresentaram um comprimento total máximo de 3,0 centímetros.

Um fator que, provavelmente, agravou o quadro de fitotoxicidade das plântulas de soja não-GM decorre que a eficiência do glifosato é incrementada com o aumento da disponibilidade hídrica (Kruse et al.,

2000). Segundo estes autores, a maior intensidade luminosa favorece a translocação do herbicida. Como no sistema hidropônico as plântulas permanecem em um ambiente com alta disponbilidade de água e na presença de luz permanente, é possível que estas condições tenham potencializado a ação do glifosato sobre as plântulas que não são resistentes a este herbicida.

De acordo com as proposições de Cobb (1992) para relações água-planta, no que se refere à absorção de herbicida, o potencial hídrico negativo da solução nutritiva em que são cultivadas as plântulas, eleva-se progressivamente da raiz em direção à parte aérea. A diferença entre os potenciais hídricos dos tecidos das plântulas e da solução nutritiva determina o influxo da mesma e de seus solutos pelo xilema, e segundo Siqueira et al. (1998), a ação rápida do glifosato ocorre devido a sua fácil absorção pelo xilema e rápida translocação.

Desta maneira, o comprimento de plântulas foi um parâmetro adequado para diferenciar cultivares de soja GM dos não-GM, através da análise visual do tamanho das plântulas. Foram observadas diferenças marcantes entre as plântulas resistente ao glifosato e as sensíveis, com destaque para as plântulas resistentes que, na presença de baixa concentração de herbicida (0,12%), apresentaram comprimento de raiz primária e parte aérea semelhantes ao da testemunha, conforme mostram as Figuras 5, 6 e 7.

Número de raízes secundárias

O número de raízes secundárias foi uma adequada característica morfológica utilizada para distinguir as cultivares de soja GM das não-GM (Figura 8). Os genótipos não resistentes ao glifosato mostraram ausência total de raízes secundárias, enquanto as plântulas GM apresentaram, em todas as concentrações raízes secundárias abundantes e bem desenvolvidas.

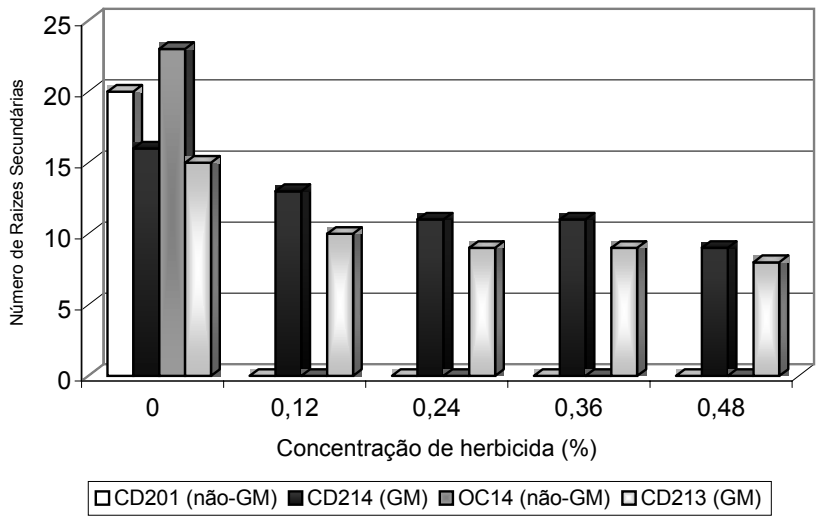

Figura 8. Número de raízes secundárias de plântulas de soja GM e não-GM, após 4 horas em contato com solução contendo diferentes concentrações de herbicida, obtidas em sistema hidropônico.

Vários autores Goggi & Stahr, 1997; Nascimento et al., 2000; Bevilaqua, 2000; Tillmann & West, 2004; Funguetto et al. 2004, Cunha 2004, avaliando soja resistente ao glifosato concordam que este parâmetro foi fundamental na separação dos genótipos GM e convencionais. Pfeilstetter et al. (2000) utilizaram bioensaios na seleção de genótipos de canola GM tolerante a phosphinothricin e detectaram uma clara diferenciação entre plântulas sensíveis e tolerantes ao herbicida, onde as plântulas GM apresentaram-se bem desenvolvidas e com raízes secundárias.

O número de raízes secundárias é a característica que mais se destacou na identificação de plântulas originárias de sementes de soja GM.

Conforme os resultados obtidos, utilizando a metodologia do sistema hidropônico pode-se distinguir as cultivares de soja GM das não-GM, cinco dias após o início da execução do teste. Embora todas as concentrações testadas tenham se mostrado eficiente, como é possível observar nas Figuras 4, 5, 6, 7 e 8, a concentração de 0,12% é a mais

recomendada. Os parâmetros que melhor permitiram separar as cultivares foram comprimento de plântula e presença de raízes secundárias das GM (Figura 9).

Figura 9. Plântulas de soja GM e não-GM, obtidas em cultivo hidropônico, após 4 horas em contato com solução de 0,12% do glifosato.

CONCLUSÕES

- O protocolo de detecção de sementes de soja GM em sistema hidropônico recomendado é a permanência das sementes em contato com a solução do herbicida na concentração de 0,12% do equivalente ácido do glifosato por quatro horas, seguido da transferência das sementes para a solução nutritiva até completar 5 dias, utilizando como parâmetro de avaliação o comprimento de plântulas e a presença de raízes secundárias das plântulas de soja GM.

- Em sistema hidropônico é possível a detecção de sementes de soja resistente ao glifosato em 5 dias, após tratamento com solução de glifosato.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

AYALA, L.; TILLMANN; M.A.A.; DODE, L.B.; VILLELA, F.A.; MAGALHÃES, A.M.; SILVA, M.P. Tetrazolium test for identificatin of transgenic rice seeds tolerant to herbicide. **Seed Science and Technology,** Zürich, v.30, p.431-436, 2002.

BERTHEAU, Y.; DIOLEZ, A.; KOBILINSKY, A.; MAGIN, K. Detection methods and performance criteria for genetically modified organisms. **Journal of AOAC International,** Maryland, v.85, n.3, p.801-808, 2002.

BEVILAQUA, G.A.P.; BONATO, E.R.; ROMAN, E.S. Identificação de soja tolerante a glyphosate através do teste de germinação. **Revista Brasileira de Herbicidas,** Brasília, v.1, n.3, p.261-265, 2000.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination.** 2ed. New York: Plenum Press, 1994, 445p.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para Análise de sementes.**Brasília:SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.

CAMARGO, C.E. de O. Melhoramento do trigo.I. hereditariedade da tolerância do alumínio tóxico. **Bragantia**, Campinas, v.40, p. 33-45, 1981.

COBB, A. **Herbicides and plant physiology.** London: Champaman and Hall, 1992,176.p.

CUNHA, C.S.M.; **Comparação de métodos na detecção de sementes de soja geneticamente modificada, tolerante ao glifosato.** 2004. 24p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Sementes) – Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2004.

DANIELL, H.; DATTA, R.; VARMA, S.; GRAY, S.; LEE, S.B. Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the cloroplast genome. **Nature Biotechnology,** New York, v.16, p.343-348, 1998.

DELANNAY, X.; BAUMAN, T.T.; BEIGHELEY, D.H..;BUETTER, M.J.; COBLE, H.D.; DEFELICE, M.S.;DERTING, C.W.;DIEDRICK, T.J.;GRIFFIN, J.L.;HAGOOD, E.S.;HANCOCK, F.G.; HART, S.E.;LAVALLEE, B.J.; LOUX, M.M.; LUESCHEN, W.E.; MATSON, K.W.; MOOTS, C.K.; MURDOCK, E.; NICKELL, A.D.; OWEN, M.D.K.; PASCHAL II, E.H.; PROCHASKA, L.M.; RAYMOND, P.J.; REYNOLDS, D.B.; RHODES, W.K.; ROETH, F.W.; SPRANKLE, P.L.; TAROCHIONE, L.J.; TINIUS, C.N.; WALKER, R.H.; WAX, L.M.; WEIGELT, H.D.; PADGETTE, S.R. Yield evaluation of a glyphosate-tolerant soybean lineafter treatment with glyphosate. **Crop Science,** Madison, v.35, p. 1461-1467, 1995.

DELHAIZE, E.; RYAN, P.R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiology,** Rockville, v.107, n.2, p.315-321, 1995.

DELLA VECCHIA, P.T.; SILVA, C.A.R.; TERENCIANO-SOBRINHO, P. Use of molecular marker techniques in seed testing by brazilian seed companies. **Scientia Agricola,** Piracicaba, v.55, p.79-81, 1998.

DUKE, S.O.; HOAGLAND, R.E. Effects of glyphasate on metabolism of phenolic compounds. Phenylalanine ammonialyase activity, free amino acids Root-fed amino acids and glyphosate toxicity in soybean (*Glycine max*) seedlings. **Weed Science,** v29, p.297, 1981.

ELMORE, R.W.; ROETH, F.W.; KLEIN, R.N.; KNEZEVIC, S.Z.; MARTIN, A.; NELSON, L.A.; SHAPIRO, C.A. Glyphosate-Resistant soybean cultivar response to glyphosate. **Agronomy Journal,** Madison, v.93, p. 404-407, 2001.

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,** Pelotas, v.26,n.1,p.130-138, 2004.

GOGGI, A.S.; STAHR, M.G. Roundup ™ pre-emergene treatment to determine the presence of the Roundup™ gene in soybean seeds: a laboratory test. **Seed Technology,** Kentucky, v.19, n.1, p.99-102,1997.

GUTORMSON, T; BRIX-DAVIS, K.; JAUERT, P. A Comparison of GMO testing strategies. **Seed World,** Illinois, v.138, p.10-12, 2000.

GUTORMSON, T. Herbicide trait testing IN: MCDONALD, M.B.; GUTORMSON, T.TURNIPSEED, B. (Ed). **Seed technologist training manual.** Society .of Commercial Seed Technologists, 2000. 292p.

JAMES, C. **Global Status of Commercialized Transgenic Crops:2003.** Ithaca: ISAAA, 2003.(Briefs 30:Preview).

KRUSE, N.D.; TREZZI, M.N.; VIDAL, R.R. Herbicidas inibidores da EPSPS: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Herbicidas,** Brasília, v.1, n.2, p. 139-146, 2000.

LE BUANEC, B. Genetically modified varieties and the seed industry. **ISTA News Bulletin,** Zürick, n.125, p.10, 2003.

LILGE, C.G.; TILLMANN, M.A.A.; VILLELA, F.A.; DODE, L.B. Identificação de sementes de arroz transformado geneticamente resistente ao herbicida glufosinato de amônio. **Revista Brasileira de Sementes,** Londrina, v.25, n.1, p.87-94, 2003.

LÜBECK M. **Detection of genetically modified plants –**methods to sample and analyze GMO contend in plants and plant products. Disponível em http://www.sns.dk/erhvogadm/biotek/detection.htm. Acesso em 17 de outubro de 2004.

MACHADO, A.A.; CONCEIÇÃO, A.R. **Sistema de análise estatística para Windows. WinStat. Versão 2.0.** UFPel, Pelotas, 2003.

MAGALHÃES, A.M.; FRANCO, D.F.; ANDRES, A.; ANTUNES, P.; DODE, L.B.; TILLMANN, M.A.A.; SILVA, M.P. Métodos para identificação de arroz transgênico resistente ao herbicida glufosinato de amônio. **Agropecuária Clima Temperado,** Pelotas, v.3, n.1,p.31-37, 2000.

MARTINEZ, H.E.P. **O uso do cultivo hidropônico de plantas em pesquisa**. Cadernos Didáticos.Viçosa: Editora UFV n.1, p.10-15, 1997.

MIRANDA, D.M. **Bioensaios na detecção e quantificação de sementes de soja geneticamente modificada resistente ao glifosato em amostras convencionais de sementes.** 2004. 44p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Sementes) – Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel", Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2004.

MOORE, D.P.; KRONSTAD, W.E.; METZGER, R.J. Screening wheat for aluminum tolerance. In: Workshop on plant adaptation to mineral stress in problem soils, 1976, Beltsville. **Proceedings.** Ithaca: Cornell University, p.287-295, 1976.

MOUSDALE D.M.; COGGINS J.R. Amino Acid Sinthesis In: KIRKWOOD, R.C. **Target sites for herbicide action.** London: Plenum Press, p. 29-39, 1991.

MUMM, R.H.; WALTERS, D.S. Quality control in development of transgenicas crop seed products. **Crop Science,** Madison, v.41, p.1381-1389, 2001.

NAGATA, R.T.; DUSKY, J.A.; FERL, R.J.; TORRES, A.C.; CANTLIFFE, D.J. Evaluation of glyphosate resistence in transgenic lettuce. **Journal of the American Society for Horticultural Science,** Alexandria, v.125, p.669-672, 2000.

NASCIMENTO, W.N.; TORRES, A.C.; FERREIRA, A.T.; PAIVA, S.A.V. Bioensaio para detecção de plantas transgênicas de soja tolerante ao herbicida glifosato. In: XVII SEMINÁRIO PANAMERICANO DE SEMILLAS, 17, Punta Del Este. **Anais...** Punta del Este: FELAS, v.1, 2000, p.102.

NASCIMENTO, W.N.; TORRES, A.C.; PAIVA, S.A.V.; TAYLOR, M.; CANTLIFFE, D.J. Bio-assay for detection of glyphosate tolerance in lettuce transgenic seeds. In: INTERNATIONAL SEED TESTING CONGRESS, 26 Angers, 2001.**Abstracts...** Zürich: ISTA, 2001.

PADGETTE, S.R.; KOLACZ, K. H.; DELANNAY, X.; RE, D.B.; La VALLEE, D.J.; TINIUS, C.N.; RHODES, W.K.; OTERO, I.; BARRY, G.F. Development, Identification, and Characterization of a Glyphosate-Tolerant Soybean Line. **Crop Science,** Madison, v.35, p.1451-1461, 1995.

PFEILSTETTER, E.; MATZK, A.; FELDMANN, S.D.; SCHIEMANN, J. Rapid and efficient screening of phosphinothricin tolerant oilseed rape (*Brassica napus*) whit a novel germination test. **Euphityca,** Dordrecht, p.119-124, 2000.

SAVOY, B.R.; BARKEY, D.A.; JOHNSON, P.G. Rolled towel bioassay to identify RR trait in cotton planting seed. **Seed Technology,** Kentucky, v.23, n.2, p.165-168, 2001.

SIQUEIRA, S.C. de; MOREIRA, M.A.; MOSQUIM, P.R. Supressão fisiológica dos efeitos fitotóxicos do glifosato em explantes de soja. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal,** Campinas, v.10, n.2, p.137-142, 1998.

SIQUEIRA, S.C. de; MOREIRA, M.A.; MOSQUIM, P.R.; JOSÉ, I.C.; FERREIRA, F.A.; SEDIYAMA, C.S. Simulação da soja geneticamente modificada tolerante ao glifosato por meio do cultivo de explantes. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal,** Campinas v.11 n.1, p.13-20, 1999.

SPEHAR, C.R. Breeding soybeans to the low latitudes of brazilian cerrados (savannahs). **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, v.29, n.8, p. 1167-1180, 1994.

SPEHAR, C.R.; MAKITA, M. Tolerância ao alumínio em plântulas de soja e sua utilização. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, v.29, n.12, p. 1927-1932, 1994.

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.

TORRES, A.C.; NASCIMENTO, W.M.; PAIVA, S.A.V.; ARAGÃO, F.A.S. Bioassay for detection of transgenic soybean seeds tolerant to glyphosate. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n.9, p.1053-1057, 2003.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PROGRAMA de PÓS-GRADUAÇÃO em CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE SEMENTES

Título: Caracterização de plântulas e quantificação de sementes de soja geneticamente modificada resistente ao glifosato em sistema hidropônico.

Autora: Carla Medianeira Bertagnolli
Orientadora: Maria Ângela André Tillmann

Resumo - Os objetivos deste trabalho foram caracterizar os sintomas sob ação do glifosato em plântulas de soja GM e não-GM e verificar a eficiência na quantificação de misturas de sementes de soja GM resistente ao glifosato em amostras de sementes convencionais em sistema hidropônico. Foram utilizados dois genótipos de soja, um GM resistente ao glifosato e o respectivo parental não-GM. O primeiro ensaio visou a caracterização morfológica das plântulas e o segundo a detecção e quantificação de sementes de soja GM em amostras convencionais. No ensaio I, a caracterização e descrição morfológica dos sintomas causados pelo glifosato foram feitas através da observação visual das plântulas. No ensaio II, amostras de sementes convencionais contaminadas com 0; 1; 3 e 5% de sementes de soja GM, avaliou-se comprimento de raiz, de parte aérea e número de raízes secundárias. Nos dois ensaios foi utilizado sistema hidropônico. As sementes foram colocadas em vasilhas contendo solução herbicida (0,12% do equivalente ácido do glifosato) por quatro horas. A seguir, foram transferidas para solução nutritiva até completar cinco dias. O glifosato causa anormalidades em plântulas de soja não-GM, tais como, raízes afinadas e firmes, redução no comprimento de plântula e inibição da emissão de raízes secundárias. As plântulas GM apresentam-se bem desenvolvidas com raízes secundárias abundantes. O cultivo hidropônico permite 100% de acertos na detecção de soja GM, independente da porcentagem de contaminantes na amostra e apresenta exatidão na quantificação da presença de até 1% de sementes de soja GM, sendo a partir daí sua precisão condicionada ao percentual de mistura presente na amostra.

Palavras –Chave: *Glycine max,* transgênicos, hidroponia, mistura varietal.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PROGRAMA de PÓS GRADUAÇÃO em CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE SEMENTES

Title: Seedlings characterization and quantification of genetically modified soybean seeds resistant to the glyphosate in hydroponics system.

Author: Carla Medianeira Bertagnolli
Adviser: Maria Ângela André Tillmann

Summary - The objectives of this research were to characterize the modified (GM) and non genetically modified (non-GM) seedlings symptoms and to verify the efficiency of the hydroponics system in the quantification of GM soybean seeds mixtures in conventional samples. Two soybean genotypes were used, a GM for glyphosate resistant and the respective parental non-GM. The first assay aimed the morphologic seedlings characterization and the second the detection and quantification of GM seeds in conventional samples. In the assay I, the morphologic characterization was made through the visual observation of the seedlings. In the assay II, samples of conventional seeds added with 0; 1; 3 and 5% of seeds GM, evaluated seedlings length and number of secondary roots. In the two assays hydroponics system was used, the seeds were placed in recipients contends herbicide solution (0,12% of the equivalent acid of glyphosate) for four hours; then, they were transferred for nutrient solution until completing five days. The glyphosate causes abnormality in non-GM soybean seedlings, such as turned and firm roots, reduction in the root length and inhibition of the emission of secondary roots, the GM seedlings presents good developed with abundant secondary roots. The cultivation hydroponics allows 100% of successes in the soy detection GM, independent of the percentage of contaminants in the sample and it presents accuracy in the quantification of the presence of up to 1% of GM soybean seeds, being its precision conditioned to the percentile of present mixture in the sample.

Key words: *Glycine max*, transgenics, hydroponics, mixes varietal.

INTRODUÇÃO

No Brasil, a soja tem grande importância econômica, o seu cultivo ocupa 21 milhões de hectares, com uma produção anual de 60 milhões de toneladas (CONAB, 2004), números que colocam o Brasil como maior exportador desta leguminosa.

Avanços na engenharia genética resultaram em cultivares de soja resistente ao glifosato, provendo uma eficaz opção no controle de invasoras. A soja resistente contém a enzima CP4-EPSPS, originalmente isolada da bactéria *Agrobacterium* sp cepa CP4, resistente ao glifosato (Padgette et al., 1995).

Nos últimos anos, o mercado de sementes tornou-se globalizado e para competir convenientemente neste novo mercado, a qualidade é um dos pontos fundamentais do negócio. Sementes de alta qualidade só podem ser obtidas através de um rigoroso controle de todo o processo produtivo desde o planejamento inicial até a comercialização final (Della Vechia et al., 1998).

A manutenção da pureza varietal é um dos aspectos mais importantes em um programa de produção de sementes, já que garante que as características incorporadas através do melhoramento e da engenharia genética sejam traduzidas em benefícios para a produção agrícola.

A mistura de sementes de organismos GM em lotes de sementes convencionais tornou-se um problema para o comércio internacional de sementes, em alguns casos acarretando sérias conseqüências para empresas exportadoras que comercializam estes lotes (ISTA, 2001), isto porque alguns países exigem rotulagem e rastreabilidade de produtos oriundos da engenharia genética (Huffmann, 2004). A rastreabilidade consiste em manter um registro confiável de todas as etapas da cadeia produtiva, a partir dos fornecedores de sementes e insumos até o transporte, armazenamento e disponibilidade do produto ao consumidor (Pessoa et al., 2002).

O controle da pureza genética em programas de produção de sementes, o mercado internacional e as informações para a rotulagem

tem exigido dos pesquisadores o desenvolvimento de procedimentos adequados, eficazes, reprodutíveis e de baixo custo para a detecção, identificação e quantificação de sementes GM.

A detecção de sementes de OGM pode ser feita com o auxílio de técnicas de biologia molecular; OGMs são identificados pela detecção direta do DNA exógeno nele contido, do mRNA correspondente produzido, da proteína resultante ou, ainda, pela característica introduzida. Os principais métodos analíticos de detecção utilizam a técnica PCR (Polymerase Chain Reaction) para detectar o DNA exógeno, ou métodos imunológicos, como o ELISA (Enzime Linked Immunosorbent Assay), para detectar a proteína (Brasileiro & Carneiro, 1998). O método analítico escolhido deve ser sensível, confiável, reprodutível, minimizando, assim, falsos resultados. Os métodos baseados na PCR e em proteínas são onerosos necessitam de equipamentos sofisticados e pessoal altamente qualificado para realizar os testes de detecção e quantificação (Della Vecchia et al.,1998).

Tradicionalmente, a determinação da pureza genética realizada pelas empresas de sementes é baseada na avaliação de características morfológicas ou fisiológicas expressas pelas sementes, plântulas ou plantas adultas, por requererem baixo investimento inicial em equipamentos, material e pessoal especializado (Della Vechia et al., 1998). Deste modo, o teste de resistência a herbicida conduzido em conjunto com o teste de germinação, denominado bioensaio, surge como uma boa opção.

Os bioensaios são alternativas eficientes na detecção e quantificação de sementes de OGM resistente ao glifosato. Esta metodologia consiste em colocar as sementes em substrato contendo solução herbicida (Lübeck, 2004), sua análise é fundamentada na caracterização morfológica das plântulas. A concentração da solução de herbicida permite que as plântulas originadas de sementes de OGM apresentem desenvolvimento, comprimento, cor ou outra característica que as distinguem das não-GM (Ayala et al., 2002).

O cultivo hidropônico é muito utilizado para observar sintomas de deficiência e toxicidez de nutrientes e substâncias tóxicas em plantas

(Martinez, 1997), pois esta técnica minimiza possíveis danos no sistema radicular, facilitando a avaliação e a obtenção de resultados mais precisos (Delhaize & Ryan, 1995).

Semelhante aos bioensaios, no sistema hidropônico a avaliação também se baseia na caracterização morfológica das plântulas, indicando nova alternativa na detecção de sementes de soja resistente ao glifosato, já que esta metodologia facilita a avaliação das características apresentadas pelas plântulas, principalmente do sistema radicular (Bertagnolli et al., 2003).

Os objetivos deste trabalho foram caracterizar os sintomas sob ação do glifosato de plântulas de soja GM e não-GM e verificar a eficiência na quantificação de misturas de sementes de soja GM resistente ao glifosato em amostras de sementes convencionais em sistema hidropônico.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Di-Haplóides e Hidroponia da Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel” da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

Foram utilizados dois genótipos de soja, um geneticamente modificado (GM), para a resistência ao glifosato, CD 214 RR e o respectivo parental não geneticamente modificado (não-GM), CD 201.

O herbicida utilizado foi o produto comercial Roundup® original contendo 480gL^{-1} de sal de isopropilamina N-(fosfometil) glicina, 360gL^{-1} do equivalente ácido (e.a.) de N-(fosfometil) glicina e 648gL^{-1} de ingredientes inertes.

Foram conduzidos dois ensaios, o primeiro visando a caracterização morfológica de plântulas das cultivares GM e não GM após tratamento com o glifosato e o segundo a detecção e a quantificação de sementes de soja GM resistente ao glifosato em amostras convencionais de sementes.

Nos dois ensaios foi utilizado um sistema hidropônico onde telas de barbante coladas a um isopor foram adaptadas sobre vasilhas de plástico de capacidade 5,0 litros, que foram previamente preenchidas com solução herbicida na concentração de 0,12% do equivalente ácido do glifosato (concentração selecionada de acordo com resultados preliminares).

As sementes foram previamente desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 20% (produto comercial) por 10 minutos e lavadas com água destilada, para retirar o excesso do produto desinfestante. Após a desinfestação, as sementes foram colocadas com o auxílio de uma pinça sobre as telas.

As vasilhas de plástico contendo solução herbicida e com as telas adaptadas foram colocadas em banho-maria, em um tanque de metal de 2,00m x 1,50m x 0,50m, a 25 °C, cuja temperatura foi mantida através de um sistema elétrico de aquecimento, e com iluminação permanente (Figura 1).

Após quatro horas em contato com a solução herbicida, cada uma das telas contendo as sementes foi transferida para outra vasilha de

plástico contendo solução nutritiva, de maneira que as sementes fossem mantidas úmidas e as raízes primárias emergentes entrassem em contato com a solução, assegurando suprimento de água e de nutrientes.

Figura 1. Sementes de soja GM e não-GM sobre tela colada a isopor e adaptadas em vasilhas de plástico contendo solução herbicida (0,12% do ea do glifosato).

A concentração da solução nutritiva utilizada foi a proposta por Moore et al. (1976): Ca $(NO_3)_2$ 4 mM; KNO_3 4mM; $(NH_4)_2SO_4$ 0,435 mM; KH_2PO_4 0,5mM; $MnSO_4$ 2 µM; $CuSO_4$ 0,3 µM; $ZnSO_4$,8µM; NaCl 30µM; Fe-CYDTA 10µM; Na_2MoO_4 0,10µM e H_3BO_3 10µM. O pH da solução foi previamente ajustado para 4,0 com H_2SO_4 1N. As vasilhas de plástico contendo as soluções foram colocadas em banho-maria a temperatura de 25°C com iluminação permanente e ligados a um sistema de arejamento (mangueiras conectadas a um compressor de ar), para suprir o meio de oxigênio necessário ao desenvolvimento do sistema radicular. As plântulas se desenvolveram neste ambiente por um período de 120 horas, quando foram realizadas as avaliações.

Ensaio I - Caracterização morfológica de plântulas de soja GM e não-GM: Foram utilizadas quatro amostras de 50 sementes de cada genótipo.

A caracterização e descrição morfológica dos sintomas causados pelo herbicida foi feita através de observação visual de plântulas.

Ensaio II - Quantificação de sementes de soja GM em amostras convencionais: Vinte e quatro amostras de 300 sementes convencionais foram contaminadas ou não com sementes de soja GM, sem o conhecimento do analista: 6 amostras convencionais (nenhuma semente GM adicionada) e 18 amostras com mistura, nas quais sementes de soja GM foram adicionadas à amostra convencional em proporções pré-estabelecidas, em número, de 1; 3 e 5%.

Cada amostra foi colocada sobre telas contendo cada uma 25 sementes, cuja distribuição foi esquematizada em um croqui que demarcava a posição das sementes de soja GM presentes na amostra (Figura 2).

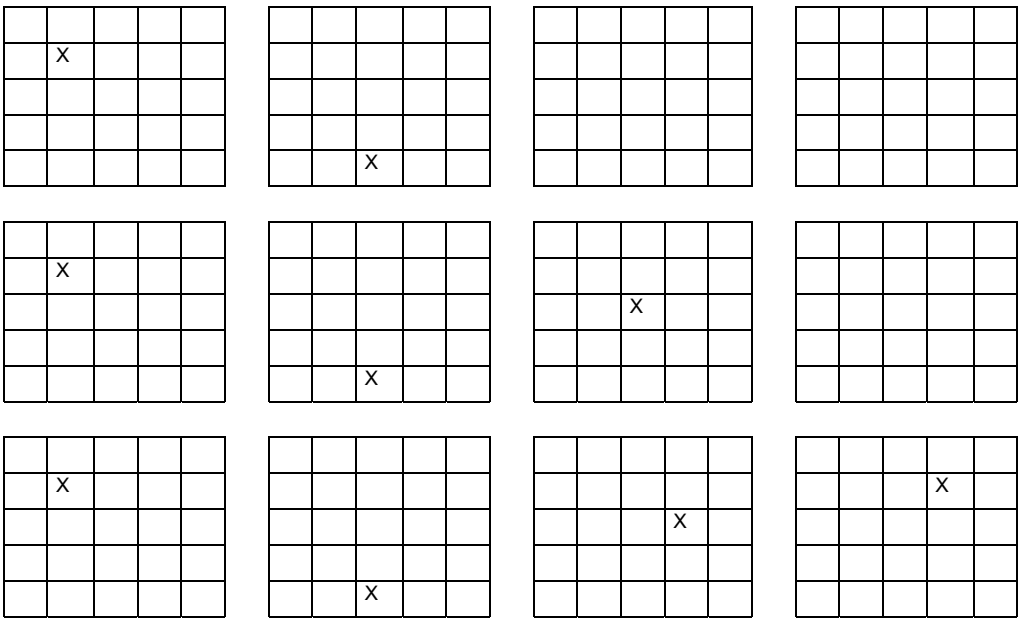

Figura 2. Exemplo do Croqui, utilizado no ensaio II, de uma amostra contendo 3% de sementes de soja GM.

A total imparcialidade foi mantida por parte do analista, uma vez que a substituição das sementes de soja não-GM por GM nas amostras foi realizada durante a instalação dos testes por uma segunda pessoa que ficava de posse do croqui, devolvendo-o para o analista apenas ao término das avaliações para conferência dos resultados.

A detecção de mistura na amostra foi indicada pela presença ou ausência de sementes de soja geneticamente modificada em meio às convencionais (não-GM). Apresentados como porcentagem de acertos e erros (falso positivo e falso negativo.).

Os resultados de quantificação da mistura presente na amostra foram expressos em porcentagem de sementes de soja GM presentes na amostra obtida através da equação de Goggy & Stahr (1997), excluindo-se as plântulas anormais e sementes mortas:

$$\% \text{ GM} = \frac{\text{GM}}{\text{GM+não-GM}} \times 100$$

GM = número de sementes de soja GM
não-GM = número de sementes de soja não-GM.

Os dados obtidos na detecção e quantificação da mistura presente na amostra foram apresentados graficamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização fenotipica das plântulas GM e não-GM em sistema hidropônico em resposta ao glifosato

Utilizando o cultivo hidropônico foi possível observar os sintomas provocados pelo glifosato nas plântulas, no quinto dia após o inicio do teste.

Os sintomas causados pelo herbicida podem ser observados nas Figuras 3 e 4, as plântulas de soja não-GM apresentaram limitação no desenvolvimento da parte aérea e da raiz primária. Além disso, o glifosato afetou a emissão de raízes secundárias. Esses dados concordam com os relatados por Funguetto et al (2004) que, ao empregar bioensaios para caracterizar as cultivares GM e não-GM, observaram que o glifosato causa anormalidade em plântulas de soja não-GM, caracterizada por inibição do desenvolvimento da raiz primária e da emissão de raízes secundárias, engrossamento e amarelecimento gradativo do hipocótilo.

Esta limitação no comprimento das plântulas é resultado da ação do herbicida que inibe a enzima EPSPS, evitando que a planta produza aminoácidos aromáticos essenciais para a síntese de proteínas e alguns metabólitos secundários (Padgette et al, 1995).

Ao testar graus de tolerância ao glifosato em explantes de genótipos de soja, em cultivo hidropônico, Siqueira et al. (1998) observaram que os sintomas visuais típicos de fitotoxicidade por glifosato surgiram após o terceiro dia de aplicação do herbicida. No presente estudo pode-se inferir que antes da ação efetiva do herbicida, as sementes iniciaram o processo germinativo, deste modo, as características que permitem separar os genótipos GM e não-GM puderam ser caracterizadas com segurança somente no quinto dia, após o inicio do teste.

O glifosato também afetou a emissão de raízes secundárias nas plântulas de soja não-GM, o que pode ser explicado pelo fato de que o glifosato provoca o déficit de aminoácidos aromáticos e compostos fenólicos secundários, tendo como conseqüência efeito inibitório na

organogênese, impedindo a diferenciação das raízes (Nagata et al., 2000).

Outra característica marcante das plântulas de soja não-GM após contato com a solução de herbicida, em sistema hidropônico, foi a aparência das raízes primárias que se apresentavam afinadas, lisas e firmes (Figura 3). Esta característica morfológica foi importante e muito utilizada na separação dos genótipos avaliados. Gutormson (2000) relata que um dos sintomas típicos que as plântulas de soja não-GM apresentam, quando submetidas aos bioensaios são raízes primárias pequenas e firmes.

Figura 3. Características morfológicas em plântulas de soja não-GM submetidas a solução de 0,12% de glifosato em cultivo hidropônico.

A solução de glifosato não produziu efeito sobre as sementes de soja GM, que mesmo na presença de herbicida produziram plântulas normais, bem desenvolvidas e com raízes secundárias abundantes (Figura 4). Após o tratamento com glifosato, a plântula de soja GM permanece inalterada, pois a ação continuada da enzima CP4-EPSPS permite que a plântula continue produzindo aminoácidos aromáticos, não comprometendo a biossíntese de enzimas envolvidas na produção de carboidratos e lipídeos (King et al., 2001), essenciais ao crescimento e desenvolvimento das plântulas.

Figura 4. Características morfológicas em plântulas de soja GM submetidas a solução de 0,12% de glifosato em cultivo hidropônico

Os genótipos de soja GM podem apresentar plântulas anormais, não devido à ação do herbicida, mas a danos mecânicos ou lesão no tecido de condução. Na presente pesquisa, as plântulas anormais GM puderam ser caracterizadas pela presença das raízes secundárias, em estudos com soja GM, Cunha (2004) indicou que a presença de raízes secundárias é a característica que torna possível diferenciar as plântulas de soja não-GM das anormais GM.

O sistema hidropônico mostrou-se eficiente na caracterização dos sintomas provocados pelo glifosato nas plântulas de soja GM e não-GM em cinco dias, principalmente por esta metodologia minimizar possíveis

danos no sistema radicular das plântulas, facilitando a avaliação e permitindo a obtenção de resultados mais precisos.

Os parâmetros que permitem a diferenciação das cultivares são comprimento de plântula e presença de raízes secundárias das GM e a raiz primaria das plântulas não GM que apresentam-se pequenas e firmes.

Detecção de mistura na amostra

O sistema hidropônico permitiu detectar a presença de sementes de soja GM em todas as amostras de sementes convencionais, apresentando resultados corretos para todas as porcentagens de contaminação estudadas (Tabela 1).

A detecção de sementes de soja GM foi baseada em características morfológicas que as plântulas apresentavam: comprimento total de plântulas, parte aérea e raiz, e presença de raízes secundárias. Utilizando bioensaios para diferenciar as cultivares de soja GM das não-GM, diversos autores Goggi & Stahr, 1997; Funguetto et al, 2004; Cunha, 2004 e Tillmann & West, 2004 observaram que a ação do glifosato reduz o comprimento das plântulas, parte aérea e raiz, além de inibir a emissão de raízes secundárias das cultivares não-GM.

Um dos principais parâmetros utilizados na diferenciação das cultivares foi a ausência de raízes secundárias. Outra característica que auxiliou a distinção das cultivares suscetíveis e resistente ao herbicida foi a aparência das raízes das plântulas de soja não-GM que se apresentaram totalmente lisas, afinadas e firmes.

Independentemente da porcentagem de sementes de soja GM na amostra alcançou-se a totalidade de resultados corretos na detecção, não apresentando resultados falsos positivos ou falsos negativos. No entanto, Miranda (2004), estudando bioensaios de pré-embebição, substrato umedecido e imersão em solução contendo herbicida, relatou que apenas em mostras que apresentavam contaminação superior a 1% foi possível obter 100% de resultados corretos, segundo o autor quanto menor a porcentagem de mistura presente na amostra, maior a dificuldade de

detecção, pois quando há maior número de sementes de soja GM na amostra é mais provável que ocorra detecção de pelo menos uma dessas sementes.

A amostragem e o preparo da amostra são dois passos importantes no processo de detecção de OGMs. O limite de detecção de um método analítico é determinado, não apenas pela sensibilidade do procedimento, mas na maioria dos casos pelo tamanho da amostra. Para a obtenção de resultados que sejam seguros e confiáveis quando se avalia OGMs é importante que a amostra seja representativa do lote e deve ser de tamanho suficiente para permitir análise com sensibilidade desejada (Bonfini et al., 2001).

No presente trabalho foram utilizadas amostras constituídas de 300 sementes, o que provavelmente facilitou a detecção das sementes de soja GM, já que em uma amostra contaminada com 1 %, existiam pelo menos três sementes de soja GM, mesmo que algumas sementes não germinassem foi possível detectar pelo menos uma das sementes de soja GM.

A demarcação da posição de todas as sementes da amostra no croqui de instalação permitiu segurança na caracterização dos sintomas causados pelo herbicida, possibilitando maior precisão na avaliação dos resultados.

A presente pesquisa confirma que o sistema hidropônico representa uma nova alternativa de bioensaio na detecção de sementes de soja GM, com 100 % de acertos, independentemente da porcentagem de mistura presente na amostra. Foram realizados dois testes de proficiência para determinar a habilidade dos laboratórios em detectar a presença de sementes de soja GM. Os resultados mostraram que no primeiro teste de proficiência 69,8% dos laboratórios participantes foram capazes de detectar a presença de sementes de soja GM nas amostras (ISTA, 2003a) e no segundo teste 85% dos laboratórios classificaram todas as amostras corretamente (ISTA, 2003b). Foi permitido aos laboratórios usarem seus próprios métodos de avaliação, aqueles que utilizaram os bioensaios apresentaram 100% de resultados corretos,

mostrando eficiência superior aos testes baseados na análise de proteínas e DNA.

Quantificação da mistura presente na amostra

Para quantificar a presença de sementes de soja GM em amostras de sementes convencionais em sistema hidropônico, foram utilizadas as mesmas características morfológicas que caracterizaram plântulas originadas de sementes de soja resistente e suscetível ao glifosato, empregadas no ensaio de detecção.

Na quantificação de mistura de sementes de soja GM em amostras convencionais, o sistema hidropônico também se mostrou eficiente. Entretanto, como observa-se na Figura 5, ao contrário do que ocorreu na detecção, quanto maior a porcentagem de contaminação com sementes de soja GM, maior é a dificuldade de quantificar a amostra.

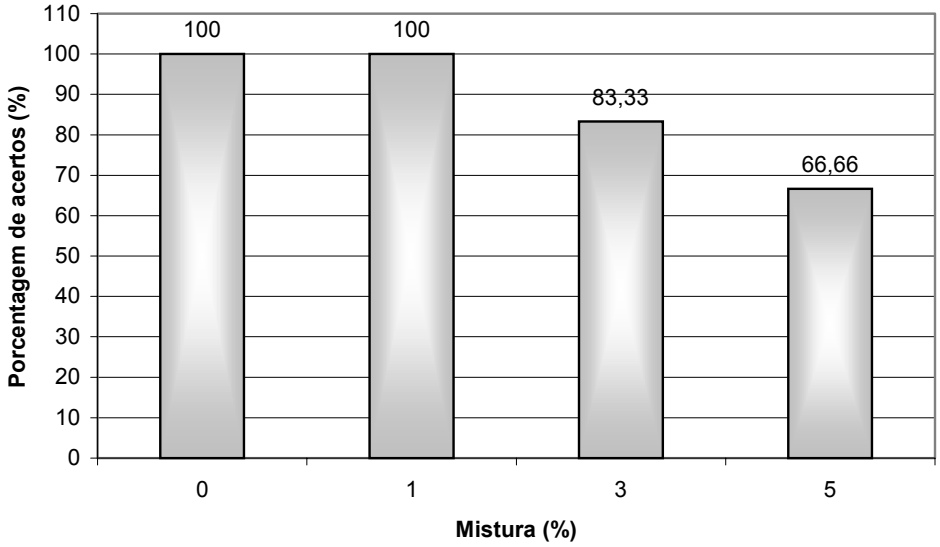

Figura 5. Porcentagem de acertos na quantificação de sementes de soja GM (contaminação de 0; 1; 3 e 5 %) em amostras convencionais em sistema hidropônico.

O sistema hidropônico permitiu quantificar corretamente 100% das amostras contaminadas com zero e 1%. Todavia, em amostras

contaminadas com 3 e 5 % a porcentagem de acertos foi respectivamente de 83,3 e 66,6 %.

A dificuldade de quantificar amostras de sementes contaminadas com mais de 1% de sementes de soja GM, também foi observada por Miranda (2004), que ao estudar a eficiência dos bioensaios na quantificação de misturas de sementes de soja GM em amostras convencionais, relatou que quanto maior a porcentagem de sementes de soja GM presentes na amostra, maior é a dificuldade em quantificá-la, pois há maior probabilidade de que uma dessas sementes não germine e cause erro na avaliação.

A capacidade de quantificar amostras está diretamente relacionada com a qualidade fisiológica das sementes que serão utilizadas nos testes. Por exemplo, se um lote de sementes apresenta germinação de 80%, significa que a cada dez sementes, duas não germinarão.

A presença de sementes mortas e de plântulas anormais nas amostras representa as mais significativas fontes de erro dos resultados nos bioensaios, de forma que Goggi & Stahr (1997) e Gutormson (2000) não as consideram no cálculo de quantificação de sementes de soja GM da amostra servindo como fator de correção na porcentagem de sementes de soja GM avaliadas. Porém, no presente trabalho, a utilização da equação para cálculo da quantificação não corrigiu os resultados devido ao tamanho da mostra utilizada.

Em amostras com 3% de contaminação, 83% amostras avaliadas, foram quantificadas corretamente. Miranda (2004), utilizando a metodologia do substrato umedecido, também conseguiu quantificar 83% das amostras contaminadas com 3% de sementes de soja GM. Já, amostras com 5% de contaminação com sementes de soja GM, a quantificação apresentou 66,6% de resultados corretos, o croqui de instalação permitiu identificar que erros na avaliação, decorreram em função de sementes mortas e plântulas anormais que foram consideradas não-GM (resultado falso negativo).

Os resultados falso negativo são atribuídos a alta concentração do herbicida utilizada, aplicação do herbicida errado, semeadura da amostra com equipamento contaminado por outro herbicida ou a viabilidade das

sementes (Gutormson, 2000), pode-se inferir que neste trabalho os resultados falso negativo ocorreram devido a qualidade das sementes do lote.

Empregando-se a tolerância de 1% nos resultados obtidos,em sistema hidropônico, observa-se na Figura 7 que esta metodologia apresentou 100% de resultados corretos, independente da porcentagem de contaminantes na amostra.

A utilização de um limite de tolerância é muito importante, pois segundo Huffmann (2004), nenhuma metodologia utilizada para avaliar OGMs pode ser considerada 100% segura, há sempre o risco de obter-se resultados equivocados, os quais variam com a tecnologia utilizada na análise, produto a ser avaliado e quantidade de OGM presente na amostra .

Ao estabelecer um limite de tolerância, buscou-se uma maneira de cobrir possíveis fontes de erro, como presença de sementes mortas ou plântulas anormais as quais poderiam ser caracterizadas inadequadamente, preparo ou manuseio da solução de herbicida ou outros problemas decorrentes da execução do teste.

O segundo teste de proficiência da ISTA teve como objetivo checar a habilidade dos laboratórios em estimar a porcentagem de sementes de soja GM na amostra ou determinar quais amostras apresentavam porcentagem de mistura superior ou inferior a 1%, participaram deste teste 19 laboratórios dos quais apenas quatro classificaram corretamente todas as amostras (ISTA, 2003b).

O cultivo hidropônico permite quantificar corretamente amostras com até 1% de mistura, acima deste percentual a precisão da metodologia será dependente da porcentagem de germinação das sementes, quanto maior a qualidade fisiológica das sementes, mais preciso será o teste.

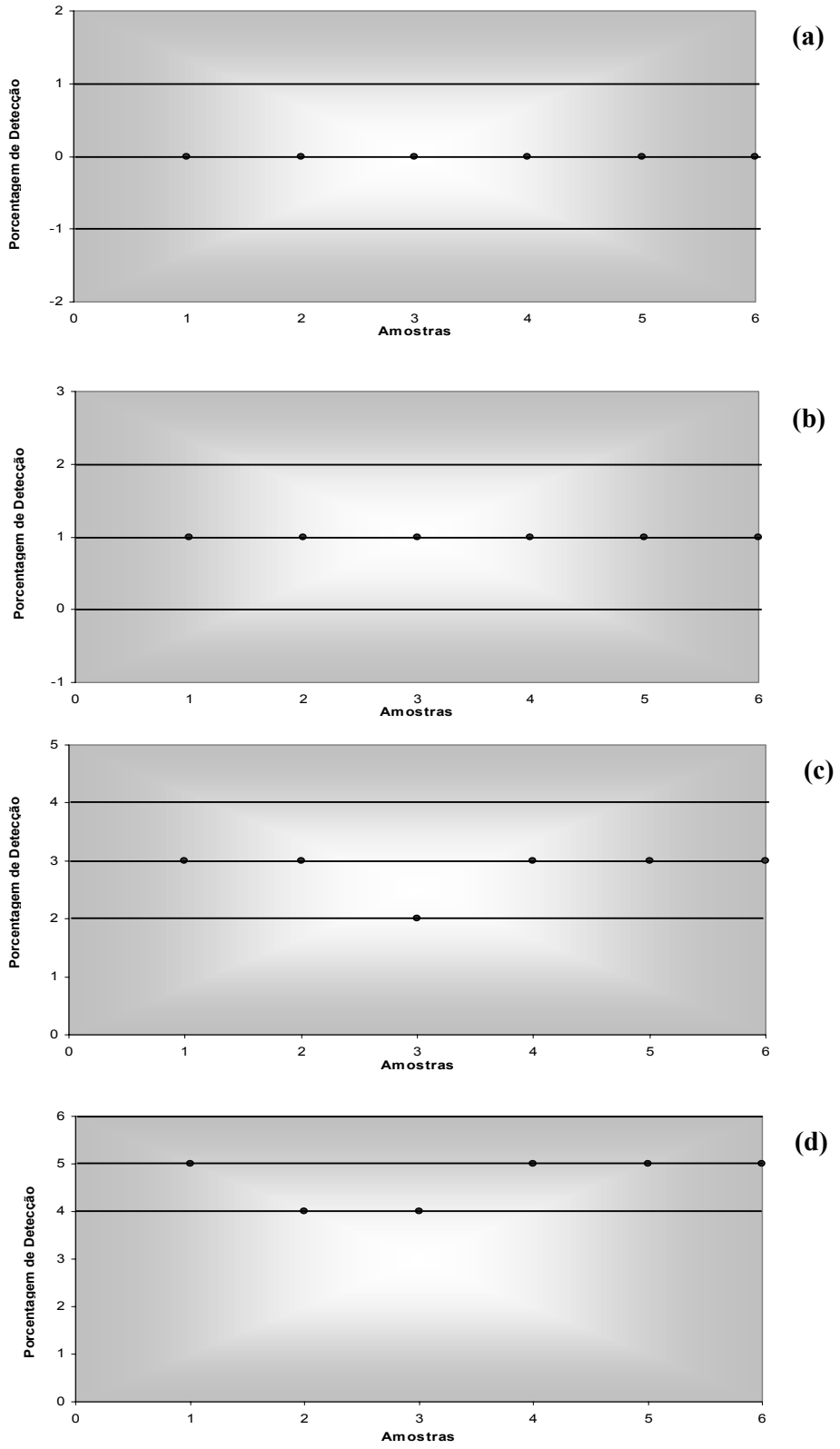

Figura 6. Porcentagem de detecção de sementes de soja GM, contaminação de (a) 0%; (b) 1%; (c) 3% e (d) 5% em amostras convencionais em sistema hidropônico.

CONCLUSÕES

- O glifosato causa anormalidade em plântulas de soja não-GM, as plântulas apresentam raízes afinadas, lisas e firmes; redução no comprimento de raiz primária e parte aérea e inibição da emissão de raízes secundárias, as plântulas de soja GM apresentam raiz primária e parte aérea bem desenvolvida e com raízes secundárias abundantes.

- O sistema hidropônico é eficiente na detecção e quantificação da presença de sementes de soja em amostras convencionais.

- O sistema hidropônico permite 100% de acertos na detecção de sementes de soja GM, independente da porcentagem de contaminantes nas amostras convencionais de sementes de soja.

- O sistema hidropônico permite a quantificação exata da presença de até 1% de sementes de soja GM, acima de 1% de contaminantes a precisão da metodologia esta condicionada ao percentual de mistura presente na amostra.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AYALA, L.; TILLMANN; M.A.A.; DODE, L.B.; VILLELA, F.A.; MAGALHÃES, A.M.; SILVA, M.P. Tetrazolium test for identificatin of transgenic rice seeds tolerant to herbicide. **Seed Science an Technology,** Zürich, v.30, p.431-436, 2002.

BERTAGNOLLI, C.M.; TILLMANN, M.A.A.; VILLELA, F.A.; DODE, L.B.; CARRARO, I.M. Detecção de sementes de soja geneticamente modificada tolerante ao glifosato através do cultivo hidropônico. **Informativo ABRATES,** Londrina, v.13, n.3, p.327, 2003.

BONFINI, L.; HEINZE, P.; KAY, S.; VAN den EEDE, G. Review of GMO detection and quantification techniques. **Report from the European Commission Joint Research Center,** Ispra, Italy, 2001. 67p.

BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. **Manual de transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH,1998.309p.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em http://www.conab.gov.br. Acesso em: 22 de dezembro de 2004.

CUNHA, C.S.M.; **Comparação de métodos na detecção de sementes de soja geneticamente modificada, tolerante ao glifosato.** 2004. 24p. dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Sementes) – Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel", Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2004.

DELHAIZE, E.; RYAN, P.R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiology,** Rockville, v.107, n.2, p.315-321, 1995.

DELLA VECCHIA, P.T.; SILVA, C.A.R.; TERENCIANO-SOBRINHO, P. Use of molecular marker techniques in seed testing by brazilian seed companies. **Scientia Agricola,** Piracicaba, v.55, p.79-81, 1998.

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,** Pelotas, v.26,n.1,p.130-138, 2004.

GOGGI, A.S.; STAHR, M.G. Roundup ™ pre-emergene treatment to determine the presence of the Roundup™ gene in soybean seeds: a laboratory test. **Seed Technology**, Kentucky, v.19, n.1, p.99-102,1997.

GUTORMSON, T. Herbicide trait testing IN: MCDONALD, M.B.; GUTORMSON, T.TURNIPSEED, B. (Ed). **Seed technologist training manual.** Society .of Commercial Seed Technologists, 2000. 292p.

HUFFMANN, W.,E. Production, identity preservation, and labeling in a marketplace with genetically modified and non-genetically modified foods. **Plant Physiology,** Rockville,v.134, p.3-10,2004

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. ISTA's strategy regarding methods for the detection, indentification and quantification of genetically modified seeds in conventional seed lots. **Position Paper.** Version 1, 2001. 3p.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. First ISTA proficiency test on GMO testing of *Zea Mays* L. **Seed Testing International,** Zürich, n.125, p.10, 2003a.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. Second ISTA proficiency test on GMO testing of *Zea Mays* (MON810):summary of the results. **Seed Testing International,** Zürich, n.126, p.15-17, 2003b.

KING, C.A.; PURCELL, L.C.; VORIES, E.D. Plant growth and nitrogenase activity of glyphosate-tolerant soybean in response to foliar glyphosate applications. **Agronomy Journal,** Madison, v.93, p.179-186, 2001.

LÜBECK M. **Detection of genetically modified plants –**methods to sample and analyze GMO contend in plants and plant products. Disponível em http://www.sns.dk/erhvogadm/biotek/detection.htm. Acesso em 17 de outubro de 2004.

MARTINEZ, H.E.P. **O uso do cultivo hidropônico de plantas em pesquisa**. Cadernos Didáticos.Viçosa: Editora UFV n.1, p.10-15, 1997.

MIRANDA, D.M. **Bioensaios na detecção e quantificação de sementes sde soja geneticamente modificada resistente ao glifosato em amostras convencionais de sementes.** 2004. 44p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Sementes) – Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel", Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2004.

MOORE, D.P.; KRONSTAD, W.E.; METZGER, R.J. Screening wheat for aluminum tolerance. In: Workshop on plant adaptation to mineral stress in problem soils, 1976, Beltsville. **Proceedings.** Ithaca: Cornell University, p.287-295, 1976.

NAGATA, R.T.; DUSKY, J.A.; FERL, R.J.; TORRES, A.C.; CANTLIFFE, D.J. Evaluation of glyphosate resistence in transgenic lettuce. **Journal of the American Society for Horticultural Science,** Alexandria, v.125, p.669-672, 2000.

PADGETTE, S.R.; KOLACZ, K. H.; DELANNAY, X.; RE, D.B.; La VALLEE, D.J.; TINIUS, C.N.; RHODES, W.K.; OTERO, I.; BARRY, G.F. Development, Identification, and Characterization of a Glyphosate-Tolerant Soybean Line. **Crop Science,** Madison, V.35, p.1451-1461,1995.

PESSOA, M.C.P.Y.; SILVA, A.S.; CAMARGO, C.P. **Qualidade e certificação de produtos agropecuários.** Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2002. 188p.

SIQUEIRA, S.C. de; MOREIRA, M.A.; MOSQUIM, P.R. Supressão fisiológica dos efeitos fitotóxicos do glifosato em explantes de soja. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal,** Campinas, v.10, n.2, p.137-142, 1998.

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.

4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARANTE JUNIOR, O.P.; SANTOS, T.C.R.; BRITO. N.M.; RIBEIRO, M.L. Glifosato: propriedades, toxidade, usos e legislação. **Química Nova,** São Paulo, v.25, n.4, p.589-593, 2002.

ARAGÃO, F.J. L.; BRASILEIRO, A.C.M. Positive, negative and marker-free strategies for transgenic plant selection. **Brazilian Journal Plant Physiology**, Campinas, v.14, n.1, p.1-10, 2002.

ARAGÃO, F.J. L.; RIBEIRO, S.G. Detecção de proteínas pala técnica ELISA. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. **Manual de transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, .p. 239-249, 1998.

ARAGÃO, F.J.L. **Organismos transgênicos: explicando e discutindo a tecnologia.** Barueri: Manole, 2003. 115p.

AYALA, L.; TILLMANN; M.A.A.; DODE, L.B.; VILLELA, F.A.; MAGALHÃES, A.M.; SILVA, M.P. Tetrazolium test for identificatin of transgenic rice seeds tolerant to herbicide. **Seed Science and Technology,** Zürich, v.30, p.431-436, 2002.

BERTRAM, M.G., PEDERSEN, P. Adjusting management practices using gliphosate-resistant soybean cultivars. **Agronomy Journal,** Madison, v.96, p.462-468,2004.

BONFINI, L.; HEINZE, P.; KAY, S.; VAN den EEDE, G. Review of GMO detection and quantification techniques. **Report from the European Commission Joint Research Center,** Ispra, Italy, 2001. 67p.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento.. Disponível em http://www.conab.gov.br. Acesso em: 22 de dezembro de 2004.

BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. **Manual de transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH,1998.309p.

CAMARGO, C.E. de O. Melhoramento do trigo.I. hereditariedade da tolerância do alumínio tóxico. **Bragantia**, Campinas, v.40, p. 33-45, 1981.

CAMARGO, C.E.de O.; FERREIRA FILHO, A.W. P.; FELICIO, J.C. Herança da tolerância ao alumínio em populações híbridas de trigo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, v.35, n.3, p.517-522, 2000.

CLEMENTE, T.E.; LA VALLE, B.J.; HOWE, A.R.; WARDE, D.C.; ROZMAN, R.J.; HUNTER, P.E.; BROYLES, D.L.; KASTEN, D.S.; HINCHEE, M.A. Progeny analysis of glyphosate selected trasngenic soybeans derived from *Agrobacterium*-mediated transformation. **Crop Science,** Madison, v.40, p.797-803, 2000.

COBB, A. **Herbicides and Plant Physiology.** London: Champaman and Hall, 1992, 176p.

CORREIA, N.M.; REZENDE, P.M. **Manejo integrado de plantas daninhas na cultura da soja .** disponível em: <http://www.editora.ufla.br/boletim/pdf/bol_51.pdf>.acesso em: 19 de outubro de 2004.

DELANNAY, X.; BAUMAN, T.T.; BEIGHELEY, D.H..;BUETTER, M.J.; COBLE, H.D.; DEFELICE, M.S.;DERTING, C.W.;DIEDRICK, T.J.;GRIFFIN, J.L.;HAGOOD, E.S.;HANCOCK, F.G.; HART, S.E.;LAVALLEE, B.J.; LOUX, M.M.; LUESCHEN, W.E.; MATSON, K.W.; MOOTS, C.K.; MURDOCK, E.; NICKELL, A.D.; OWEN, M.D.K.; PASCHAL II, E.H.; PROCHASKA, L.M.; RAYMOND, P.J.; REYNOLDS, D.B.; RHODES, W.K.; ROETH, F.W.; SPRANKLE, P.L.; TAROCHIONE, L.J.; TINIUS, C.N.; WALKER, R.H.; WAX, L.M.; WEIGELT, H.D.; PADGETTE, S.R. Yield evaluation of a glyphosate-tolerant soybean lineafter treatment with glyphosate. **Crop Science,** Madison, v.35, p. 1461-1467, 1995.

ELMORE, R.W.; ROETH, F.W.; KLEIN, R.N.; KNEZEVIC, S.Z.; MARTIN, A.; NELSON, L.A.; SHAPIRO, C.A. Glyphosate-Resistant soybean cultivar response to glyphosate. **Agronomy Journal,** Madison, v.93, p. 404-407, 2001.

GUTORMSON, T. Herbicide trait testing IN: MCDONALD, M.B.; GUTORMSON, T.TURNIPSEED, B. (Ed). **Seed technologist training manual.** Society .of Commercial Seed Technologists, 2000, 292p.

GUTORMSON, T; BRIX-DAVIS, K.; JAUERT, P. A Comparison of GMO testing strategies. **Seed World,** Illinois, v.138, p.10-12, 2000.

HUFFMANN, W.,E. Production, identity preservation, and labeling in a marketplace with genetically modified and non-genetically modified foods. **Plant Physiology,** Rockville,v.134, p.3-10, 2004.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. ISTA's strategy regarding methods for the detection, indentification and quantification of genetically modified seeds in conventional seed lots. **Position Paper.** Version 1, 2001. 3p.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. First ISTA proficiency test on GMO testing of *Zea Mays* L. **Seed Testing International,** Zürich, n.125, p.10, 2003a.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. Second ISTA proficiency test on GMO testing of *Zea Mays* (MON810):summary of the results. **Seed Testing International,** Zürich, n.126, p.15-17, 2003b.

JAMES, C. **Global Status of Commercialized Transgenic Crops:2003.** Ithaca: ISAAA, 2003.(Briefs 30:Preview)

KRUSE, N.D.; TREZZI, M.N.; VIDAL, R.R.Herbicidas inibidores da EPSPS: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Herbicidas,** Brasília, v.1, n.2, p. 139-146, 2000.

LILGE, C.G.; TILLMANN, M.A.A.; VILLELA, F.A.; DODE, L.B. Identificação de sementes de arroz transformado geneticamente resistente ao herbicida glufosinato de amônio. **Revista Brasileira de Sementes,** Londrina, v.25, n.1, p.87-94, 2003.

LÜBECK M. **Detection of genetically modified plants –**methods to sample and analyze GMO contend in plants and plant products. Disponível em http://www.sns.dk/erhvogadm/biotek/detection.htm. Acesso em 17 de outubro de 2004.

MARTINEZ, H.E.P. **O uso do cultivo hidropônico de plantas em pesquisa**. Cadernos Didáticos.Viçosa: Editora UFV n.1, p.10-15, 1997.

MENOSSO, O.G.; COSTA, J.A.; ANGHINONI, I.; BOHNEN, H. Tolerância de genótipos de soja ao alumínio em solução. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, v.23, n.11, p.2157-2166, 2000.

MOUSDALE D.M. & COGGINS J.R. Amino Acid Sinthesis In: KIRKWOOD, R.C. **Target sites for herbicide action.** London: Plenum Press, p. 29-39, 1991.

MUMM, R.H.; WALTERS, D.S. Quality control in development of transgenicas crop seed products. **Crop Science,** Madison, v.41, p.1381-1389, 2001.

NORDIC COUNCIL OF MINISTERS. **Control of GMO content in seed and feed –** possibilities and limitations. Copenhagen: TemaNord 541, 2004. 74p

PADGETTE, S.R.; KOLACZ, K. H.; DELANNAY, X.; RE, D.B.; La VALLEE, D.J.; TINIUS, C.N.; RHODES, W.K.; OTERO, I.; BARRY, G.F. Development, Identification, and Characterization of a Glyphosate-Tolerant Soybean Line. **Crop Science,** Madison, V.35, p.1451-1461, 1995.

SIQUEIRA, S.C. de; MOREIRA, M.A.; MOSQUIM, P.R.; JOSÉ, I.C.; FERREIRA, F.A.; SEDIYAMA, C.S. Simulação da soja geneticamente modificada tolerante ao glifosato por meio do cultivo de explantes. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal,** Campinas v.11 n.1, p.13-20, 1999.

SPEHAR, C.R. Breeding soybeans to the low latitudes of brazilian cerrados (savannahs). **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, v.29, n.8, p. 1167-1180, 1994.

SPEHAR, C.R.; MAKITA, M. Tolerância ao alumínio em plântulas de soja e sua utilização. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, v.29, n.12, p. 1927-1932, 1994.

TREZZI, M.M.; KRUSE, N.D.; VIDAL,R.A. Inibidores de EPSPS. In: VIDAL, R.A.; MEROTTO JR, A. (Eds.). **Herbicidologia,** Porto Alegre, p.37-45, 2001.

VIDAL, R.A. **Herbicidas:** mecanismos de ação e resistência de plantas. Porto Alegre: Ribas Vidal, 1997.165p.