

BIOENSAIOS NA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE SEMENTES DE SOJA GENETICAMENTE MODIFICADA RESISTENTE AO GLIFOSATO¹

DENISE MEZA DE MIRANDA², MARIA ÂNGELA ANDRÉ TILLMANN³, FÁBIO BALERINI⁴, FRANCISCO AMARAL VILLELA³

RESUMO - O cultivo mundial de soja geneticamente modificada (GM) resistente ao glifosato é crescente e a presença dessas sementes em lotes de sementes convencionais tornou-se um problema para o comércio internacional da soja. Reconhecendo a importância dos novos mercados e dos produtos GM, a Tecnologia de Sementes terá que assegurar a pureza genética dos produtos derivados da biotecnologia através de testes confiáveis, práticos e de baixo custo. Nesse contexto, os objetivos do trabalho foram verificar a eficiência do teste de germinação com herbicida no substrato (bioensaios) na detecção e na quantificação de misturas de cultivares GM em amostras de sementes convencionais. Amostras de sementes convencionais foram preparadas com 0, 1, 3 e 5% de sementes de soja GM e submetidas aos métodos de pré-embebição, substrato umedecido e imersão em herbicida, instaladas em bandejas plásticas contendo 25 sementes, com e sem associação ao *kit* de detecção de OGM. Na seqüência, amostras contaminadas com 0, 1, 3, 5 e 8% de sementes de soja GM foram semeadas em rolos de papel (25 e 50 sementes/rolo) e bandejas plásticas com 25 sementes seguindo o método de pré-embebição em herbicida. Aos seis dias após a instalação, avaliaram-se comprimento de hipocótilo, comprimento de raiz, número de raízes secundárias e comprimento da maior raiz secundária. O método de pré-embebição é o mais eficiente para a detecção e quantificação da presença de sementes de soja GM, permitindo 100% de acertos na detecção, independentemente da porcentagem de contaminantes nas amostras convencionais de sementes de soja e apresenta exatidão na quantificação da presença de até 3% de sementes de soja GM em amostras convencionais, sendo sua precisão condicionada ao percentual de mistura presente na amostra.

Termos para indexação: *Glycine max*, transgênicos, herbicida, germinação.

BIOASSAYS ON THE DETECTION AND QUANTIFICATION OF GENETICALLY MODIFIED SOYBEAN RESISTANT TO GLYPHOSATE

ABSTRACT - The world cultivation of genetically modified (GM) soybean resistant to glyphosate is increasing and the presence of these seeds in lots of conventional seeds has become a problem for international soybean trade. Recognizing the importance of the new markets and GM products, Seed Technology will have to assure the genetic purity of the biotechnologically derived products through reliable, practical and low cost tests. In this context, the aims of this study were to verify the efficiency of the germination test with herbicide in the substratum (bioassays) in the detection and quantification of GM soybean seed mixtures in conventional seed samples. Samples of conventional seeds were prepared with 0, 1, 3 and 5% GM soybean seeds and submitted to the procedures of pre-soak, soak and immersion in herbicide, installed in plastic trays containing 25 seeds, with and without association to the GMO detection kit. In the sequence, contaminated samples with 0, 1, 3, 5 and 8% GM soybean seeds were installed in paper rolls (25 and 50 seeds/roll)

¹ Submetido em 03/02/2004. Aceito para publicação em 07/12/2004. Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor, apresentada à FAEM/UFPel.

²Eng^a. Agr^a., M.Sc., e-mail: denise.miranda@ufpel.edu.br

³ Prof. Adjunto, Dr., Departamento de Fitotecnia, FAEM/UFPel, caixa postal 354, 96010-900, Pelotas, RS. Bolsista de produtividade em pesquisa do CNPq.

⁴ Aluno de graduação em Agronomia, bolsista do CNPq

and plastic trays with 25 seeds following the pre-soak procedure in herbicide. Six days after the installation, hypocotyl length, root length, number of secondary roots and the largest secondary root length were evaluated. The pre-soak procedure is the appropriate for the detection and quantification of GM soybean seed presence, permitting 100% successes in the detection, regardless of the contaminant percentage in conventional samples of soybean seeds and it presents accuracy in the quantification of GM soybean seed presence of up to 3% in conventional samples, and its precision is conditioned to the percentual of present mixture in the sample.

Index terms: *Glycine max*, transgenics, herbicide, germination.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de culturas geneticamente modificadas (GM) resistentes a determinados herbicidas disponibiliza nova tecnologia no controle de plantas daninhas, ressaltando-se a soja resistente ao glifosato (Elmore et al., 2001a). A possibilidade do uso de glifosato aplicado na pós-emergência da cultura representa nova alternativa de controle em função da eficiência e viabilidade econômica, características essenciais no conceito de praticabilidade (Gazziero & Prete, 2004) desde que seja utilizada como parte de um manejo integrado, alternando-a com outras práticas já existentes (Reddy, 2001; Bertram & Pedersen, 2004).

Durante o período de nove anos, a área global cultivada com organismos GM cresceu 47 vezes, de 1,7 milhões de hectares em 1996 para 81,0 milhões em 2004. Oito países foram responsáveis pela maior parte da área total do cultivo GM em 2004: EUA (59%), Argentina (20%), Canadá (6%), Brasil (6%), China (5%), Paraguai (2%), Índia (1%) e África do Sul (1%). A soja resistente ao glifosato ocupou 56% da área mundial de soja em 2004, representando 48,1 milhões de hectares. O Brasil teve seu primeiro cultivo autorizado de soja GM na safra 2003/2004 que abrangeu 2,785 milhões de hectares, totalizando 4,1 milhões de toneladas produzidas e, em 2004/2005, cultivou 5 milhões de hectares, significando um incremento de 66% em relação à safra anterior (James, 2004).

Preocupações com os atributos intrínsecos e extrínsecos de qualidade nos alimentos têm crescido nas últimas décadas e a polêmica acirrou-se com a entrada dos alimentos geneticamente modificados no mercado de consumo global. Fazendo com que as técnicas de segregação, rastreabilidade e preservação de identidade dos recursos genéticos e produtos alimentares assumam caráter particularmente estratégico em nosso país, que hoje ocupa o lugar de maior fornecedor de soja convencional no mercado internacional (Pessanha & Wilkinson, 2003).

Os grandes importadores de soja (União Européia, China, Japão, Coréia) chegaram internamente a um acordo no sentido da satisfação da demanda de seus consumidores: a introdução da obrigatoriedade de rotulagem em produtos que contenham níveis de organismos GM acima dos limites permitidos, sem com isso restringir as importações do complexo soja (Ablin & Paz, 2002). No Brasil, a rotulagem é obrigatória em produtos que apresentam organismos GM em nível superior a 1%, a fiscalização fica a cargo do Ministério da Agricultura na sementeira, transporte e armazenamento e a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) fiscaliza a indústria.

Grande fonte de risco desse sistema de segregação consiste nos testes de identificação utilizados porque nenhum apresenta absoluta exatidão (Huffmann, 2004). Os métodos de detecção de organismos GM estão no estágio inicial, seus resultados são qualitativos ou semi-quantitativos, mas métodos quantitativos são necessários para submeter os produtos aos limites permitidos de organismos GM.

A presença constante de sementes de plantas GM em lotes de sementes convencionais tornou-se um crescente problema para o comércio internacional e, em alguns casos, acarretando em sérias conseqüências para as empresas exportadoras que as comercializam. Numerosos métodos analíticos são normalmente usados ou estão sendo desenvolvidos para a determinação da taxa de pureza de lotes de sementes e que os critérios relevantes na avaliação da performance de cada teste consistem em exatidão, precisão, sensibilidade, especificidade, repetibilidade das operações e reprodutibilidade dos resultados (Bertheau et al., 2002).

Os métodos analíticos de sementes de espécies GM podem ser divididos entre os baseados em proteína, como o teste de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbant Assay*) que detecta proteínas específicas contidas nas sementes GM e os *kits* (tiras de fluxo lateral) que trabalham com anticorpos, ambos só oferecem resultado qualitativo e aqueles baseados no DNA, a técnica mais empregada é o PCR (*Polymerase Chain Reaction*) que estuda o gene inserido no DNA do

material, pode ser utilizado para ambas análises: qualitativa (detecção e identificação) e quantitativa através do PCR competitivo e do PCR em tempo real (Nordic Council of Ministers, 2004). Os procedimentos utilizados para a determinação ou quantificação de organismos GM são onerosos, demandam equipamentos e pessoal altamente tecnificado, levando à 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 de organismos GM (Ayala et al., 2002).

Tradicionalmente, a determinação da pureza genética feita pelas grandes 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 Vecchia et al., 1998). Assim, o teste de resistência a herbicidas conduzido em conjunto ao teste de germinação, denominado de bioensaio constitui-se em promissora opção, pois permite na avaliação que as plântulas originadas de sementes convencionais apresentem características no desenvolvimento, que as distinguem das geneticamente modificadas (Ayala et al., 2002).

O estabelecimento de metodologias adequadas, seguras e econômicas para detecção, identificação e quantificação de sementes de plantas GM em lotes convencionais continua a ser um desafio (ISTA, 2001). Reconhecendo a importância dos novos mercados e dos produtos geneticamente modificados, a Tecnologia de Sementes terá que assegurar a pureza genética dos novos produtos da biotecnologia, a fim de evitar causas judiciais devido à incorreta identificação de variedades. Nesse contexto, os objetivos do trabalho foram verificar a eficiência dos bioensaios na detecção e quantificação de misturas de sementes de soja GM em amostras de sementes convencionais.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho de pesquisa foi realizado na Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, Universidade Federal de Pelotas. Foram conduzidos dois ensaios, o primeiro visando à detecção de mistura na amostra e o segundo, à quantificação da mistura presente na amostra.

A caracterização inicial dos lotes consistiu em determinação do grau de umidade, teste de germinação, primeira contagem de germinação e peso de mil sementes,

segundo Brasil (1992). O herbicida glifosato usado foi o produto comercial Roundup® original de formulação contendo 480gL⁻¹ de sal de isopropilamina de N-(fosfonometil) glicina, 360gL⁻¹ do equivalente ácido (e.a.) de N-(fosfonometil) glicina (GLYPHOSATE) e 684gL⁻¹ de ingredientes inertes.

ENSAIO 1: foram utilizadas sementes das cultivares OC 14 (não-GM) e CD 213 (GM), provenientes da safra 2002/2003. Setenta e duas amostras de 100 sementes foram elaboradas sem o conhecimento do analista:

- Dezoito amostras convencionais (nenhuma semente GM adicionada);

- Cinquenta e quatro amostras com mistura, apresentando sementes de soja GM adicionadas à amostra convencional em proporções estabelecidas, em número, de 1, 3 e 5%.

Para possibilitar a execução dos estudos de detecção e quantificação, folhas de papel germitest foram colocadas sobre bandejas plásticas (38 x 25 x 7 cm), umedecidas com solução de herbicida ou água equivalente a duas vezes e meia o peso do papel. Cada amostra foi instalada em quatro bandejas com vinte e cinco sementes, devidamente espaçadas, cuja distribuição foi esquematizada em um croqui que demarcava a posição das sementes de soja GM presentes na amostra.

As amostras foram submetidas aos seguintes bioensaios baseados no teste de germinação (Brasil, 1992):

Bioensaio 1 – Pré-embebição das sementes em substrato umedecido com solução de herbicida

As amostras (duas subamostras de 50 sementes) foram pré-embebidas em papel germitest umedecido com solução 0,6% do e.a. do herbicida por 16 horas a 25°C. Após, foram transferidas para substrato umedecido com água destilada e mantidas em germinador regulado a 25°C (Tillmann & West, 2004).

Bioensaio 2 – Substrato umedecido com solução de herbicida

As amostras foram semeadas diretamente no substrato umedecido com solução 0,03% do e.a. do herbicida, permanecendo nesta condição durante todo o período do teste, em germinador a 25°C (Cunha, 2004).

Bioensaio 3 - Imersão das sementes em solução de herbicida

As sementes foram imersas em solução 0,06% do e.a. do herbicida por uma hora a 25°C. Depois, foram lavadas em água corrente, semeadas em substrato umedecido com água destilada e mantidas em germinador regulado a 25°C (Tillmann & West, 2004).

Seis dias após a instalação, avaliaram-se os seguintes parâmetros: comprimento de hipocótilo, comprimento de raiz,

número de raízes secundárias e comprimento da maior raiz secundária, determinando se a plântula era GM ou não (Tillmann & West, 2004). No caso de sementes mortas e plântulas com características de difícil avaliação, testou-se a aplicação individual do *kit* para *Roundup Ready* (tiras de fluxo lateral que detectam a proteína CP4EPSPS) e a avaliação sem o uso do *kit*.

ENSAIO 2: o bioensaio de pré-embebição das sementes em substrato com herbicida foi adotado, sendo instalado tanto em folhas de papel germitest nas bandejas plásticas quanto em rolos de papel. Foram utilizadas sementes das cultivares CD 201 (não-GM) e CD 214 (GM) da safra 2003/2004. Sessenta amostras de 100 sementes por substrato foram previamente preparadas por uma segunda pessoa, sem o conhecimento do analista:

- doze amostras convencionais (nenhuma semente GM adicionada);

- quarenta e oito amostras com sementes convencionais substituídas por sementes de soja GM, nas proporções, em número, de 1, 3, 5 e 8%.

Nas bandejas plásticas, a instalação procedeu de modo semelhante ao ensaio 1. Cada amostra foi dividida em quatro bandejas com vinte e cinco sementes. Em rolos de papel, testou-se o número de sementes adequado por rolo, cada amostra foi dividida em duas subamostras de cinquenta sementes ou quatro subamostras de vinte e cinco sementes. O restante dos procedimentos de instalação e avaliação foi similar à primeira parte do experimento.

Detecção de mistura na amostra

Os resultados foram indicados como presença ou ausência de sementes de soja geneticamente modificada (GM) em meio às convencionais (não-GM). Apresentados como porcentagem de acertos e erros (falso positivo e falso negativo).

Quantificação da mistura presente na amostra

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

$$\% \text{ GM} = \frac{\text{GM}}{\text{GM} + \text{nGM}} \times 100, \text{ onde}$$

GM e nGM representam o número de sementes de soja GM e não, respectivamente.

Ao utilizar o *kit*, todas as sementes da amostra foram avaliadas e os resultados expressos em número de sementes GM contida na amostra, equivalendo à porcentagem de

sementes de soja GM em cem sementes utilizadas por amostra.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados médios obtidos nos testes de germinação, primeira contagem de germinação e peso de mil sementes mostraram a superioridade da qualidade das sementes dos lotes das cultivares OC14 e CD 201 relativamente às sementes da CD 213 e CD 214. Os lotes apresentaram graus de umidade similares, o que permitiu inferir que este parâmetro não interferiu no resultado dos demais testes.

A ausência do crescimento de raízes secundárias consistiu no principal parâmetro para diferenciação de plântulas susceptíveis e resistentes ao herbicida permitindo classificá-las com facilidade, concordando com Goggi & Stahr (1997), Funghetto et al. (2004), Cunha (2004) e Tillmann & West (2004).

Detecção de mistura na amostra

Todos os procedimentos de bioensaios estudados permitiram detectar a presença de sementes de soja GM em meio às convencionais nas amostras com contaminação superior a 1%, apresentando 100% de acertos (Tabela 1). Quanto menor a porcentagem de mistura presente na amostra, maior a dificuldade de detecção, o que pode ser explicado através da probabilidade matemática: quando há maior número de sementes de soja GM na amostra (3 e 5%, em questão) é maior a probabilidade da detecção de pelo menos uma dessas sementes do que quando se tem apenas uma GM entre as não-GM.

A capacidade de identificar amostras contaminadas com 0 ou 1% de sementes de soja GM variou para cada procedimento de bioensaio. A Tabela 1 mostra os resultados observados quando estes foram instalados em bandejas plásticas, demarcando-se as posições das sementes pelo croqui. O procedimento de pré-embebição apresentou melhor resultado, 94% de acertos e 6% de falso positivo, isto é, as amostras não possuíam nenhuma semente GM e foram classificadas como tendo a presença desta. O bioensaio em substrato umedecido apresentou 92% de acertos e 8% de resultados falso negativo, ou seja, considerou-se amostras que continham sementes de soja GM como convencionais. A imersão das sementes em solução de herbicida permitiu a menor detecção entre os bioensaios, apenas 67% de seus resultados foram de acertos e 33%, falso positivo.

Para as sementes que não germinaram ou não apresentaram características típicas de plântulas de soja GM e não-GM, testou-se o *kit* de identificação de organismos

GM (*lateral flow strips*), individualmente para cada semente morta ou com característica duvidosa. Esperava-se que o uso do *kit*, na identificação das sementes, elevasse a porcentagem de acertos na detecção, porém tal expectativa não se concretizou e os resultados se mantiveram semelhantes aos expostos na Tabela 1, sem nenhuma alteração. Esse fato pode ser explicado pela alta qualidade dos lotes empregados, que apresentaram baixa porcentagem de sementes mortas e plântulas anormais. Dessa forma, salienta-se a importância do bom conhecimento das características das plântulas de soja GM e não-GM por parte do analista, aliado à eficiente treinamento no laboratório.

A Tabela 2 evidencia a precisão e exatidão dos resultados conseguidos pelo procedimento de pré-embebição das sementes, instalado em bandejas e em rolos de papel com 25 e 50 sementes, mesmo em amostras com contaminação igual a 0 e 1% de sementes de soja GM, a porcentagem de acertos manteve-se superior a 91%, destacando-se sua instalação em bandejas com 25 sementes e rolo de papel com 25 sementes (100% de acertos). Todavia, para as amostras compostas por mais de 1% de sementes de soja GM, todos os procedimentos de pré-embebição foram eficientes, atingindo 100% de acertos na detecção de sementes GM.

TABELA 1. Porcentagem de acertos na detecção de sementes de soja GM em 72 amostras convencionais contaminadas com 0, 1, 3 e 5% nos bioensaios de pré-embebição, substrato umedecido e imersão, instalados em bandejas plásticas com 25 sementes

BIOENSAIOS	Mistura de 0 e 1%		Mistura de 3 e 5%
	% de acertos	% de erros	% de acertos
Pré - embebição	94	06 (falso positivo)	100
Substrato umedecido	92	08 (falso negativo)	100
Imersão	67	33 (falso positivo)	100

TABELA 2. Porcentagem de acertos na detecção de sementes de soja GM em 60 amostras convencionais contaminadas com 0, 1, 3, 5 e 8% no bioensaio de pré-embebição instalado em bandejas plásticas com 25 sementes (BP25), rolo de papel com 25 sementes (RP25) e rolo de papel com 50 sementes (RP50)

PRÉ-EMBEBIÇÃO	Mistura de 0 e 1%		Mistura de 3, 5 e 8%
	% de acertos	% de erros	% de acertos
BP25	100	00	100
RP25	100	00	100
RP50	92	08 (falso positivo)	100

A presente pesquisa confirma que os bioensaios representam eficiente alternativa na detecção de sementes de soja GM, com 100% de acertos, sendo o teste preciso e exato. A *International Seed Testing Association* já realizou dois testes de proficiência para determinar a habilidade dos laboratórios em detectar a presença de sementes de soja GM em amostras de sementes convencionais de milho; no primeiro 69,8% dos participantes foram capazes de identificar corretamente todas as amostras e, no segundo, 85% (ISTA, 2003a; ISTA, 2003b). Foi permitido aos laboratórios usarem seus próprios métodos de avaliação e aqueles que optaram pelos bioensaios, 100% detectaram corretamente a presença do material GM, mostrando eficiência superior aos testes mais sofisticados (ISTA, 2003a).

Quantificação da mistura presente na amostra

A quantificação de sementes de soja GM, contrariamente ao observado no estudo de detecção, apresenta maior

dificuldade quanto maior for a porcentagem de contaminantes na amostra, pois há maior probabilidade de que uma dessas sementes não germine ou cause erro na avaliação.

A presença de sementes mortas e plântulas anormais nas amostras representam as mais significativas fontes de erro dos resultados nos bioensaios, de forma que Goggi & Stahr (1997) e Gutormson (2000) não as consideraram no cálculo da quantificação do material GM da amostra, servindo como fator de correção na porcentagem de sementes de soja GM avaliadas. Por apresentar fórmula mais simplificada, seguiu-se a de Goggi & Stahr (1997).

Em amostras convencionais sem contaminação, o bioensaio de substrato umedecido foi o mais eficiente na quantificação, amostras contaminadas com 1 e 5% de soja GM foram corretamente quantificadas através da pré-embebição e ambos bioensaios avaliaram certo amostras contendo 3% de sementes de soja GM. O método de imersão

mostrou resultados insatisfatórios de ampla variabilidade, independentemente da porcentagem de sementes de soja GM presente na amostra. De maneira geral, a pré-embebição demonstrou maior capacidade em estimar a porcentagem de sementes de soja GM adicionadas às convencionais (Figura 1).

Testando o uso das tiras de fluxo lateral (*kit*) em cada semente morta ou plântula com característica duvidosa como auxílio na classificação, obteve-se alteração dos resultados anteriores (Figuras 1 e 2).

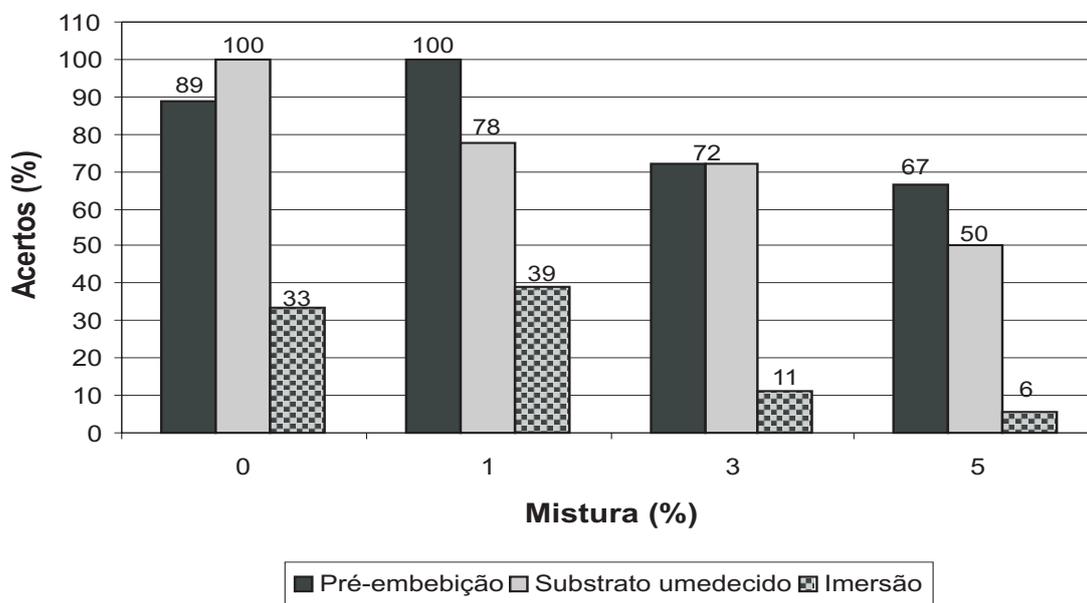


FIGURA 1. Porcentagem de acertos na quantificação de sementes de soja GM (contaminações de 0, 1, 3 e 5%) em 72 amostras convencionais, sem auxílio do *kit*, nos bioensaios instalados em bandejas plásticas com 25 sementes.

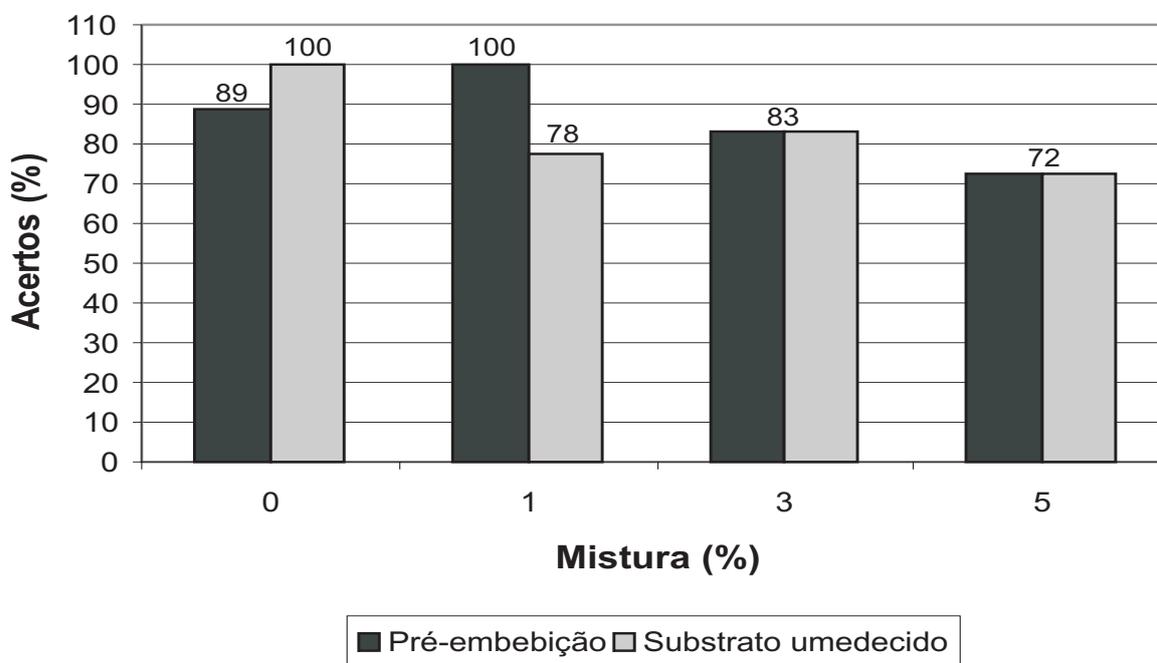


FIGURA 2. Porcentagem de acertos na quantificação de sementes de soja GM (contaminações de 0, 1, 3 e 5%) em 72 amostras convencionais, com auxílio do *kit*, nos bioensaios instalados em bandejas plásticas com 25 sementes.

Apesar de o procedimento de pré-embebição ter apresentado diferença entre os resultados sem e com *kit*, sua execução não compensa, uma vez que é mais complicada e o *kit* torna-o caro. Entretanto, no procedimento de substrato umedecido, a porcentagem de acertos para as contaminações de 3 e 5% subiu mais de 10 pontos percentuais (Figuras 1 e 2). O auxílio do *kit* no método de imersão não foi adotado por causa da ampla dispersão dos valores de misturas obtida inicialmente, o que tornaria o teste oneroso e inviável. Desse modo, pode-se afirmar que os bioensaios de pré-embebição sem e com auxílio do *kit* nas avaliações e substrato umedecido com auxílio do *kit* foram eficientes em quantificar a mistura do material GM em não-GM (Figuras 1 e 2).

A utilização da equação para cálculo do material GM da amostra que desconta sementes mortas e plântulas anormais é de fácil aplicação nos laboratórios, fornece a porcentagem de sementes de soja GM estimada da amostra, segue as regras internacionais, o que torna fácil a padronização do procedimento, mesmo que na presente pesquisa não tenha corrigido os resultados devido a alta porcentagem de germinação dos lotes e ao baixo número de sementes (100) que compunha as amostras analisadas. Enquanto que na aplicação do *kit*, todas as sementes da amostra são avaliadas, ocasionando erros mais expressivos nos resultados.

Empregando-se a tolerância de 1% no presente trabalho, que corresponde a uma semente em cem (número de sementes analisadas por amostra), a superioridade do bioensaio de pré-embebição sem e com o uso do *kit* estaria confirmada com 100% de acertos na quantificação de sementes de soja GM (Figura 3). O estabelecimento de um limite de tolerância é capaz de minimizar possíveis fontes de erro nos bioensaios, tais como, probabilidade da presença de sementes mortas e ocorrência de plântulas não caracterizada adequadamente, preparo e manuseio da solução de herbicida, instalação do teste e regulagem da temperatura do germinador (Miranda et al., 2004).

Para o segundo ensaio foi adotado o procedimento de pré-embebição por ter apresentado os melhores resultados entre os bioensaios. Visando a padronização, foram utilizadas bandejas plásticas e rolos de papel. Considerando que a maior dificuldade na quantificação estava em amostras contaminadas por sementes de soja GM em nível superior a 1%, estabeleceu-se outra porcentagem de contaminação (8%).

Nesta fase, observou-se tendência semelhante à anterior, sendo mais fácil a quantificação de menor número de sementes de soja GM em amostras não-GM. A eficiência do bioensaio da pré-embebição instalada em rolo de papel também ficou

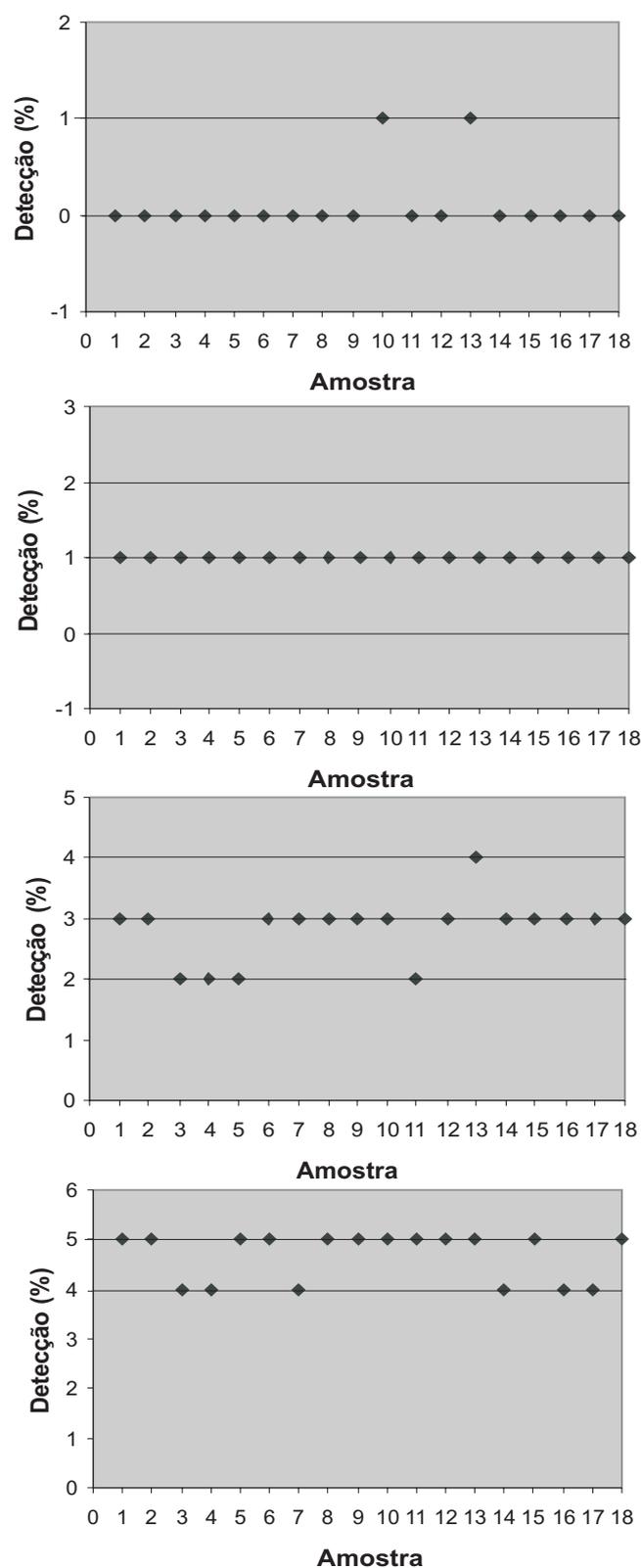


FIGURA 3. Pré-embebição sem uso do *kit*: porcentagem de detecção de soja GM, contaminação de (a) 0%; (b) 1%; (c) 3%; (d) 5% em amostras convencionais, com 1% de tolerância nas avaliações.

condicionada ao número de sementes colocadas por rolo. No rolo com 25 sementes, 100% dos resultados foram de acertos nas porcentagens de contaminação de 0 e 1%, 75% de acertos com 3 e 5% e 25% com mistura de 8%. No rolo com 50 sementes houve resultado satisfatório apenas em amostras contendo 0 e 1% de mistura e nas outras, os acertos foram inferiores a 50%. A instalação em bandejas com 25 sementes manteve a totalidade de acertos para as porcentagens de sementes de soja GM de 0, 1 e 3%, em mistura de 5% foram acertados 75% dos resultados e com 8% de contaminação, 25% de acertos (Figura 4).

Empregando-se o limite de tolerância nas avaliações adotado por Miranda et al. (2004) nestes resultados, a pré-embebição com instalação em bandejas com 25 sementes apresentou 100% dos resultados corretos, independentemente

da porcentagem de mistura das amostras (Figura 5). A Figura 6 mostra que em rolo de papel com 25 sementes, têm-se resultados semelhantes, exceto nas amostras contendo 5% de contaminantes, onde os acertos alcançam 92%. Em rolo de papel de 50 sementes atingiu-se 100% de acertos na quantificação de amostras com 0 e 1% de mistura, em amostras contendo 3% de sementes de soja GM, a porcentagem de acertos correspondem a 92% e em misturas superiores a esse valor, os acertos alcançaram menos que 50%.

Assim, o bioensaio de pré-embebição, instalado em bandejas plásticas e em rolos de papel com 25 sementes, apresentou precisão de 100% de acertos na detecção de misturas e quantificação exata da presença de até 3% de mistura de sementes de soja GM em amostras convencionais.

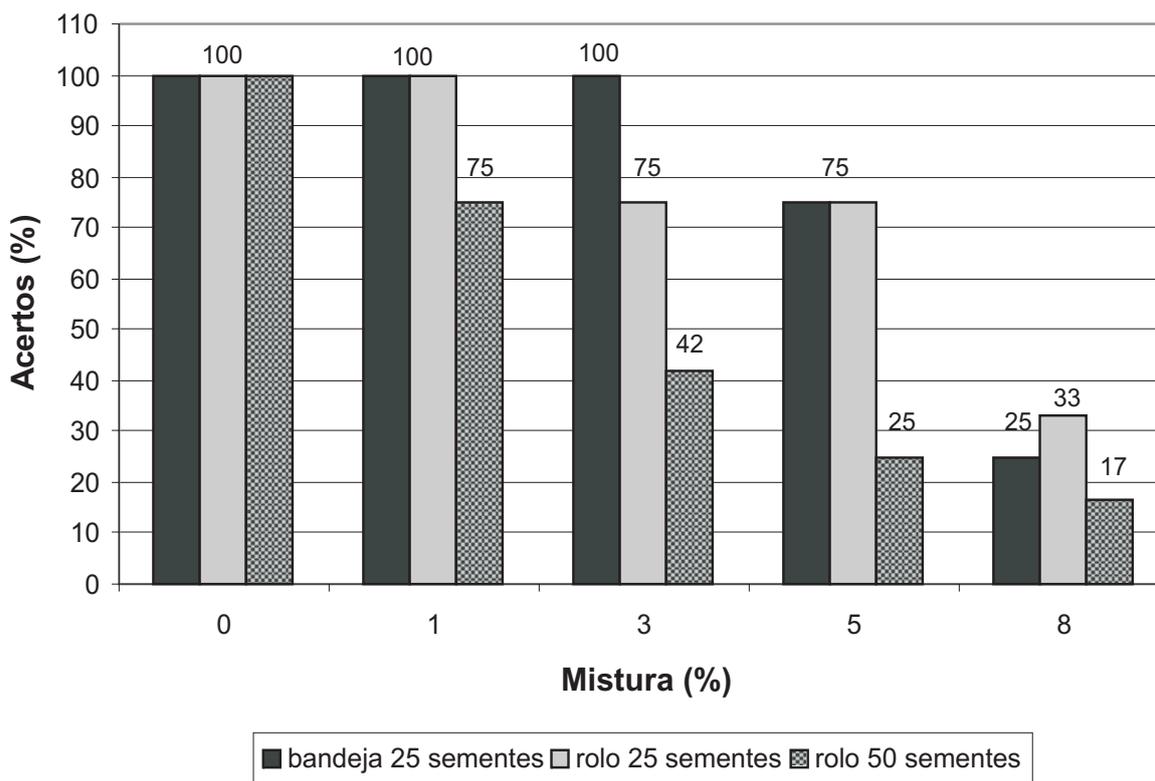


FIGURA 4. Porcentagem de acertos na quantificação de sementes GM (contaminações de 0, 1, 3, 5 e 8%) em 60 amostras convencionais, no bioensaio de pré-embebição instalado em bandejas plásticas com 25 sementes, rolo de papel com 25 sementes e rolo de papel com 50 sementes.

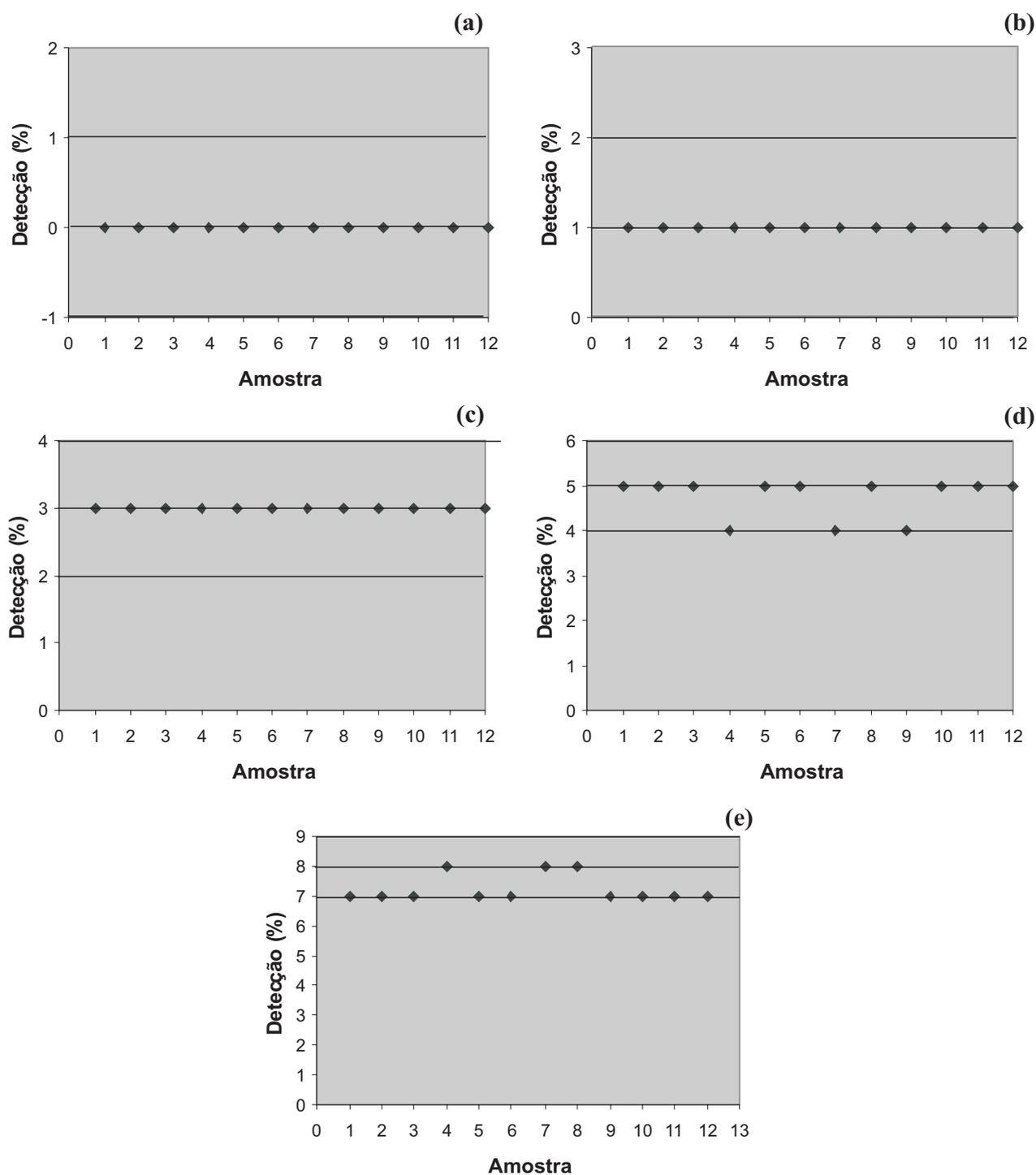


FIGURA 5. Pré-embebição instalado em bandejas plásticas com 25 sementes: porcentagem de detecção de sementes de soja GM, contaminações de (a) 0%; (b) 1%; (c) 3%; (d) 5%; (e) 8% em amostras convencionais, com 1% de tolerância nas avaliações.

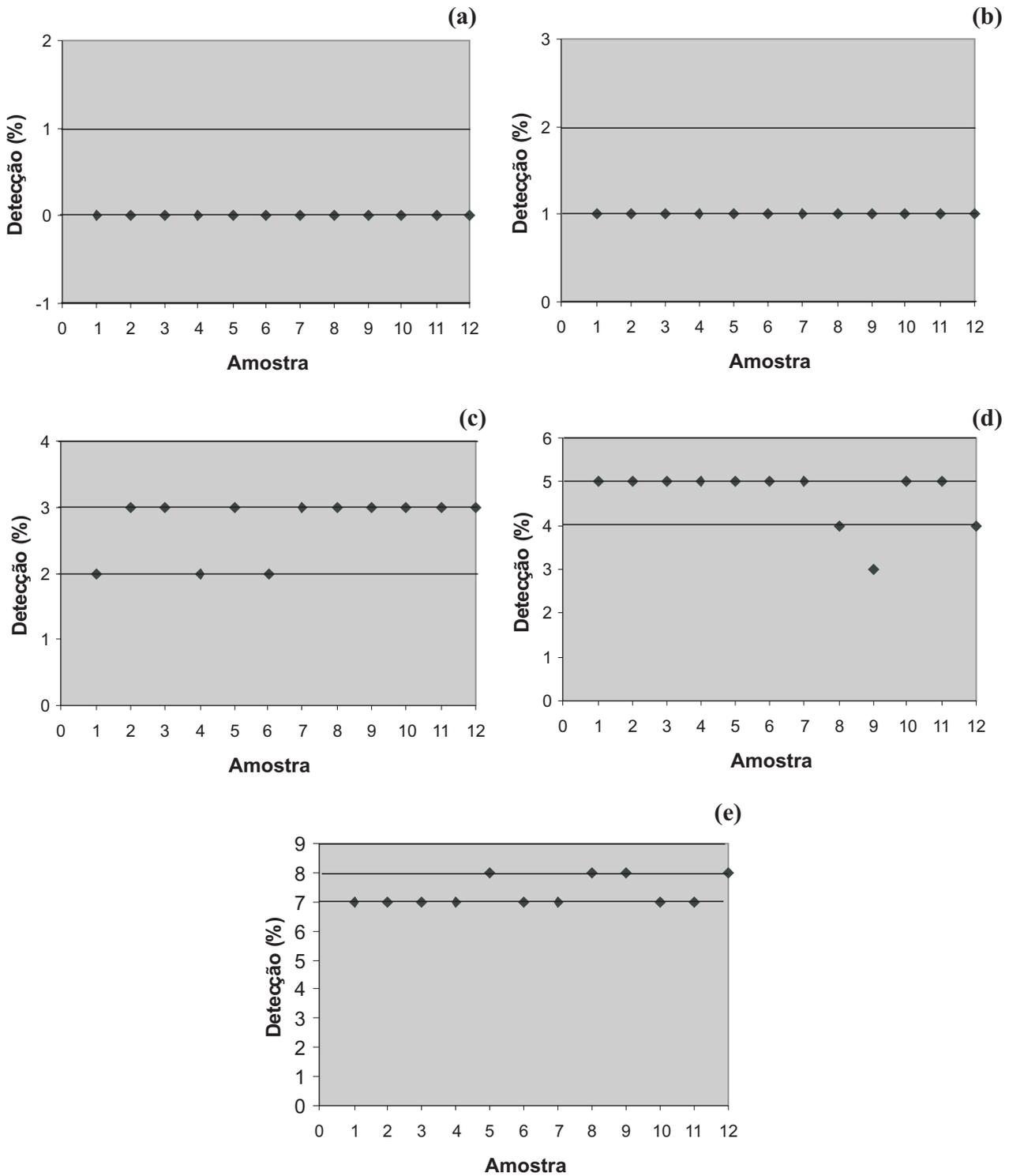


FIGURA 6. Pré-embebição instalado em rolo de papel com 25 sementes: porcentagem de detecção de sementes de soja GM, contaminações de (a) 0%; (b) 1%; (c) 3%; (d) 5%; (e) 8%, em amostras convencionais, com 1% de tolerância nas avaliações

CONCLUSÕES

O bioensaio de pré-embebição, instalado em bandejas plásticas e rolos de papel com 25 sementes, é eficiente para detecção e quantificação da presença de sementes de soja GM em amostras convencionais e permite 100% de acertos na detecção de sementes de soja GM em amostras convencionais. Apresenta exatidão na quantificação da presença de até 3% de sementes de soja GM em amostras convencionais e precisão condicionada ao porcentual de mistura presente na amostra.

REFERÊNCIAS

- ABLIN, E.R.; PAZ, S. Rumo à rastreabilidade no mercado mundial de soja: um novo olhar sobre a lei de oferta e procura. **Revista Brasileira de Comércio Exterior**. Disponível em: <<http://www.funccex.com.br>>. Acesso em: 18 abr. 2004.
- AYALA, L.; TILLMANN, M.A.A.; DODE, L.B.; VILLELA, F.A.; MAGALHÃES, A.M.; SILVA, M.P. Tetrazolium test for identification 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.
- BERTRAM, M.G.; PEDERSEN, P. Adjusting management practices using glyphosate-resistant soybean cultivars. **Agronomy Journal**, Madison, v.96, n.2, 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, 2001. 67p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/ DNDV/ CLAV, 1992. 365p.
- 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: 17 mai. 2004.
- CUNHA, C.S.M. **Comparação de métodos na detecção de sementes de soja geneticamente modificada, tolerante ao glifosato**. 2004. 24f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Sementes) - Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel", Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2004.
- DELLA VECCHIA, P.T.; SILVA, C.A.R.; TERCENIANO-SOBRINHO, P. Use of molecular marker techniques in seed testing by Brazilian seed companies. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.55, número especial, p.79-81, 1998.
- 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, n.2, p.404-407, 2001.
- GAZZIERO, D.L.P.; PRETE, C.E.C. Resistência é a Questão. **Revista Cultivar**, Porto Alegre, n.4, p.22-24, 2004.
- GAZZIERO, D. L. P.; KARAM, D.; VOLL, E.; VALL, W. C.; YORINORI, J. T.; CORREA, B. S. Biologia e manejo integrado de plantas daninhas na cultura da soja. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO SUL, 22., 1994, Cruz Alta. **Resumos...** Cruz Alta: [s.n.], 1994. p. 81.
- GOGGI, A.S.; STAHR, M.G. Roundup™ pre-emergence treatment to determine the presence of the Roundup Ready™ gene in soybean seeds: a laboratory test. **Seed Technology**, Kentucky, v.19, n.1, p.99-102, 1997.
- HUFFMANN, W.E. Production, identify preservation and labeling in a marketplace with genetically modified and non-genetically modified foods. **Plant Physiology**, Wellesbourne, v.34, n.1, p.3-10, 2004.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. **Position paper on ISTA's strategy regarding methods for the detection, identification and quantification of genetically modified seeds in conventional seed lots**, Zürich: ISTA, version I, 2001.
- 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 on *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**: 2005. Ithaca: ISAAA, 2005.
- KNAKE, E. L. Weed control for soybean in the nineties. In: COPPING, L.G.; GREEN, N. B.; REES, R. T. (Ed.). **Pest management in soybean**. London: SCI, 1992. p. 360-367.
- MIRANDA, D.M.; TILLMANN, M.A.A.; BALERINI, F.; VILLELA, F.A. Bioensaios na detecção e quantificação de sementes de soja geneticamente modificada em amostras convencionais de sementes. In: SEMINÁRIO PANAMERICANO DE SEMILLAS, 19., 2004, Asunción. **Anais...** Asunción: FELAS, 2004. p.342.
- NORDIC COUNCIL OF MINISTERS. **Control of GMO content in seed and feed – possibilities and limitations**. Copenhagen: TemaNord 541, 2004. 74p.
- PESSANHA, L.D.R.; WILKINSON, J. Transgênicos provocam novo quadro regulatório e novas formas de coordenação do sistema agroalimentar. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v.20, n.2, p.263-303, 2003.
- REDDY, K.N. Glyphosate-resistant soybean as a weed management tool: opportunities and challenges. **Weed Biology and Management**, Japan, v.1, n.4, p.193-203, 2001.
- 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.

