

## COMPARAÇÃO DE MÉTODOS NA DETECÇÃO DE SEMENTES DE SOJA GENETICAMENTE MODIFICADA RESISTENTE AO GLIFOSATO<sup>1</sup>

CRISTINA DOS SANTOS MADRUGA CUNHA<sup>2</sup>, MARIA ÂNGELA ANDRÉ TILLMANN<sup>3</sup>,  
FRANCISCO AMARAL VILLELA<sup>3</sup>, LUCIANA BICCA DODE<sup>4</sup>, FABIO BALERINI<sup>5</sup>

**RESUMO** - Pesquisas tem sido conduzidas visando determinar métodos de detecção de organismos geneticamente modificados (OGM), devido, principalmente, à importância sobre a atividade comercial. Atualmente, são utilizados bioensaios, que avaliam características fenotípicas das plântulas, testes de ELISA e *Kits*, que possibilitam identificar proteínas transgênicas específicas de DNA. O objetivo deste trabalho foi comparar a eficiência dos métodos para detectar sementes de soja Roundup Ready (RR). Amostras de sementes de soja geneticamente modificada (GM) resistente ao glifosato e de sementes do parental suscetível foram submetidas a bioensaios (pré-embebidas, umedecidas em substrato, imersas em solução contendo glifosato e pulverização de plântulas), *Kit Trait Test* e detecção pelo método da PCR. Os bioensaios são métodos mais eficientes comparando a relação custo/benefício na detecção de sementes de soja GM, sendo o método de pré-embebição o mais indicado e a análise das características morfológicas de plântulas é importante nos bioensaios para detecção de sementes de soja GM.

Termos para indexação: *Glycine max*, transgênico, herbicida, OGM.

### COMPARISON OF METHODS TO DETECT GENETICALLY MODIFIED SOYBEAN SEEDS RESISTANT TO GLYPHOSATE

**ABSTRACT** - Due to the great importance of the trade business, there are significant world efforts in establishing GMO detection methods. Currently, bioassays that analyse seedling phenotype, the ELISA test and kits that enable specific transgene protein identification, and PCR to detect specific DNA sequences are frequently used. The aim of this study was to compare the efficiency of different methods to detect RR soybean. Genetically modified seed samples, tolerant to glyphosate and susceptible parental seeds were submitted to bioassays (pre-imbibed, imbibed and immersion in herbicide solutions and seedling spraying), the Kit trait test and PCR detection. Bioassays were shown to be more efficient, comparing the ratio cost/benefit. The seedling visual analysis is a very important parameter to be considered in GM soybean seeds detection.

Index terms: *Glycine max*, transgenic, herbicide, GMO.

### INTRODUÇÃO

Atualmente, estudos têm sido conduzidos para a produção de plantas resistentes a herbicidas. Com isto, a utilização de herbicidas de amplo espectro de atuação pode ser favorecida, pois haveria o controle de vários tipos de plantas daninhas

com menor número de aplicações, sem prejudicar a cultura (Brasileiro & Dusi, 1999).

A soja Roundup Ready (RR) consiste numa cultivar geneticamente modificada que tem a característica de tolerância ao herbicida não seletivo, glifosato (N-fosfonometilglicina), conforme Cobb (1992). O glifosato é um herbicida

<sup>1</sup> Submetido em 06/04/2004. Aceito para publicação em 14/12/2004. Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor apresentada a FAEM/UFPeL.

<sup>2</sup> Eng<sup>a</sup> Agr<sup>a</sup>, M. Sc. Rua vinte e sete, n<sup>o</sup> 508 apt<sup>o</sup> 301 – Setor Bosque, 73808-470, Formosa – GO, E-mail: cris.mcunha@uol.com.br.

<sup>3</sup> Prof. Adjunto, Dr., Departamento de Fitotecnia, FAEM/UFPeL, C. P. 354, 96010-900, Pelotas, RS. Bolsista de produtividade em pesquisa do CNPq.

<sup>4</sup> Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>., Universidade Católica de Pelotas, 96015-560, Pelotas, RS.

<sup>5</sup> Estudante de Agronomia FAEM/UFPeL, bolsista PIBIC/CNPq.

sistêmico de ação total, que inibe a enzima 5-enolpiruvil shiquimato-3-fosfato sintetase (EPSP sintetase ou EPSPS) e impede que a planta forme aminoácidos essenciais para a síntese de proteínas e, também, alguns metabólitos secundários (Kruse et al., 2000). O gene que confere tolerância à enzima EPSPS, denominado CP4, é proveniente da bactéria de solo do gênero *Agrobacterium*, introduzido na soja pelo método de biobalística (Kruse et al., 2000).

Na detecção de sementes de plantas geneticamente modificada, prefere-se a utilização de métodos fáceis, tal como o teste de tolerância ou resistência a herbicidas, chamados de bioensaios, que é conduzido através do teste de germinação, de forma similar ao descrito nas Regras para Análise de Sementes do Brasil (1992). Este teste utiliza testemunhas positivas e negativas, em substrato contendo herbicida específico, sendo que na avaliação final, as características no desenvolvimento, comprimento, coloração ou outro, as distingue das provenientes de sementes de plantas GM.

Outros métodos são utilizados na detecção de organismos geneticamente modificados, como por exemplo, o teste de ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) que detecta proteínas específicas contidas nas sementes de plantas GM (Aragão & Ribeiro, 1998) e técnicas da PCR (*Polimerase Chain Reaction*) que emite resultados qualitativos e quantitativos mediante a detecção da presença de seqüências específicas de DNA.

Além disso, ainda existem os testes rápidos, desenvolvidos para detectar a proteína CP4 EPSPS com uso de "kits" específicos que determinam qualitativamente a presença ou ausência da proteína CP4 EPSPS na folha ou grão, podendo ser usado tanto em campo como em ambiente laboratorial.

Com a liberação do plantio e comercialização da soja Roundup Ready no Brasil e o rigor das legislações de rotulagem e rastreabilidade de organismos geneticamente modificados, a procura por metodologias adequadas, simples e econômicas para detecção, identificação e quantificação de sementes de plantas GM é cada vez maior. Assim, o presente trabalho teve como objetivo comparar a eficiência dos diferentes métodos utilizados na detecção de sementes de soja geneticamente modificada.

## MATERIALE MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório Didático de Análise de Sementes Flávio Rocha, do Departamento de

Fitotecnia, e no Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, do Departamento de Tecnologia Agroindustrial da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, ambos na Universidade Federal de Pelotas.

Oito lotes de sementes, quatro de soja GM e quatro de soja convencional, foram submetidos aos seguintes métodos para detecção de soja (*Glycine max* L. Merr.) geneticamente modificada:

### BIOENSAIOS

#### Pré-embebição das sementes em substrato umedecido com solução de herbicida

As sementes foram pré-embebidas em papel toalha em solução com 0,6% do equivalente ácido (e.a.) do glifosato, por 16 horas, a 25°C. Após esse período foram transferidas para substrato umedecido, com água destilada, permanecendo até o 5º dia, quando foram realizadas as avaliações (Tillmann & West, 2004).

#### Substrato com solução de herbicida

As sementes foram semeadas diretamente em substrato umedecido com solução contendo 0,03% do e.a. do glifosato, permanecendo nesta condição durante todo o período do teste de germinação, a 25°C. A avaliação foi realizada no 5º dia (Funguetto et al., 2004).

#### Imersão das sementes em solução de herbicida

As sementes foram colocadas em copos plásticos de 100ml, contendo 50ml de solução de herbicida na concentração de 0,12% do e.a. do glifosato durante 1 hora a uma temperatura de 30°C. Após, as sementes foram transferidas para papel toalha e o teste de germinação conduzido a temperatura de 30°C, permanecendo nesta condição até a avaliação, realizada no quinto dia (Tillmann & West, 2004).

#### Pulverização das plântulas com o herbicida

No quinto dia do teste de germinação, as plântulas foram dispostas de modo que a parte aérea ficasse exposta e, antes de aplicar a solução contendo o herbicida, as raízes foram cobertas com um papel toalha seco e limpo.

Para esse tratamento foi utilizado um pulverizador de uso doméstico contendo a solução com 0,4% do e.a. do glifosato. Após a pulverização, as plântulas permaneceram por uma hora em cima da bancada, antes de voltar ao germinador, para favorecer a absorção do herbicida. Três dias após a pulverização foram realizadas as avaliações (Gutormson, 2000).

### Avaliações

Nos bioensaios, as sementes foram submetidas ao teste de germinação de acordo com as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992) e ao teste de vigor baseado no comprimento de plântulas (Krzyzanowski, 1991). Foram determinados, os comprimentos totais da plântula, da raiz primária e da parte aérea e o número de raízes secundárias. As médias de germinação foram expressas em porcentagem, a presença de raízes secundárias, em número, e os comprimentos, em centímetros.

Utilizaram-se 200 sementes por repetição, subdivididas em 8 amostras de 25 sementes cada, distribuídas no substrato, com o auxílio de um tabuleiro específico para a semente de soja. O papel toalha foi umedecido com quantidade equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco. Os rolos de papel contendo as sementes foram acondicionados em sacos plásticos transparentes fechados a fim de manter a umidade constante e dispostos verticalmente dentro do germinador, para orientar o crescimento das plântulas de forma mais retilínea possível, para favorecer a mensuração do comprimento.

Foram consideradas plântulas normais aquelas que apresentassem comprimento total mínimo de 3 cm e presença de raízes secundárias desenvolvidas.

O herbicida glifosato utilizado possuía formulação contendo 360gL<sup>-1</sup> do equivalente ácido de N-(fosfometil) glicina.

### Procedimento Estatístico

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os dados médios das avaliações foram apresentados graficamente. O sistema de análise estatística adotado foi o WinStat, versão 2.0 (Machado & Conceição, 2003).

## ANÁLISE DO DNA ATRAVÉS DA REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA (PCR)

### Extração de DNA

Foram estudados diferentes protocolos para otimizar a

extração de DNA em sementes de soja, entre eles, Edwards et al. (1991); Ferreira & Grattapaglia (1998) e Doyle & Doyle (1990), sendo mais adequado o protocolo modificado de Doyle & Doyle (1990).

Antes de iniciar a extração, foi realizada a assepsia da câmara de fluxo laminar com hipoclorito de sódio e álcool. Os tubos de eppendorf, ponteiras (previamente autoclavados) e micropipetas foram colocadas em luz ultra-violeta por 20 – 30 minutos.

A qualidade e a concentração das amostras de DNA obtidas foram avaliadas através de eletroforese em gel de agarose.

### PCR

Para esta análise foram utilizados tubos novos e autoclavados para reação de PCR; DNA extraído a ser analisado; mistura da reação; tampão para PCR 10X; termociclador; cuba e fonte para eletroforese; gel de agarose (1,0%; p/v) em tampão TBE 1X; transiluminador (ultravioleta); água deionizada autoclavada; iniciador A e iniciador B (Tabela 1) cada um com 10mM; cada um dos quatro nucleotídeos (4 mM) e *Taq* DNA polimerase (5U/mL<sup>-1</sup>).

Foram realizadas três repetições de cada amostra de DNA, num total de vinte e quatro reações. A mistura de reação foi preparada para as 24 amostras de DNA e para uma amostra do controle em branco (com água).

O volume final da reação de PCR foi de 25ml, sendo 24ml da mistura de reação e 1ml do DNA genômico ou da água deionizada autoclavada. Antes de fechar os tubos com a mistura foi acrescentada uma gota de óleo mineral, para evitar evaporação durante a reação.

O programa específico para amplificar o primer 35S

**TABELA 1. Iniciadores utilizados na análise das amostras de sementes por PCR.**

Gene	Posição	Seqüência (5' → 3')	Tamanho do fragmento
35S	Senso	GCTCCTACAAATGCCATCA	195pb
	Antisenso	GATAGTGGGATTGTGCGTCA	

**TABELA 2. Condições do programa utilizado no termociclador para amplificar as reações de PCR.**

Etapa	Temperatura	Tempo
Pré-ciclo	94°C	3 minutos
Ciclos (35 vezes)	94°C	1 minuto (desnaturação)
	55°C	1 minuto (anelamento)
	72°C	1 minuto (alongamento)
	72°C	10 minutos

fragmento de 195 pares de base (pb) esta descrito na Tabela 2.

Concluída a fase de amplificação, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1% submetendo o DNA a uma tensão elétrica (eletroforese) de 90-100 V por 1 hora. Esse gel foi corado com brometo de etídio para permitir sua visualização sobre luz ultravioleta e posterior análise do DNA amplificado.

### TESTE RÁPIDO PARA SOJA COM USO DE “KIT” TRAIT TEST

Anticorpos específicos à proteína CP4EPSPS são acoplados a um reagente colorido e incorporados na tira do teste. Quando a tira é introduzida em uma pequena fração de extrato que contenha a proteína CP4EPSPS, forma-se um co-anticorpo que incorporado ao reagente colorido, flui na tira através de uma membrana porosa. A membrana contém duas zonas de captura, uma específica para a proteína CP4EPSPS e outra para os anticorpos não reagidos.

O teste foi conduzido conforme as instruções, recomendadas pelo fabricante. Utilizaram-se 60 sementes trituradas durante 10 segundos em liquidificador, em volume de água indicado (70ml), para a respectiva quantidade de semente.

Para proceder ao teste, 0,5ml do extrato de sementes trituradas foi pipetado e colocado em um tubo de 1,5ml. Posteriormente, com o auxílio da tira de teste observou-se o resultado.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as metodologias utilizadas (Figura 1) permitiram diferenciar, através da percentagem de germinação, lotes GM e não-GM em cinco dias, com exceção da pulverização que permitiu a diferenciação em 8 dias, devido à metodologia utilizada.

Conforme a Figura 1, as metodologias que permitiram com maior eficácia a diferenciação de uma plântula GM de uma não-GM foram a de pré-embebição e a do substrato umedecido. Nestas metodologias, os lotes de sementes de soja GM apresentaram plântulas normais, bem desenvolvidas, mesmo na presença do herbicida e os de soja não-GM apenas iniciaram o processo germinativo, não atendendo aos critérios de plântulas normais. Vários trabalhos científicos descrevem como único mecanismo de ação do glifosato a inibição da enzima 5-enolpiruvil shiquimato-3-fosfato sintetase (EPSPS). Em consequência desta inibição, não ocorre a síntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano e de compostos secundários como alcalóides, cumarinas e flavonóides (Monquero, 2003). A cultivar GM possui o gene de resistência ao herbicida permitindo o desenvolvimento e a formação de plântulas normais. Os resultados alcançados no presente trabalho concordam com os obtidos por Tillmann & West (2004) quanto à eficiência do método de pré-embebição na detecção de soja GM.

Analisando os resultados apresentados na Figura 2,

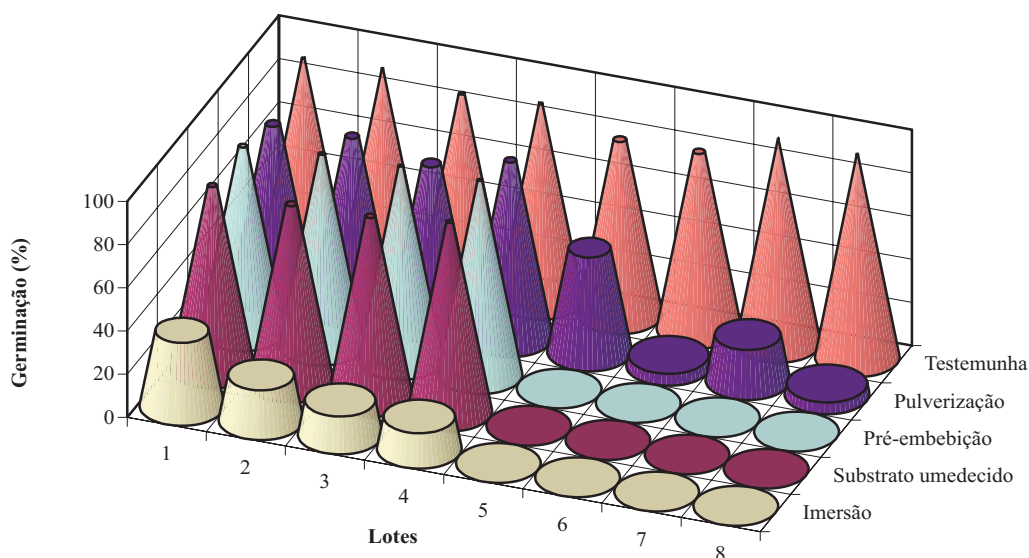


FIGURA 1. Percentagem de germinação de sementes de soja submetidas a diferentes metodologias. Lotes GM de 1 à 4 e lotes não-GM de 5 à 8.



observa-se que todos os métodos empregados foram eficientes para diferenciação entre os lotes de sementes de soja GM e não-GM, quanto ao comprimento total das plântulas, com exceção do método de pulverização. Essa diferenciação também foi observada quanto ao comprimento da raiz primária e da parte aérea das plântulas (Figuras 3 e 4, respectivamente).

Para as características de comprimento, o método de pulverização mostrou-se menos eficiente, uma vez que as diferenças obtidas entre as plântulas GM e as não-GM não foram tão proeminentes, tendo em vista que a solução contendo o herbicida não foi aplicada na semente, mas sim na plântula.

Funguetto et al. (2004) verificaram que o herbicida

glifosato reduziu o comprimento total de plântulas de soja da cultivar GM em relação à testemunha. Isto também foi observado no presente trabalho sendo que, nos lotes das cultivares não-GM, a redução no crescimento foi acentuada.

Em biotestes para detecção de alface (*Lactuca sativa* L.) transgênica resistente ao glifosato, Nascimento et al. (2001) verificaram que a diferenciação e o crescimento de raízes em plântulas não-GM foi inibido. Esta constatação está de acordo com os resultados obtidos neste trabalho (Figura 3).

É possível verificar que a ação do herbicida é mais acentuada no comprimento do sistema radicular que no da parte aérea, concordando com os resultados obtidos por Lilge et al. (2003) e Silva (2003) em sementes de arroz.

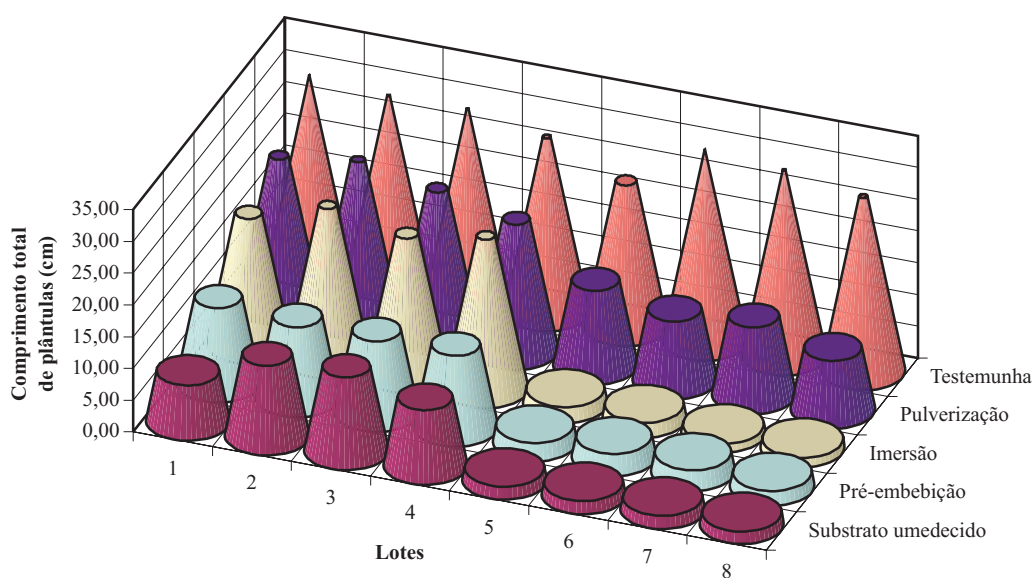


FIGURA 2. Comprimento total de plântulas de soja provenientes de sementes submetidas a diferentes metodologias. Lotes GM, de 1 à 4 e lotes não-GM, de 5 à 8.

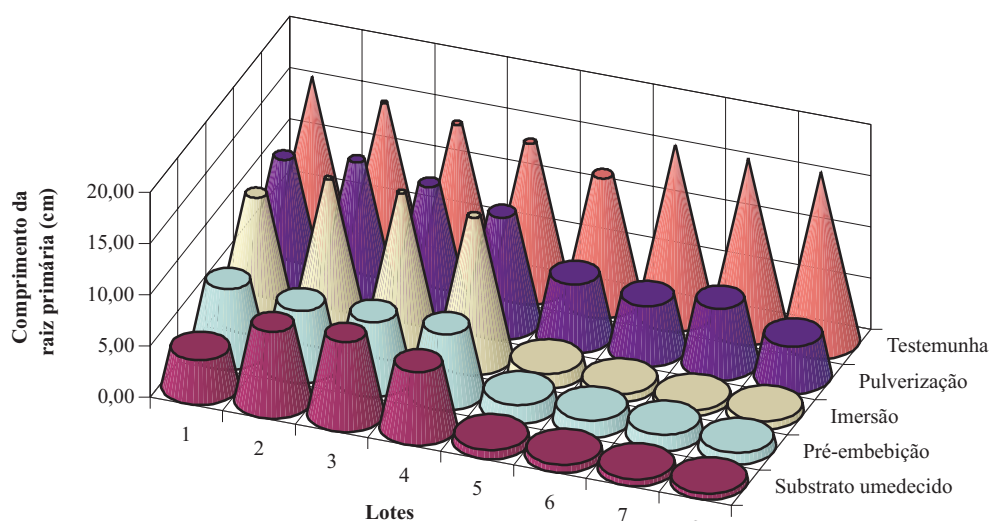


FIGURA 3. Comprimento de raiz primária de plântulas provenientes de sementes de soja submetidas a diferentes metodologias. Lotes GM, de 1 à 4 e lotes não-GM de 5 à 8.

Na análise visual do crescimento de raiz primária observou-se diferença marcante entre as plântulas GM e não-GM dos lotes analisados, com destaque para as plântulas GM que apresentaram um crescimento da raiz primária similar ao da testemunha, conforme mostra a Figura 5.

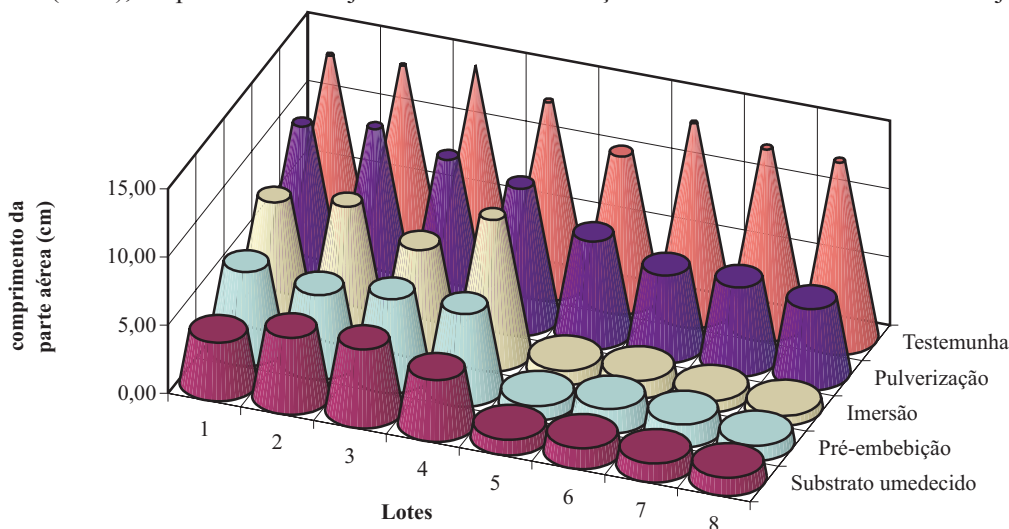
No campo, após a aplicação de glifosato, algumas plantas podem levar até três semanas para morrer. Provavelmente esta lenta ação, reflete o tempo necessário para a redução das fontes de aminoácidos aromáticos que causariam taxas reduzidas na síntese de proteínas. Isto levaria a uma lenta ação do herbicida, permitindo que plantas de soja não-GM iniciassem o processo germinativo.

As plântulas não-GM apresentaram crescimento reduzido da raiz primária, sem formação de raiz secundária. De acordo com Funguetto et al. (2004), as plântulas de soja não-GM

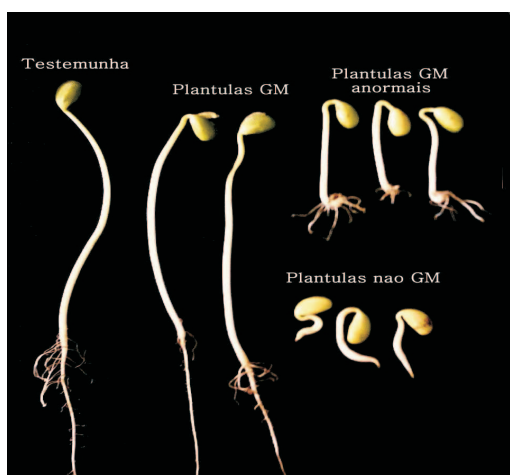
apresentam como sintomas o engrossamento, estrias longitudinais e amarelecimento gradativo do hipocótilo; inibição do desenvolvimento da raiz primária e da emissão de raízes secundárias, e, hipocótilo proporcionalmente maior que a raiz primária. É possível diferenciar as plântulas não-GM das anormais GM, sendo que as anormais GM apresentam raiz primária atrofiada, presença de raízes secundárias e maior comprimento de parte aérea (Figura 5).

De acordo com Torres et al. (2003), esta visualização de crescimento mais rápido da raiz primária indica que o alongamento da raiz poderia ser usado como um prognóstico exato para seleção de ambos genótipos de soja, GM e não-GM, em seu estágio inicial de desenvolvimento.

O teste de pulverização com o glifosato também mostrou diferenças entre os lotes de sementes de soja GM e não-GM,



**FIGURA 4.** Comprimento da parte aérea de plântulas de soja, provenientes de sementes submetidas a diferentes metodologias. Lotes GM, de 1 à 4 e lotes não-GM de 5 à 8.



**FIGURA 5.** Plântulas de soja GM e não-GM, escolhidas de vários tratamentos ao acaso, após 5 dias de germinação.

embora as diferenças não tenham sido tão acentuadas quanto as observadas nos testes anteriores. O comprimento total da plântula, da raiz primária, da parte aérea e desenvolvimento de raízes secundárias das plântulas GM e não-GM foram similares.

Pelos resultados apresentados, evidencia-se que a melhor metodologia foi a de pré-embebição. A imersão das sementes em solução herbicida reduziu a percentagem de germinação, conforme mostra a Figura 1. Na metodologia de umedecimento do substrato, a semente ficou todo o período em contato com a solução de herbicida, e no método de pulverização, as plântulas já apresentavam determinado crescimento, fato que dificultou a diferenciação dos lotes GM e não-GM através da característica de comprimento.

Na avaliação do número de raízes secundárias (Figura

6), verifica-se, em todas as metodologias, que houve diferença quanto ao número de raízes secundárias das plântulas GM em relação às não-GM. No método de pulverização houve maior dificuldade de diferenciação, conforme discutido anteriormente.

Avaliando soja GM, Goggi & Stahr (1997), constataram que a ausência de crescimento de raiz secundária permite com facilidade a detecção de plântulas susceptíveis, conforme também pode ser observado neste trabalho (Figura 5).

Dentre as metodologias que avaliaram o número de raízes secundárias, a de imersão das sementes em solução contendo o herbicida se mostrou mais eficiente (Figura 6).

Após a extração de DNA dos oito lotes de sementes de soja (Figura 7), foram realizadas as reações de PCR para amplificar o DNA genômico. Na Figura 8 são apresentados os resultados da amplificação do DNA utilizando-se o “primer”

35S. Verificou-se que os lotes de sementes de soja GM avaliados pela reação de PCR determinaram bandas, que são resultados da amplificação específica do DNA alvo com 195 pares de bases, enquanto nas amostras de sementes de soja não-GM não determinaram amplificação desta seqüência do DNA. A análise de PCR dos lotes de sementes confirma os resultados obtidos nas outras metodologias para detecção de soja GM.

Os resultados da análise da qualidade e extração do DNA, utilizando o protocolo modificado Doyle & Doyle (1990) pode ser observado na Figura 7.

O PCR é uma análise sensível e precisa para detecção de plantas transgênicas, conforme Duijn et al. (1999). Entretanto, o uso de uma adequada combinação de primers e um adequado controle da performance do experimento é imprescindível.

O primer 35S é o mais expressivo e a seqüência

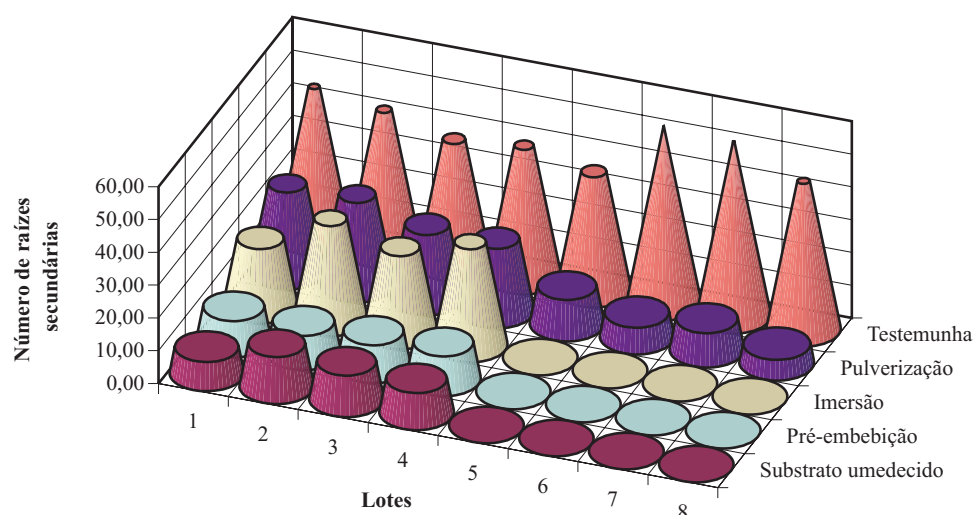


FIGURA 6. Número de raízes secundárias de plântulas de soja, submetidas a diferentes metodologias. Lotes GM, de 1 à 4 e lotes não-GM de 5 à 8.

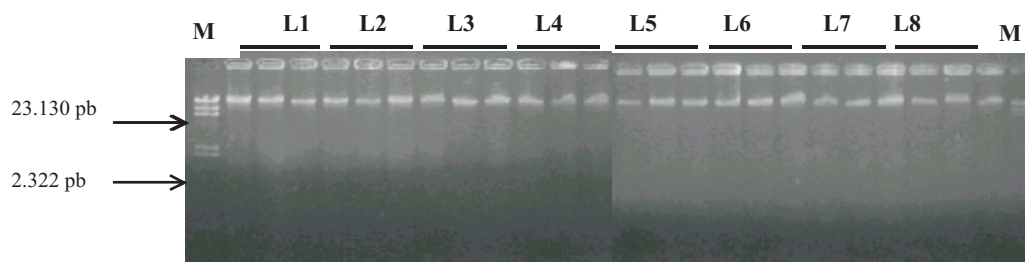


FIGURA 7. Extração de DNA de oito lotes (L1 a L8) de sementes de soja. M – Marcador de peso molecular Lambda Hind III.

específica para o promotor 35S é a mais encontrada. Ainda existem outros primers específicos para checar a presença de soja RR; entretanto, o primer 35S foi suficiente para permitir a diferenciação entre os lotes avaliados.

Trabalhando com trigo, Terzi et al. (2003), concordaram com Duijn et al. (1999) ao afirmarem que a reação de polimerase em cadeia (PCR) é uma metodologia altamente específica e sensível que detecta pequenas quantidades do DNA alvo, acrescentando ainda que é uma ferramenta fidedigna para identificação de produtos derivados de OGM.

O teste rápido com o uso de “kit” indicou corretamente a presença da proteína CP4EPSPS incorporada nas sementes de soja GM. Em soja GM, a tira de teste apresentava duas linhas avermelhadas sendo a amostra considerada positiva para soja RR. Por outro lado, quando a soja não era GM apresentava apenas uma única linha claramente visível, indicando que a amostra era negativa para soja RR.

Os resultados obtidos utilizando o “kit Trait Test” confirmam que este teste é rápido, prático e de fácil manuseio. Assim, os testes rápidos, quando utilizados de maneira indicada pelo fabricante, geram resultados confiáveis.

Pelos resultados obtidos, salienta-se que os bioensaios se mostraram mais adequados, por apresentarem baixo custo, sem necessidade de equipamentos sofisticados. Além disso,

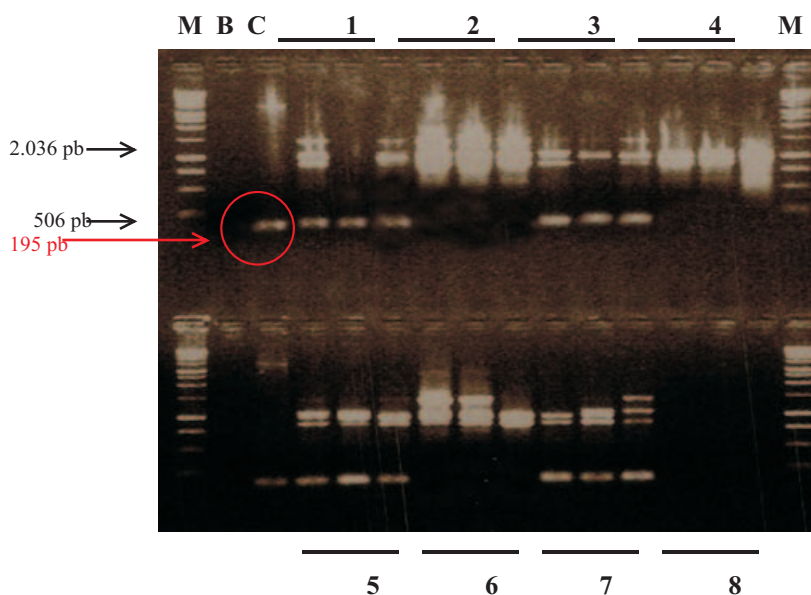
são de fácil padronização, o que facilita seu uso na rotina do laboratório de sementes.

Dos bioensaios estudados, o mais indicado é o da pré-embrição das sementes, porque não afetou a porcentagem de germinação e permitiu clara diferenciação nas características de crescimento de plântulas. O método da imersão também permitiu esta distinção, embora tenha reduzido drasticamente a porcentagem de germinação de sementes.

O método de pulverização não se mostrou eficiente na distinção entre os lotes GM e não-GM, além da necessidade de maior tempo para sua condução.

Apesar de o método do substrato umedecido com solução de herbicida não apresentar resultados tão satisfatórios quanto os demais, deveria ser melhor estudado, por apresentar maior facilidade na sua condução.

A análise da PCR é uma técnica bastante sensível e confiável, mas requer equipamentos sofisticados e reagentes de alto custo. É de difícil padronização, dificultando a repetibilidade dos resultados devido a variações causadas, principalmente, por contaminações e calibração de equipamentos tornando-a inviável como análise de rotina, mas é uma ferramenta importante no caso de um re-teste quando houver dúvidas quanto à detecção de GM por outras metodologias.



**FIGURA 8.** Resultado da amplificação do DNA corado com brometo de etídio, utilizando o primer 35S com 195pb. M: marcador de peso molecular 1 Kb Ladder; B: branco; C+: controle positivo utilizando o plasmídeo pGus Hyg; 1, 3, 5, 7: sementes de soja GM; 2, 4, 6, 8: sementes de soja não-GM.



O teste rápido com a utilização de “kit” já está padronizado, é prático e eficiente, mas comparado com os bioensaios apresenta um custo bem superior, não sendo recomendado o uso para rotina do Laboratório de Análise de Sementes. A utilização de “kits” é viável para checagem rápida, por exemplo, na recepção de sementes em uma unidade de beneficiamento de sementes, permitindo agilidade na tomada de decisão.

### CONCLUSÕES

Os bioensaios são os métodos mais eficientes comparando a relação custo/benefício na detecção de sementes de soja GM, sendo o método de pré-embebição o mais indicado. A análise das características morfológicas de plântulas é importante nos bioensaios para detecção de sementes de soja GM.

### REFERÊNCIAS

- ARAGÃO, F. J. L.; RIBEIRO, S. G. Detecção de proteínas pela técnica ELISA. In: BRASILEIRO, A. C. M. & CARNEIRO, V. T. C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA–SPI/EMBRAPA–CENARGEN, 1998. p.239–249.
- BRASIL. Companhia Nacional de Abastecimento. CONAB. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 28 mar. 2004.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.
- BRASILEIRO, A. C. M.; DUSI, D. M. A. Transformação genética de plantas. V.2, In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J. A.. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA–SPI/EMBRAPA–CNPq, 1999. p.679–735.
- COBB, A. **Herbicides and plant physiology**. London: Champman and Hall, 1992. p.176.
- DOYLE, J. J. T.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-18, 1990.
- DUIJN, G.; BIERT, R.; BLEEKER-MARCELIS, H.; PEPPelman, H.; HESSING, M. Detection methods for genetically modified crops. **Food Control**, Zeist, v.10, p.359-361, 1999.
- EDWARDS, K.; JOHNSTONE, C.; THOMPSON, C. A simple and rapid for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 1349, 1991.
- FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**, 3º ed. Brasília: EMBRAPA–CENARGEN, 1998. p.220.
- 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-emergence treatment to determine the presence of the Roundup Ready™ gene in soybean seed: A Laboratory Test. **Seed Technology**, United States, v.19, n.1, p.99–102, 1997.
- GUTORMSON, T. Herbicide trait testing. In: MACDONALD, M. B.; GUTORMSON, T.; TURNIPSEED, B. **Seed Technologist Training Manual**. Society of Commercial Seed Technologists, 2000. p.13–20.
- JAMES, C. **Global Status of Commercialized Transgenic Crops: 2003**. Ithaca: ISAAA, 2003. Briefs 30: Preview.
- KRZYZANOWSKI, F., C. Teste de comprimento de raiz de plântulas de soja. **Informativo ABRATES**, Londrina, v.2, n.1, p.11–14, 1991.
- KRUSE, N. D.; TREZZI, M. M.; VIDAL, R.A. 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.
- MACHADO, A. A.; CONCEIÇÃO, A. R. **Sistema de análise estatística para windows. WinStat. Versão 2.0**. UFPel, 2003.
- MONQUERO, P. A. **Dinâmica populacional e mecanismos de tolerância de espécies de plantas daninhas ao herbicida glyphosate**. 2003. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.
- NASCIMENTO, W. M.; TORRES, A. C.; PAIVA, S. A. V.; TAYLOR, M.; CANTLIFFE, D. J. Bio-assay for detection of glyphosate tolerance in lettuce transgenic seeds. In: 26 INTERNATIONAL SEED TESTING CONGRESS – Seed Symposium, 143., 2001, p.18-20.
- SILVA, M. P. **Metodologias para identificação de sementes de arroz mutante, tolerante ao herbicida imazethapyr**. Pelotas. 2003. 30p. Dissertação (Mestrado em Ciência & Tecnologia de Sementes) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2003.
- TERZI, V.; FERRARI, B.; FINOCCHIAROT, F.; FONZO, N. D.; STANCA, A. M. LAMACCHIA, C.; NAPIER, J.; CEGRI, P. R.; FACCIOLI, P. TaqMan PCR for detection of genetically modified durum wheat. **Journal of Cereal Science**, Inglaterra, n.37, p.157–163, 2003.
- 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, 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.

