



Deteccção de sementes de soja geneticamente modificada por meio de teste de germinação

Detection of Soybean seeds genetically modified by means of germination test

Rafael Heinz¹, Antonio Luiz Viegas Neto¹, Tarcisio de Oliveira Valente¹

¹Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Faculdade de Ciências Agrárias (FCA), Rodovia Dourados-Itahum, km 12, CEP 79804-970, Dourados, MS.
E-mail: agroraf@yahoo.com.br

Recebido em: 14/06/2010

Aceito em: 14/03/2011

Resumo. O trabalho teve como objetivo a detecccção de sementes de soja geneticamente modificadas utilizando teste de germinação. O experimento foi baseado no teste de germinação, utilizando como tratamento duas variedades de soja (BRS 245RR e CD202) e cinco concentrações da solução de glyphosate (15, 30, 45, 60 e 75%) e uma testemunha (água destilada). As sementes de soja foram alocadas em papel germitest pré-embebidos em solução de glyphosate de acordo com os tratamentos e levadas ao germinador. Foram avaliadas a porcentagem de germinação de plântulas normais, anormais e sementes mortas, comprimento de radícula, hipocótilo e epicótilo. A cultivar de soja convencional apresentou as menores porcentagens de plântulas normais e maiores de plântulas anormais e sementes mortas. Houve redução do comprimento de radícula, hipocótilo e epicótilo proporcional ao aumento da concentração de solução de glyphosate, sendo mais drástica na cultivar não geneticamente modificada. A utilização de teste de germinação com substrato embebido em solução de glyphosate é eficiente para detectar sementes de soja geneticamente modificadas resistentes ao glyphosate. Recomenda-se a semeadura em substrato umidecido com solução de glyphosate na concentração de 45%.

Palavras-chave. *Glycine max*, glyphosate, resistência.

Abstract. The work had as objective the detection of seeds of soybean genetically modified using germination test. The experiment was based on the germination test, using as treatment two varieties of soybean (BRS 245RR and CD202) and five concentrations of the glyphosate solution (15, 30, 45, 60 and 75%) and a witness (distilled water). The soybean seeds had been placed in paper embryo-test daily pay-absorbed in solution of glyphosate in accordance with the treatment and taken to the germination chamber. Had been evaluated the percentage of germination of seedling normal, abnormal and deceased seeds, length of radicle, hypocotyl and epicotyl. The conventional soybean it presented the lesser normal percentages of seedlings and bigger of abnormal seedlings and deceased seeds. It had reduction of the length of radicle, hypocotyl and epicotyl proportional to the increase of the concentration of glyphosate solution, being more drastic in cultivating not genetically modified. The use of test of germination with substratum absorbed in glyphosate solution is efficient to detect resistant seeds of soybean genetically modified to glyphosate. Sowing in substratum humidified with solution of glyphosate in the 45% concentration sends regards to it.

Keywords. *Glycine max*, glyphosate, resistance.

Introdução

A cultura da soja (*Glycine max* L. Merrill.) ocupa atualmente, no Brasil, uma área de 21,7 milhões de hectares (Conab, 2010), tendo relevante importância econômica no país.

Existem vários métodos de detecccção de sementes de soja transgênica tolerante a herbicida, eles são baseados em características celulares ou moleculares dos genótipos e que diferem quanto

ao nível de sofisticação, tempo de execução e custo.

A soja transgênica tem a característica de tolerância ao herbicida não seletivo, glyphosate. O glyphosate é um ingrediente ativo herbicida 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 glyphosate apresenta elevada eficiência na eliminação de ervas daninhas. Desde 1971, quando foi relatado primeiramente como herbicida, três tipos de glyphosate vêm sendo comercializados: glyphosate-isopropilamônio, glyphosate-sesquisódio (patenteados por Monsanto e vendido como Round-up), e glyphosate-trimesium (patenteado por ICI, atual Syngenta). Seja como sal de amônio ou sódio, glyphosate é um organofosfato que não afeta o sistema nervoso da mesma maneira que outros organofosforados, em geral inseticidas, inibidores da enzima colinesterase (Amarante Júnior et al., 2002). Entre os efeitos sobre plântulas o glyphosate causa anormalidade em soja não geneticamente modificada (Funguetto et al., 2004).

O teste de resistência a herbicidas conduzidos 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 (Miranda et al., 2006). Na detecção de sementes de plantas transgênicas, a utilização de métodos mais rápidos e eficientes a baixo custo é preferível. Os bioensaios são os métodos mais eficientes comparando a relação custo/benefício na detecção de sementes de soja transgênica, sendo o método de pré-embebição o mais indicado (Cunha, 2005).

Torres (2003) em trabalho com bioensaio para detecção de sementes de soja transgênicas verificou que sementes transgênicas de soja tolerantes ao glyphosate germinaram normalmente em solução de glyphosate e entre sete e 10 dias, desenvolveram um sistema radicular normal, enquanto nas sementes de soja não-transgênicas ocorreram paralisações do crescimento da raiz primária e da emissão de raízes secundárias.

Desta forma, o trabalho teve como objetivo a detecção de sementes de soja geneticamente modificadas utilizando testes de germinação como alternativa de identificação de lote de sementes transgênicas.

Material e Métodos

O trabalho foi conduzido em agosto de 2009 no laboratório de sementes da Faculdade de

Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados, em Dourados, MS. Foi realizado o ensaio baseado no teste de germinação, de acordo com as Regras de Análise de Sementes – RAS (Brasil, 1992).

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 6x2, com quatro repetições. Os tratamentos consistiram da combinação fatorial de duas variedades de soja (CD 202, BRS 245RR) e cinco concentrações da solução de glyphosate (15, 30,45, 60 e 75%) e uma testemunha (água destilada). Foram utilizadas 50 sementes de soja por unidade experimental.

No ensaio foram utilizadas duas cultivares de soja (*Glycine max*, L. Merrill), sendo uma delas convencional (CD 202) e a outra geneticamente modificada para tolerância ao glyphosate (BRS 245RR), a primeira é uma cultivar da Coodetec e a segunda da Embrapa. As sementes são procedentes do ano agrícola 2008/2009.

Foi utilizado o herbicida glyphosate que possuía formulação contendo 480 g L⁻¹ de sal isopropilamina de N- (fosfometil) glicina, 360 g L⁻¹ de equivalente ácido de N- (fosfometil) glicina e 684 g L⁻¹ de outros componentes. A solução estoque de glyphosate foi diluída em concentrações de 15, 30, 45, 60 e 75%.

As sementes de soja foram alocadas em papel germitest pré-embebidos em solução de glyphosate, de acordo com os tratamentos. O papel germitest foi umedecido com quantidade de solução equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco. Os rolos de papel contendo as sementes de soja foram levados ao germinador a uma temperatura de 25° C (Brasil, 1992).

Após setes dias de implantação do estudo foi realizado a leitura da germinação através de observação visual de plântulas. Foram avaliados o comprimento de epicótilo, do hipocótilo, radícula e porcentagem de germinação. A porcentagem de germinação foi dividida, em germinação quanto a plântulas normais, anormais e sementes mortas.

Os resultados foram submetidos à análise de variância. As médias foram analisadas por meio de ajuste de equações de regressão em função da concentração da solução de glyphosate, aplicando-se o sistema de análise estatística SAEG (Ribeiro Júnior, 2001).



Resultados e Discussão

Na Tabela 1 observa-se o resumo da análise de variância dos parâmetros comprimento de epicótilo (EP), de hipocótilo (HIPO) e radícula (RAD), germinação de plântulas normais (NORMAIS), anormais (ANORMAIS) e sementes mortas (MORTAS) de duas variedades

de soja sob diferentes doses de glyphosate. Na análise de variância houve efeito significativo para todos os parâmetros estudados, mostrando a possibilidade de detecção de diferenças entre soja transgênica e convencional por meio de teste de germinação com o uso de diferentes doses de solução de glyphosate.

Tabela 1. Análise de variância do tamanho médio do epicótilo (EP), hipocótilo (HIPO), radícula (RAD), porcentagem de germinação de plântulas normais (NORMAIS), anormais (ANORMAIS) e sementes mortas (MORTAS) de duas cultivares de soja, uma transgênica e outra convencional em diferentes doses de glyphosate. Dourados (MS), 2009.

Fonte de Variação	G. L.	QM		
		EP	HIPO	RAD
Cultivares	1	0,65*	27,45*	53,67*
Doses	5	0,30*	24,70*	39,93*
Variedades x Doses	5	0,04*	2,07*	14,57*
Repetições	3	0,00	0,22	1,51
Resíduo	33	0,01	0,33	1,38
Média (cm)		0,28	2,75	1,89
CV%		23,41	21,08	22,27

Fonte de Variação	G. L.	QM		
		NORMAIS	ANORMAIS	MORTAS
Cultivares	1	60066,75*	46750,08*	784,08*
Doses	5	2188,48*	1888,48*	36,35*
Variedades x Doses	5	1865,95*	1747,28*	39,68*
Repetições	3	56,30	12,75	22,97
Resíduo	33	43,94	42,20	9,82
Média (%)		58,54	35,04	6,37
CV%		11,32	18,54	29,16

* Efeito significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Observa-se na Tabela 1, que a porcentagem de germinação de plântulas normais apresentou o menor valor de coeficiente de variação, estimado em 11,32%, enquanto que a porcentagem de sementes mortas apresentou o maior valor, estimado em 29,16. Valores altos de coeficientes de variação devem estar relacionados à avaliação da germinação em condição de estresse. Em trabalho realizado por Henicka et al. (2006), avaliando o comportamento germinativo da espécie *Apuleia leiocarpa*, sob diferentes condições de temperatura, luz e estresse salino, o coeficiente de variação para a germinação foi estimado em 26,03%.

De acordo com a Figura 1, observa-se resposta quadrática da germinação da BRS 245 RR em função das diferentes concentrações da solução de glyphosate. A porcentagem de germinação da BRS 245 RR apresentou leve

redução com o aumento da concentração da solução, demonstrando pouco efeito do glyphosate no processo de germinação, isto devido à presença do gene de resistência ao herbicida.

Com relação à porcentagem de germinação da cultivar de soja convencional, CD 202, observou-se resposta quadrática. Foram obtidas maiores porcentagens de germinação quando as sementes foram embebidas em água e observou-se uma drástica redução na germinação com o aumento dos níveis de concentração, apresentando valores de germinação abaixo de 10% quando submetido à dose de 45% de solução de glyphosate (Figura 1). Em estudo utilizando a pré-embebição em sementes de soja, Tillmann & West (2004) observaram inibição do processo de germinação de sementes de cultivar não geneticamente modificado.

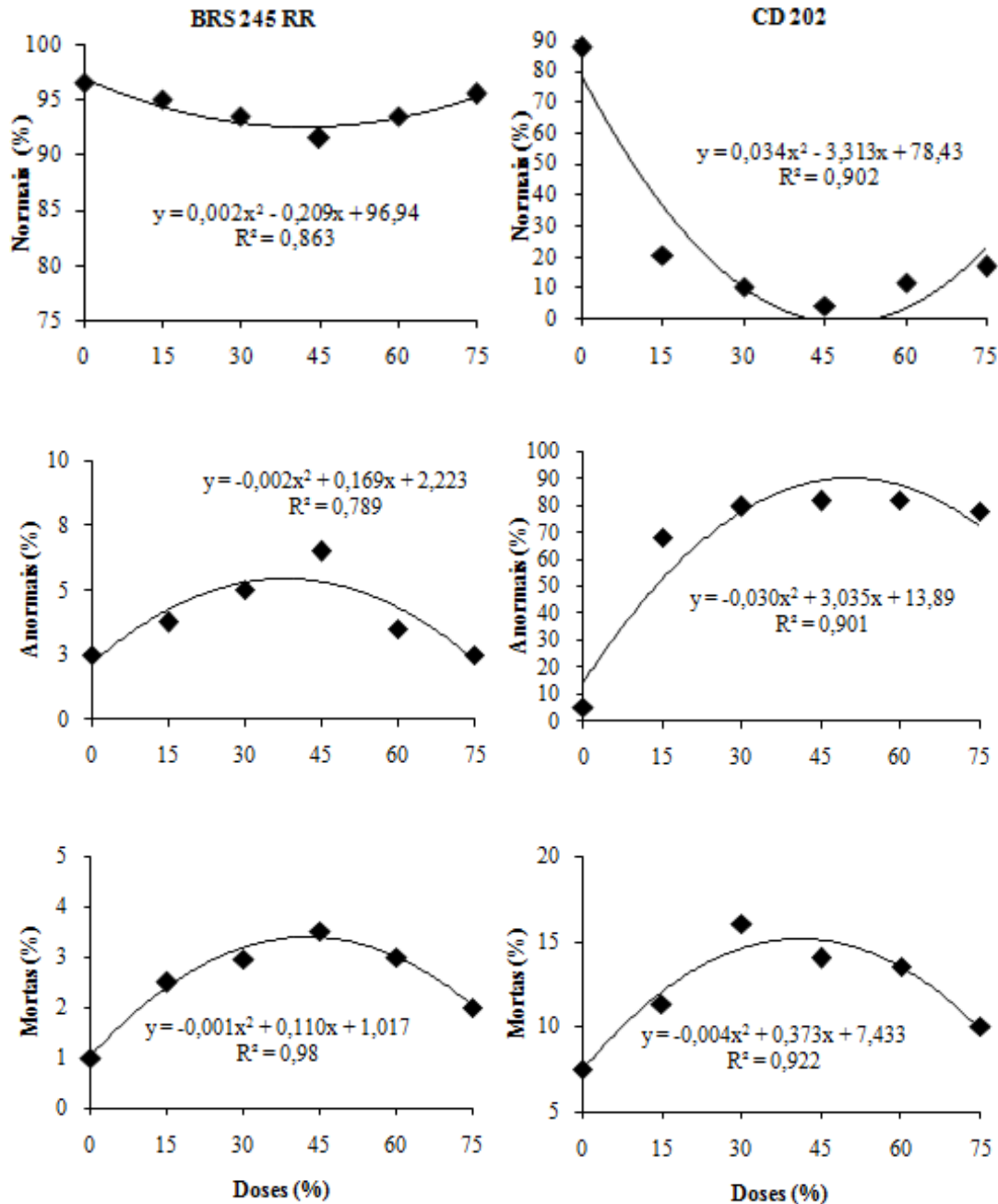


Figura 1. Porcentagem de germinação de plântulas normais (%), porcentagem de plântulas anormais (%) e sementes mortas (%) de duas cultivares de soja (BRS 245 RR e CD 202), em função de diferentes concentrações de solução de glyphosate. Dourados (MS), 2009.

Para a porcentagem de plântulas anormais observou-se menores valores para a cultivar geneticamente modificada, a maior média obtida foi de 8% quando submetido a concentração de 45% de solução (Figura 1). O menor

desenvolvimento de plântulas anormais em soja geneticamente modificada é devido à presença do gene que confere resistência ao herbicida por codificar uma variante da enzima EPSPS insensível a este inibidor.



Na CD 202, cultivar convencional a resposta aos níveis de concentração de glyphosate foi quadrática, apresentando menores porcentagens de plântulas anormais quando embebida em água e aumento de plântulas anormais até a concentração de 45%, quando foi possível observar entorno de 80% de plântulas anormais (Figura 1). Em soja não geneticamente modificada, o glyphosate inibe a enzima 5-enolpiruvil shiquimato-3-fosfato sintetase (EPSPS) e impede que a planta forme aminoácidos essenciais para a síntese de proteínas e também alguns metabolitos secundários (Kruser et al., 2000). Desta maneira a cultivar convencional na presença de herbicida apenas iniciou o processo germinativo não atendendo aos critérios de plântulas normais. Quanto à porcentagem de sementes mortas, observou-se maiores valores de sementes mortas para a cultivar convencional quando comparada com a cultivar geneticamente modificada (Figura 1). A maior porcentagem de sementes mortas foi obtida quando as sementes de soja foram embebidas em solução de glyphosate na concentração de 45%.

Em relação ao efeito do glyphosate sobre o desenvolvimento de plântulas de soja, observou-se que as plântulas de soja convencional foram drasticamente afetadas, apresentando uma redução geral no desenvolvimento da radícula, hipocótilo e epicótilo. Contudo o desenvolvimento das plântulas de soja geneticamente modificadas foi pouco afetado pelo herbicida, apresentando plântulas bem desenvolvidas, com redução do comprimento de hipocótilo e epicótilo quando submetida em altas concentrações da solução de glyphosate (Figura 2).

Em relação ao desenvolvimento das plântulas de soja convencional, observou-se acentuada redução quando submetida às concentrações superiores a 30% da solução. A redução no comprimento pode ser atribuída à privação de aminoácidos aromáticos, provocada pelo glyphosate, que compromete a biossíntese de enzimas envolvidas na produção de carboidratos e lipídeos (Siqueira et al., 1998).

Observa-se na Figura 2 decréscimo no tamanho de hipocótilo, epicótilo e radícula de soja geneticamente modificada proporcional ao aumento da concentração da solução de glyphosate, observando menores médias quando as sementes foram submetidas a concentração de 60% da solução. Bertagnolli et al. (2006), estudando a eficiência de sistemas hidropônicos para detecção de sementes de soja geneticamente modificada observaram decréscimo no tamanho de plântulas normais com o aumento da concentração da solução de glyphosate.

De acordo com a Figura 2, observa-se a redução mais acentuada na radícula das plântulas do que no hipocótilo e epicótilo para as cultivares geneticamente modificada e convencional. Resultados semelhantes foram obtidos por Funguetto et al. (2004), avaliando metodologias de bioensaio para detecção de sementes de soja tolerantes ao herbicida glyphosate.

Apesar de o herbicida causar redução no comprimento de hipocótilo, epicótilo e radícula dos cultivares convencional e geneticamente modificado, é possível diferenciar o cultivar geneticamente modificado do convencional utilizando principalmente o comprimento de radícula, que foi drasticamente afetada na cultivar convencional.

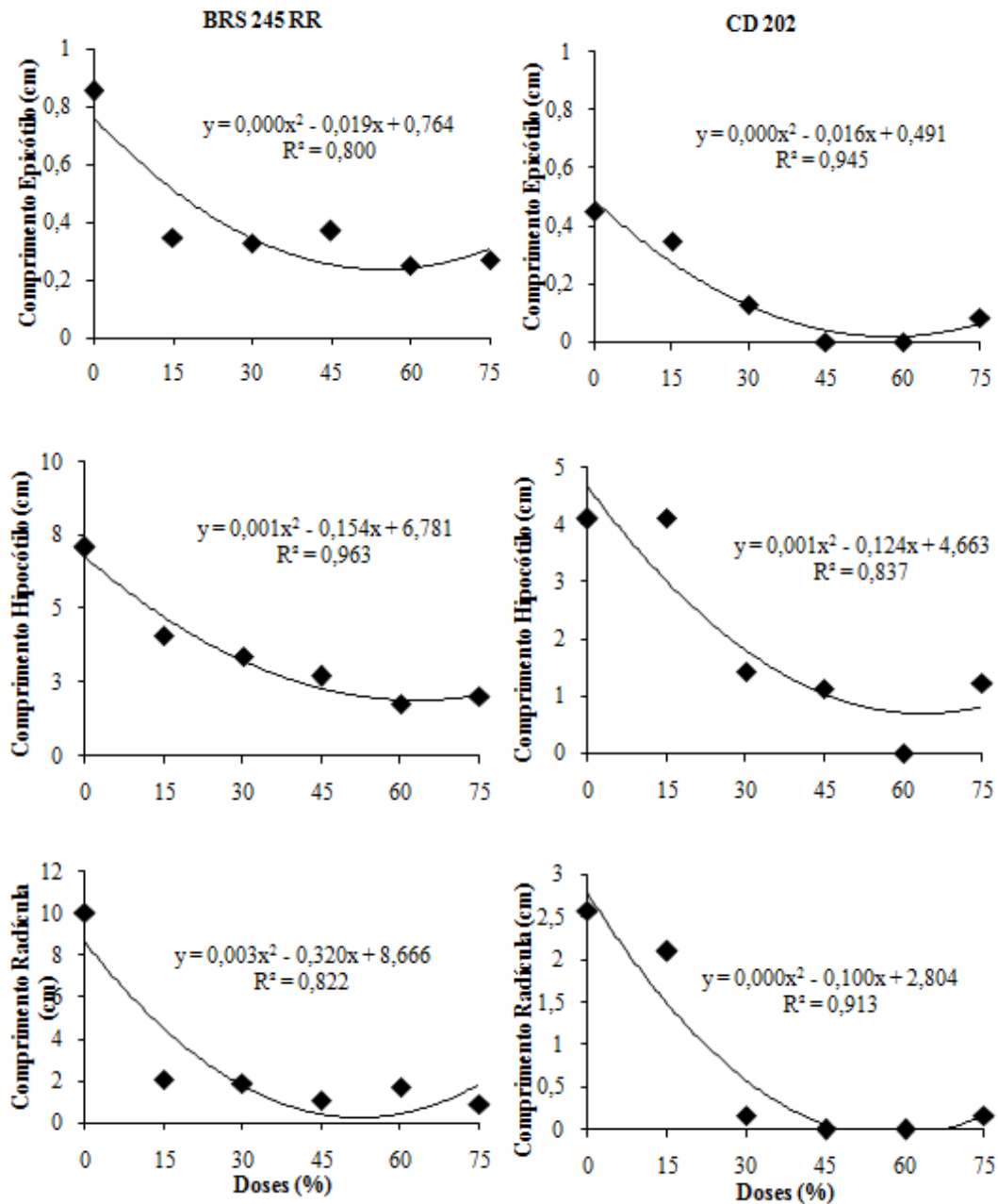


Figura 2. Comprimento de epicótilo (cm), comprimento de hipocótilo (cm) e comprimento de radícula (cm) de duas cultivares de soja (BRS 245 RR e CD 202), em função de diferentes concentrações de solução de glyphosate. Dourados (MS), 2009.

Conclusões

A utilização de teste de germinação com substrato embebido em solução de glyphosate é eficiente para detectar sementes de soja geneticamente modificadas e sementes de soja convencional.

Para a detecção de soja geneticamente modificada recomenda-se a semeadura em substrato umedecido com solução de glyphosate, na concentração de 45%.

Referências

AMARANTE JUNIOR, O.P.; SANTOS, T.C.R.; BRITO, N.M.; RIBEIRO, M.L. Glifosato:



propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, v.25, n.4, p.589-593, 2002.

BERTAGNOLLI, C.M.; TILLMANN, M.A.A.; VILLELA, F.A. Sistema hidropônico com uso de solução de herbicida na detecção de soja geneticamente modificada resistente ao glifosato. **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, n.2, p.182-192, 2006.

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

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, sexto levantamento, março 2010**. Brasília: Conab, 2010, 22 p. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/4graos_07.01.10.pdf>. Acesso em: 29 de maio de 2010.

CUNHA, C.S.M.; TILLMANN, M.A.A.; VILLELA, F.A.; DODE, L.B.; BALERINI, F. Comparação de métodos na detecção de sementes de soja geneticamente modificada resistente ao glifosato. **Revista Brasileira de Sementes**, v.27, n.1, p.167-175, 2005.

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

HENICKA, G. S.; BRAGA, L. F.; SOUSA, M. P.; CARVALHO, M. A. C. Germinação de Sementes de *Apuleia leiocarpa* (VOGEL.) J. F. MACBR.: Temperatura, fotoblatismo e estresse salino. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, v.4, n.1, p.37-46, 2006.

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

MIRANDA, D.M.; TILLMANN, M.A.A.; NOLDIN, J.A.; BALERINI, F. Bioensaio em casa-de-vegetação na detecção e quantificação de

sementes de soja geneticamente modificada. **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, n.1, p.187-192, 2006.

PEREIRA, T.S. Germinação de sementes de *Bauhinia forficata* LINK.(Leguminosae Caesalpinoideae). **Revista Brasileira de Sementes**, v.14, n.1, p.77-82, 1992.

RIBEIRO JÚNIOR, J.I. **Análises Estatísticas no SAEG**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2001. 301p.

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

TILLMANN, M.A.A.; WEST, S.H. Identification of genetically modified soybean (*Glycine max* L. Merr.) seeds resistant to glyphosate. **Scientia Agricola**, v.61, n.3, 2004.

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