

NOTA CIENTÍFICA

BIOENSAIO EM CASA-DE-VEGETAÇÃO NA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE SEMENTES DE SOJA GENETICAMENTE MODIFICADA¹

DENISE MEZA DE MIRANDA², MARIA ÂNGELA ANDRÉ TILLMANN³, JOSÉ ALBERTO NOLDIN⁴, FÁBIO BALERINI⁵

RESUMO – Preocupações com os atributos intrínsecos e extrínsecos de qualidade nos alimentos têm crescido nas últimas décadas e a polêmica acirrou-se com a entrada no mercado dos alimentos geneticamente modificados (GM) de consumo global. Esta situação tem levado institutos de pesquisa, agências de inspeção e companhias de vários países a desenvolver estratégias e métodos para detecção de sementes de plantas GM. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência de bioensaio em casa-de-vegetação na detecção e quantificação de misturas de sementes GM em amostras convencionais. Amostras de sementes convencionais foram preparadas com 0, 1, 3 e 5% de sementes de soja GM e semeadas em bandejas plásticas contendo areia peneirada. As bandejas foram mantidas em casa-de-vegetação climatizada e, após quinze dias da instalação do experimento, aplicou-se o herbicida glifosato sobre as plântulas. Catorze dias depois da aplicação do herbicida, avaliou-se o número de plântulas sobreviventes, sem sintomas da ação do glifosato, determinando se a plântula era ou não geneticamente modificada. O bioensaio em casa-de-vegetação é eficiente para detecção e estimativa da quantidade de sementes de soja GM em amostras de soja convencional.

Termos para indexação: soja transgênica, glifosato, resistência a herbicidas.

GREENHOUSE BIOASSAY TO DETECT AND QUANTIFY GENETICALLY MODIFIED SOYBEAN SEEDS

ABSTRACT - Concerns with the intrinsic and extrinsic quality attributes in foods have been growing in the last decades and the controversy was incited with the entrance of genetically modified foods on the global consumer market. Research institutes, inspection agencies and companies in several countries have developed strategies and methods to detect GM seeds. In this context, the objective of this experiment was to verify the efficacy of greenhouse bioassays to detect and quantify GM soybean seeds mixtures in conventional seeds samples. Conventional seeds samples were prepared with 0, 1, 3 and 5% of GM soybean seeds and sown in plastic trays containing sifted sand. The trays were maintained in an acclimatized greenhouse and, after fifteen days, the herbicide glyphosate was applied to the seedlings. Fourteen days after the herbicide application, the number of surviving seedlings was recorded. The greenhouse bioassay was efficient in detecting and estimating the quantity of GM soybean seeds in conventional soybean samples.

Index terms: transgenic soybeans, glyphosate, herbicide resistance.

¹Submetido em 18/10/2004. Aceito para publicação em 30/08/2005;

²Eng. Agr., MSc., Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas – RS, denise.miranda@ufpel.edu.br;

³ Prof. Adjunta Dra., Departamento de Fitotecnia, FAEM/UFPEL, bolsista CNPq;

⁴ Pesquisador, PhD, Epagri, Itajaí – SC;

⁵ Aluno de graduação em Agronomia, bolsista do CNPq.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor de soja, produzindo cerca de 20% da soja mundial. A soja exerce papel fundamental na história da agricultura brasileira, com participação de 51% do total produzido no mundo e tem importância estratégica não apenas no suprimento da demanda mundial de óleos vegetais, mas também, na oferta de proteínas para a produção de carnes (Arias, 2004).

O controle de plantas daninhas representa um dos itens que mais oneram o produtor, variando de 15 a 40% do custo total com insumos (Gazziero et al., 1994). A presença de plantas daninhas no campo de cultivo pode reduzir a produtividade em mais de 50%; ocasionar implicações na qualidade do material como a redução no tamanho das sementes, gerando contaminações com material potencialmente tóxico ou não palatável ou causando clorose nos grãos; como também podem favorecer o ataque de insetos e doenças e aumentar as perdas na colheita.

As ferramentas recentemente disponibilizadas em biotecnologia promoveram um incremento do escopo de produtos a serem gerados. A quebra das barreiras reprodutivas, permitindo a troca de genes entre espécies distintas, possibilitou o desenvolvimento de novos produtos com qualidades e características nunca antes possível seguindo os métodos tradicionais, chamados de organismos geneticamente modificados ou transgênicos – GM (Arias, 2004). Até o momento, a principal característica inserida nas culturas é a que confere resistência a determinados herbicidas.

O primeiro sucesso mundial de cultura resistente aos herbicidas foi obtido com a soja, através do gene que confere insensibilidade à enzima EPSPS. Esse gene é denominado CP4 e provém de bactéria de solo do gênero *Agrobacterium*. A produtividade, morfologia e constituição das cultivares de soja GM permaneceram iguais às susceptíveis correspondentes. Genótipos de soja portadores deste gene, tratadas com glifosato, nas doses comerciais, não apresentam sintomas de fitotoxicidade ou redução de produtividade e qualidade do produto, viabilizando seu uso comercial (Trezzi et al., 2001).

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 é o maior fornecedor de soja convencional

no mercado internacional (Pessanha e Wilkinson, 2003).

Grande fonte de risco desse sistema de segregação consiste nos testes de detecção utilizados porque nenhum apresenta absoluta exatidão (Huffmann, 2004). A produção mundial de sementes de espécies GM atingiu proporções significativas, levando institutos de pesquisa, agências de inspeção e companhias de vários países a desenvolver estratégias e métodos para detecção de sementes de plantas GM. Embora diversas pesquisas tenham sido conduzidas com o objetivo de detectar culturas GM, não há um método padronizado (Cunha et al., 2005).

Os métodos analíticos de detecção 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 presentes em sementes de plantas 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 as análises: qualitativa (detecção e identificação) e quantitativa através do PCR competitivo e do PCR em tempo real. Os procedimentos utilizados para a determinação ou quantificação de organismos GM são onerosos, demandam equipamentos e pessoal altamente tecnificado, levando à necessidade do desenvolvimento de novas alternativas que envolvam testes práticos, eficazes, de baixo custo e fácil execução pelos laboratórios, simplificando sua adoção na rotina de detecção de sementes de plantas GM (Miranda et al., 2005).

O teste de resistência a herbicidas conduzido em conjunto com o teste padrão de germinação, denominado bioensaio, pode seguir as metodologias de substrato umedecido, imersão das sementes em solução de herbicida, pré-embebição em substrato com herbicida, em sistema hidropônico e pulverização de plântulas em laboratório ou casa-de-vegetação.

O objetivo do trabalho foi verificar a eficiência do bioensaio de aspersão de plântulas em casa-de-vegetação na detecção e quantificação de misturas de sementes de soja GM em amostras de sementes convencionais.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido em casa-de-vegetação do Departamento de Fitotecnia, Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, da Universidade Federal de Pelotas. Foram utilizadas duas cultivares de soja, cada uma representada por um lote de sementes, sendo uma convencional (OC 14) e uma parental

geneticamente modificada para a resistência ao herbicida glifosato, CD 213, produzidos na safra 2002/2003.

A caracterização inicial dos lotes consistiu em determinação do grau de umidade, teste de germinação, primeira contagem de germinação e peso de mil sementes (Brasil, 1992). O herbicida glifosato usado foi o produto comercial Roundup, 360g.L⁻¹ do equivalente ácido (e.a.) de N-(fosfometil) glicina (GLYPHOSATE) e 684g.L⁻¹ de ingredientes inertes.

Foram conduzidos dois ensaios, o primeiro visando à detecção de mistura na amostra e o segundo, à quantificação da mistura presente na amostra. Quarenta e oito amostras de 100 sementes foram elaboradas sem o conhecimento do analista:

- doze amostras convencionais (nenhuma semente de soja GM adicionada);
- trinta e seis amostras com mistura, onde sementes de soja GM foram adicionadas à amostra convencional nas proporções de 1, 3 e 5%.

Cada amostra foi instalada em duas bandejas com cinquenta sementes, devidamente espaçadas, cuja distribuição foi esquematizada em um croqui que demarcava a posição das sementes de soja GM presentes na amostra (Figura 1). A

total imparcialidade nas avaliações foi mantida por parte do analista, uma vez que a substituição das sementes 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 a conferência dos resultados.

As duas sub-amostras de cinquenta sementes foram semeadas em bandejas plásticas (38x25x7cm) contendo 3kg de areia peneirada e cobertas por 1kg de areia. As bandejas foram mantidas em casa-de-vegetação climatizada e, após quinze dias da instalação do experimento, aplicou-se sobre as plantas o herbicida glifosato, na dose de 4L.ha⁻¹ e volume de calda de 150L.ha⁻¹. Aos catorze dias após a aplicação do herbicida, avaliou-se o número de plântulas sobreviventes, sem sintomas da ação do glifosato, determinando se a plântula era geneticamente modificada ou não.

Detecção de mistura presente 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 resultados corretos, falso positivo (detecção da presença de sementes de soja GM em amostras sem contaminação) e falso negativo (detecção da ausência de sementes de sementes de soja GM em amostras com contaminação).

		X							
					X				

			X						
		X						X	

FIGURA 1. Exemplo do croqui de uma amostra contendo 5% de sementes de soja GM.

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 e Stahr (1997), excluindo-se as plântulas anormais e sementes mortas:

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

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1, encontram-se os dados médios obtidos nos testes de germinação, primeira contagem de germinação, peso de mil sementes e determinação do grau de umidade. Os resultados mostram a superioridade da qualidade das sementes do lote da cultivar OC 14 comparativamente às sementes da CD 213. Os lotes apresentaram teores de água similares, o que permitiu afirmar que este parâmetro não interferiu no

TABELA 1. Valores médios dos testes de germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), peso de mil sementes (P1000) e grau de umidade (U) de sementes de soja das duas cultivares utilizadas. Pelotas, 2004.

Cultivar	Testes			
	G (%)	PCG (%)	P1000 (g)	U (%)
OC 14	95	92	125,0	12,6
CD 213	87	84	128,0	13,0

resultado dos testes.

A detecção e quantificação de plântulas provenientes de sementes de soja GM foram realizadas através de observação visual das características morfológicas apresentadas. O “amarelecimento” dos meristemas, com ênfase no trifólio mais jovem da plântula, consistiu no principal parâmetro para diferenciação entre plântulas susceptíveis e resistentes ao herbicida, o que se explica, uma vez que logo após a aplicação, os inibidores da EPSPS reduzem a importação de assimilados por folhas jovens em desenvolvimento (Kruse et al., 2000). As plantas tratadas com glifosato paralisam seu crescimento e murcham, posteriormente ficam cloróticas e necrosadas, levando à morte do vegetal, de acordo com Trezzi et al. (2001).

No campo, após a aplicação do glifosato, algumas plantas podem levar até três semanas para morrer. Provavelmente esta lenta ação, reflete o tempo necessário para a redução da fonte de aminoácidos aromáticos que causariam taxas reduzidas na síntese de proteínas. Este fato pode justificar a não constatação da morte de plântulas de soja GM aos catorze dias após a aplicação do glifosato no presente experimento. Apesar de não ter ocorrido a mortalidade das plântulas aos 14 dias após a aplicação do herbicida, o bioensaio em casa-de-vegetação permitiu detectar a presença de sementes de soja GM misturadas às convencionais nas amostras contaminadas com mais de 1%, apresentando 100% de acertos e, em amostras com contaminação igual ou inferior a este valor, obtiveram-se 92% de acertos e 8% de resultados falso negativo, ou seja, considerou-se plântulas de soja GM como convencionais (Tabela 2).

Os resultados obtidos concordam com Miranda et al. (2005) que ao avaliar a eficiência dos bioensaios de pré-embebição, substrato umedecido e imersão das sementes contendo solução herbicida na detecção de soja GM, verificaram que apenas em amostras cuja contaminação excedeu a 1% foi possível obter 100% de resultados corretos. Segundos os autores quanto menor a porcentagem de mistura

TABELA 2. Porcentagem de acertos na detecção de sementes de soja GM em 48 amostras convencionais contaminadas com 0, 1, 3 e 5% de sementes de soja GM. Pelotas, 2004.

% de mistura	% de detecção	Falso positivo	Falso negativo
0 e 1	92	-	8
3 e 5	100	-	-

presente na amostra, maior a dificuldade de detecção, pois se há maior número de sementes de soja GM na amostra é mais provável que ocorra detecção de pelo menos uma dessas sementes. Todavia, Bertagnolli (2005) estudando o bioensaio em sistema hidropônico, relatou que, independentemente, da porcentagem de sementes de soja GM na amostra, alcançou a totalidade de resultados corretos na detecção, sem resultados falsos positivos ou falsos negativos.

No presente experimento os resultados dos acertos foram superiores a 92%, reafirmando os bioensaios como eficientes alternativas na detecção de sementes de soja GM, se comparados aos resultados obtidos nos dois testes de proficiência para determinar a habilidade dos laboratórios em detectar misturas em amostras de sementes de milho GM realizados pela *International Seed Testing Association*. Em ambos, foi permitido aos laboratórios usarem seus próprios métodos, sendo que no primeiro teste, 69,8% dos laboratórios detectaram de forma correta as amostras e, no segundo, 85% (ISTA, 2003a, b).

Observa-se na Figura 2 que, ao contrário do que ocorreu na detecção, quanto maior a porcentagem de contaminação

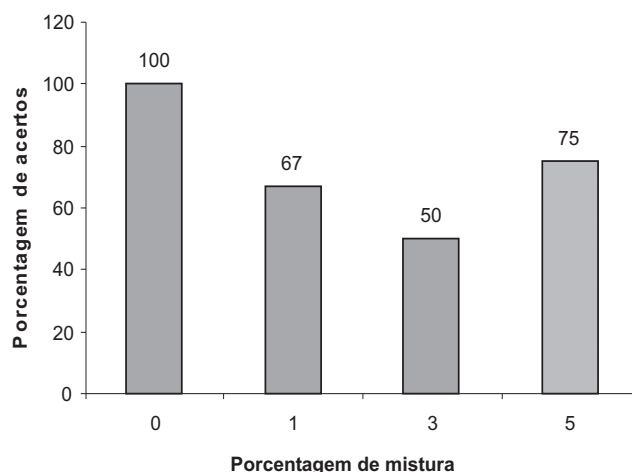


FIGURA 2. Porcentagem de acertos na quantificação de sementes de soja GM (contaminações de 0, 1, 3 e 5%) em 48 amostras convencionais. Pelotas, 2004.

com sementes de soja GM, maior é a dificuldade de quantificar a amostra, exceto para as amostras contendo 5% de contaminação.

A dificuldade de quantificar amostras de sementes contaminadas com mais de 1% de sementes de soja GM, também foi observada por Miranda et al. (2005) e Bertagnolli (2005) que, ao estudarem a eficiência dos bioensaios na quantificação de misturas de sementes de soja GM em amostras convencionais, relataram que quanto maior a porcentagem de sementes de soja GM presentes na amostra, maior é a dificuldade de quantificação, fato atribuído a maior probabilidade de que uma dessas sementes não germine e cause erro na avaliação.

A presença de sementes mortas e plântulas anormais nas amostras representam as mais importantes fontes de erro dos resultados nos bioensaios, de forma que Goggi e Stahr (1997) e Gutormson (2000) não as consideram no cálculo da quantificação do material GM da amostra, servindo como fator de correção na porcentagem de sementes de soja GM avaliadas.

Empregando-se uma tolerância de 1% nos resultados da quantificação do bioensaio em casa-de-vegetação, observa-se na Figura 3 que esta metodologia apresentou 100% de acertos, independentemente da porcentagem de mistura 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 metodologia utilizada na análise, produto a ser avaliado e quantidade de sementes GM presente na amostra (Bertagnolli, 2005). Assim, fixando um limite de tolerância, buscou-se uma maneira de minimizar 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 bioensaio em casa-de-vegetação representa uma ferramenta útil no controle interno de qualidade, tanto para os produtores quanto para aqueles que compram as sementes, por ser um teste barato, fácil de ser conduzido e poder ser realizado na propriedade, adotando-se o uso de canteiros. A realização deste teste fornece ainda garantia extra ao produtor sobre o material produzido ou comprado, pois permite verificar se há ocorrência de mistura de sementes GM e convencionais nos lotes.

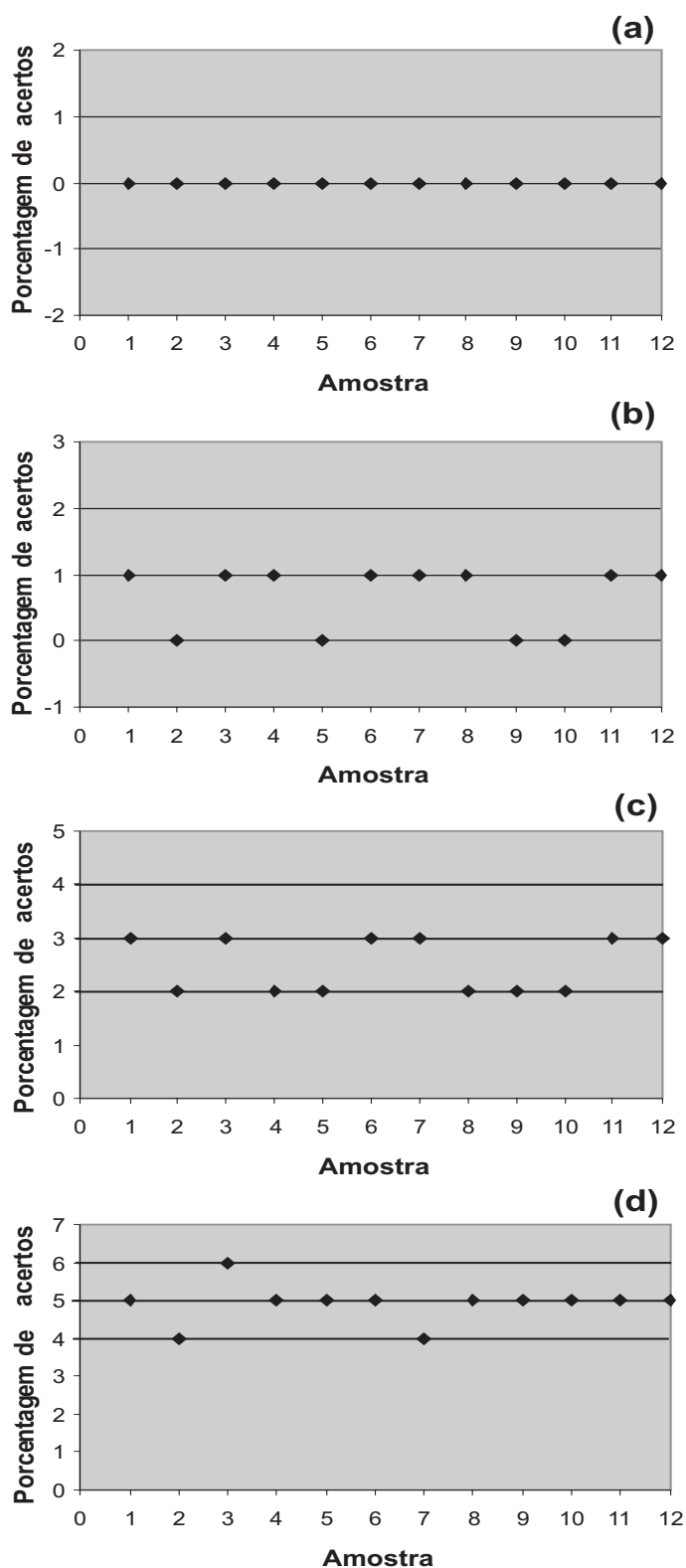


FIGURA 3. Porcentagem de acertos na quantificação de soja GM, contaminação de (a) 0%; (b) 1%; (c) 3%; (d) 5% em amostras convencionais, com 1% de tolerância nas avaliações.

CONCLUSÃO

O bioensaio conduzido em casa-de-vegetação é eficiente para detecção e estimativa da quantidade de sementes de soja GM em amostras de sementes de soja convencional.

REFERÊNCIAS

- ARIAS, C.A.A. **Soja transgênica: experiências de pesquisa e produção**. Disponível em: <http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/talleres/w-03/carlos%20arrabal/redbio.pdf>. Acesso em: 20 ago 2004.
- BERTAGNOLLI, C.M. **Deteção e quantificação de sementes de soja geneticamente modificada resistente ao glifosato em sistema hidropônico**. 2005. 64f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Sementes) - Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel", Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2005.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.
- CUNHA, C.S.M.; TILLMANN, M.A.M.; VILLELA, F.A.; DODE, L.B.; BALERINI, F. Comparação de métodos na detecção de sementes de soja geneticamente modificada, tolerante ao glifosato. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.27, n.2, p. 167-175, 2005.
- 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.
- 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, identify preservation and labeling in a marketplace with genetically modified and non-genetically modified foods. **Plant Physiology**, Wellesbourne, v.34, p.3-10, 2004.
- 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.
- KRUSE, N.D.; TREZZI, M.M.; VIDAL, R.R. Herbicidas inibidores da EPSPS: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Herbicidas**, Brasília, v.1, n.2, p.139-146, 2000.
- MIRANDA, D.M.; TILLMANN, M.A.M.; BALERINI, F.; VILLELA, F.A. Bioensaios na detecção e quantificação de sementes de soja geneticamente modificada resistente ao glifosato. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.27, n.2, p. 93-103, 2005.
- 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.
- TREZZI, M.M.; KRUSE, N.D.; VIDAL, R.A. Inibidores de EPSPS. In: VIDAL, R.A.; MEROTTO JR, A. (Ed.). **Herbicidologia**, Porto Alegre. 2001. p.37-45.

