

IDENTIFICAÇÃO DE SEMENTES DE ARROZ TRANSFORMADO GENETICAMENTE RESISTENTE AO HERBICIDA GLUFOSINATO DE AMÔNIO¹

CLÁUDIO GILNEI LILGE², MARIA ÂNGELA ANDRÉ TILLMANN³, FRANCISCO AMARAL VILLELA³, LUCIANA BICCA DODE⁴

RESUMO - O presente trabalho teve como objetivo avaliar a técnica do bioteste, em análise de rotina, para a detecção de sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) geneticamente modificadas, resistentes ao herbicida glufosinato de amônio. Foram conduzidos dois ensaios baseados no teste de germinação. No Ensaio 1 foi empregado substrato umedecido com herbicida e no Ensaio 2, embebição da semente em solução contendo o herbicida. Foram utilizadas sementes de arroz da cultivar BR-IRGA 410 e da linhagem geneticamente modificada ABR 15, que contém o gene *bar*. No Ensaio 1 utilizou-se concentrações de zero a 0,2% do princípio ativo glufosinato de amônio e na embebição da semente (Ensaio 2), de zero a 2,0%. Foram medidos os comprimentos das plântulas normais aos sete e quatorze dias. Concluiu-se que a técnica do bioteste utilizando o substrato umedecido com herbicida e a embebição das sementes em solução aquosa do herbicida no teste de germinação são eficientes na identificação de sementes de arroz resistentes ao herbicida glufosinato de amônio.

Termos para indexação: *Oryza sativa*, sementes, identificação, transgênico, herbicida.

IDENTIFICATION OF GENETICALLY MODIFIED RICE SEEDS RESISTANT TO AMMONIUM GLUPHOSINATE HERBICIDE

ABSTRACT - This research aimed to analyze the biotest technique as a routine procedure for testing genetically modified rice (*Oryza sativa* L.) seeds that are resistant to ammonium gluphosinate. Two assays were conducted based on the germination test. In the first assay moist germination paper with herbicide was used and in the second assay, the seeds were imbibed in herbicide solution. The seeds used were BR-IRGA 410 and the genetically modified line ABR 15 which contains the gene *bar*. In the first assay, ammonium gluphosinate concentrations between 0,0 and 0,2% were tested and in the second, the concentrations between 0,0 and 2,0%. The length of normal seedlings was analyzed after 7 and 14 days. It was concluded that both biotest techniques are efficient to identify in the germination test genetically modified seeds that are resistant to ammonium gluphosinate.

Index terms: *Oryza sativa*, seeds, identification, transgenic, herbicide.

INTRODUÇÃO

Anualmente, são cultivados cerca de 150 milhões de hectares de arroz no mundo e a produção atinge, aproximadamente, 550 milhões de toneladas. Mais da metade dessa produção provém de lavouras com irrigação controlada, que

ocupam 25% da área total cultivada. No Brasil, cerca de 1,3 milhões de hectares são cultivados anualmente em sistema irrigado, sendo 950 mil, no Estado do Rio Grande do Sul.

O problema de maior relevância nesta cultura é representado pela elevada infestação por plantas daninhas, que ocorre na maioria das lavouras de arroz irrigado e, entre elas principalmente, o arroz vermelho (Yokoyama et al., 1999). Esta planta daninha pertence a mesma espécie de arroz cultivado, com características morfológicas e fisiológicas similares (Hoagland, 1978), por isso seu controle é considerado difícil, sendo inviável o uso de herbicidas seletivos ao arroz (Cobucci & Noldin, 1999).

¹ Aceito para publicação em 02.07.2003.

² Engº Agrº, MSC.; Departamento de Fitotecnia, FAEM/UFPEL; Cx. Postal, 354, 96010-900, Pelotas, RS.

³ Prof. Adjunto, Dr.; Departamento de Fitotecnia, FAEM/UFPEL.

⁴ Profª. Drª.; Universidade Católica de Pelotas, 96015-560. Pelotas, RS.

Avanços na engenharia genética têm resultado na obtenção de seletividade a determinados herbicidas de amplo espectro, pela modificação genética das plantas. As plantas transgênicas são produzidas em laboratório aplicando-se conhecimentos de biologia celular e molecular. O seu estado transgênico é revelado pela expressão do transgene inserido. Após análises iniciais em laboratórios, as plantas transgênicas são avaliadas em casas de vegetação tendo como controle o genótipo original não transgênico. O teste final para uma planta transgênica é sua performance no campo, que permitirá verificar a estabilidade da característica introduzida, bem como avaliar outras características agrônomicas pertinentes (Brasileiro & Carneiro, 1998). A característica mais utilizada tem sido a resistência a herbicidas representando 77% da área com transgênicos, seguida de resistência a insetos, Bt com 15% da área. Em arroz tem sido desenvolvidas cultivares geneticamente modificadas resistente ao herbicida glufosinato de amônio.

A L-fosfinotricina (PPT), ou glufosinato, é um princípio ativo herbicida que age como inibidor competitivo da enzima glutamina sintetase, promovendo acúmulo de amônio e a morte de células. O gene *bar* confere resistência aos herbicidas que apresentam princípio ativo PPT e codifica a enzima fosfinotricina-N-acetil transferase, promotora da acetilação do PPT, utilizando como co-fator acetil-coenzima a, fazendo com que o PPT perca a ação inibidora (Dekeyser et al., 1989; Wilmlink & Dons, 1993). Plantas de arroz geneticamente modificadas, carregando o gene *bar*, quando pulverizadas com PPT ou glufosinato de amônio, apresentaram resistência, mesmo em doses superiores às letais para plantas não transformadas (Datta et al., 1992). Em estudos de campo, Oard et al. (1996) verificaram que o gene *bar* foi efetivo em conferir resistência a esse herbicida em arroz..

A necessidade da detecção de plantas, sementes e derivados da tecnologia do DNA recombinante tem aumentado muito nos últimos anos, fruto não apenas de exigências comerciais, mas de todo o processo produtivo até a chegada ao consumidor final.

Sendo assim, a aplicação da tecnologia do DNA recombinante poderá ser de alta importância para o avanço da produção arroseira, rumo à sustentabilidade ambiental, agrônômica e mesmo econômica, no controle do arroz vermelho.

O controle da pureza genética em programas de sementes, os aspectos legais envolvendo os transgênicos e a opção em não aceitar produtos geneticamente modificados, tem exigido do setor de pesquisa o desenvolvimento de metodologias eficientes para a detecção de transgênicos.

Em resposta, tecnologistas de sementes tem procurado desenvolver métodos para identificação dessas sementes. Uma alternativa, eficiente e de baixo custo é a utilização do bioteste para a detecção de sementes transgênicas.

Estudos realizados por Goggi e Stahr (1997) desenvolvidos pela Iowa State University Seed Testing Laboratory e aprovados pela Monsanto buscaram identificar o gene RRTM em sementes de soja através de bioteste. Da mesma forma, Magalhães e colaboradores (2000) determinaram uma metodologia para identificação e separação de sementes transgênicas de arroz, resistentes ao herbicida de ação total glufosinato de amônio, capaz de permitir estudos de fluxo gênico.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a técnica de bioteste em análise de rotina, para a detecção de sementes de arroz geneticamente modificado, resistente ao herbicida glufosinato de amônio.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas e no Laboratório de Cultura de Tecidos da Estação Experimental Terras Baixas, pertencente ao Centro de Pesquisas Agropecuárias de Clima Temperado (CPACT) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA).

Foram conduzidos dois estudos. No Ensaio 1 foi empregado substrato umedecido com herbicida e no Ensaio 2, embebição da semente em solução contendo o herbicida.

Ensaio 1- Substrato umedecido com solução do herbicida

Foram utilizadas sementes da cultivar parental não transgênica BR IRGA 410 e da linhagem geneticamente modificada ABR15 que contém o gene *bar*, capaz de conferir resistência ao herbicida Finale[®] (AVENTIS), possuidor do princípio ativo glufosinato de amônio, cedidas pela empresa Aventis Seeds do Brasil Ltda.

As sementes da cultivar e da linhagem foram submetidas ao teste de germinação, de acordo com as Regras para Análise de Sementes - RAS (Brasil, 1992), com exceção do número de sementes, que foi de 100, dividido em duas subamostras iguais. O substrato utilizado foi papel toalha umedecido com soluções aquosas do princípio ativo do herbicida glufosinato de amônio (4-hidroxi(metil) fosfinol-DL-holoalanina sal de amônio) (formulação comercial 200g/l), nas concentrações: 0,0; 0,04; 0,16; e 0,2%. O substrato foi umedecido com a solução em quantidade equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco.

Os rolos foram acondicionados em sacos plásticos para impedir o contato entre rolos contendo diferentes concentrações. A extremidade superior permaneceu aberta para facilitar a ventilação.

O germinador foi regulado a temperatura constante de 25°C e as avaliações foram realizadas aos sete e quatorze dias, com contagem e medição dos comprimentos da parte aérea, sistema radicular e total das plântulas normais. Não houve descarte das plântulas normais aos sete dias, para verificação do desenvolvimento das plântulas, na segunda avaliação.

As médias do número de plântulas normais foram expressas em porcentagem e dos comprimentos das partes aérea, radicular e total, em centímetros.

Ensaio 2- Embebição da semente em solução do herbicida

Foram utilizadas sementes da linhagem geneticamente modificado ABR 15 e da cultivar parental BR-IRGA 410.

Conforme o fabricante do herbicida Finale^a (AVENTIS), a absorção do glufosinato de amônio é lenta e requer de quatro a seis horas, sem a ocorrência de chuvas, após a aplicação, para adequado controle de plantas daninhas. Desta forma, a metodologia foi baseada nesta informação e também, levando em conta que o período de seis horas ocorre na fase 1 do processo de germinação, onde verifica-se rápida absorção de água. Ensaio preliminares com sementes das diferentes cultivares apontaram tendência de estabilização da embebição após esse período.

As sementes foram submetidas a embebição por seis horas, a temperatura de 20°C, em copos plásticos contendo solução de H₂O e herbicida nas concentrações: 0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 1,0 e 2,0%, do princípio ativo herbicida glufosinato de amônio (formulação comercial 200g/l).

Transcorrido o período de embebição, as sementes foram retiradas da solução e foi conduzido o teste de germinação em rolo de papel, a temperatura de 25°C, conforme Brasil (1992), com exceção do número de sementes, que foi de 100, dividido em duas subamostras iguais. O substrato utilizado foi papel toalha umedecido com água destilada em quantidade equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco.

As avaliações foram realizadas aos sete e quatorze dias, com contagem e medição dos comprimentos da parte aérea, sistema radicular e total das plântulas normais. Não houve descarte das plântulas normais aos sete dias, para verificação do desenvolvimento das plântulas na segunda avaliação.

Procedimento estatístico

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial A x B (cultivares x concentrações do herbicida), com quatro repetições estatísticas utilizando-se duas subamostras de laboratório. Os dados de germinação e primeira contagem foram transformados em arco-seno. As médias observadas nos testes de germinação para o fator cultivar, foram comparadas pelo teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade e as observadas para o fator concentração do herbicida foram submetidas a análise de regressão polinomial.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ensaio 1- Substrato umedecido com solução do herbicida

Os dados médios de germinação, comprimento da parte aérea, do sistema radicular e total das plântulas, apresentados nas Tabelas 1 e 2, não foram submetidos a análise de regressão polinomial, tendo em vista que as diferentes concentrações do herbicida inibiram a germinação da cultivar BR-IRGA 410.

TABELA 1. Dados médios da primeira contagem da germinação (%), comprimentos (cm) da parte aérea, do sistema radicular e total das plântulas de arroz, linhagem geneticamente modificada ABR 15 e cultivar parental BR-IRGA 410, após semeadura em rolo umedecido com solução de diferentes concentrações do herbicida. Pelotas, 2000.

Conc (%)	Avaliações							
	Germinação		Comp. Parte aérea		Comp. Radicular		Comp. Total	
	ABR 15	BR-IRGA 410	ABR 15	BR-IRGA 410	ABR 15	BR-IRGA 410	ABR 15	BR-IRGA 410
0	75 a B	85 a A	3,82 a A	2,95 a B	8,35 a A	6,21 a B	12,17 a A	9,16 a B
0,04	64 b A	0 b B	3,16 b A	0,00 b B	2,76 b A	0,00 b B	5,92 b A	0,00 b B
0,16	6 c A	0 b B	1,25 c A	0,00 b B	0,75 c A	0,00 b B	2,00 c A	0,00 b B
0,2	0 d A	0 b A	0,00 d A	0,00 b A	0,00 c A	0,00 b A	0,00 d A	0,00 b A
CV	9,0		22,2		20,2		18,5	

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

TABELA 2. Dados médios de germinação (%), comprimento (cm) da parte aérea, do sistema radicular e total das plântulas de arroz, linhagem geneticamente modificada ABR 15 e cultivar parental BR-IRGA 410, após semeadura em rolo umedecido com solução de diferentes concentrações do herbicida. Pelotas, 2000.

Conc (%)	Avaliações							
	Germinação		Comp. Parte aérea		Comp. Radicular		Comp. Total	
	ABR 15	BR-IRGA 410	ABR 15	BR-IRGA 410	ABR 15	BR-IRGA 410	ABR 15	BR-IRGA 410
0	75 a B	90 a A	4,13 a A	3,63 a A	8,19 a A	5,75 a B	12,32 a A	9,38 a B
0,04	80 a A	0 b B	4,35 a A	0,00 b B	3,60 b A	0,00 b B	7,95 b A	0,00 b B
0,16	11 b A	0 b B	3,35 a A	0,00 b B	1,40 c A	0,00 b B	4,75 c A	0,00 b B
0,2	0 c A	0 b A	0,00 b A	0,00 b A	0,00 d A	0,00 b A	0,00 d A	0,00 b A
CV	9,6		30,6		18,5		15,2	

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A qualidade fisiológica das sementes da cultivar BR-IRGA 410 foi superior a das sementes da linhagem ABR 15, conforme verificado na primeira e na segunda contagens do teste de germinação. Mas, o mesmo não ocorreu em relação aos comprimentos da parte aérea, radicular e total das plântulas. Assim, é possível verificar que o vigor do lote da linhagem ABR 15 foi superior em relação ao da cultivar BR-IRGA 410 nestes parâmetros, onde foi levado em conta, unicamente, o comportamento das plântulas normais.

Por outro lado, verificou-se que a menor concentração utilizada do produto foi capaz de paralisar o processo de germinação no início da fase visível, das sementes da cultivar BR-IRGA 410. No entanto, o genótipo transformado contendo o gene *bar* foi capaz de suportar concentrações até 0,16%, sendo que nesta o poder germinativo foi fortemente afetado, reduzindo de 75 para 6%, e na concentração 0,2%, inibido.

As sementes da linhagem ABR 15, contém o gene *bar*, capaz de codificar a enzima fosfotricina-N-acetil transferase e promover a acetilação do PPT utilizando como co-fator acetil-coenzima a, o que faz o glufosinato perder a ação inibidora (Dekeyser et al., 1989; Wilmink & Dons, 1993). Desta forma, as sementes dessa linhagem transformada geneticamente suportam concentrações do princípio ativo glufosinato de amônio, letais a genótipos não geneticamente modificados.

Existe diferença significativa entre os lotes dos dois genótipos testados, para todas as avaliações realizadas, já constatada na primeira contagem do teste de germinação. Verifica-se na Tabela 1, que a semente de arroz da linhagem ABR 15 quando submetida à concentração de 0,04% teve reduzido o seu poder germinativo, assim como o comprimento das estruturas das plântulas em relação às sementes não tratadas (concentração 0,0) e no lote da cultivar BR-IRGA 410, o processo de germinação foi totalmente inibido. Entre-

tanto, na segunda contagem, aos 14 dias (Tabela 2), observa-se nas sementes do arroz transformado geneticamente que o percentual germinativo e o comprimento da parte aérea aumentaram na concentração de 0,04%, embora não tenham diferido significativamente das sementes não tratadas. Todavia, os comprimentos radicular e total das plântulas foram inferiores em relação à testemunha, resultados também evidenciados na primeira avaliação. Da mesma forma, nas concentrações superiores a 0,04% houve redução significativa nos valores de germinação, inclusive causando a inibição total do processo germinativo, na concentração 0,20%.

Em relação ao desenvolvimento das plântulas nos genótipos avaliados, pode-se afirmar que o herbicida afeta o desenvolvimento do sistema radicular de maneira mais pronunciada que a parte aérea. Este fato já foi evidenciado com determinados herbicidas em outras espécies. Bingham et al. (1995) verificaram inibição do crescimento radicular na germinação de sementes de *Brassica napus*, pela ação do herbicida metazachlor.

Conforme os resultados obtidos, aos sete dias após a semeadura, já se pode identificar com precisão, a presença ou não de sementes de arroz transgênico, uma vez que o processo germinativo de sementes das plantas não transformadas apresentou desenvolvimento severamente inibido (Figura 1). Se persistir qualquer dúvida, ou houver a necessidade de avaliar o desenvolvimento, o teste pode ser conduzido até 14 dias. Esta metodologia, baseada no teste de germinação, está de acordo com Pfeilstetter et al. (2000) que desenvolveu protocolo para *Brassica napus*, transformada para resistência ao herbicida glufosinato de amônio, utilizando 0,005% do ingrediente ativo na solução e avaliação realizada aos 10 dias. Em soja, Bevilacqua et al. (2000) identificaram sementes transformadas resistentes ao glifosato utilizando concentrações de 280 a 560mg/l de glifosato e avaliações realizadas no oitavo



FIG. 1. Plântulas de arroz linhagem geneticamente modificada ABR 15 e cultivar parental BR-IRGA 410, aos 7 dias após semeadura em rolo com soluções de 0,0 e 0,04% do princípio ativo do herbicida glufosinato de amônio. Pelotas, 2000.

dia. Segundo Nedel (1998), já foram desenvolvidas metodologias para testar a pureza genética de genótipos resistentes a herbicidas, como milho resistente a imidazolinonas, onde é utilizado 4,6 ppm do princípio ativo imazethapyr para umedecer o substrato, com avaliação realizada cinco a seis dias após e em milho híbrido resistente ao glufosinato de amônio, utilizando 638 ppm do princípio ativo do herbicida com avaliação no quinto ou sexto dia.

De maneira geral, constata-se que a metodologia é simples, eficiente e de baixo custo, sendo uma alternativa para a identificação de sementes de arroz geneticamente modificadas, resistentes à herbicidas.

Ensaio 2- Embebição da semente em solução do herbicida

Os dados médios de germinação, comprimento da parte aérea, do sistema radicular e total das plântulas, apresentados nas Tabelas 3 e 4, não foram submetidos a análise de regressão polinomial, tendo em vista que concentrações superiores a 0,2% inibiram a germinação das sementes da cultivar BR-IRGA 410.

A germinação das sementes de arroz do lote da cultivar BR-IRGA 410, após embebição em água por seis horas (testemunha) teve comportamento semelhante às que não tiveram esse período de embebição (Ensaio 1). Sementes da linhagem ABR 15 apresentaram redução na ger-

TABELA 3. Dados médios da primeira contagem da germinação (%), comprimentos (cm) da parte aérea, do sistema radicular e total das plântulas de arroz, linhagem geneticamente modificada ABR 15 e cultivar parental BR-IRGA 410, após embebição das sementes em solução com diferentes concentrações do herbicida. Pelotas, 2000.

Conc (%)	Avaliações							
	Germinação		Comp. parte aérea		Comp. radicular		Comp. total	
	ABR 15	BR-IRGA 410	ABR 15	BR-IRGA 410	ABR 15	BR-IRGA 410	ABR 15	BR-IRGA 410
0	65a B	85 a A	2,08 b c B	3,03a A	6,19 c B	12,65a A	8,27 c d B	15,68a A
0,2	65a A	36 b B	3,50a A	1,10 b B	9,53a A	1,44 b B	13,03a A	2,54 b B
0,4	61a A	0 c B	3,17a A	0,00 c B	7,32 b A	0,00 c B	10,49 b A	0,00 c B
0,6	65a A	0 c B	2,44 b A	0,00 c B	7,09 b c A	0,00 c B	9,53 b c A	0,00 c B
1,0	38 b A	0 c B	2,03 b c A	0,00 c B	6,02 c A	0,00 c B	8,04 d A	0,00 c B
2,0	33 b A	0 c B	1,66 c A	0,00 c B	3,94 d A	0,00 c B	5,59 e A	0,00 c B
CV	11,1		16,4		11,7		10,7	

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

TABELA 4. Dados médios de germinação (%), comprimentos (cm) da parte aérea, do sistema radicular e total das plântulas de arroz linhagem geneticamente modificada ABR 15 e cultivar parental BR-IRGA 410, após embebição das sementes em solução de diferentes concentrações do herbicida. Pelotas, 2000.

Conc (%)	Avaliações									
	Germinação		Comp. parte aérea		Comp. radicular		Comp. total			
	ABR 15	BR-IRGA 410	ABR 15	BR-IRGA 410	ABR 15	BR-IRGA 410	ABR 15	BR-IRGA 410	ABR 15	BR-IRGA 410
0	70 a b B	90 a A	1,96 d B	3,89 a A	5,93 c B	11,57 a A	7,88 e B	15,45 a A		
0,2	74 a A	42 b B	6,25 a A	1,12 b B	10,47 a A	1,58 b B	16,72 a A	2,70 b B		
0,4	76 a A	0 c B	5,97 a A	0,00 c B	9,67 a b A	0,00 c B	15,64 a b A	0,00 c B		
0,6	80 a A	0 c B	5,27 b A	0,00 c B	8,84 b A	0,00 c B	14,11 b c A A	0,00 c B		
1,0	75 a A	0 c B	3,97 c A	0,00 c B	8,32 b A	0,00 c B	12,29 d A	0,00 c B		
2,0	59 b A	0 c B	4,11 c A	0,00 c B	9,48 a b A	0,00 c B	13,59 c d A	0,00 c B		
CV	8,6		11,4		12,6		10,3			

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

minação em cinco pontos percentuais, quando submetida à embebição. Esta redução nos valores também foi verificada no comprimento das partes aérea, sistema radicular e total das plântulas.

Alguns valores de comprimento das estruturas de plântulas aos 14 dias foram menores em relação à primeira contagem, fato atribuído às medições terem sido realizadas em todas as plântulas normais no teste de germinação, onde algumas consideradas na segunda contagem tiveram comprimento menor, baixando a média geral.

As sementes de arroz da linhagem ABR 15, embora tivessem qualidade fisiológica inicial menor em relação à cultivar BR-IRGA 410, apresentaram-se mais resistentes em todas as concentrações do herbicida. Inclusive, o desenvolvimento das estruturas das plântulas foram estimulados de forma significativa, nas concentrações do herbicida de 0,2 e 0,4%. O herbicida somente afetou o poder germinativo na maior concentração (2%). Por outro lado, sementes do genótipo BR-IRGA 410 tiveram seu poder germinativo reduzido para menos da metade do valor inicial, na menor concentração, no entanto, 0,4% foi suficiente para a inibição total da germinação. É possível verificar que a concentração do herbicida necessária para interromper o processo germinativo nas sementes da cultivar BR IRGA 410 foi 10 vezes maior ao proceder a embebição da semente ao invés de umedecer o substrato. Verifica-se na Tabela 3 que os valores de germinação observados na primeira contagem da germinação em sementes da linhagem ABR 15 expostas nas concentrações 0,0; 0,2; 0,4; e 0,6 % não tiveram variações significativas a nível de 5% de probabilidade. Na Tabela 4, constata-se redução na germinação na concentração mais elevada do herbicida.

Observa-se que a linhagem ABR 15 diferiu em todas as avaliações da cultivar BR-IRGA 410. Desta forma, a identificação da semente transformada ficou facilitada, sendo possível inclusive, na primeira contagem do teste de germinação, identificar a semente que possui o gene de resistência ao herbicida (Figura 2). Na germinação (Tabela 4), os resultados em termos de inibição da germinação não variaram em relação a primeira contagem (Tabela 3). Esta metodologia possui princípios semelhantes aos utilizados em soja, segundo Nedel (1998), onde as sementes são colocadas em papel germitest previamente umedecido com solução de 1 ppm do ingrediente ativo clorosulfuron, permanecendo por 15 horas. A seguir, após lavagem em água corrente e semeadura em rolo de papel umedecido com água, são colocadas em germinador e a avaliação realizada no sétimo dia. Assim, o procedimento envolvendo a imersão das sementes na solução contendo o herbicida, possui as vantagens de ser conduzido com menor tempo de embebição da semente (seis horas) e evitar o contato direto do laboratorista com o herbicida, o que acontece ao colocar a semente no papel umedecido com a solução.

Por meio dos resultados observados para o comprimento de plântulas, na primeira e na segunda avaliação, observou-se maiores valores quando as sementes da linhagem ABR 15 foram submetidas à solução a 0,2%, mostrando assim que houve estímulo do herbicida no processo de germinação. Provavelmente, isto se deve ao fato da linhagem possuir o gene de resistência, assim o amônio presente na composição do herbicida, vai atuar como nutriente para a plântula. Entretanto, para a cultivar BR-IRGA 410, talvez, tenha ocorrido ação fitotóxica na semente, observando-se redução significativa nesses valores.



FIG. 2. Plântulas de arroz linhagem geneticamente modificada ABR 15 e cultivar parental BR-IRGA 410, aos 7 dias após embebição das sementes em solução de 0,0 e 0,4% do princípio ativo do herbicida glifosinato de amônio. Pelotas, 2000.

Constatou-se a eficiência dos dois métodos (Ensaio 1 e 2) na identificação de sementes de arroz transgênico, resistente ao herbicida com princípio ativo glifosinato de amônio. Nos dois estudos foi verificado que essa identificação foi possível no sétimo dia, correspondente a primeira contagem do teste de germinação.

Ao utilizar-se o papel substrato umedecido com o herbicida (Ensaio 1), a concentração de 0,04% foi a mais adequada, permitindo identificar as sementes portadoras do gene *bar*. Ao realizar a pré-embebição das sementes com o herbicida (Ensaio 2) foi constatado que a partir de 0,4% do princípio ativo é possível a identificação, de forma eficiente, das sementes que possuem o gene de resistência ao herbicida.

Pela comparação dos dois métodos observou-se que no processo envolvendo a pré-embebição das sementes (Ensaio 2) necessita-se de maior concentração do herbicida em relação ao umedecimento do substrato com a solução (Ensaio 1). As metodologias desenvolvidas são econômicas, não exigem equipamento sofisticado e treinamento específico de pessoal, apresentando possibilidade de padronização e adoção imediata pelos laboratórios. Mas, deve-se salientar que o método de identificação é aplicável somente às sementes de arroz transgênico resistente ao glifosinato de amônio. Para plantas de arroz modificadas para outras características, métodos específicos devem ser desenvolvidos. Também vale ressaltar que estas metodologias apresentam o inconveniente de iden-

tificar apenas sementes viáveis, não sendo obtidos resultados com sementes mortas.

CONCLUSÃO

A técnica de bioteste utilizando substrato umedecido com herbicida e a embebição das sementes em solução aquosa do herbicida no teste de germinação, é eficiente na identificação de sementes de arroz resistente ao herbicida glifosinato de amônio.

REFERÊNCIAS

- BEVILAQUA, G.A.P.; BONATO, E.R.; ROMAN, E.S. Identification of glyphosate-tolerant soybean plants through germination test. In: XVII Seminário Panamericano de Semillas, 20-22 nov. 2000, Punta del Este – Uruguay. **Anais...** Punta del Este: Felas, 2000. V.1, p.112.
- BINGHAM, I.J.; KAY, J.; WHYTOCK, G.P. Effects of seed condition and the herbicide metazachlor on the germination and establishment of swede (*Brassica napus*). **Brighton Crop Protection Conference: Weeds proceedings of an international conference**, Brighton, v.3, p.913-918. 20-23 nov. 1995.
- BRASIL, Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992, 365p.
- BRASILEIRO, A.C.M. & CARNEIRO, V.T. de C. **Manual de**

- transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA SPI/ EMBRAPA-Cenargen, 1998. 309p.; il.
- COBUCCI, T. & NOLDIN, J.A. Plantas daninhas e seu controle. **In:** VIEIRA, N.R.A.; SANTOS, A.B.; SANT'ANA, E.P. **A cultura do arroz no Brasil.** Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA arroz e feijão, 1999. p.375-415.
- DATTA, S.K.; DATTA, K.; SOLTANIFAR, N.; DONN, G.; POTRYKOS, I.; Herbicide-resistant indica rice plants from IRRI breeding line IR 72 after PEG-mediated transformation of protoplasts. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.20, p. 619-629, 1992.
- DEKEISER, D.; CLAES, B.; MARICHAL, M.; MONTAGU, M.B.; CAPLAN, A. Evaluation of selectable markers for rice transformation. **Plant Physiology**, Bethesda, v.90, p.217-223, 1989.
- GOGGI, A.S.; STAHR, M.G. Roundup Pre-emergence treatment to determine the presence of the Roudup Ready gene in soybean seed: A laboratory test. **Seed Science and Technology**. v.19, n.1, p. 99-102, 1997.
- HOAGLAND, R.E. Isolation and properties of an aryl acylamidase from red rice, *Oryza sativa* L., that metabolizes 3', 4'-dichloropropionilidade. **Plant cell physiology**, Tokio, v.19, p.1019-1029, 1978.
- HOECHST SCHERING AgrEVO do BRASIL LTDA. **FINALE.** São Paulo, Bula.
- MAGALHÃES, A.M. Jr.; FRANCO, D.F.; ANDRES, A.; ANTUNES, P.; LUZZARDI, R.; DODE, L.B.; TILLMANN.; SILVA, M.P. Metodologia para identificação de sementes de arroz transgênico resistente ao herbicida glufosinato de amônio. **Agropecu. Clima Temp.** Pelotas, v.3, n.1, p.31-38, 2000.
- NEDEL, J.L. Avaliando a semente transgênica. **Seed News**, Pelotas. v.2, n.3, p. 30, 1998
- OARD, J.H.; LINScombe, S.D.; BRAVERMAN, M.P.; LEECH, M.; KOHLI, A.; VAIN, P.; COOLEY, J.C.; CHRISTOU, P. Development, field evaluation, and agronomic performance of transgenic herbicide resistant rice. **Molecular Breeding**, Bélgica (Kluwer Academic Publishers), V.2, p. 359-368, 1996.
- PFEILSTETTER, E.; MATZK, A.; FELDMANN, S.D.; SCHIEMANN, J. Rapid and efficient screening of phosphinothricin tolerant oilseed rape (*Brassica napus*) with a novel germination test. **Euphytica**, v.113:2, p.119-124, 2000
- WILMINK, A.; DONS, J.J.M. Selective agents and marker genes for use in transformation systems of monocotyledonous plants. **Plant Molecular Biology**, Reporter, Wageningen, v.11, n.2, p.165-185, 1993.
- YOKOYAMA, L.P.; RUCATTI, E.G.; KLUTHCOUSKI, J. Economia da produção: Conjuntura, mercado e custos. **In:** VIEIRA, N.R.A.; SANTOS, A.B.; SANT'ANA, E.P. **A cultura do arroz no Brasil.** Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA arroz e feijão, 1999. P.36-57.

