WELISON ANDRADE PEREIRA

ANÁLISE DO FLUXO GÊNICO EM SOJA RR E METODOLOGIA PARA SUA DETECÇÃO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de "Magister Scientiae".

VIÇOSA

MINAS GERAIS - BRASIL

2006

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e Classificação da Biblioteca Central da UFV

T
P436a
2006

Pereira, Welison Andrade, 1979-
Análise do fluxo gênico em soja RR e metodologia para sua detecção / Welison Andrade Pereira. – Viçosa : UFV, 2006.
xi, 65f. : il. ; 29cm.

Inclui anexo.

Orientador: Aluízio Borém.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 56-61.

1. Soja - Semente - Efeito dos herbicidas. 2. Soja - Reprodução. 3. Herbicidas - Toxicologia. 4. Organismos transgênicos. 5. Biossegurança. 6. Glifosato. I. Universidade Federal de Viçosa. II.Título.

CDD 22.ed. 635.655233

WELISON ANDRADE PEREIRA

ANÁLISE DO FLUXO GÊNICO EM SOJA RR E METODOLOGIA PARA SUA DETECÇÃO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de "Magister Scientiae".

APROVADA: 13 de fevereiro de 2006.

Prof. José Eustáquio de Souza Carneiro
(Conselheiro)

Prof. Marcos Paiva Del Giúdice
(Conselheiro)

Profa. Denise Cunha F. dos Santos Dias

Prof. Tuneo Sediyama

Prof. Aluízio Borém de Oliveira
(Orientador)

Dedico,

a vocês, pilares de minha vida, Silvia Pereira, Irineu Pereira (*in memoriam*), Sara Pereira e Kelly Cunha, pelos momentos imprescindíveis de força, compreensão, carinho e amor.

A G R A D E C I M E N T O S

Ao PAI toda Honra e toda a Glória;

À Universidade Federal de Viçosa e, especificamente, ao Programa de Pós-Graduação Genética e Melhoramento pela oportunidade da realização deste sonho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio por meio de bolsa de estudo.

À COODETEC pela prontidão no fornecimento do material de estudo.

Ao Prof. orientador, Aluízio Borém, a quem devo gratidão e respeito por todos os momentos de incentivo, ensinamento, sugestões e críticas.

Ao Prof. conselheiro Marcos Paiva Del Giúdice pela prontidão tanto na instalação propriamente dita dos experimentos quanto pelas sugestões para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao Prof. conselheiro José Eustáquio de Souza Carneiro, por contribuir para a realização deste trabalho.

À Profª Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias, pela concessão de sua atenção e experiência profissional, fundamentais para o êxito das pesquisas realizadas no laboratório de sementes.

Aos pilares de minha vida e equilíbrio Sílvia Pereira, Sara Pereira e Kelly Cunha por toda compreensão, carinho e amor.

À Irineu Pereira, meu pai, (*in memoriam*) pelos ensinamentos de vida.

À todos os entes queridos, vó, tios e primos *Pereira* e tios e primos *Andrade*, TODOS essenciais para minha formação.

Aos companheiros irmãos da república *Acima da Perfeição*, Carlos Eduardo Magalhães dos Santos e Paulo Cesar Dias pelo convívio e amizade.

Ao amigo Bruno Laviola pelo incentivo e orientação antes e durante o curso.

Aos amigos que compartilharam comigo momentos deste período, Tatiana Rosado, Rafael Vivian, Márcio Rocha, Antônio Almeida, Almir Bissiatti e Edmar Vasconcellos.

Aos professores Aluízio Borém, Fernando Pinto, Cláudio Bruckner, Tuneo Sediyama, Glauco Miranda, José Eustáquio, José Marcelo Soriano, Elza Fernandes de Araújo e Marcos Ribeiro Furtado pelos ensinamentos por meio de suas disciplinas.

Aos professores da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Carangola, por toda orientação e apoio à minha formação acadêmica.

À Juliano Ferreira e Fabiéli Lanes pelas contribuições essenciais.

Aos funcionários do laboratório de genética de soja, em todos os momentos dispostos a contribuir com a realização da pesquisa científica, não somente exercendo suas funções como também colaborando com suas experiências em forma de sugestões, críticas e ensinamentos;

Ao Paulo Paiva, técnico presente e sempre determinado a contribuir com sua experiência na realização desta pesquisa;

Aos funcionários dos campos experimentais de Coimbra e do Aeroporto.

Aos companheiros da Genética e Melhoramento pelos imprescindíveis momentos de aprendizagem mútua, alegria e amizade.

À consciência de que sozinho não obteria tantos êxitos.

Enfim, à todos que participaram de minha vida contribuindo na conquista desta vitória singular.

A todos vocês, de coração, obrigado.

BIOGRAFIA

Welison Andrade Pereira, filho de Irineu Pereira e Silvia Andrade de Oliveira Pereira, nasceu aos 28 dias do mês de novembro do ano de 1979, no município de Nova Iguaçu, estado do Rio de Janeiro. Cursou as três primeiras séries do ensino fundamental no município de Divino, Minas Gerais, terminando-o na cidade de São Francisco do Glória, deste mesmo Estado.

Cursou o segundo grau profissionalizante 'Técnico em Contabilidade' na cidade de Miradouro, em Minas Gerais, concluindo-o no ano de 1997. Em 1999 iniciou sua graduação pelo curso de Ciências Biológicas – Licenciatura plena, na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Carangola, vindo a colar grau no ano de 2002.

No período de 2003 a 2005 realizou o curso de *Lato Sensu* em Biologia pela Universidade Federal de Lavras, UFLA, Minas Gerais, com monografia de conclusão de curso de título *Controle Genético de Caracteres Qualitativos em Soja*, sob orientação do professor Antônio Magno Patto Ramalho.

No primeiro semestre de 2004, ingressou no *Stricto Sensu* em Genética e Melhoramento pela Universidade Federal de Viçosa, sob orientação do professor Aluízio Borém, vindo a apresentar sua dissertação em 2006.

CONTEÚDO

LISTA DE FIGURAS..... viii
LISTA DE TABELAS..... ix
RESUMO..... x
ABSTRACT..... xi
Introdução Geral..... 1
Capítulo 1 Bioensaios para detecção de sementes de soja RR
Introdução..... 8
Material e Métodos
Localidade e genótipos..... 15
Bioensaios..... 15
Teste de germinação..... 16
Herbicida..... 16
Bioensaio 1 – Teste de emergência em leito de areia após imersão das sementes em solução do herbicida por uma hora..... 16
Bioensaio 2 – Teste de germinação após imersão das sementes em solução do herbicida por uma hora..... 18
Bioensaio 3 – Teste de germinação em papel germiteste umedecido com solução do herbicida..... 18
Bioensaio 4 – Teste de germinação de sementes pré-embebidas por 24 horas em papel germiteste umedecido com solução do herbicida..... 19
Bioensaio 5 – Teste de germinação em caixa gerbox..... 19
Procedimento Estatístico..... 20
Resultados e Discussão
Bioensaio 1 – Teste de emergência em leito de areia..... 21
Bioensaios (2) Teste de germinação após imersão das sementes em solução do herbicida por uma hora; (3) Teste de germinação em papel germiteste umedecido com solução do herbicida; e, (4) Teste de germinação de sementes pré-embebidas por 24 horas em papel germiteste umedecido com solução do herbicida..... 26
Bioensaio 5 – Teste de germinação em caixa gerbox..... 31

Conclusões..... 35
Capítulo 2 Análise do fluxo gênico em soja
Introdução..... 36
Material e Métodos
Germoplasma..... 43
Localidade..... 44
Plantio dos Ensaios..... 44
Resultados e Discussão..... 48
Conclusões..... 55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 56
Anexo I – Plântulas observadas aos sete dias de teste de germinação após imersão das sementes em solução do herbicida por uma hora..... 62
Anexo II – Plântulas observadas aos sete dias de teste de germinação em papel germiteste umedecido com solução do herbicida..... 63
Anexo III – Plântulas observadas aos sete dias de teste de germinação das sementes pré-embebidas por 24 horas em papel germiteste umedecido com solução do herbicida..... 64

LISTA DE FIGURAS

01 (A) Índice de Velocidade de Emergência e (B) percentagem de emergência..... 22
02 (A) Comprimento de raiz primária e (B) comprimento de hipocótilo..... 23
03 (A) Percentagem de plântulas normais e (B) percentagem de plântulas anormais..... 24
04 (A) Peso de matéria seca por repetição e (B) peso de matéria seca por plântula normal.. 25
05 Percentagem de sementes não germinadas nos diferentes tratamentos e nos diferentes ensaios..... 26
06 Teor de água das plântulas nos diferentes tratamentos e nos diferentes ensaios..... 27
07 Comprimento médio de plântulas nos diferentes tratamentos e nos diferentes ensaios.... 27
08 Percentagem de plântulas normais nos diferentes tratamentos e nos diferentes ensaios... 28
09 Percentagem de plântulas anormais nos diferentes tratamentos e nos diferentes ensaios. 29
10 Percentagem de plântulas com raízes secundárias nos diferentes tratamentos e nos diferentes ensaios..... 29
11 Peso (gramas) de matéria seca de plântulas nos diferentes tratamentos e nos diferentes ensaios..... 30
12 Emissão de raiz primária ao 5º dia, em percentagem média..... 31
13 Emissão da raiz primária ao 7º dia, em percentagem média..... 32
14 Percentagem de plântulas com raízes secundárias ao 7º dia..... 32
15 Emissão de raízes secundárias..... 33
16 Percentagem de sementes não germinadas..... 33
17 Esquema do experimento em campo..... 45
18 Fotografia enfatizando o florescimento simultâneo das cultivares..... 46
19 Fotografias enfatizando o padrão de plântulas normais e anormais, obtidas em teste de germinação sob tratamento com solução do glifosato a 0,06%..... 49
20 Fotografias de plântulas de soja tolerante e sensível ao glifosato..... 50
21 Fotografia enfatizando a comparação e identificação de plântulas tolerantes e sensíveis ao glifosato..... 51
22 Regressão linear com platô dos dados para as localidades de Viçosa e Florestal..... 53

LISTA DE TABELAS

01 Panorama dos estudos relativos à taxa de fecundação cruzada em soja até 1972..... 39

02 Características das cultivares CD211 e CD219RR®..... 43

03 Autores, ano, local do estudo sobre fluxo gênico e percentagem de fecundação cruzada observada..... 47

04 Percentagem de fecundação cruzada aos 8m de distância da fonte de pólen..... 49

05 Percentagem de fecundação cruzada aos 4m de distância da fonte de pólen..... 50

06 Percentagem de fecundação cruzada aos 2m de distância da fonte de pólen..... 51

07 Percentagem de fecundação cruzada a 1m de distância da fonte de pólen..... 52

08 Percentagem de fecundação cruzada a 0,5m de distância da fonte de pólen..... 52

RESUMO

PEREIRA, Welison Andrade, M.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2006. **Análise do fluxo gênico em soja RR e metodologia para sua detecção**. Orientador: Aluízio Borém. Conselheiros: Marcos Paiva Del Giúdice e José Eustáquio de Souza Carneiro.

O objetivo deste trabalho foi investigar o fluxo gênico da soja Roundup Ready para uma convencional em duas localidades no Estado de Minas Gerais: Viçosa e Florestal. Foi observada a taxa de fecundação cruzada entre CD219RR® e CD211, ambas de propriedade da COODETEC (Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola). Foi também objetivo dessa pesquisa estudar cinco metodologias para identificar sementes de soja tolerante ao herbicida. Uma delas foi escolhida para detecção do fluxo gênico neste trabalho. O primeiro experimento foi instalado em campo num esquema constituído de quadrados concêntricos, delineado especialmente para os objetivos deste estudo. Os cinco primeiros quadrados, do centro para borda, formaram a fonte de pólen, onde sementes do cultivar tolerante ao glifosato foram semeadas. À sua volta, foi semeado o cultivar sensível. Na fase de maturação, estágio R8, foram colhidas nas quatro direções a partir do centro, fileiras correspondentes aos lados dos quadrados, em distâncias variadas da fonte de pólen: 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 metros. Das fileiras colhidas, amostras de 900 sementes por fileira foram avaliadas por meio do bioensaio de germinação de sementes em substrato umedecido com solução 0,06% de glifosato, metodologia adotada a partir dos estudos realizados sobre os bioensaios. Nesta análise, plântulas dotadas de traços indicativos de tolerância ao glifosato indicaram ocorrência de fecundação cruzada. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por meio de regressão linear com platô. Os resultados indicaram taxas de fecundação cruzada diferentes para as duas localidades mostrando que esta característica varia em função do ambiente. As maiores taxas de hibridação natural (1,27% em Florestal e 0,25% em Viçosa) ocorreram às menores distâncias. As taxas de fecundação cruzada aproximaram-se de zero às distâncias de 2,26 e 1,16m da fonte, para Florestal e Viçosa, respectivamente.

ABSTRACT

PEREIRA, Welison Andrade, M.S., Universidade Federal de Viçosa, February, 2006. **Gene flow analisys in RR soybean and methodology for its deteccion**. Adviser: Aluízio Borém. Committee members: Marcos Paiva Del Giúdice and José Eustáquio de Souza Carneiro.

The objective of this work was to investigate the gene flow from the Roundup Ready soybean to a conventional in two sites of Minas Gerais: Viçosa and Florestal. Cross-pollination rate was observed between CD219RR® and CD211, both of property of COODETEC (Central Cooperative of Agricultural Research). It was also objective of this research to study five methodologies to identify tolerant soybean seeds to the herbicide, and one of them was chosen for the detection of the occurrence of gene flow in this work. The first experiment was installed in the field in an outline of concentric squares delineated especially for the objectives of this study. The first five squares, from the center to the border, formed the pollen source, where seeds were sowed of gliphosate tolerant cultivar. The remaing squares were sowed susceptible cultivar seeds. In the maturation stage, stage R8, were harvested in the four directions starting from the center, rows corresponding to the sides of the squares, in varied distances of the pollen source: 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 and 8,0 meters. Of the harvested rows, samples of 900 seeds per row were evaluated through the bioassay of germination in substrate moistened with 0,06% glifosato solution. In this analysis, seedling endowed with indicative trace of tolerance to the gliphosate indicated occurrence of cross-pollination. The obtained data were analyzed statistically through linear regression with plateau. Results indicated cross-pollination rates different for the two locations showing that this trait can vary in function of the environment. The largest natural hybridization rates (1,27% in Florestal and 0,25% in Viçosa) happened at the smallest distances. The cross-pollination rates approached zero at the distances of 2,26 and 1,16m from the source, for Florestal and Viçosa, respectively.

INTRODUÇÃO GERAL

A soja é uma leguminosa dotada de significativos valores nutricionais e industriais. Tipicamente, cultivares comerciais apresentam teores médios de óleo em torno dos 23% e composição protéica podendo chegar a 40%, possuindo um excelente balanço de aminoácidos essenciais, além de sais minerais, fibras e glicídios (Vieira et al., 1999). Todas estas propriedades elevam os seus valores nutritivos para a alimentação humana e de matéria-prima para fabricação industrial de vários produtos, tornando, consequentemente, grande a demanda por esta leguminosa no mercado mundial.

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, com a safra 2004/05 superior aos 51 milhões de toneladas de grãos. Este valor consolida um crescimento de 2,6% em relação à safra anterior (Conab, 2005b). Especula-se que, ainda nessa década, o País ocupe a liderança em produção de soja, superando os Estados Unidos. Esta expectativa se baseia no seu notável potencial de expansão de áreas cultiváveis, bem como no aumento de produtividade devido ao melhoramento genético, o qual tem sido responsável pelo desenvolvimento de variedades adaptadas às diversas condições edafoclimáticas do território nacional.

Economicamente, o complexo soja tem representado mais de 10% do total das exportações do Brasil e esta informação se torna mais relevante se for

considerado que o agronegócio tem sido responsável por mais de 40% do produto interno bruto nacional (França Neto, 2004). A soja, que começou a ser cultivada no país como uma opção de verão para alternar com o trigo, hoje é parte fundamental da economia brasileira.

Dentre os países produtores de soja, os Estados Unidos representam para o Brasil o maior competidor no mercado internacional, porém, aparentando ter atingido o seu teto produtivo. Conforme estudos acerca das perspectivas de produção de soja, os Estados Unidos não apresentam significativas possibilidades de expansão em fronteiras agrícolas, e desta forma, a maneira de aumentar sua produção seria por substituição de outras culturas, caso semelhante ao da Argentina e da Bolívia. Os mega populosos China e Índia, por sua vez, se enquadram como importadores do produto. Sendo assim, o Brasil se destaca, entre os produtores, exibindo a possibilidade de ultrapassar os 85 milhões de toneladas de grãos de soja. Considerando o aumento na demanda de 5,3% ao ano, o Brasil seria o único País capaz de satisfazê-la (Roessing, 2004).

A manutenção da elevada produção é função da produtividade dos cultivares. Existem vários fatores que impedem que as variedades expressem seu potencial produtivo máximo. No Brasil, pelo segundo ano consecutivo, a cultura apresentou queda (5,8%) em produtividade (Conab, 2005a). Na safra 2003/04, a chegada da ferrugem asiática às lavouras levou prejuízo a muitos sojicultores. Em 2004/05, o fator responsável pela queda foi a acentuada seca sofrida por notáveis estados produtores, como o Rio Grande do Sul, Paraná, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso, sendo que este último Estado ainda sofreu com o excesso de chuvas no período da colheita (Conab, 2005b). A manutenção do crescimento em produção só ocorreu em virtude da expansão em área de 9,0% em relação à safra anterior.

Outro fator negativo para a manifestação do potencial produtivo de uma variedade é a infestação da lavoura com plantas daninhas. Estas podem interferir de forma direta no rendimento e qualidade do produto, ou ainda, indiretamente no manejo da cultura, na eficiência técnica da colheita e beneficiamento dos grãos, até mesmo como hospedeiras de pragas, doenças e nematóides (Gazziero e Prete, 2004). Assim, o manejo de plantas daninhas é fundamental para a estabilidade da cultura.

No final da década de 70, a disponibilidade do herbicida glifosato no mercado alavancou o controle químico de plantas daninhas no sistema de plantio direto, em virtude do amplo espectro de ação deste herbicida (Kruse et al., 2000), que atua inibindo a ação da enzima 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPS). Esta inibição, em suma, previne a síntese dos aminoácidos aromáticos derivados do corismato e também de metabólitos secundários (Shah et al., 1986).

O precursor 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato (EPSP) é fundamental para várias vias metabólicas que são vitais para as plantas, como na síntese dos aminoácidos aromáticos essenciais fenilalanina, triptofano e tirosina. Compostos secundários como alcalóides, cumarinas, flavonóides, lignina, ácidos benzóicos, vitaminas (K e E) e alguns hormônios (auxina e etileno) também dependem do EPSP (Trezzi et al., 2001; Amarante Jr. et al., 2002b).

Os inibidores da EPSPS são classificados como sistêmicos, pós-emergentes, não-seletivos, controlando plantas mono e dicotiledôneas, anuais e perenes (Shah et al., 1986; Kruse et al., 2000; Amarante Jr. et al., 2002a; Amarante Jr. et al., 2002b). O glifosato possui alta eficiência na eliminação de plantas daninhas (Amarante Jr., et al., 2002b), no entanto, a sensibilidade de plantas cultivadas a este herbicida limita a sua utilização na pós-emergência das culturas. Dessa condição, surgiu o desafio de se desenvolver variedades tolerantes à ação deste herbicida, o que facilitaria o controle de daninhas (Kruse et al., 2000).

O desenvolvimento de variedades tolerantes à ação de herbicidas vem sendo discutido como um dos pontos de enfoque no melhoramento de plantas. Em vista dessa possibilidade, discute-se sobre os benefícios que a tolerância de culturas a determinados herbicidas poderia trazer para o manejo de plantas daninhas na lavoura, disponibilizando uma nova tecnologia no seu controle (Elmore et al., 2001).

O melhoramento vegetal, definido como ciência e arte de tornar as culturas mais úteis à humanidade (Borém, 2005), vem sendo fundamental, no decorrer da história de domesticação das espécies cultivadas, para o aumento da produtividade, melhoria da qualidade nutricional e manutenção da estabilidade de produção das diversas culturas que o homem faz uso. O conhecimento de que um genótipo é o resultado do cruzamento de genitores, e que estes genitores podem ser selecionados, consiste no ponto inicial da ação de melhorar. Contudo, se a soja

for analisada no que se refere ao pool genético, será constatado que as diversas variedades disponíveis atualmente no Brasil representam um pool gênico estreito da espécie. Este é um fator limitante para programas de melhoramento convencional, pois sem variabilidade torna-se difícil obter progresso genético.

O advento da engenharia genética, um ramo recente das ciências agrárias e biológicas, gerou para biólogos, agrônomos, geneticistas e melhoristas de plantas, a expectativa da utilização de ferramentas anteriormente indisponíveis no melhoramento convencional. Por intermédio da biotecnologia, barreiras inter-específicas tornaram superáveis, e os genes puderam ser identificados em qualquer organismo vivo, modificados para expressão em algum tecido específico e inseridos no genoma das espécies cultivadas (Gasser e Fraley, 1989). A incorporação ao genoma de uma espécie, de genes de outras espécies, sem o concurso da reprodução sexual, resulta em organismos geneticamente modificados, ou simplesmente, transgênicos (Paterniani, 2001).

Basicamente, a obtenção de um transgênico segue uma seqüência de procedimentos. Inicialmente, o gene de interesse é identificado e isolado. Em seguida, um vetor de expressão é utilizado para a clonagem desse gene e depois a construção gênica produzida é inserida na planta de interesse. Quando o evento da transgenia é obtido ele é identificado por seleção e este genótipo é introduzido em um programa de melhoramento. Em seguida, sementes são produzidas e lançadas no mercado. Paralelamente a esse processo de obtenção do organismo geneticamente modificado, são também realizadas as etapas fundamentais da propriedade intelectual e da biossegurança alimentar e ambiental (Rech, 2000).

Em soja, uma das primeiras aplicações práticas da engenharia genética foi o desenvolvimento da linhagem tolerante ao glifosato (Padgette et al., 1995). A soja tolerante ao glifosato foi obtida a partir da introdução do gene CP4 EPSPS proveniente da bactéria do solo do gênero *Agrobacterium*, identificada a partir da seleção entre microorganismos decompositores do glifosato. O princípio da tolerância é a elevada afinidade da EPSPS oriunda da Cepa 4 de *Agrobacterium* para com o fosfoenolpiruvato (PEP), levando à resistência aos inibidores da EPSPS (Kruse et al., 2000). A EPSPS convencional encontrada nas plantas possui maior afinidade com o glifosato do que com o PEP.

O gene CP4 EPSPS foi fundido a uma seqüência de genes derivada da EPSPS de petúnia (promotor) e introduzido na soja pelo método da biobalística.

Daí, a linhagem tolerante foi cruzada com linhagens sensíveis de alto desempenho agronômico. A partir da segregação 3:1 (tolerante: sensível) na geração F2, caracterizou-se o controle genético qualitativo monogênico de herança dominante completa (Padgette et al., 1995).

A soja geneticamente modificada apresenta expressão dupla da enzima EPSPS, original e da CP4 EPSPS, sendo esta última insensível à presença do herbicida (Kleba, 1998). Além da seqüência derivada da petúnia (CTP), a soja ainda possui seqüências do vírus do mosaico da couve-flor (P-E35S) e da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* (NOS 3'), as quais são necessárias como reguladoras da integração e funcionamento do gene CP4 EPSPS no genoma da planta (Padgette et al., 1995).

A linhagem 40-3-2, também referida como evento GTS 40-3-2, foi a primeira tolerante ao herbicida em soja. Suas plantas expressam a enzima EPSPS da *Agrobacterium* sp., sendo altamente tolerante ao glifosato e, desta forma, não apresentaram injúrias visíveis após a aplicação deste herbicida nas concentrações comerciais (Padgette et al., 1995).

Delannay et al. (1995) avaliaram o desempenho da linhagem 40-3-2 quanto ao impacto sobre suas características agronômicas e de sua progênie, sob tratamento com o herbicida durante o período de três anos (1992-1994), em dezenas de localidades. Em conclusão a este estudo, foi possível constatar que o gene CP4 EPSPS, inserido na linha 40-3-2, conferiu alto nível de tolerância à aplicação do herbicida em proporções de até duas vezes mais altas que o necessário para o manejo de plantas daninhas, não resultando em impactos negativos sobre a produtividade. Verificaram também estabilidade desse nível de tolerância geração-pós-geração, o qual não foi afetado por diferenças ambientais, tempo de aplicação ou background genético. Concluiu-se também que, por se tratar de único gene dominante, ele pode ser utilizado eficientemente em programas de melhoramento na geração de novos cultivares tolerantes ao herbicida.

A partir da chegada da soja Roundup Ready (RR) foi gerada a expectativa de redução no uso de herbicidas, possibilidade de utilização do plantio direto, flexibilidade de uso somente quando e onde necessário, menor impacto ambiental (Kleba, 1998), favorecimento do manejo das lavouras, redução dos custos (Nepomuceno, 2004), diminuição das perdas de produção (Siqueira et al., 2004) e,

com isso, potencial para aumento da produtividade e estabilidade da cultura. A disponibilidade de variedades de soja RR é uma alternativa no manejo de plantas daninhas (Dellanay et al., 1995), que possibilita controle químico eficiente com menor impacto ao ambiente.

Tantos benefícios e expectativas positivas aguardadas com a aplicação da tecnologia do DNA recombinante na agricultura fizeram com que o cultivo de culturas transformadas geneticamente crescesse mais de 47 vezes desde 1996. Em 2004, 81 milhões de hectares pelo mundo foram cultivados com culturas geneticamente modificadas. Dentre todas as lavouras transgênicas, a soja tolerante ao herbicida ocupou 48,4 milhões de hectares, ou seja, 60% de toda área plantada com transgênicos no mundo. Outro dado relevante é que, mundialmente, 56% dos 86 milhões de hectares de toda a soja cultivada foi transgênica. Nesse cenário, o Brasil também recebe destaque pelo cultivo de soja RR. Dos 23 milhões de hectares cultivados na última safra, estima-se, de forma conservadora, que cinco milhões foram de soja transgênica tolerante ao glifosato (James, 2004). Considerando que na safra 2003/04 cultivou-se aproximadamente três milhões de hectares (James, 2003), efetivou-se um aumento de 66%, refletindo crescimento significativo do interesse pela adoção da biotecnologia. No entanto, ainda especula-se sobre a segurança dos transgênicos para a saúde humana e para o meio ambiente.

O presente estudo teve como finalidade discutir duas questões que se tornaram inerentes com a chegada da soja transgênica tolerante ao glifosato. Primeiro, é preciso refletir sobre a possibilidade de escape gênico de uma variedade geneticamente modificada para uma outra convencional em condições naturais de campo. Segundo, com o crescimento do cultivo de variedades dotadas da característica transgênica, aumenta a possibilidade de mistura de lotes de soja convencional com sementes de soja Roundup Ready, logo, necessita-se de métodos que sejam capazes de identificar lotes de soja misturados e até mesmo quantificar esta mistura para fins de certificação e garantia de pureza varietal. É imprescindível a disponibilidade de meios eficazes, rápidos, práticos e de baixo custo na identificação de sementes de soja tolerante ao glifosato.

No primeiro capítulo deste trabalho, procurou-se analisar possíveis metodologias para identificação e quantificação de sementes de soja tolerante ao glifosato.

No segundo, foram analisados os resultados de experimentos realizados com o objetivo de investigar a taxa de fluxo gênico ocorrente entre uma variedade tolerante ao herbicida e uma variedade convencional não tolerante.

CAPÍTULO 1
BIOENSAIOS PARA DETECÇÃO DE SEMENTES DE SOJA RR

Introdução

A soja Roundup Ready foi responsável por mais de 21% da área de soja plantada na safra de 2004/05 no Brasil (James, 2004). Seus benefícios, como flexibilidade no controle de daninhas, redução na aplicação de herbicidas, possibilidade de redução no custo da lavoura e utilização de um herbicida com características menos tóxicas ao ambiente, chamaram a atenção dos sojicultores em todo o país e o resultado está sendo visto nas lavouras. Esse crescimento em área plantada não foi particularidade nacional. A soja RR ocupou 56% de toda área plantada com esta leguminosa no mundo e existe a expectativa de que com a plena aceitação pelo mercado, esses percentuais ainda possam aumentar.

É esperado que a diversidade do mercado exija também diversidade de produtos e que estes sejam seguramente identificados para serem comercializados. Existem variados nichos no mercado e a necessidade de se dispor de meios que detectem as características principais de uma determinada cultivar se faz imperativo tanto para produção de sementes com pureza genética garantida quanto para certificação de produtos.

Em plena globalização econômica, aberturas de novos mercados, acordos e expansão do comércio exterior, as oportunidades são crescentes e sucessivas. De forma contemporânea a essa situação, encontra-se o crescimento significativo do

cultivo com organismos geneticamente modificados (OGM) em todo o mundo. São diversas culturas com características devidas à transgenia, sendo as principais soja, milho, canola e algodão.

A utilização da biotecnologia na agricultura é vista de diferentes formas em diversas regiões do mundo. A aceitação de determinadas cultivares num país não significa que as mesmas sejam aceitas em outros, o que significa dizer que é necessário garantir a identidade dos produtos comercializados. Na comercialização de lotes de sementes convencionais, produzidos em países onde variedades geneticamente modificadas também são cultivadas, a presença de sementes de soja transgênica em lotes de sementes convencionais é possível (Miranda, 2004). Desta forma, a disponibilidade de metodologias práticas para a detecção de sementes de soja RR em lotes convencionais torna-se necessária para garantir as exigências do mercado. Assim, é real a demanda por metodologias capazes de detectar lotes de sementes com mistura.

Vários autores têm citado o problema da mistura de sementes no comércio internacional (Ayala et al., 2002; Bonow e Pinho, 2003; Lilge, et al., 2003; Tillmann e West, 2004; Menezes et al., 2004; Miranda, 2004; Bertagnolli, 2005). Esta é a principal justificativa para a construção de uma metodologia eficiente para a detecção, identificação e quantificação de sementes de soja transgênica em lotes de sementes convencionais.

Vários métodos têm sido publicados na literatura com capacidade comprovada de identificar a tolerância e sensibilidade ao glifosato. Estes métodos variam desde aqueles que são onerosos e não recomendáveis para testes de rotina, até aqueles considerados práticos, rápidos e de aplicação rotineira em laboratórios de sementes.

Bonow e Pinho (2003) relataram em trabalho técnico a situação dos métodos reconhecidos e utilizados para detectar, identificar e quantificar OGMs. O ELISA ("Enzyme Linked Imunosorbent Assay") se baseia no reconhecimento de um antígeno por um anticorpo formando um complexo antígeno-anticorpo; no método da PCR ("Polymerase Chain Reaction"), um fragmento de DNA presente na construção gênica introduzida no genoma é amplificado; os bioensaios consistem basicamente nos testes de germinação de sementes em presença do glifosato.

Apesar da existência de métodos variados para este fim, a detecção realizada por meio de bioensaios sobressai em relação aos demais por fornecer vantagens em custo/benefício para trabalhos com este objetivo (Cunha et al., 2005). Os biotestes são procedimentos simples na rotina de laboratórios de sementes, práticos, eficientes, baratos e rápidos. Os métodos de detecção baseados em análises de enzimas, bem como aqueles fundamentados na utilização da PCR são onerosos, além de demandar pessoal especializado e equipamentos sofisticados (Bonow e Pinho, 2003).

Os bioensaios não exigem mão-de-obra altamente especializada e nem equipamentos sofisticados e, além disso, geram resultados que variam, conforme a literatura, desde 3 até 14 dias após a implantação do teste (Bevilaqua et al., 2000; Torres et al., 2003; Funguetto et al., 2004; Menezes et al., 2004; Tillmann e West, 2004; Cunha et al., 2005; Miranda et al., 2005). Os resultados dos bioensaios se baseiam no fato de que a ocorrência do gene CP4 EPSPS possibilita aos genótipos do cultivar produzir sementes com tolerância ao herbicida.

Bioquimicamente, EPSP é produzido a partir do shiquimato-3-fosfato (S3P) e fosfoenolpiruvato (PEP), reação catalizada pela enzima EPSPS. É relevante notar a existência de dois compostos distintos: EPSPS e EPSP, o primeiro, enzima catalisadora da formação do segundo. Inicialmente, a enzima EPSPS se liga ao S3P, complexando-se em EPSPS-S3P. Em seguida, este complexo é acrescido pelo PEP, originando a EPSP (Kruse et al., 2000). A ação do glifosato impede esta última ligação (EPSPS-S3P-PEP) quando forma o complexo inativo EPSPS-S3P-glifosato. Ressalta-se aqui que o herbicida não se liga à enzima livre, mas sim ao complexo intermediário EPSPS-S3P, fato explicado por questões de competitividade. O glifosato é significativamente mais eficiente que o PEP na ligação ao complexo intermediário EPSPS-S3P, isso por que, quando comparado com o PEP, o glifosato se liga 115 vezes mais firmemente e se dissocia 2.300 vezes de forma mais lenta ao EPSPS-S3P (Trezzi et al., 2001). Em outras palavras, em plantas sensíveis, é mais provável a ligação do glifosato ao complexo EPSPS-S3P do que a ligação entre EPSPS-S3P e PEP.

A soja RR apresenta uma variável do gene codificador da enzima EPSPS. O seu produto gênico é uma alternativa da enzima, que realiza todas as suas funções, mas que, no entanto, é insensível ao ingrediente ativo do herbicida. Com isso, na presença do glifosato, os genótipos de soja dotados de tal gene, logo

tolerantes, prosseguem com o seu desenvolvimento de maneira normal, enquanto genótipos sensíveis apresentam desenvolvimento paralisado, sinais de senescência e efetiva morte (Padgette et al., 1995).

O glifosato penetra na planta por suas folhas, ou ainda, pelos caulículos jovens e, via floema, percorre todo o sistema vegetal causando a morte das raízes e de estruturas reprodutivas de plantas perenes, como rizomas, bulbos e tubérculos (Kruse et al., 2000), enfim, nenhuma parte da planta sobrevive (Amarante Jr. et al., 2002b). Proteínas transportadoras de fosfato do plasmalema permitem a penetração nas células. Na planta, simplasticamente, e também apoplasticamente, é distribuído. Espécie, estádio de desenvolvimento e condições ambientais influenciam na sua translocação (Monquero, 2003).

Na planta, a síntese da EPSPS é realizada no citoplasma e o seu transporte aos cloroplastos é feito na sua forma de pré-enzima (pEPSPS), em que um peptídeo sinal direciona a enzima ao cloroplasto (Kruse et al., 2000). A inibição por glifosato também parece ocorrer no citoplasma, impedindo que a enzima seja transportada pela membrana do cloroplasto devido à flexibilidade conformacional do complexo inativo glifosato-EPSPS-S3P. Com isso, fica comprometida a fotossíntese, além da baixa na produção dos aminoácidos aromáticos (Trezzi et al., 2001). Clorose nos meristemas, necrose e morte das plantas em poucos dias são sinais da ação do herbicida (Amarante Jr. et al., 2002b).

Kruse et al. (2000) relataram o surgimento natural da resistência de plantas daninhas aos inibidores da EPSPS na Austrália, Malásia e Estados Unidos. Os mecanismos de resistência se constituiriam em menor sensibilidade da enzima EPSPS para com o glifosato e supostamente uma maior estabilidade do mRNA, possibilitando mais traduções em enzimas EPSPS. Esses dados são indicadores da demanda por uma utilização criteriosa deste herbicida no manejo de plantas daninhas. Contudo, no cumprimento de critérios e estratégias planejadas, o surgimento da tolerância de daninhas é evitado (Monquero, 2003).

O diferencial a ser explorado em trabalhos de identificação de sementes de soja RR em lotes de sementes de variedades convencionais é que o comportamento das cultivares em presença do herbicida é determinante da presença ou ausência da característica.

Com o intuito de desenvolver uma metodologia aplicável para detecção de sementes de soja tolerante ao glifosato, alguns trabalhos já foram realizados.

Goggi e Stahr (1997) analisaram duas metodologias onde exploraram a aplicação pré e pós-emergente de solução (2 e 3%) do herbicida Roundup Ultra™ (41% do ingrediente ativo) para verificação de presença ou ausência de tolerância ao herbicida. Foi possível identificar sementes do cultivar tolerante ao glifosato 7 (sete) dias após serem submetidas ao contato (18 horas) com a solução do herbicida entre papéis germitest. A descoloração característica das raízes e a ausência de crescimento de raízes secundárias permitiram a detecção das plântulas sensíveis. O teste de aplicação pós-emergente foi abandonado devido ao longo tempo de duração (7 dias para o crescimento das mudas e mais 10 após a aplicação do herbicida para o aparecimento dos sintomas).

Bevilaqua et al. (2000) conseguiram identificar, em 8 (oito) dias de teste, sementes de soja tolerante ao glifosato utilizando solução do herbicida para embeber o papel de germinação na concentração de 280 mg/l. Neste estudo, os autores também avaliaram outras concentrações (0; 280; 560; 1120; 2240; 4480; 6720 e 8960 mg/l) e um segundo método, onde estudaram a aplicação em pulverização cotiledonar/foliar de solução do glifosato, na concentração de 8960mg/l em volume de 100 l/ha de calda. Neste último estudo, o tempo prolongado para obtenção dos resultados (14 dias) prejudicou a avaliação dos parâmetros em razão do surgimento de infecções secundárias.

Torres et al. (2003) usaram papel de filtro umedecido com a solução de 100 a 200 μM do herbicida como substrato de germinação para sementes de soja. Verificaram que as sementes de soja tolerante ao herbicida germinaram normalmente nessa condição e, entre 7 e 10 dias, desenvolveram um sistema radicular normal, ao contrário do que se verificou para sementes de soja sensível, onde o crescimento da radícula e a emissão de raízes secundárias foram paralisados.

Tillman e West (2004) realizaram dois estudos baseados no teste de germinação. No primeiro, as sementes foram pré-embebidas pelo período de 16 horas em papel germitest umedecido com solução do herbicida e em seguida transferidas deste para o teste de germinação. No segundo, as sementes foram submersas diretamente em solução do herbicida pelo período de uma hora e, logo após, submetidas ao teste de germinação. Os dois métodos possibilitaram a identificação de sementes de soja tolerante ao glifosato. A partir da embebição direta das sementes em solução 0,12% do herbicida, identificou-se em 3 (três) dias

genótipos tolerantes; em substrato umedecido com solução 0,6% tais genótipos foram identificados em 6 (seis) dias.

Em 2004, Funguetto e sua equipe estudaram a (1) imersão das sementes em solução do herbicida pelo período de uma hora, seguida de teste de geminação; o (2) teste de germinação de sementes em substrato umedecido com solução do herbicida e, a (3) pré-embebição por 16 horas de sementes em papel umedecido com solução seguida de teste de germinação. Os autores concluíram que existe a possibilidade de se detectar genótipos tolerantes ao herbicida em 5 (cinco) dias após a implantação dos testes.

Em outro estudo, seis formas de detecção de soja tolerante ao glifosato foram comparadas: pré-embebição das sementes em papel umedecido com solução do herbicida; umedecimento do papel germitest com solução do herbicida; imersão das sementes em solução do herbicida (Funguetto et al., 2004); pulverização de plântulas com o herbicida; detecção pelo método da PCR; e, Kit Trait Test. Nesse trabalho, os autores concluíram que os bioensaios foram os mais eficientes na detecção de sementes de soja GM levando em conta custo/benefício e que os traços das plântulas são determinantes na caracterização (Cunha et al., 2005).

A eficiência de alguns testes para detecção e quantificação de sementes tolerantes ao glifosato também foi estudada. Para isso, foram simuladas situações em que lotes de sementes de cultivares convencionais estariam misturadas nas proporções de 0, 1, 3, 5 e 8% com sementes de soja tolerante ao glifosato. Os resultados foram distintos para detecção e quantificação. Para detecção, chegou-se a 100% de acertos, em qualquer uma das situações. Para quantificação, foi verificado que até 3% de mistura, os testes foram eficientes. Acima desta porcentagem, a exatidão foi reduzida provavelmente em virtude do aumento na probabilidade de falsos negativos, como exemplo na não-germinação de uma semente tolerante ao herbicida (Miranda et al., 2004).

Bertagnolli (2005) estudou a eficiência do método da hidroponia na identificação e quantificação de misturas em lotes de soja convencional com sementes de soja tolerante. Tal metodologia mostrou-se eficiente na detecção e, assim como encontrado por Miranda (2004), a eficiência do método para quantificação prevaleceu até os 3% de mistura, justificando que acima desta percentagem aumentou-se a chance da ocorrência de falsos negativos, em virtude

da probabilidade associada à qualidade fisiológica das sementes. Em outras palavras, quanto maior o número de sementes, maior a chance de que nem todas germinem.

É importante ressaltar que os métodos para detecção de OGMs ainda se encontram em fase inicial de desenvolvimento, sendo seus dados apenas qualitativos e semi-quantitativos (Miranda et al., 2005). A partir desse ponto, cria-se a expectativa pelo desenvolvimento de meios mais acurados para quantificação plena nas amostras. Nenhum teste apresenta eficiência absoluta para quantificação em seus resultados (Huffman, 2004), contudo, a precisão dos métodos quanto à quantificação encontrada por alguns autores (Miranda, 2004; Bertagnolli, 2005) permitiu a realização de estudos sobre fluxo gênico (Capítulo 2) envolvendo soja geneticamente modificada tolerante ao glifosato.

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência de diferentes metodologias para detecção de sementes de soja tolerante ao herbicida glifosato, escolhendo uma delas para a realização da segunda etapa desta pesquisa, a qual consistiu da investigação das sementes dotadas de tolerância ao herbicida na descendência da cultivar sensível, ou seja, oriundas de fecundação cruzada.

MATERIAL E MÉTODOS

Localidade e Genótipos

Os estudos foram conduzidos no laboratório de sementes e nas casas de vegetação do Departamento de Fitotecnia, ambos na Universidade Federal de Viçosa, nos meses de junho e julho de 2005. As cultivares utilizadas foram CD219RR®, tolerante ao glifosato, e Elite, cultivar com excelente qualidade fisiológica de sementes e sensível a este herbicida. A primeira, propriedade da COODETEC (Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola) e a segunda pertencente à COOPADAP (Cooperativa Agropecuária Alto Paranaíba).

Bioensaios

Foram analisadas cinco metodologias: (1) teste de emergência em leito de areia após imersão das sementes em solução do herbicida por uma hora; (2) teste de germinação após imersão das sementes em solução do herbicida por uma hora; (3) teste de germinação em papel germiteste umedecido com solução do herbicida; (4) teste de germinação de sementes pré-embebidas por 24 horas em papel germiteste umedecido com solução do herbicida; e, (5) teste de germinação em caixa gerbox.

As concentrações nas soluções estudadas foram 0; 0,03; 0,06 e 0,12% do equivalente ácido (e.a.) do herbicida comercial Roundup® nos três primeiros bioensaios; na quarta metodologia, foram testadas as concentrações 0; 0,30; 0,60 e 1,20% do e. a. No último, como não foi encontrado estudo similar na literatura, foram utilizadas as concentrações: 0; 0,18; 0,36 e 0,54% do e.a. No teste de emergência em leito de areia, um tratamento adicional como controle foi utilizado. Neste, as sementes foram semeadas sem ser submetidas à imersão em solução. Para as outras metodologias, foi realizado teste de germinação preliminar com as cultivares utilizadas.

Teste de germinação

Inicialmente, amostras das sementes das cultivares estudadas foram submetidas ao teste de germinação conforme as Regras para Análise de Sementes – RAS (Brasil, 1992). Os resultados evidenciaram germinação média acima dos 90% para as sementes das duas cultivares, portanto, satisfatória para os fins deste trabalho.

Herbicida

O herbicida comercial Roundup® utilizado em todos os bioensaios possui formulação de 480g/L do ingrediente ativo sal de isopropilamina de n-(fosfometil) glicina e 360g/L de equivalente ácido de N-(fosfonometil) glicina. Para os ajustes de concentrações e preparo das soluções, bem como para embebição das sementes, foi utilizada água destilada.

Para o preparo das soluções foram utilizados misturador de soluções de laboratório, pipeta milimetrada (1mL/100) e becker.

Bioensaio 1 - Teste de emergência em leito de areia após imersão das sementes em solução do herbicida por uma hora

As sementes das duas cultivares, CD219RR® e Elite, foram submetidas a cinco tratamentos, sendo que dois deles constituíram os controles: no primeiro as sementes não foram imersas em solução, sendo simplesmente distribuídas no leito de areia. O segundo controle foi constituído por sementes submersas em água pelo período de uma hora. Nos outros três tratamentos, as sementes foram submetidas à

pré-embebição direta em soluções do glifosato nas concentrações 0,03; 0,06 e 0,12% do equivalente ácido (e.a.) do herbicida pelo período de uma hora.

Para a imersão das sementes, foram utilizados copos descartáveis de plástico de 50mL, sendo que em cada copo foram colocadas 50 sementes, completando a sua capacidade, em volume, com a solução em estudo, equivalente a aproximadamente 35mL de solução.

Após o período da pré-embebição, as sementes foram lavadas em água corrente (Funguetto et al. 2004) e distribuídas manualmente no leito de areia. A areia utilizada foi previamente esterilizada e acomodada em bandejas de plástico. Em cada bandeja (40 x 27 x 5 cm) foram distribuídas 150 sementes dispostas em 6 sulcos de 2cm de profundidade (25sementes/sulco). Desta forma, em cada bandeja foram semeados três tratamentos distintos, conforme a casualização.

Em virtude das baixas temperaturas durante a condução dos experimentos (inverno), foram instalados aquecedores automáticos na casa de vegetação, os quais fizeram com que a temperatura média no interior do ambiente permanecesse em torno dos 25ºC durante todo o período da experimentação.

Avaliou-se a percentagem de emergência (considerada plântula emergida quando emitia o cotilédone, num ângulo de 90°, acima do nível da areia), o índice de velocidade de emergência (IVE), conforme Nakagawa (1994), o comprimento médio do hipocótilo e da raiz primária, em centímetros, ao 7º dia, a percentagem de plântulas normais e anormais, segundo as Regras de Análises de Sementes - RAS (Brasil 1992) e o peso de matéria seca das plântulas em gramas (Nakagawa, 1994). Para este último parâmetro realizou-se uma adaptação à metodologia quando também se avaliou peso de matéria seca por repetição.

Cada repetição constituiu-se num grupo formado por plântulas normais e anormais. Nakagawa (1994) descreve o método para a determinação de matéria seca recomendando a utilização exclusiva de plântulas normais. Contudo, foi estudada nesta pesquisa também uma adaptação a esta metodologia quando se avaliou o peso bruto obtido em cada repetição do experimento, incluindo plântulas normais e anormais. Com isso, procurou-se verificar a síntese de matéria seca por cada repetição sob seu respectivo tratamento.

O delineamento experimental usado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 5 (2 cultivares x 5 tratamentos), com 4 repetições de 50 sementes.

Bioensaio 2 - Teste de germinação após imersão das sementes em solução do herbicida por uma hora

As sementes foram submersas em soluções de diferentes concentrações do glifosato pelo período de uma hora antes de serem transferidas para o papel germitest, umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes o volume de água por peso de papel.

Para a imersão das sementes em solução, foram utilizados copos plásticos descartáveis com capacidade de 50mL, sendo que nestes foram colocadas 50 (cinqüenta) sementes, equivalente a uma repetição, e em seguida, adicionada a solução do herbicida na quantidade apropriada para completar a capacidade do copo.

Findo o período (1 hora) de embebição nas soluções, as sementes foram lavadas em água corrente (Funguetto et al., 2004) e distribuídas manualmente no papel germitest umedecido com água destilada. Para cada tratamento, foram confeccionados 4 (quatro) rolos com 50 sementes, os quais foram mantidos em câmara de germinação com temperatura regulada a 25ºC ±1ºC. Ao final de sete dias, foram analisados o comprimento de plântulas em centímetros, a percentagem de plântulas normais, anormais e de sementes não germinadas, a percentagem de germinação, a percentagem de plântulas dotadas de raízes secundárias, o peso de matéria seca em gramas e o teor de água das plântulas.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 4 (2 cultivares x 4 concentrações), com 4 repetições de 50 sementes.

Bioensaio 3 - Teste de germinação em papel germiteste umedecido com solução do herbicida

O método deste bioensaio consistiu em umedecer com soluções do glifosato o papel germitest usado no teste de germinação. Foram analisadas quatro dosagens: 0; 0,03; 0,06 e 0,12% do e.a. do herbicida. O volume de solução aplicado em cada tratamento foi de 2,5 vezes o peso do papel seco.

O princípio deste método foi o de deixar as sementes em contato com o herbicida durante todo o período do teste de germinação.

O papel necessário para o teste foi colocado em uma bandeja, onde foi adicionada a solução do glifosato, aguardando-se um período de repouso de 3 minutos, suficiente para que toda a solução fosse absorvida pelo papel. Em

seguida, as sementes foram distribuídas no substrato umedecido, confeccionando-se rolos que foram mantidos em câmara de germinação a 25ºC ±1ºC.

Ao final de 7 dias, foram analisados o comprimento de plântula, em centímetros, a percentagem de plântulas normais, anormais e de sementes não germinadas, a percentagem de germinação, a percentagem de plântulas dotadas de raízes secundárias, o peso de matéria seca, em gramas, e o teor de água das plântulas.

Adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 4 (2 cultivares x 4 concentrações), com 4 repetições de 50 sementes.

Bioensaio 4 - Teste de germinação de sementes pré-embebidas por 24 horas em papel germiteste umedecido com solução do herbicida

Este bioensaio consistiu em pré-embeber as sementes em papel germitest umedecido com solução do glifosato pelo período de 24 horas, e ao final deste período, transferir as sementes para o teste de germinação em germinador a 25°C ±1°C.

Foram analisadas quatro dosagens, sendo uma delas o controle experimental, ou seja, água (0,00%), e as outras 0,3; 0,6 e 1,2% do e.a. do herbicida.

Passados os sete dias, foram avaliados o comprimento de plântulas, em centímetros, a percentagem de plântulas normais, anormais e de sementes não germinadas, a percentagem de germinação, a percentagem de plântulas dotadas de raízes secundárias, o peso de matéria seca, em gramas, e o teor de água das plântulas.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 4 (2 cultivares x 4 concentrações), com 4 repetições de 50 sementes.

Bioensaio 5 - Teste de germinação em caixa gerbox

Este estudo foi conduzido no Laboratório de Sementes e Melhoramento de Soja do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa.

Inicialmente, todas as caixas gerbox foram pré-esterilizadas com uma solução de álcool e hipoclorito, assim como as sementes, que também foram

tratadas, de modo que patógenos superficiais fossem eliminados. O papel de filtro utilizado como substrato e a água destilada usada nas soluções foram autoclavados por 24 horas a 130ºC.

Em seguida, foram adicionadas 8 unidades de papel filtro em cada caixa gerbox onde foram colocadas as soluções do e.a. do herbicida nas seguintes concentrações: 0; 0,18; 0,36 e 0,54%. Vinte e cinco sementes de cada tratamento foram distribuídas em cada uma das caixas, as quais foram mantidas em condições de temperatura ambiente durante 7 dias.

Foi adotado o delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 4 (2 cultivares x 4 concentrações) com 8 repetições de 25 sementes; os caracteres avaliados, tomados como parâmetros, foram: emissão de raiz primária ao quinto e sétimo dia, emissão de raiz secundária e número de sementes não germinadas ao 7º dia. Todos os valores obtidos foram expressos em percentagem.

Procedimento estatístico

Todos os dados colhidos em percentagem foram transformados, previamente, em *arc seno* $\sqrt{x}/100$ e, assim, analisados. Contudo, para melhor visualização, nas análises, os resultados foram apresentados graficamente em seus valores originais de percentagem. Os dados médios das avaliações foram comparados pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, e apresentados graficamente. Na execução das análises estatísticas foi utilizado o Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas da UFV (SAEG-UFV, 1993).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Bioensaio 1 – Teste de emergência em leito de areia após imersão das sementes em solução do herbicida por uma hora

Os resultados encontrados para índice de velocidade de emergência (IVE) encontram-se na Figura 1A. Foi possível constatar que para esta característica o comportamento das cultivares tornou-se distinto no tratamento com 0,06% do equivalente ácido (e.a.) do herbicida, resultado também encontrado por Funguetto et al. (2004). No tratamento em que foi utilizada a concentração de 0,03%, as duas cultivares apresentaram desempenhos similares e na concentração mais elevada, de 0,12%, as plântulas da cultivar tolerante também tiveram o seu vigor reduzido em relação aos grupos controles. Os resultados observados para a cultivar sensível sugerem a existência de correlação negativa (r = -0,95) entre concentração do e.a. e velocidade de emergência, o que não foi verificado para CD219RR®. Isto pode ser indicador de que a concentração do glifosato esteja relacionada com a redução do vigor das plântulas da cultivar sensível.

Os resultados relativos à percentagem de emergência encontram-se na Figura 1B. Nos dois controles as duas cultivares comportaram-se de forma semelhante ao apresentarem, em média, mais de 95% de emergência média. Sob tratamento com o herbicida, na menor concentração estudada já houve inibição da

emergência das plântulas da cultivar sensível, o que também se observou nas concentrações de 0,06 e 0,12% do e.a., apesar de ter ocorrido também para a cultivar tolerante redução na emergência com o aumento da concentração do glifosato. Foi notável que em todos, com exceção dos controles, a cultivar tolerante foi superior a cultivar sensível em percentagem de emergência. Isto indica que esta característica foi eficiente em distinguir as cultivares, pois, a presença deste herbicida nas soluções de imersão possibilitou a discriminação das cultivares.

Alguns autores (Bevilaqua et al. 2000, Torres et al. 2003, Tillmann e West 2004) citaram que, na presença do glifosato, embriões de cultivares sensíveis iniciam o processo germinativo, mas logo paralisam o seu desenvolvimento, fato também ocorrido neste estudo, onde algumas plântulas chegaram a emitir seus cotilédones para fora da areia, mas não tiveram vigor suficiente para continuar o seu desenvolvimento.

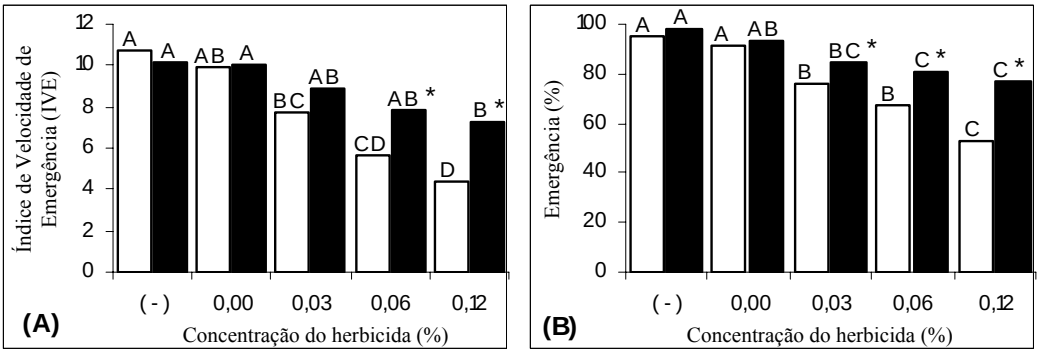


Figura 1 - (A) Índice de Velocidade de Emergência e (B) percentagem de emergência. Colunas enegrecidas mostram os dados médios observados para a cultivar CD219RR® e as colunas claras aqueles para a cultivar Elite. Tratamentos: não submerso em solução (-), imersão em água (0.00%), 0.03, 0.06 e 0.12% do e.a. Para cada cultivar, médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, e para cada tratamento o asterisco indica o dado superior, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O comprimento da raiz primária, como pode ser observado na Figura 2A, mostrou-se uma característica adequada para diferenciar as cultivares em relação à tolerância ao herbicida, conforme também destacado por Goggi e Stahr (1997), Bevilaqua et al. (2000), Tillmann e West (2004) e Funguetto el al. (2004). A redução no comprimento da raiz primária das plântulas da cultivar sensível foi observada em todos os tratamentos com glifosato, enquanto que para a cultivar

tolerante, o comprimento da raiz primária não variou com os diferentes tratamentos com herbicida.

Foi possível distinguir também as cultivares por meio do comprimento do hipocótilo (Figura 2B), o qual se tornou reduzido e pouco desenvolvido na cultivar sensível em presença do herbicida. Novamente a distinção pôde ser detectada com o tratamento de menor concentração, 0,03% do e.a. A redução encontrada para o comprimento do hipocótilo foi menos acentuada do que aquela observada para comprimento de raiz. Resultados semelhantes foram relatados por Goggi e Stahr (1997), Bevilaqua et al. (2000), Tillmann e West (2004) e Funguetto et al. (2004). A partir desses dados é possível inferir que a redução no comprimento total das plântulas sensíveis, na presença do herbicida, pareceu dever-se principalmente à redução no comprimento da raiz primária.

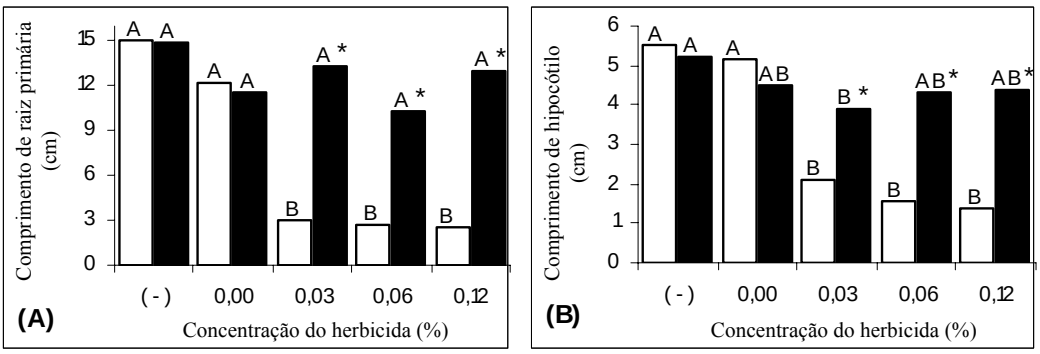


Figura 2 - (A) Comprimento de raiz primária e (B) comprimento de hipocótilo. Colunas enegrecidas mostram os dados médios observados para a cultivar CD219RR® e as colunas claras aqueles para a cultivar Elite. Tratamentos: não submerso em solução (-), imersão em água (0.00%), 0.03, 0.06 e 0.12% do e.a. Para cada cultivar, médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, e para cada tratamento o asterisco indica o dado superior, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O percentual de plântulas normais foi um dos parâmetros mais eficientes na distinção das cultivares estudadas (Figura 3A). Nos tratamentos que serviram de controle experimental, plântulas das duas cultivares apresentaram normalidade similar (P>0,05), bem como no percentual de plântulas anormais (Figura 3B). No entanto, já na menor concentração do e.a. houve diferença (P<0,05) entre as cultivares. Bevilaqua et al. (2000) chegaram a resultados satisfatórios na detecção de sementes da cultivar tolerante ao glifosato estudando estas características.

A anormalidade de plântulas, avaliada conforme as Regras de Análises de Sementes (Brasil 1992), constitui um parâmetro de extrema relevância na

detecção de sementes sensíveis e tolerantes ao glifosato num bioensaio. Comparando o comportamento da cultivar Elite nos diferentes tratamentos, foi notável a incidência de plântulas anormais naqueles em que havia o glifosato, inclusive na concentração mais baixa, o que não foi observado para a cultivar tolerante. Contudo, para esta última, na solução mais concentrada (0,12% do e.a.), houve aumento na percentagem de plântulas anormais em relação aos grupos-controle, indicando que doses elevadas podem afetar a cultivar tolerante.

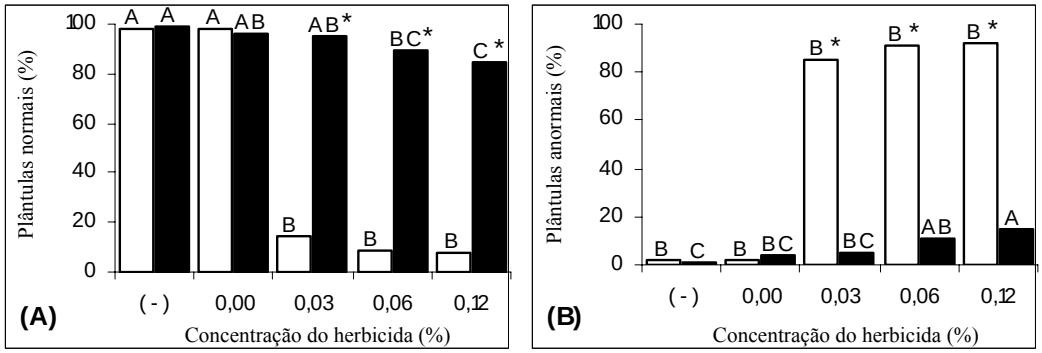


Figura 3 - (A) Percentagem de plântulas normais e (B) percentagem de plântulas anormais. Colunas enegrecidas mostram os dados médios observados para a cultivar CD219RR® e as colunas claras aqueles para a cultivar Elite. Tratamentos: não submerso em solução (-), imersão em água (0.00%), 0.03, 0.06 e 0.12% do e.a. Para cada cultivar, médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, e para cada tratamento o asterisco indica o dado superior, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Para o parâmetro peso médio de matéria seca existem duas considerações a serem feitas: calculou-se (1) o peso de matéria seca por repetição (Figura 4A), incluindo plântulas normais e anormais (adaptando a metodologia citada por Nakagawa, 1994); e, o (2) peso de matéria seca por plântula normal (Figura 4B), conforme Nakagawa (1994). Pôde ser constatado que para matéria seca por repetição houve distinção entre as cultivares nos tratamentos em que foram aplicados o glifosato. No entanto, não se observou o mesmo para peso de matéria seca por plântula normal, mostrando que quando as plântulas foram normais os seus pesos médios não diferiram estatisticamente nos diferentes tratamentos. Torres et al. (2003) estudaram matéria seca e fresca do sistema radicular e relataram potencial de seu uso na identificação de genótipos tolerantes ao glifosato.

As diferenças encontradas entre as cultivares para o acúmulo de matéria seca seguem a mesma reflexão aplicada à germinação. É possível inferir que, se as

sementes da cultivar sensível não completam efetivamente o processo germinativo na presença do glifosato, elas não originam plântulas normais, e desta forma, acumulam pouca matéria seca. Plântulas tolerantes, dotadas de desenvolvimento normal, produzem e, logo, contêm mais matéria seca acumulada.

A determinação do peso de matéria fresca e seca de plântulas exige uma estufa com regulagem de temperatura, além de requerer maior tempo para obtenção dos resultados. Apesar de fornecer dados conclusivos, características como percentagem de plântulas normais, anormais, de plântulas com raízes secundárias, comprimentos de raiz primária e de hipocótilo parecem ser mais adequadas para a detecção de sementes de soja tolerante ao glifosato. Contudo, a característica pode ser adotada para discriminação de genótipos tolerantes e sensíveis ao glifosato.

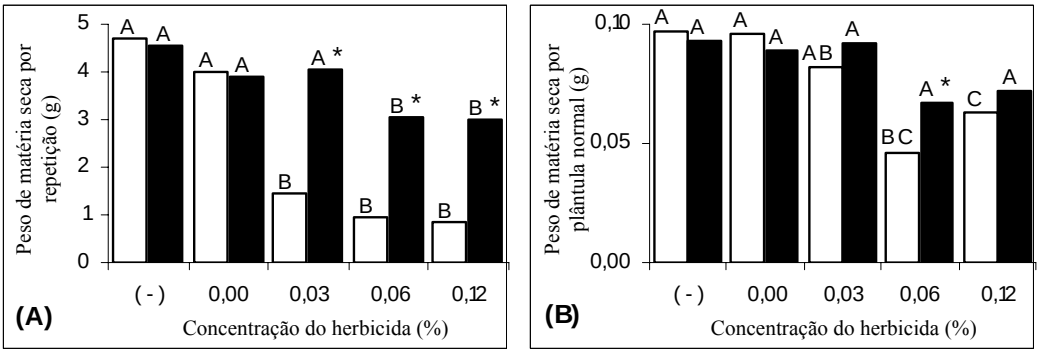


Figura 4 - (A) Peso de matéria seca por repetição e (B) peso de matéria seca por plântula normal. Colunas enegrecidas mostram os dados médios observados para a cultivar CD219RR® e as colunas claras aqueles para a cultivar Elite. Tratamentos: não submerso em solução (-), imersão em água (0.00%), 0.03, 0.06 e 0.12% do e.a. Para cada cultivar, médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, e para cada tratamento o asterisco indica o dado superior, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O teste de emergência em leito de areia mostrou eficiência na detecção de lotes de sementes tolerantes ao glifosato. A maioria dos parâmetros estudados possibilitou a identificação de tolerância nos lotes. Índice de velocidade de emergência, percentagem de emergência, comprimento médio de raiz primária, comprimento médio de hipocótilo, percentagem de plântulas normais e anormais, além de peso de matéria seca por repetição mostraram ser utilizáveis para este fim. Em contrapartida, peso de matéria seca por plântula normal não discriminou as variedades.

Em relação à concentração do herbicida, 0,03% do e.a. mostrou ser a apropriada para a caracterização das variedades na maioria dos parâmetros estudados, exceto para IVE, onde o tratamento de concentração 0,06% do e.a. mostrou-se mais adequado.

Bioensaios (2) Teste de germinação após imersão das sementes em solução do herbicida por uma hora; (3) Teste de germinação em papel germiteste umedecido com solução do herbicida; e, (4) Teste de germinação de sementes pré-embebidas por 24 horas em papel germiteste umedecido com solução do herbicida

Inicialmente, percentagem de germinação merece um destaque especial, pois o critério a ser utilizado para a sua determinação pode variar. Para os fins deste estudo, considerou-se como início da germinação a emissão da raiz primária. Justifica-se essa decisão pelo fato de que nos primeiros dias do teste, as plântulas se comportaram similarmente, o que poderia corresponder ao tempo necessário para a utilização das reservas de aminoácidos contidas nas sementes (Vieira et al., 1999). Com a enzima EPSPS inativada pelo glifosato, o composto EPSP não é sintetizado nas plântulas e, com isso, várias vias metabólicas dependentes deste não ocorrem. A plântula cessa o desenvolvimento e senesce (Menezes et al., 2004).

Seguindo a mesma reflexão sobre germinação, foi observado que a presença do glifosato não impediu que as sementes emitissem a radícula. Portanto, percentagem de sementes que não germinaram, ou seja, que não emitiram a radícula, não diferenciou as cultivares quanto à tolerância ao herbicida (Figura 5).

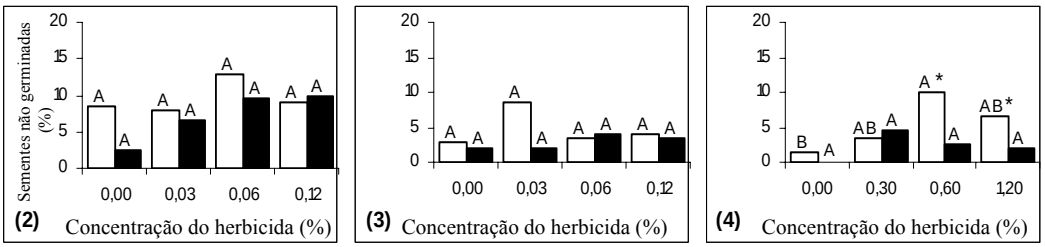


Figura 5 - Percentagem de sementes não germinadas nos diferentes tratamentos e nos diferentes ensaios. Colunas claras representam a cultivar Elite, sensível ao glifosato; colunas escuras a cultivar CD219RR®, tolerante ao herbicida. Bioensaios: (2) imersão em solução; (3) germinação em papel umedecido com solução; (4) pré-embebição por 24 horas em papel umedecido com solução. Para cada cultivar, médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, e para cada tratamento o asterisco indica o dado superior, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Para teor de água nas plântulas, os dados obtidos mostraram que não existe diferença entre as cultivares no que se refere à tolerância ao herbicida.

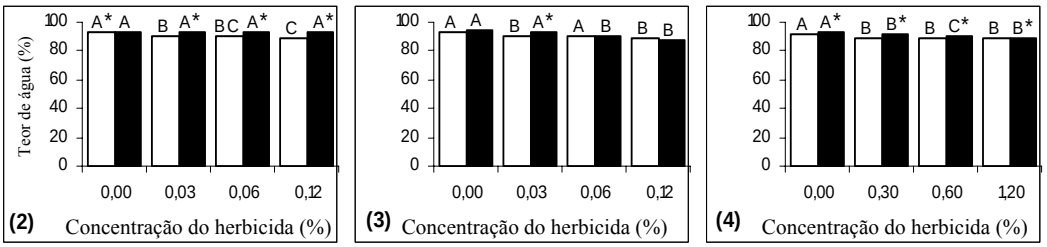


Figura 6 - Teor de água das plântulas nos diferentes tratamentos e nos diferentes ensaios. Colunas enegrecidas mostram os dados médios observados para a cultivar CD219RR® e as colunas claras aqueles para a cultivar Elite. Bioensaios (2) imersão em solução; (3) germinação em papel umedecido com solução; (4) pré-embebição 24 horas em papel umedecido com solução. Para cada cultivar, médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, e para cada tratamento o asterisco indica o dado superior, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O comprimento médio das plântulas (Figura 7) mostrou ser uma das características na manifestação de tolerância ou sensibilidade ao glifosato pelas plântulas (Funguetto et al., 2004; Tillmann e West, 2004; Cunha et al., 2005).

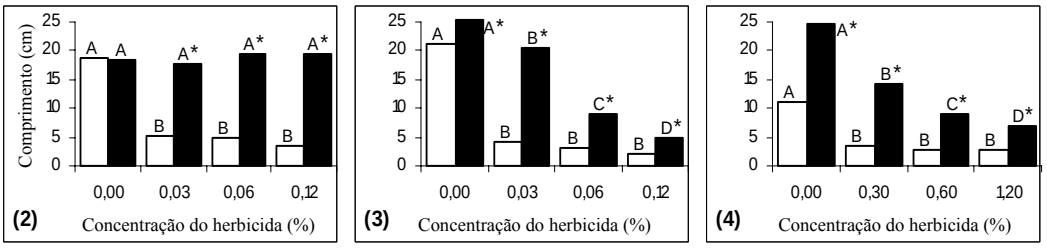


Figura 7 - Comprimento médio de plântulas nos diferentes tratamentos e nos diferentes ensaios. Colunas enegrecidas mostram os dados médios observados para a cultivar CD219RR® e as colunas claras aqueles para a cultivar Elite. Bioensaios (2) imersão em solução; (3) germinação em papel umedecido com solução; (4) pré-embebição 24 horas em papel umedecido com solução. Acima das colunas, análise estatística. Para cada cultivar, médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, e para cada tratamento o asterisco indica o dado superior, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A análise estatística dos dados mostrou que os resultados diferiram nos bioensaios, mas somente em relação à cultivar CD219RR®. Nos bioensaios 3 e 4 o comprimento médio das plântulas tolerantes decresceu na medida em que aumentou a concentração do glifosato, o que não ocorreu no bioensaio 2. De qualquer modo, é fundamental destacar que o comprimento médio das plântulas

da cultivar tolerante ao herbicida foi sistematicamente superior àquele apresentado pelas plântulas da cultivar sensível em todos os tratamentos com herbicida.

A percentagem de plântulas normais pode ser considerada um parâmetro fundamental na diferenciação das cultivares (Figura 8). A presença do e.a. não permitiu a formação de plântulas normais pela cultivar sensível, como também foi destacado por Bevilaqua et al. (2000).

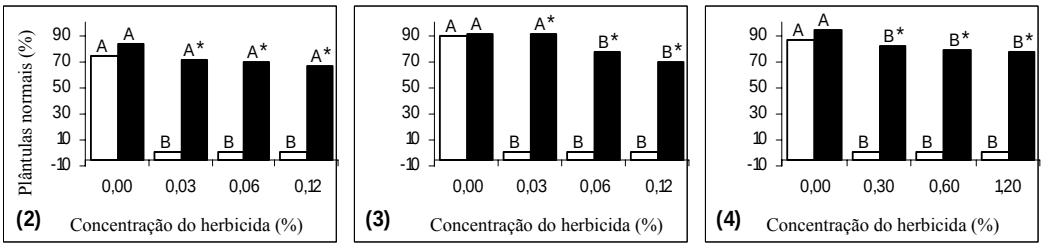


Figura 8 - Percentagem de plântulas normais nos diferentes tratamentos e nos diferentes ensaios. Colunas enegrecidas mostram os dados médios observados para a cultivar CD219RR® e as colunas claras aqueles para a cultivar Elite. Bioensaios (2) imersão em solução; (3) germinação em papel umedecido com solução; (4) pré-embebição 24 horas em papel umedecido com solução. Para cada cultivar, médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, e para cada tratamento o asterisco indica o dado superior, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

No bioensaio 2, a presença e concentração do herbicida glifosato nos tratamentos não interferiram no desenvolvimento de plântulas normais pela cultivar CD219RR®, indicando eficiência do método. No bioensaio 3, a concentração 0,03% do e.a. não afetou a cultivar tolerante em relação a este parâmetro, fato observado no uso das concentrações 0,06 e 0,12%, logo, a concentração de 0,03% parece ser a mais indicada para esta metodologia. No bioensaio 4, qualquer concentração do e.a. levou à mesma queda estatística no percentual de plântulas normais, no entanto, assim como o ocorrido para os bioensaios 2 e 3, a percentagem de plântulas normais apresentada pela cultivar tolerante foi superior à da cultivar sensível em qualquer concentração e bioensaio.

A percentagem de plântulas anormais apresentou-se como um bom parâmetro para detecção de sementes de soja sensível ao glifosato (Figura 9). A presença do glifosato levou as sementes da cultivar sensível ao desenvolvimento de plântulas com anormalidade. No bioensaio 3, o tratamento com 0,12% do e.a. levou ao aumento da percentagem de plântulas com anormalidade observada para a cultivar tolerante. No bioensaio 4, todos os tratamentos com glifosato levaram

ao mesmo aumento no percentual de plântulas anormais pela cultivar tolerante em relação ao grupo controle. Comparando as duas cultivares entre si, aquela sensível ao herbicida apresentou maior ocorrência de plântulas com anormalidade em presença do herbicida nos três bioensaios.

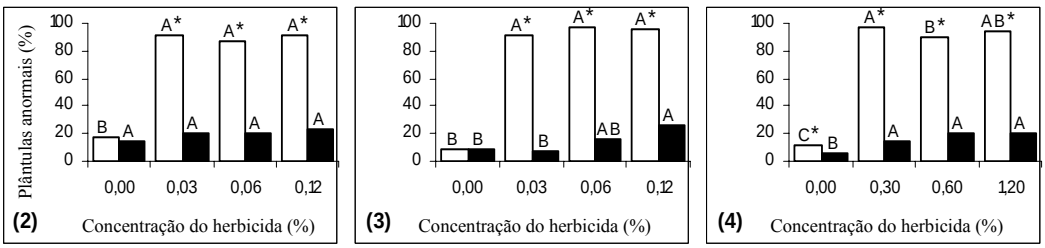


Figura 9 - Percentagem de plântulas anormais nos diferentes tratamentos e nos diferentes ensaios. Colunas enegrecidas mostram os dados médios observados para a cultivar CD219RR® e as colunas claras aqueles para a cultivar Elite. Bioensaios (2) imersão em solução; (3) germinação em papel umedecido com solução; (4) pré-embebição 24 horas em papel umedecido com solução. Para cada cultivar, médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, e para cada tratamento o asterisco indica o dado superior, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Como pode ser constatado graficamente na Figura 10, em presença do herbicida, a cultivar tolerante apresentou maior percentagem de plântulas com raízes secundárias do que a cultivar sensível. Na ausência do glifosato, ou seja, na testemunha, as cultivares emitiram raízes secundárias similarmente. Resultado também encontrado por outros autores (Funguetto et al., 2004; Tillmann e West, 2004; Torres et al., 2003). Decréscimos percentuais puderam ser observados nos bioensaios 2 e 4 para a cultivar tolerante, mas estes não prejudicaram a distinção das cultivares.

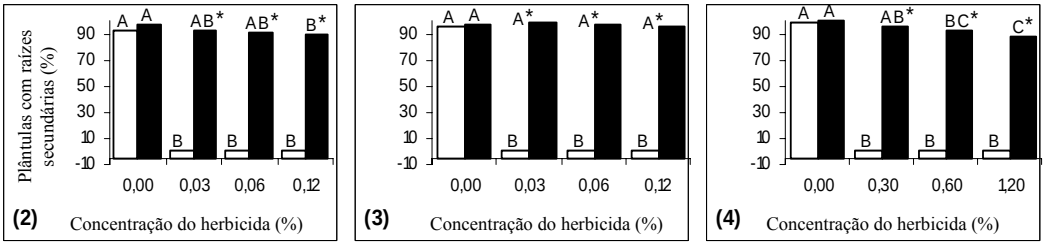


Figura 10 - Percentagem de plântulas com raízes secundárias nos diferentes tratamentos e nos diferentes ensaios. Colunas enegrecidas mostram os dados médios observados para a cultivar CD219RR® e as colunas claras aqueles para a cultivar Elite. Bioensaios (2) imersão em solução; (3) germinação em papel umedecido com solução; (4) pré-embebição 24 horas em papel umedecido com solução. Para cada cultivar, médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, e para cada tratamento o asterisco indica o dado superior, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A determinação do peso de matéria seca das plântulas distinguiu as cultivares em relação à tolerância ao herbicida (Figura 11). É importante destacar que para esse cálculo realizou-se uma adaptação à recomendação da literatura (Nakagawa, 1994), quando foi considerada cada repetição, o que incluiu plântulas normais e anormais.

No bioensaio 2, a cultivar CD219RR® teve mantido o peso de matéria seca de plântulas em todos os tratamentos com o herbicida em relação à testemunha. Para a cultivar Elite, na medida em que se aumentou a concentração da solução, foi observado decréscimo no peso médio de matéria seca nas plântulas. Comparando as duas cultivares entre si, em todos os tratamentos com glifosato, a cultivar sensível teve peso inferior ao apresentado pela cultivar tolerante, assim como verificado por Torres et al. (2003). No bioensaio 3, houve decréscimo no peso seco da CD219RR® nos tratamentos de concentrações 0,06 e 0,12% do e.a., porém, sempre superior ao peso apresentado pelas plântulas da cultivar sensível, assim como observado para o bioensaio 4. Neste, a cultivar CD219RR® teve redução no peso de matéria seca na medida em que se aumentava a concentração do e.a. na solução utilizada.

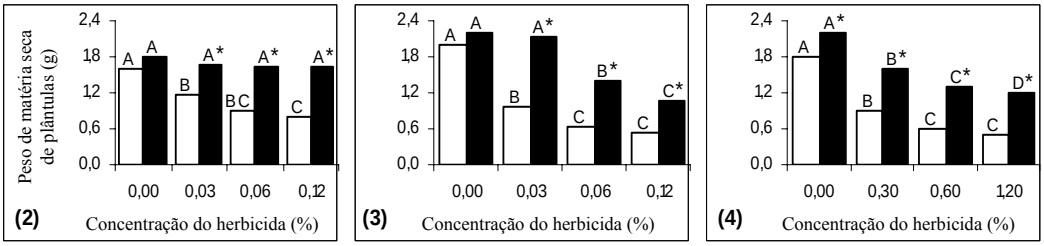


Figura 11 - Peso (gramas) de matéria seca de plântulas nos diferentes tratamentos e nos diferentes ensaios. Colunas enegrecidas mostram os dados médios observados para a cultivar CD219RR® e as colunas claras aqueles para a cultivar Elite. Bioensaios (2) imersão em solução; (3) germinação em papel umedecido com solução; (4) pré-embebição 24 horas em papel umedecido com solução. Para cada cultivar, médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, e para cada tratamento o asterisco indica o dado superior, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Por meio dos três bioensaios em papel germitest como substrato de germinação foi possível identificar plântulas tolerantes ao glifosato. Considerando os resultados obtidos, o bioensaio 2 sobressaiu aos demais apresentando menor dano a cultivar tolerante ao glifosato sem perder o rigor na caracterização da

cultivar sensível. O bioensaio 3, entretanto, mostrou ser mais prático que os outros dois bioensaios 2 e 4, como destacado também por Cunha et al. (2005).

As características comprimento médio das plântulas em centímetros, percentagem de plântulas normais e anormais, percentagem de plântulas com raízes secundárias e peso de matéria seca por lote, mostraram ser úteis ao procedimento de identificação de sementes de soja tolerante ao glifosato.

Quanto às concentrações das soluções, 0,03% de e.a. foi eficiente para caracterização das plântulas quanto à tolerância ao herbicida, resultado encontrado também por Funguetto et al. (2004). Contudo, para os fins do estudo de identificação de plântulas tolerantes entre sementes da cultivar sensível, julgou-se que a dose 0,06% do e.a. seria a recomendada com o intuito de submeter as sementes analisadas em teste de germinação à condição de maior estresse.

Fotografias dos bioensaios encontram-se em anexo (Anexos I, II e III).

Bioensaio 5 - Teste de germinação em caixa gerbox

Considerando aqui a mesma reflexão aplicada na interpretação dos bioensaios, decidiu-se por não utilizar a percentagem de germinação devido ao comportamento similar das duas cultivares nos primeiros dias do teste.

A primeira característica analisada foi emissão de raiz primária ao 5º e 7º dia. Os dados coletados apontaram maior emissão de raiz primária ao 5º dia pela cultivar sensível (Figura 12).

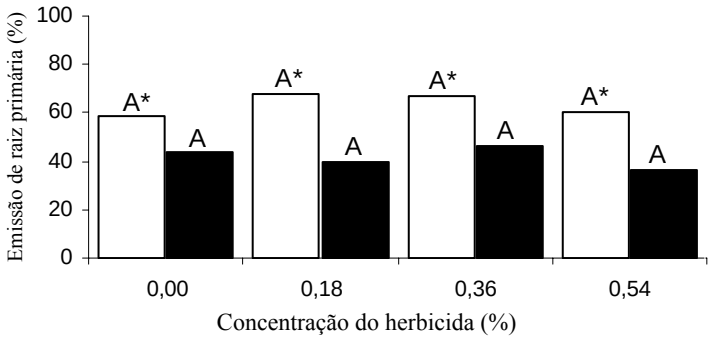


Figura 12 - Emissão de raiz primária ao 5º dia, em percentagem média. Colunas enegrecidas mostram os dados médios observados para a cultivar CD219RR® e as colunas claras aqueles para a cultivar Elite. Acima das colunas, análise estatística. Para cada cultivar, médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, e para cada tratamento o asterisco indica o dado superior, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A interpretação da emissão de raiz primária ao 7º dia (Figura 13) indicou que sensibilidade e tolerância ao glifosato são características que parecem não estar relacionadas com a emissão de raiz primária.

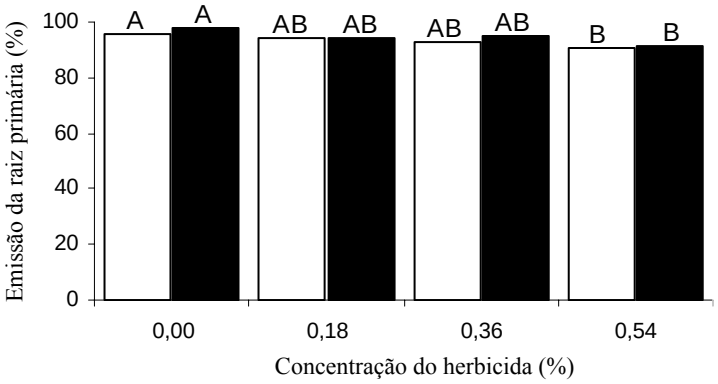


Figura 13 - Emissão da raiz primária ao 7º dia, em percentagem média. Colunas enegrecidas mostram os dados médios observados para a cultivar CD219RR® e as colunas claras aqueles para a cultivar Elite. Acima das colunas, análise estatística. Para cada cultivar, médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, e para cada tratamento o asterisco indica o dado superior, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Outra característica avaliada foi a emissão de raízes secundárias. Seus dados podem ser visualizados na Figura 14. Foi possível verificar diferença entre as cultivares, sendo que a cultivar sensível não apresentou formação destas raízes.

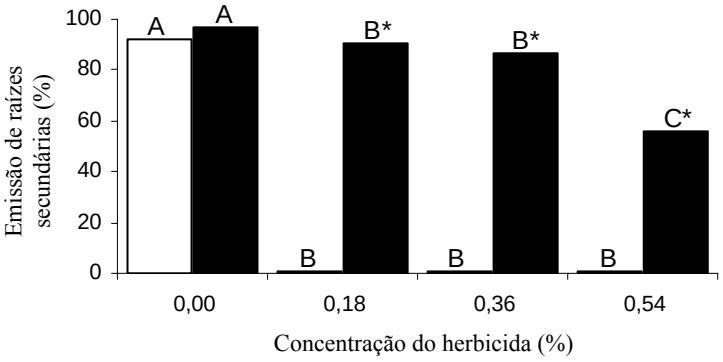


Figura 14 - Percentagem de plântulas com raízes secundárias ao 7º dia. Colunas enegrecidas mostram os dados médios observados para a cultivar CD219RR® e as colunas claras aqueles para a cultivar Elite. Acima das colunas, análise estatística. Para cada cultivar, médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, e para cada tratamento o asterisco indica o dado superior, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Na presença do glifosato, mesmo na menor concentração adotada neste estudo, a emissão de raízes secundárias ocorreu somente na cultivar CD219RR®.

Estas observações também foram encontradas em outros estudos (Funguetto et al., 2004; Tillmann e West, 2004; Torres et al., 2003) que destacaram a inibição do desenvolvimento de raízes secundárias nas plântulas sensíveis ao glifosato quando estas estão em contanto com o herbicida (Figura 15).

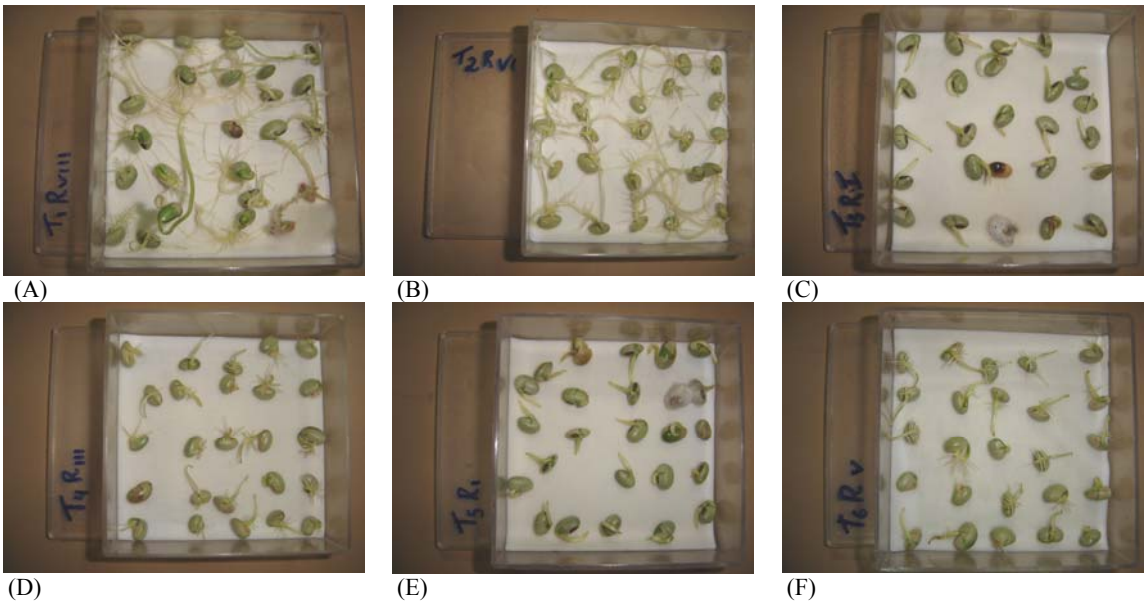


Figura 15 - Emissão de raízes secundárias. Fotografias tiradas ao sétimo dia após implantação do teste. (A) Cultivar Elite em água; (B) Cultivar CD219RR® em água; (C) Cultivar Elite em 0,18% do glifosato; (D) Cultivar CD219RR® em 0,18% do glifosato; (E) Cultivar Elite em 0,36% do glifosato; (F) Cultivar CD219RR® em 0,36% do glifosato.

Enfim, o número de sementes não germinadas ao 7º dia (Figura 16) não discriminou as cultivares em relação à presença ou ausência de tolerância ao glifosato.

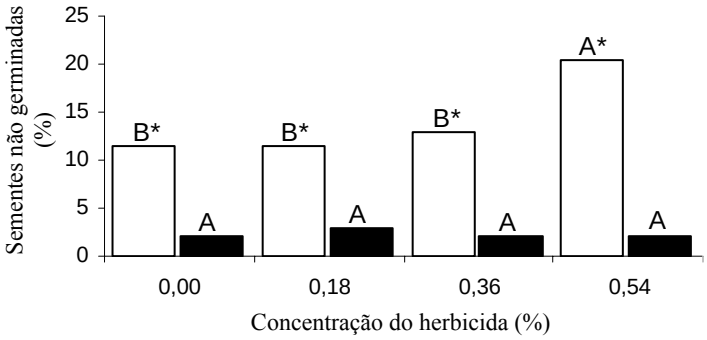


Figura 16 - Percentagem de sementes não germinadas. Colunas enegrecidas mostram os dados médios observados para a cultivar CD219RR® e as colunas claras aqueles para a cultivar Elite. Para cada cultivar, médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, e para cada tratamento o asterisco indica o dado superior, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Este parâmetro também não foi apropriado para a caracterização das cultivares quanto à tolerância ao glifosato, uma vez que a cultivar Elite, sensível ao herbicida, apresentou sistematicamente maior incidência de sementes não germinadas que a cultivar CD219RR®, inclusive no controle.

O teste de germinação em Gerbox constitui um meio para detecção de sementes tolerantes ao glifosato. A emissão de raiz primária pelas plântulas, seja ao 5º ou 7º dia, não apresentou relação com resposta à presença de glifosato, assim como ocorreu para incidência de sementes não germinadas. Por outro lado, a emissão de raízes secundárias foi a característica marcante na identificação de tolerância ao glifosato, mesmo na menor concentração. Apesar de ter apresentado resultados positivos para o referido fim, este método não se encontra ajustado em relação às concentrações a serem adotadas.

CONCLUSÕES

O bioensaio germinação em papel germitest umedecido com solução do herbicida na concentração de 0,06% do glifosato foi estabelecido como protocolo de detecção para a etapa da pesquisa sobre fluxo gênico. Este método combinou praticidade com eficiência, pois a concentração de 0,06% do e.a., definitivamente, não permitiu que uma semente isenta da característica de tolerância fosse capaz de se desenvolver normalmente.

Dentre as características estudadas, plântula com comprimento total acima dos cinco centímetros e dotada de raízes primária e secundárias desenvolvidas foi considerada tolerante ao herbicida na condição de teste de germinação em papel umedecido com solução 0,06% do e.a. do herbicida.

CAPÍTULO 2
ANÁLISE DE FLUXO GÊNICO EM SOJA

Introdução

A possibilidade dos transgenes escaparem das variedades geneticamente modificadas, invadirem o genoma de populações silvestres e, assim, desequilibrarem o meio ambiente constitui um dos maiores receios de ecologistas em relação a estas variedades (Borém, 2001). Uma das formas de desequilíbrio seria o surgimento de novas plantas invasoras.

Crawley et al. (2001) apresentou o resultado de 10 anos de observações e monitoramento de quatro culturas geneticamente modificadas - GM (canola, milho, beterraba e batata) em relação ao seu comportamento invasivo, quando comparado à sua contrapartida convencional. Nenhuma cultura, transgênica ou convencional, cresceu de forma abundante em nenhum local e, muito pelo contrário, todas declinaram nesse aspecto após o primeiro ano devido a alguma forma de competição. Os resultados deste estudo não isentaram definitivamente as culturas GM da possibilidade de se tornarem daninhas ou invasoras, mas indicaram que as plantas cultivadas, fora de seu ambiente de cultivo, pouco provavelmente sobreviveriam, ainda mais em ambientes de competição. De qualquer modo, o impacto ecológico de cada evento biotecnológico desenvolvido deve ser estudado especificamente, isto é, a biossegurança deve ser avaliada caso a caso. Borém (2001) chegou a considerações semelhantes a partir dos primeiros

resultados obtidos com os transgênicos. Após um entendimento mais refinado do tema, este autor relatou que em se tratando de transgenicidade, generalizações não devem ser realizadas.

A expectativa relativa à ocorrência de fluxo gênico deve estar baseada em alguns fatores categóricos, como, ocorrência de parentes silvestres sexualmente compatíveis na mesma região e época, modo de reprodução das espécies envolvidas, sobreposição de florescimento das populações, dentre outras. Considerando o caso da soja [*Glycine max* (L.) Merrill], a probabilidade de fluxo gênico no Brasil é praticamente nula, tendo em vista a não ocorrência de parentes silvestres neste País (Borém, 2005). Considerando localidades onde ocorrem tais parentes silvestres da soja, a possibilidade de escape gênico ainda é reduzida (em média, inferior a 1%) devido ao sistema de reprodução e à biologia floral da espécie. A soja é autógama devido à cleistogamia, fenômeno caracterizado pela autopolinização antes da antese.

Beard & Knowles (1971) apresentaram um ponto de vista em relação à ocorrência de fecundação cruzada. Inicialmente, consideraram que este fenômeno estaria relacionado a dois fatores básicos: falha no processo de autopolinização e presença de pólen vindo de outra planta. Daí, a indagação se concentra em saber se a baixa taxa de híbridos naturais em soja se dá pela alta eficiência no processo de autopolinização ou então pela ausência de polinização cruzada. Parece que o primeiro caso seria o principal responsável considerando a manifestação da cleistogamia.

Muitos estudos acerca da hibridação em soja foram realizados até o momento, envolvendo desde o desenvolvimento de meios que aumentariam a ocorrência de fecundação cruzada, passando pelo entendimento de como o processo se dá, quando é favorecido ou não, até as formas de anular possibilidades de que esse evento ocorra. Todo esse interesse acerca do tema se dá por receio (ou desejo) de que genótipos se cruzem e produzam a sua progênie.

Culter (1934) utilizou 6 (seis) genótipos diferentes organizando-os aos pares em blocos cercados por um tecido de algodão de cerca de 90 cm, no período de florescimento. Além disso, manteve cerca de 15 colméias de abelhas nas proximidades dos blocos. Assim, foram obtidos resultados indicativos de taxa de fecundação cruzada variando de 0,38 a 2,43%.

Em Campinas, Miyasaka (1958) encontrou taxa de hibridação de 0,5% entre as variedades Abura de flores brancas e Abura de flores roxas.

Nos estados de Iowa e Maryland (EUA), um estudo foi realizado com o objetivo de se verificar o efeito da radiação sobre a polinização cruzada em soja sob condições de campo. Em Iowa os resultados indicaram mais de quatro vezes (4,4%) mais a ocorrência de híbridos em progênies irradiadas do que no controle (1,0%). Em Maryland, enquanto o controle apresentou uma média de 0,8% de híbridos, progênies irradiadas com raios-X e nêutrons térmicos apontaram para hibridações de 4,7 e 4,8%, respectivamente, o que representa um aumento de 6 (seis) vezes. Este acréscimo estaria relacionado à macho esterilidade incidente. Outra consideração importante é feita em relação ao efeito da densidade populacional dos insetos polinizadores. Sendo verdadeira a existência da relação entre densidade de insetos e cruzamentos naturais em soja, então poderia se tornar verdadeira a inferência de que o tratamento com irradiação reduziria o número de flores e, assim, aumentaria a densidade de insetos em detrimento da redução no número de flores. De qualquer modo, chegou-se ao aumento (400 a 600%) de cruzamentos naturais com o uso de irradiação (Weber e Hanson, 1961).

Starnes e Hadley (1962) avaliaram o efeito do α-β-dicloroisobutirato sobre a soja, como gameticida, sob a perspectiva de obtenção de uma metodologia prática para a obtenção da macho esterilidade, logo, favorecendo a geração de híbridos nesta cultura. Contudo, a alta toxicidade deste produto sobre a soja inviabilizou a expectativa inicial. Os resultados tornaram-se minimizados em detrimento dos efeitos colaterais.

O efeito combinado de abelhas e de irradiação de sementes na promoção de fecundação cruzada em diferentes variedades de soja, pertencentes a diferentes grupos de maturação em diferentes localizações na Califórnia foi também avaliado por Beard e Knowles (1971). Tanto a irradiação com raios-gama quanto o tratamento das sementes com Etil Metano Sulfonato (EMS), produto químico mutagênico, mostraram ser igualmente efetivos na promoção de fecundação cruzada, sendo que acréscimos na escala de 11 a 14% foram observados em alguns casos. Quanto aos locais, os resultados mostraram-se erráticos, 10%, 1-5% e 0-1%, nas localidades estudadas, ou seja, não se chegou a nenhum consenso ou relação. A combinação avaliada neste estudo não aumentou a taxa de fecundação cruzada quando comparada a cada situação separadamente.

Caviness (1966) estudando fluxo gênico entre duas variedades de soja pelo período de 3 anos (1961, 1962 e 1963) encontrou resultados variáveis de taxa de hibridação, sendo que no primeiro ano, a 90 cm de distância entre as fileiras, encontrou-se a maior taxa de fecundação cruzada (0,44%). Nos anos seguintes, encontrou 0,03%. Nesse mesmo estudo, verificou-se que não foi possível eliminar completamente a fecundação cruzada com distâncias maiores, como 9 a 15m de distância.

Sediyama et al. (1970) estudaram a taxa de fecundação cruzada em soja em duas localidades distintas, sob a suspeita de que esta poderia variar de local para local em virtude das diferenças ambientais. Instalaram ensaios nas cidades de Capinópolis, localizada no Triângulo Mineiro, e Viçosa, situada na Zona da Mata de Minas Gerais. Em Viçosa, os resultados obtidos indicaram taxa de fecundação cruzada entre fileiras adjacentes e alternadas de 0,09%. Já entre plantas alternadas, foram obtidas 1,30% de fecundação cruzada. Em Capinópolis, também no sistema de fileiras alternadas, foram obtidas 0,90% de plantas híbridas.

Vernetti et al. (1972) procuraram determinar a taxa de fecundação cruzada natural em três localidades, Pelotas e Sertão, no Rio Grande do Sul e em Ponta Grossa, Paraná. Chegaram a resultados variando entre 0,03 e 1,22%, em Ponta Grossa e Pelotas, respectivamente. Estes autores, em revisão de literatura, esboçaram um panorama dos estudos relativos à fecundação cruzada até então disponíveis (Tabela 1).

Tabela 1 – Panorama dos estudos relativos à taxa de fecundação cruzada em soja até 1972.

Autores	Ano	Localidade	Percentagem (%)
Woodhouse, E.J. & Taylor, C.S.	1913	Índia	<0,50
Jones, D.F. & Hayes, H.K.	1916	-	0
Woodworth, C.M.	1922	Wisconsin (EUA)	0,04
Garber, R.J. e Odland, T.E.	1926	Virgínia (EUA)	0,07 e 0,18
Takagi, M.	1927	-	0,62
Culter, G.H.	1934	Indiana (EUA)	0,38 e 2,43
Miyasaka, S.	1958	Piracicaba (BRA)	0,50
Probst, A.H.	1961	Indiana (EUA)	0,50
Weber, C.R. & Hanson, W.D.	1961	Iowa e Maryland (EUA)	4,0 e 6,0*
Casas, E.	1961	North Carolina (EUA)	0,6 e 5,2*
Caviness, C.E.	1966	Arkansas (EUA)	0,03 e 0,44

* Tratamentos Especiais (Irradiação; mutagênicos químicos)
Fonte: Adaptado de Vernetti et al., 1972.

Nos anos agrícolas de 1973 e 1974, Boerma e Moradshahi (1975), estudaram distâncias percorridas por polinizadores entre e dentro de fileiras de soja nas condições de campo. Os resultados obtidos levaram a sugerir que além dos 7m de distância de uma fonte de pólen, reduzida taxa de polinização cruzada poderia ocorrer. Ainda nas conclusões deste trabalho os autores sugeriram realização de experimentos adicionais para inferências a respeito do total isolamento por distância entre variedades distintas cultivadas em campo.

Aproximadamente duas décadas mais tarde, Ahrent e Caviness (1994) avaliaram a taxa de fecundação cruzada em 12 cultivares de soja cultivadas em fileiras adjacentes, espaçadas por 102 cm, sob condições de campo. Neste estudo, populações de abelhas e outros insetos estavam presentes. Os resultados apontaram ocorrência de fecundação cruzada variando de 0 a 2,55%, o que levou à conclusão de que a presença de polinizadores naturais favoreceu a ocorrência de fecundação cruzada.

Ray et al. (2003) realizaram em Mississipi (EUA) um estudo procurando observar o potencial de fluxo gênico em soja. No primeiro experimento, 12 fileiras de soja, variedade de flor branca, foram ladeadas por 4 fileiras de soja, variedade de flor roxa. No segundo experimento, numa mesma fileira, estas duas variedades foram semeadas alternadamente, espaçadas 15 cm. Encontraram, para o primeiro ensaio, 0,41% e 0,03% de polinização cruzada a 0,9m e 5,4m da fonte, respectivamente. No segundo ensaio, o resultado médio indicou 1,8%, resultado considerado alto pelos autores, em alusão ao relatado na literatura.

Abud et al. (2003) procuraram investigar a dispersão de pólen de soja geneticamente modificada para resistência ao herbicida imazapyr cultivando esta variedade junto com uma convencional sensível a este herbicida. De acordo com o desenho experimental, a maior incidência de pólen transgênico ocorreu na primeira linha de soja convencional imediatamente 0,5m distante da soja transgênica, 0,44 a 0,45%. Já na segunda fileira, estes percentuais foram reduzidos a 0,04 e 0,14% chegando à zero na 13ª linha, a 6,5m de distância da parcela central, onde se encontravam as plantas transgênicas.

Existem autores que recomendam a duplicação do resultado obtido no cálculo da taxa de fecundação cruzada, sendo equivalente à ocorrência de cruzamento natural recíproco (Culter, 1934; Caviness, 1966; Boerma e Moradshahi, 1975). No entanto, esta atitude é criticada por outros autores (Weber

e Hanson, 1961; Vernetti et al., 1972). Com base na revisão de literatura, fica estabelecido que não se deve duplicar a taxa de hibridação cruzada, pois como ficou evidente, este valor modifica de variedade para variedade e de local para local. A taxa de alogamia é uma particularidade da variedade em interação com o seu meio.

Vários trabalhos mostraram que a taxa de fecundação cruzada é um evento influenciado por muitos fatores, como o próprio cultivar (Culter, 1934; Rubis, 1970; Beard e Knowles, 1971; Ahrent e Caviness, 1994), o local (Sediyama et al., 1970; Beard e Knowles, 1971), o ano (Caviness, 1966), distância entre as plantas (Caviness, 1966; Ahrent e Caviness, 1994) e o manejo de pragas com inseticidas (Abud et al., 2003). Erickson (1975b) indiretamente faz referência à influência de fatores ambientais para a ocorrência de cruzamentos naturais entre variedades de soja. Neste trabalho, o autor inferiu que a temperatura esteve relacionada com produção de néctar pela planta, logo, com a atração de insetos polinizadores, no caso, abelhas. Em geral, as plantas competem pela atenção dos insetos por meio das concentrações de açúcar em seu néctar.

Um estudo objetivou avaliar, durante de três anos, a importância de insetos na polinização de soja. Para isso, parcelas de soja engaioladas com abelhas, parcelas tratadas com inseticidas, logo, desprovidas de quaisquer insetos, e parcelas abertas, sem tratamento algum foram estudadas. Os resultados indicaram que a atividade de polinização das abelhas resultou em ganhos significativos em taxa de fecundação cruzada para duas de três cultivares estudadas. A atividade de alimentação de abelhas sobre a soja depende da resposta floral de cada cultivar ao seu ambiente no que se refere tanto à concentração quanto na relação néctar/flor (Erickson, 1975a). Essas considerações estão diretamente relacionadas com a ocorrência de fecundação cruzada.

Erickson (1975b) verificou que em temperaturas abaixo de 21ºC as flores das cultivares estudadas não se abriram e a secreção de néctar cessou. Tais resultados levam a sugerir uma relação entre as condições ambientais e a hibridação natural, mesmo que indireta.

Informação de alta relevância é que o fotoperíodo e a temperatura afetam a distância em dias entre emergência e florescimento de cultivares de soja, que por sua vez, têm tipos de sensibilidades distintas em relação a cada um desses fatores (Rodrigues et al, 2001). Oliveira et al. (1999) verificaram retardamento na data de

florescimento de variedades sob baixas temperaturas nas fases iniciais do desenvolvimento e interação entre temperatura, fotoperíodo e genótipos no que tange época de florescimento. Conforme Câmara et al. (1997), acréscimos no fotoperíodo e temperatura antecipam o florescimento da soja e aumentam a altura de plantas.

Fatores genéticos estão inseridos nessas considerações a respeito de floração e polinização em soja e o grau de cleistogamia parece estar relacionado com a secreção de néctar. Quanto mais efetiva a cleistogamia, menor se torna a secreção de néctar. Erickson (1975b) observou que cultivares semi-cleistógamas usualmente continuavam a secretar pequenas quantidades à baixas temperaturas, e cultivares cleistógamas produziram pouco néctar.

Em relação aos principais agentes polinizadores em soja, diversos trabalhos citam os insetos, de maneira geral (Weber e Hanson, 1961; Caviness, 1966; Ahrent e Caviness, 1994; Abud et al., 2003). Contudo, alguns autores especificaram as abelhas *Apis mellifera* L. como agentes principais (Culter, 1934; Weber e Hanson, 1961; Boerma e Moradshahi, 1975; Abud et al., 2003) e os tripes *Thrips tabaci* Lind (Weber e Hanson, 1961; Sediyama et al., 1970). Abud et al. (2003) ainda citam a espécie *Trigona spinipes* (Apidae) como visitante das flores de soja.

Apesar da existência de significativas considerações em estudos que verificaram que a ocorrência de fecundação cruzada é baixa (em média, inferior a 1%), existe o receio de que o cultivo da soja geneticamente modificada tolerante ao glifosato permita o fluxo gênico indesejado no ambiente. Existe o questionamento se naturalmente uma variedade tolerante ao glifosato poderia fornecer pólen para a fecundação de plantas de uma variedade convencional.

O objetivo deste estudo foi investigar o fluxo gênico, de uma variedade de soja geneticamente modificada para uma outra convencional, estimado pela taxa de fecundação cruzada natural.

MATERIAL E MÉTODOS

Germoplasma

As variedades utilizadas neste estudo foram concedidas pela Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola, COODETEC. Uma das variedades, CD219RR®, tolerante ao herbicida glifosato e outra convencional, CD211, sensível à ação deste. Os descritores das duas variedades mostram que a principal diferença entre elas está na sensibilidade ao herbicida glifosato (Tabela 2).

Tabela 2 - Características das cultivares CD211 e CD219RR®

Característica	CD211	CD219RR®
Grupo de Maturação	Médio	Médio
Ciclo Total (dias)	125	122
Ciclo Vegetativo (dias)	51 (Detectado neste estudo)	51
Hábito de crescimento	Determinado	Determinado
Altura média de planta (cm)	83	78
Acamamento	Mod.Resistente	Mod. Resistente
Cor da Flor	Branca	Branca
Cor da Pubescência	Cinza	Cinza
Deiscência da vagem	Tolerante	Tolerante
Cor do hilo	Marrom clara	Marrom clara
Peso 100 sementes (g)	14,0	15,9
Resposta ao herbicida	**Sensível**	**Tolerante**

Fonte: COODETEC, 2005ab.

Localidade

Os ensaios foram implantados em duas localidades. Uma das localidades foi o Campo Experimental da Agronomia, pertencente à Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais (latitude 20º45'14" Sul, longitude 42º52'55" Oeste, altitude 648m) e a segunda localidade foi o Campo Experimental da Central de Ensino e Desenvolvimento Agrário de Florestal, CEDAF, localizada na cidade de Florestal, Minas Gerais (latitude 19º52' Sul, longitude 44º25' Oeste, altitude 749m).

Plantio dos Ensaios

Com o preceito da padronização, todos os procedimentos adotados na implantação e condução dos ensaios foram os mesmos nas duas localidades. Os experimentos foram instalados no mês de dezembro de 2004 e a colheita realizada em abril de 2005.

Anteriormente ao plantio, as fileiras (sulcos) foram marcadas com estacas e etiquetas, ficando assim garantida a precisão dos procedimentos posteriores.

O esquema do experimento (Figura 17) mostra quadrados concêntricos (desconsiderando escala) espaçados 0,5m. A partir do primeiro quadrado, central, com 0,5m de lado, os demais foram adicionados/feitos até chegar ao último, totalizando 22,5m de lateral.

Para evitar que sementes fossem semeadas erroneamente em fileiras impróprias, primeiro e cuidadosamente semeou-se a variedade tolerante ao glifosato. Apenas uma pessoa realizou manualmente o plantio enquanto uma segunda pessoa permaneceu fiscalizando o processo. Procurou-se assegurar que sementes da cultivar tolerante não caíssem acidentalmente em fileiras reservadas à segunda cultivar. Em seguida, a cultivar sensível foi semeada.

Época, densidade de semeadura, adubação, manejo de insetos, entre outras práticas culturais seguiram as recomendações que predominam para a grande lavoura de soja. É importante destacar, entretanto, a isenção de aplicação de inseticida próximo e durante a época do florescimento. No período de florescimento da lavoura, foi realizado um 'roguing' para confirmar que as cultivares floresceram simultaneamente (Figura 18).

No estádio R8, ocorrido em abril de 2005, foram colhidas fileiras de plantas a diferentes distâncias da fonte de pólen. As distâncias, consideradas como

os tratamentos deste estudo, foram 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0m da fonte de pólen, correspondentes a 1ª, 2ª, 4ª, 8ª e 16ª fileiras, respectivamente.

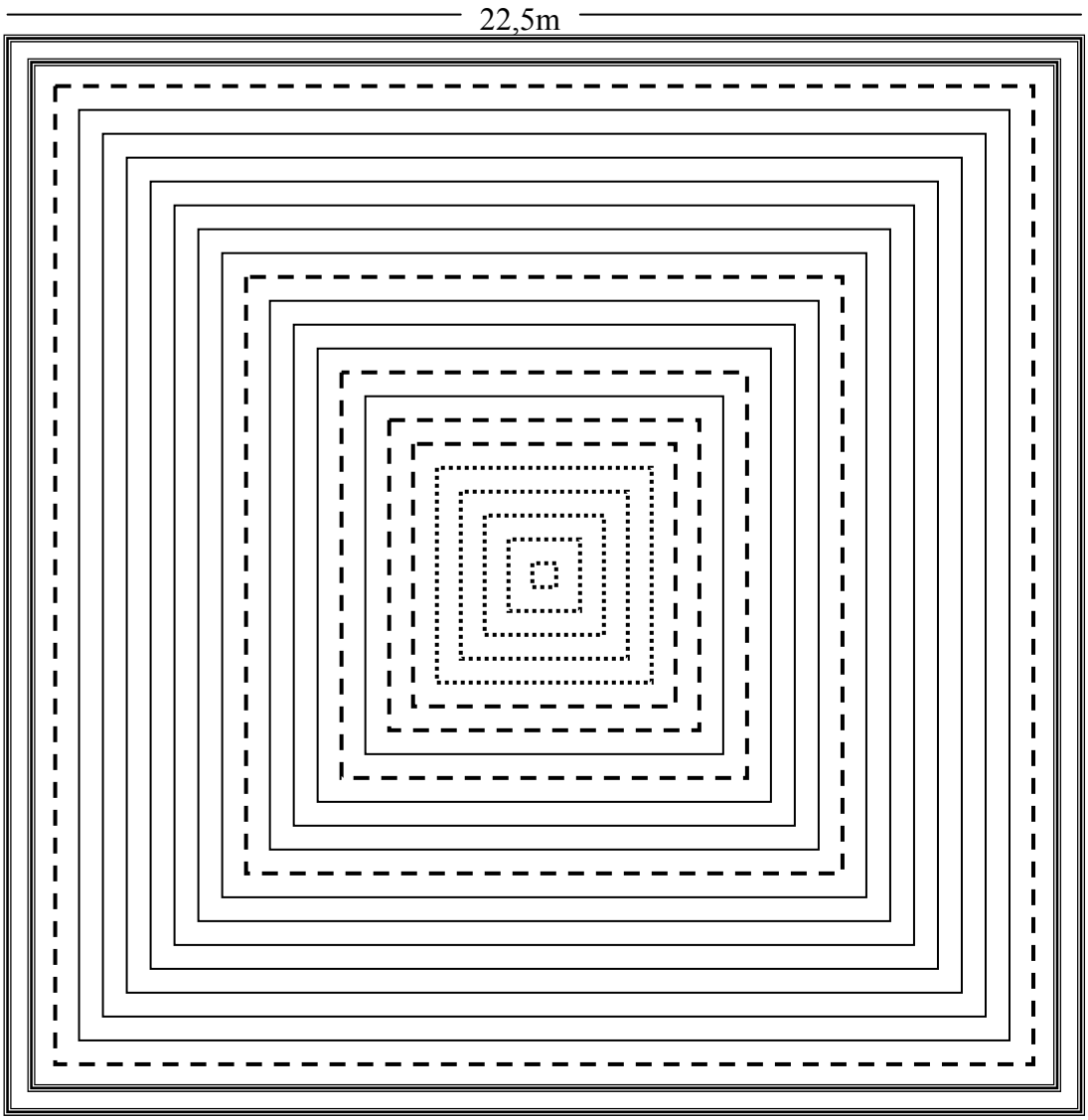


Figura 17 - Esquema do experimento em campo. Quadrados com linhas pontilhadas ao centro representam a variedade tolerante ao herbicida glifosato; quadrados com linhas únicas mostram a disposição da variedade sensível; quadrados com linhas triplas na periferia do esquema apontam a disposição da borda do experimento. Nota-se que alguns dos quadrados estão com linhas tracejadas, representando as fileiras (1ª; 2ª; 4ª; 8ª e 16ª) que foram colhidas no estágio R8 para análise de fluxo gênico. Espaçamento de 0,5m entre fileiras.

Cada lado do quadrado foi colhido separadamente, como uma repetição do tratamento (fileira). Assim, cada distância, referida como tratamento, possuiu quatro repetições. Na colheita e trilhagem também foram adotados cuidados fundamentais para evitar misturas acidentais, as quais poderiam confundir os resultados. Inicialmente, as fileiras a serem avaliadas foram colhidas individualmente, da 16ª para a 1ª, e transportadas para o local de trilhagem.

Na trilhagem do material a norma se repetiu. Começando a partir da 16ª, os tratamentos foram trilhados (16ª; 8ª; 4ª; 2ª e, por último, 1ª fileira). Após a trilhagem de cada tratamento, tomou-se o cuidado de limpar a máquina de modo que sementes de uma fileira não fossem misturadas com as sementes das outras. Assim, observa-se que dois procedimentos de precaução foram tomados, e com isso reduziu-se a praticamente nula a possibilidade de serem obtidos resultados prejudicados por ocorrência de misturas. Primeiro, a atitude de trilhar da última para a primeira fileira a ser avaliada. A base desse procedimento está no conceito teórico de que a probabilidade de fecundação cruzada diminui com o aumento da distância. Sendo assim, mesmo que acidentalmente uma semente ficasse na trilhadeira, pouco provavelmente esta prejudicaria os resultados do tratamento que esteve mais próximo à fonte de pólen na disposição experimental. Em segundo, com a limpeza da máquina após a trilhagem de cada tratamento, reduziu ainda mais a chance de mistura de fileiras distintas.

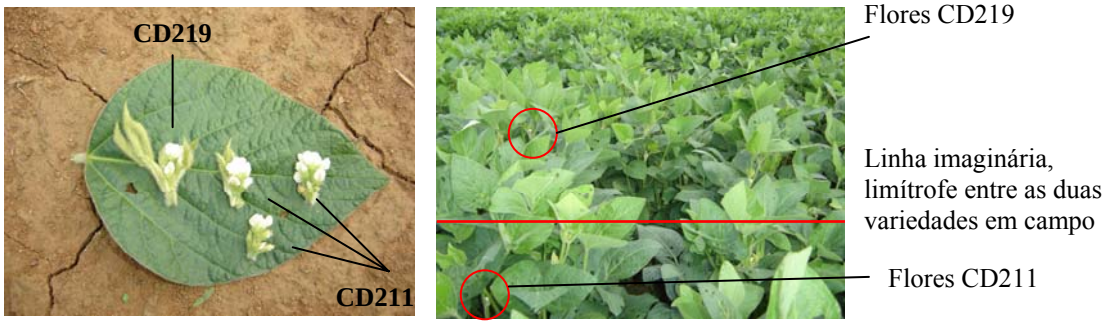


Figura 18 - Fotografia enfatizando o florescimento simultâneo das cultivares. À esquerda, destaque para as flores coletadas das plantas, e à direita, ênfase às flores ainda em campo.

O tamanho de cada amostra (n) de sementes a ser analisada foi obtido a partir da expressão matemática n = [log (1-P)]/[log (1-p)]; sendo n = número de sementes da amostra; P = probabilidade de o evento não ocorrer devido ao acaso; e p = taxa, em decimal, de fecundação cruzada esperada (Ramalho et al., 2000).

Conforme revisão de literatura, constatou-se que a taxa de fecundação cruzada em soja em condições de campo encontrada em diversos estudos com este fim, variou de 0,00 à 2,43%. Contudo, para os fins desta pesquisa, avaliou-se a probabilidade de fecundação cruzada esperada de 0,51%. Este valor de 'p' foi obtido de uma média entre os resultados encontrados por vários autores em seus trabalhos (Tabela 3). Assim, com P = 0,99 e p = 0,51. O 'n' encontrado foi de 900 sementes por amostra.

Tabela 3 - Autores, ano, local do estudo sobre fluxo gênico e percentagem de fecundação cruzada observada

Autores	Ano	Localidade(s)	Percentagem (%)
Woodhouse, E.J. & Taylor, C.S.	1913	Índia	<0,50
Jones, D.F. & Hayes, H.K.	1916	-	0
Woodworth, C.M.	1922	Wisconsin (EUA)	0,04
Garber, R.J. & Odland, T.E.	1926	Virgínia (EUA)	0,07 e 0,18
Takagi, M.	1927	-	0,62
Culter, G.H.	1934	Indiana (EUA)	0,38 e 2,43
Miyasaka, S.	1958	Piracicaba (BRA)	0,50
Probst, A.H.	1961	Indiana (EUA)	0,50
Caviness, C.E.	1966	Arkansas (EUA)	0,03; 0,03 e 0,44
Sediyama, T.	1971	Viçosa e Capinópolis (BRA)	0,09; 1,3 e 0,9
Vernetti et al.	1972	Pelotas e Ponta Grossa (BRA)	0,03 e 1,22
Ray et al.	2003	Mississipi (EUA)	1,8; 0,41 e 0,03
Abud et al.	2003	Planaltina (BRA)	0,44; 0,45; 0,04 e 0,14
Taxa de fecundação cruzada média obtida dos estudos			0,5028 ~ 0,51

Como verificado na Tabela 2, a característica discrepante entre as cultivares CD211 e CD219RR® é a resposta ao glifosato. Dessa forma, a investigação da ocorrência de fecundação cruzada se deu por meio da condução do teste de germinação das sementes de cada tratamento em papel germitest umedecido com solução do herbicida à 0,06% de concentração. A metodologia para a condução deste teste foi previamente definida na primeira etapa deste estudo. As amostras dos tratamentos, constituídas de 900 sementes cada, foram analisadas 7 dias após a implantação do teste. Para isso, foram distribuídas em 18 rolos de papel germitest com 50 sementes cada.

A base desta análise foi que sementes de soja tolerante ao herbicida germinam normalmente na presença deste, enquanto que aquelas sementes de cultivares sensíveis ao herbicida não o fazem, conforme verificado nos estudos conduzidos sobre bioensaios (Capítulo 1).

Os dados foram coletados e a análise estatística utilizada foi a regressão linear platô, como também realizado por Ferreira (2004), obtida com o auxílio do aplicativo SAEG. Trabalhou-se com esse tipo de análise porque a distribuição dos dados no começo decresce linearmente com o aumento da distância e atinge um platô que continua ao longo das distâncias. Para cada localidade, as equações de regressão foram ajustadas utilizando-se as médias das quatro repetições de cada tratamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A identificação de sementes oriundas de fecundação cruzada foi realizada a partir do método detecção de sementes de soja tolerante ao glifosato na descendência da cultivar sensível. A característica de tolerância foi manifestada pela germinação em meio com presença de glifosato (Figura 19A). Foi considerada plântula normal aquela com comprimento total acima dos 3cm, dotada de raízes secundárias desenvolvidas, como realizado por Cunha et al. (2005).

Em contrapartida, plântulas anormais foram reconhecidas por apresentar engrossamento, estrias longitudinais, desenvolvimento inibido da raiz primária e das raízes secundárias (raízes atrofiadas), além de hipocótilo relativamente maior que a raiz primária (Figura 19B), como relatado também por Funguetto et al. (2004).

Figura 19 - Fotografias enfatizando o padrão de plântulas normais e anormais, obtidas em teste de germinação sob tratamento com solução do glifosato a 0,06%. (A) Plântulas da cultivar tolerante ao herbicida, dotadas de desenvolvimento normal do sistema radicular. Esta foi uma das melhores características na identificação de plântulas tolerantes ao glifosato. (B) Plântulas da cultivar sensível, com desenvolvimento do sistema radicular inibido por ação do herbicida.

As sementes das fileiras das distâncias 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0m foram analisadas ao 7º dia após a implantação do teste de germinação em presença do glifosato e os resultados encontrados para os campos experimentais de Florestal e Viçosa para o fluxo gênico podem ser observados nas tabelas a seguir.

Como verificado em alguns trabalhos (Boerma e Moradshahi, 1975; Ahrent e Caviness, 1994; Ray et al., 2003; Abud et al., 2003), aos 8m de distância da fonte de pólen (Tabela 4), não foram detectados eventos de fecundação cruzada em nenhuma das duas localidades. Este dado mostrou que a distância foi um fator capaz de isolar as variedades de soja no que se refere ao escape gênico, entretanto, existem estudos que apresentam ocorrência de fecundação cruzada a distâncias superiores a esta encontrada neste estudo, como verificado por Caviness (1966).

Tabela 4 - Percentagem de fecundação cruzada aos 8m de distância da fonte de pólen

Fileira	Repetição	Sementes	Eventos de fecundação cruzada	Percentual
16ª	1	900	0	0
16ª	2	900	0	0
16ª	3	900	0	0
16ª	4	900	0	0
(CEDAF) Subtotal		3600	0	0
16ª	1	900	0	0
16ª	2	900	0	0
16ª	3	900	0	0
16ª	4	900	0	0
(Viçosa) Subtotal		3600	0	0
Total Geral		7200	0	0

Aos quatro metros de distância da fonte de pólen, observou-se a ocorrência de eventos de hibridação no campo experimental de Florestal (Tabela 5), o mesmo não sendo verificado em Viçosa. Um dos únicos trabalhos sobre fluxo gênico que cita variedade GM tolerante a herbicida relata que a partir dos 6,5m não se observou casos de disseminação de pólen transgênico (Abud et al., 2003). Outros autores também detectaram a ocorrência de fecundação cruzada aos 4m de distância da fonte de pólen (Boerma e Moradshahi, 1975; Ahrent e Caviness, 1994; Ray et al., 2003).

Tabela 5 - Percentagem de fecundação cruzada aos 4m de distância da fonte de pólen

Fileira	Repetição	Sementes	Eventos de fecundação cruzada	Percentual
8ª	1	900	0	0
8ª	2	900	2	0,22
8ª	3	900	1	0,11
8ª	4	900	0	0
(CEDAF) Subtotal		3600	3	0,33
8ª	1	900	0	0
8ª	2	900	0	0
8ª	3	900	0	0
8ª	4	900	0	0
(Viçosa) Subtotal		3600	0	0
Total Geral		7200	3	0,04

O fato do evento ter ocorrido num local e não no outro sugere que as condições do ambiente são relevantes no que se refere à taxa de fecundação cruzada, como destacado por Culter, 1934; Caviness, 1966; Rubis, 1970; Sediyama et al., 1970; Beard & Knowles, 1971; Ahrent & Caviness, 1994; Abud et al., 2003. A distinção entre as plântulas tolerantes e sensíveis foi facilitada pela caracterização morfológica das plântulas (Figura 20).

Figura 20 - Fotografias de plântulas de soja tolerante e sensível ao glifosato. À esquerda, plântulas de CD211 da 4ª fileira e de CD219RR® (controle). À direita, visão somente de plântulas da cultivar CD211, provenientes de sementes da 4ª fileira. Em destaque, plântulas sensíveis ao centro e híbridas tolerantes, provenientes de fecundação cruzada, às extremidades.

Como esperado, na medida em que a distância da variedade sensível para a variedade tolerante foi diminuindo, observou-se aumento na taxa de fecundação cruzada uma vez que é mais provável a ocorrência de hibridação natural em soja quando a distância percorrida entre as variedades envolvidas é menor. A dois metros de distância da fonte, nos dois locais, foram observados casos de hibridação (Tabela 6). Os percentuais médios encontrados diferiram para os dois campos experimentais, sendo superiores em Florestal, MG.

Tabela 6 - Percentagem de fecundação cruzada aos 2m de distância da fonte de pólen

Fileira	Repetição	Sementes	Eventos de fecundação cruzada	Percentual
4ª	1	900	3	0,33
4ª	2	900	1	0,11
4ª	3	900	0	0
4ª	4	900	5	0,55
(CEDAF) Subtotal		3600	9	0,25
4ª	1	900	1	0,11
4ª	2	900	2	0,22
4ª	3	900	0	0
4ª	4	900	0	0
(Viçosa) Subtotal		3600	3	0,08
Total Geral		7200	12	0,16

Na Figura 21, visualiza-se novamente a comparação entre plântulas tolerantes naturais, tolerantes híbridas e sensíveis.

Figura 21 - Fotografia enfatizando a comparação e identificação de plântulas tolerantes e sensíveis ao glifosato. Da esquerda para direita, podem ser observadas 6 (seis) plântulas tolerantes progênie CD219; 3 (três) plântulas tolerantes híbridas; e, 3 (três) plântulas sensíveis da progênie CD211.

A um metro de distância, os percentuais médios de fecundação cruzada foram de 0,80 e 0,08%, em Florestal e Viçosa, respectivamente (Tabela 7). Neste tratamento ficou evidente a ocorrência mais pronunciada de fecundação cruzada em Florestal do que em Viçosa, o que foi confirmado a 0,5m de distância da fonte de pólen.

Tabela 7 - Percentagem de fecundação cruzada a 1m de distância da fonte de pólen

Fileira	Repetição	Sementes	Eventos de fecundação cruzada	Percentual
2ª	1	900	1	0,11
2ª	2	900	7	0,77
2ª	3	900	11	1,22
2ª	4	900	10	1,11
(CEDAF) Subtotal		3600	29	0,80
2ª	1	900	1	0,11
2ª	2	900	1	0,11
2ª	3	900	1	0,11
2ª	4	900	0	0
(Viçosa) Subtotal		3600	3	0,08
Total Geral		7200	32	0,44

Enfim, na primeira fileira de variedade sensível, a partir da fonte, confirmou-se a expectativa de que, pelo menos em números absolutos, quanto menor a distância entre duas variedades diferentes, maiores são as chances de ocorrência de eventos de fecundação cruzada. Para as duas localidades, o maior número de eventos foi observado na menor distância entre doador e receptor de pólen (Tabela 8), como constatado por outros autores (Caviness, 1966; Abud et al., 2003; Ray et al., 2003).

Tabela 8 - Percentagem de fecundação cruzada aos 0,5m de distância da fonte de pólen

Fileira	Repetição	Sementes	Eventos de fecundação cruzada	Percentual
1ª	1	900	18	2,00
1ª	2	900	10	1,11
1ª	3	900	12	1,33
1ª	4	900	6	0,66
(CEDAF) Subtotal		3600	46	1,27
1ª	1	900	4	0,44
1ª	2	900	3	0,33
1ª	3	900	1	0,11
1ª	4	900	1	0,11
(Viçosa) Subtotal		3600	9	0,25
Total Geral		7200	55	0,76

Como também verificado por outros autores (Vernetti et al., 1972), observou-se variação na percentagem de hibridação natural, considerando o local. Considerando o desconhecimento de como seria o cruzamento natural recíproco,

os resultados encontrados para cada tratamento não puderam ser duplicados, tendo em vista que este fenômeno é uma particularidade de cada variedade (Vernetti et al., 1972).

A análise de regressão linear com platô estimou as distâncias para as duas localidades até onde ocorreu efeito de polinização cruzada. Os resultados desta análise estão apresentados na Figura 22, onde se encontram as equações de regressão e os valores do platô.

Para Florestal, a taxa de fecundação cruzada aproximou-se de zero à distância de 2,27m da fonte. A partir desse ponto, a taxa de hibridação natural se estabilizou em 0,0412%. Para Viçosa, a distância encontrada foi de 1,17m, a partir da qual, a taxa de hibridação natural se estabilizou em 0,0275% (Figura 22).

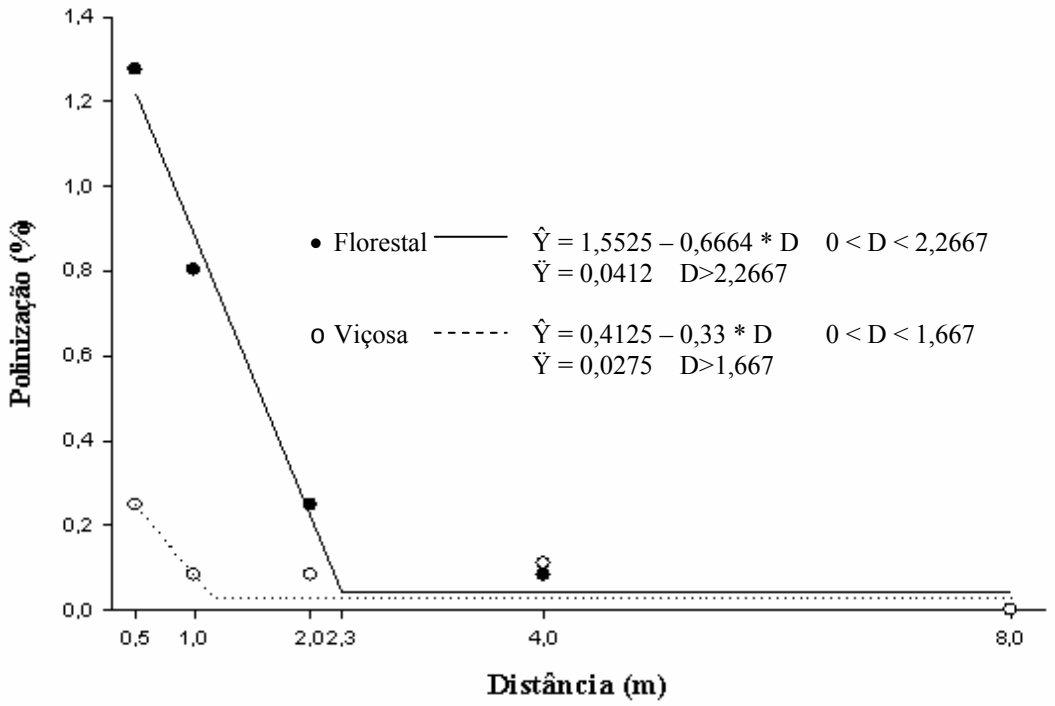


Figura 22 - Regressão linear com platô dos dados obtidos para as localidades de Viçosa e Florestal. [D - Distância (m)]

As variações encontradas para as duas localidades confirmaram que as condições particulares de cada ambiente interferem na taxa de hibridação natural. Em Florestal, os percentuais médios de fecundação cruzada foram 1,27% a 0,5m da fonte, decaindo para 0,8% a 1,0m, não sendo relatado nenhum evento aos 8m de distância da fonte. Em Viçosa, os percentuais médios encontrados foram menores do que os observados em Florestal. Foram observados 0,25 e 0,08%, na

1ª e 2ª fileiras, respectivamente, não sendo relatado nenhum evento aos 4m de distância da fonte, nem tampouco aos 8m de distância.

Os dados obtidos permitiram inferir também que o fato da variedade ser geneticamente modificada não contribuiu nem para o aumento e nem para a redução da taxa de fecundação cruzada, quando comparado com o relatado na literatura para variedades convencionais.

Os resultados desse trabalho referem-se à análise específica do fluxo gênico da cultivar CD219RR® para CD211 nos ambientes estudados, outras variedades requerem novas pesquisas.

CONCLUSÕES

O fato da variedade ser geneticamente modificada não interferiu na taxa de fecundação cruzada em soja, quando comparado com o que já é relatado para variedades convencionais.

As maiores taxas de hibridação natural (1,27% em Florestal e 0,25% em Viçosa) ocorreram às menores distâncias entre doador e receptor de pólen (0,5m).

A taxa de fecundação cruzada aproximou-se de zero às distâncias de 2,26 e 1,16m da fonte, para Florestal e Viçosa, respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUD, S.; SOUZA, I.M.; MOREIRA, C.T.; ANDRADE, S.R.M.; ULBRICH, A.V.; VIANNA, G.R.; RECH, E.L.; ARAGÃO, F.J.L. Dispersão de pólen em soja transgênica na região Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.10, p.1229-1235, 2003.

AHRENT, D.K.; CAVINESS, C.E. Natural cross-pollination of twelve soybean cultivars in Arkansas. **Crop Science**, v.34, p.376-378, 1994.

AMARANTE JÚNIOR, O.P.; SANTOS, T.C.R.; BRITO, N.M.; RIBEIRO, M.L. Métodos de extração e determinação do herbicida glifosato: Breve Revisão. **Química Nova**, v.25, n.3, p.420-428, 2002a.

AMARANTE JÚNIOR, 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, 2002b.

AYALA, L.; TILLMANN, M.A.A.; DODE, L.B.; VILLELA, F.A.; MAGALHÃES, A.M.; SILVA, M.P. Tetrazolium test for identification of transgenic rice seeds tolerant to herbicide. **Seed Science & Technology**, n.30, p.431-436, 2002.

BEARD, B.H.; KNOWLES, F. Frequency of cross-pollination of soybeans after seed irradiation. **Crop Science**, v.11, p.489-492, 1971.

BERTAGNOLLI, C.M. **Detecção e quantificação de sementes de soja geneticamente modificada resistente ao glifosato em sistema hidropônico**. 2005. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Sementes) – Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel", Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2005.

BEVILAQUA, G.A.P.; BONATO, E.R.; ROMAN, E.S. Identificação de soja tolerante a glyphosate através do teste de germinação. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.1, n.3, p.261-265, 2000.

BOERMA, H.R.; MORADSHAHI, A. Pollen movement within and between rows to male-sterile soybeans. **Crop Science**, v.15, p.858-861, 1975.

BONOW, S.; PINHO, E.V.R.V. Detecção, identificação e quantificação de organismos geneticamente modificados. **Informativo Abrates**, v.13, n.1,2, 2003.

BORÉM, A. **Escape gênico & transgênicos**, Viçosa: UFV, 2001, 206 p.: il.

BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. **Melhoramento de Plantas**, (5ª ed), Viçosa: UFV, 2005, 525 p.: il.

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

CÂMARA, G.M.S.; SEDIYAMA, T.; DOURADO-NETO, D.; BERNARDES, M.S. Influence of photoperiod and air temperature on the growth, flowering and maturation of soybean (Glycine max (L.) Merrill). **Scientia Agricola**, v.54 (nº especial), p.149-154, 1997.

CAVINESS, C.E. Estimates of natural cross-pollination in Jackson soybeans in Arkansas. **Crop Science**, v.6, p.211-212, 1966.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Sexto levantamento da safra agrícola 2004/05**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 27 ago. 2005a.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Safras: séries históricas 1990/91 a 2004/05**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 27 ago. 2005b.

COODETEC Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola. **Cultivares de Soja RR®**. Cascavel: Paraná, 2005a.

COODETEC Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola. **Guia de Produtos 2005**. Cascavel: Paraná, 2005b.

CRAWLEY, M.J.; BROWN, S.L.; HAILS, R.S.; KOHN, D.D.; REES, M. Transgenic crop in natural habitats, **Nature**, v.409, p.682-683, 2001.

CULTER, G.H. A simple method for making soybean hybrids. **Journal of the American Society of Agronomy**, v.26, p.252-254, 1934.

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.

DELANNAY, X.; BAUMAN, T.T.; BEIGHLEY, D.H.; BUETTNER, M.J.; COBLE, H.D.; DEFELICE, M.S.; DERTING, C.W.; DIEDRICK, T.J.; GRIFFIN, J.L.; HAGOOD, E.S.; HANCOCK, F.G.; HART, S.E.; LAVALLEE, B.J.; LOUX, M.M.; LUESCHEN, W.E.; MATSON, K.W.; MOOTS, C.K.; MURDOCK, E.; NICKELL, A.D.; OWEN, M.D.K.; PASCHAL II, E.H.; PROCHASKA, L.M.; RAYMOND, P.J.; REYNOLDS, D.B.; RHODES, W.K.; ROETH, F.W.; SPRANKLE, P.L.; TAROCHIONE, L.J.; TINIUS, C.N.; WALKER, R.H.; WAX, L.M.; WEIGELT, H.D.; PADGETTE, S.R. Yield evaluation of a glyphosate-tolerant soybean line after treatment with glyphosate. **Crop Science**, Madison, v.35, p.1461-1467, 1995.

ELMORE, R.W.; ROETH, F.W.; KLEIN, R.N.; KNEZEVIC, S.Z.; MARTIN, A.; NELSON, L.A.; SHAPIRO, C.A. Glyphosate-resistant soybean cultivar response to glyphosate. **Agronomy Journal**, Madison, v.93, p.404-407, 2001.

ERICKSON, E.H. Effect of honey bees on yield of three soybean cultivars. **Crop Science**, v.15, p.84-86, 1975a.

ERICKSON, E.H. Variability of floral characteristics influences honey bee visitation to soybean blossoms. **Crop Science**, v.15, p.767-771, 1975b.

FERREIRA, J.L. **Análise do fluxo gênico em feijoeiro**. 2004, 33p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

FRANÇA NETO, J de B. Perspectivas futuras da cultura da soja no Brasil: produção, produtividade, expansão de área. In: MOSCARDI, F.; HOFFMANN-CAMPO, C.B.; SARAIVA, O.F.; GALERANI, P.R.; KRZYZANOWSKI, F.C.; CARRÃO-PANIZZI, M.C. (Ed.) **Proceedings...Congresso Brasileiro de Soja (III)** Foz do Iguaçu, PR, 2004. p.1203-1209, 2004.

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.

GASSER, C.S.; FRALEY, R.T. Genetically engineering plants for crop improvement. **Science**, v.244, p.1293-1299, 1989.

GAZZIERO, D.L.P.; PRETE, C.E.C. Dinâmica da população e manejo de plantas daninhas na cultura da soja RR: vantagens e riscos. In: MOSCARDI, F.; HOFFMANN-CAMPO, C.B.; SARAIVA, O.F.; GALERANI, P.R.; KRZYZANOWSKI, F.C.; CARRÃO-PANIZZI, M.C. (Ed.) **Proceedings...Congresso Brasileiro de Soja (III)** Foz do Iguaçu, PR, 2004. p.1221-1230, 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.

HUFFMAN, W.E. Production, Identity Preservation, and Labeling in a Marketplace with Genetically Modified and Non-Genetically Modified Foods. **Plant Physiology**, v.134, p.3-10, 2004.

JAMES, C. **Preview: Global Status of Commercialized Transgenic Crops: 2003**. ISAAA Briefs n.30. ISAAA: Ithaca, NY, 2003.

JAMES, C. **Preview: Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2004**. ISAAA Briefs n.32. ISAAA: Ithaca, NY, 2004.

KLEBA, J.B. Riscos e benefícios de plantas transgênicas resistentes a herbicidas: o caso da soja RR da Monsanto. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v.15, n.3, p.9-42, 1998.

KRUSE, N.D.; TREZZI, M.M.; VIDAL, R.A. Herbicidas inibidores da EPSPS: Revisão de Literatura. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.1, n.2, 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**, n.25, n.1, p.87-94, 2003.

MENEZES, S.M.; TILLMANN, M.A.A.; DODE, L.B.; VILLELA, F.A. Detecção de soja geneticamente modificada tolerante ao glifosato por métodos baseados na atividade de enzimas. **Revista Brasileira de Sementes**, v.26, n.2, p.150-155, 2004.

MIRANDA, D.M. **Bioensaios na detecção e quantificação de sementes de soja geneticamente modificada resistente ao glifosato em amostras convencionais de sementes**. 2004, 44p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Sementes) – Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel", Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2004.

MIRANDA, D.M.; TILLMANN, M.A.A.; BALERINI, F.; VILLELA, F.A. Bioensaios na detecção e quantificação de sementes de soja geneticamente modificada resistente ao glifosato. **Revista Brasileira de Sementes**, v.27, n.1, p.93-103, 2005.

MIYASAKA, S. **Contribuição para o melhoramento da soja no Estado de São Paulo**. 1958, 49p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1958.

MONQUERO, P.A. **Dinâmica populacional e mecanismos de tolerância de espécies de plantas daninhas ao herbicida glyphosate**. 2003, 111p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados na avaliação das plântulas. In.: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. (org.) **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. p. 49-85.

NEPOMUCENO, A.L. A agricultura e as plantas geneticamente modificados. In: MOSCARDI, F.; HOFFMANN-CAMPO, C.B.; SARAIVA, O.F.; GALERANI, P.R.; KRZYZANOWSKI, F.C.; CARRÃO-PANIZZI, M.C. (Ed.) **Proceedings...Congresso Brasileiro de Soja (III)** Foz do Iguaçu, PR, 2004. p.1217-1220, 2004.

OLIVEIRA, A.C.B.; SEDIYAMA, C.S.; CRUZ, C.D. Selection for later flowering in soybean (Glycine max L.Merrill) F2 populations cultivated under short day conditions. **Genetics and Molecular Biology**, v.22, n.2, p.243-247, 1999.

PADGETTE, R.; KOLACZ, K.H.; DELANNAY, X.; RE, D.B.; LAVALLEE, B.J.; TINIUS, C.N.; RHODES, W.K.; OTERO, I.; BARRY, G.F.; KISHORE, G.M. Development, identification and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. **Crop Science**, Madison, v.35, p.1451-1461, 1995.

PATERNIANI, E. From wild to transgenic plants. **Caderno de Ciência e Tecnologia**, v. 8, n. 1, p.169-178, 2001.

RAMALHO, M. A. P., SANTOS, J. B., PINTO, C.A.B.P. **Genética na Agropecuária,** Lavras – MG. Editora UFLA. 472p., 2000.

RAY, J.D.; KILEN, T.C.; ABEL, C.A.; PARIS, R.L. Soybean natural cross-pollination rates under field conditions. **Environmental Biosafety Research**, v.2, n.2, p.133-138, 2003.

RECH, E.L. Transgênicos x Sustentabilidade. **SEED News**, Pelotas, v.4, n.5, p.34, 2000.

RODRIGUES, O.; DIDONET, A.D.; LHAMBY, J.C.B.; BERTAGNOLLI, P.F.; LUZ, J.S. Resposta quantitativa do florescimento da soja à temperatura e ao fotoperíodo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n.3, p.431-437, 2001.

ROESSING, A.C. Competitividade da cultura da soja no Brasil e no mundo. In: **Proceedings... Congresso Brasileiro de Soja (III)**. Foz do Iguaçu, PR, 2004. p. 1203-1209.

RUBIS, D.D. Breeding insect-pollinated crops. P. 19-24. In: **The indispensable Pollinators.** A report of the 9th Polination Conf. Miss. Publ. 127. Ark. Agric. Exp. Stn. Fayetteville, AR. 1970.

SEDIYAMA, T.; CARDOSO, A.A.; VIEIRA, C.; ANDRADE, D. Taxa de hibridação natural na soja, em Viçosa e em Capinópolis, Minas Gerais. **Revista Ceres**, v.17, n.94, p.329-331, 1970.

SHAH, D.M.; HORSCH, R.B.; KLEE, H.J.; KISHORE, G.M.; WINTER, J.A.; TUMER, N.E.; HIRONAKA, C.M.; SANDERS, P.R.; GASSER, C.S.; AYKENT, S.; SIEGEL, N.R.; ROGERS, S.G.; FRALEY, R.T. Engineering herbicide tolerance in transgenic plants, **Science**, v.233, p.478-481, 1986.

SIQUEIRA, J.O.; TRANNIN, I.C.B.; RAMALHO, M.A.P.; FONTES, E.M.G. Interferências no agrossistema e riscos ambientais de culturas transgênicas tolerantes a herbicidas e protegidas contra insetos. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v.21, n.1, p.11-81, 2004.

STARNES, W.J.; HADLEY, H.H. Some effects of the gametocide, alpha, beta-dichloroisobutyrate, on soybeans. **Crop Science**, v.2, p.305-310, 1962.

TILLMANN, M.A.A.; WEST, S. Identification of genetically modified soybean seeds resistant to glyphosate. **Scientia Agricola**, v.61, n.3, p.336-341, 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.

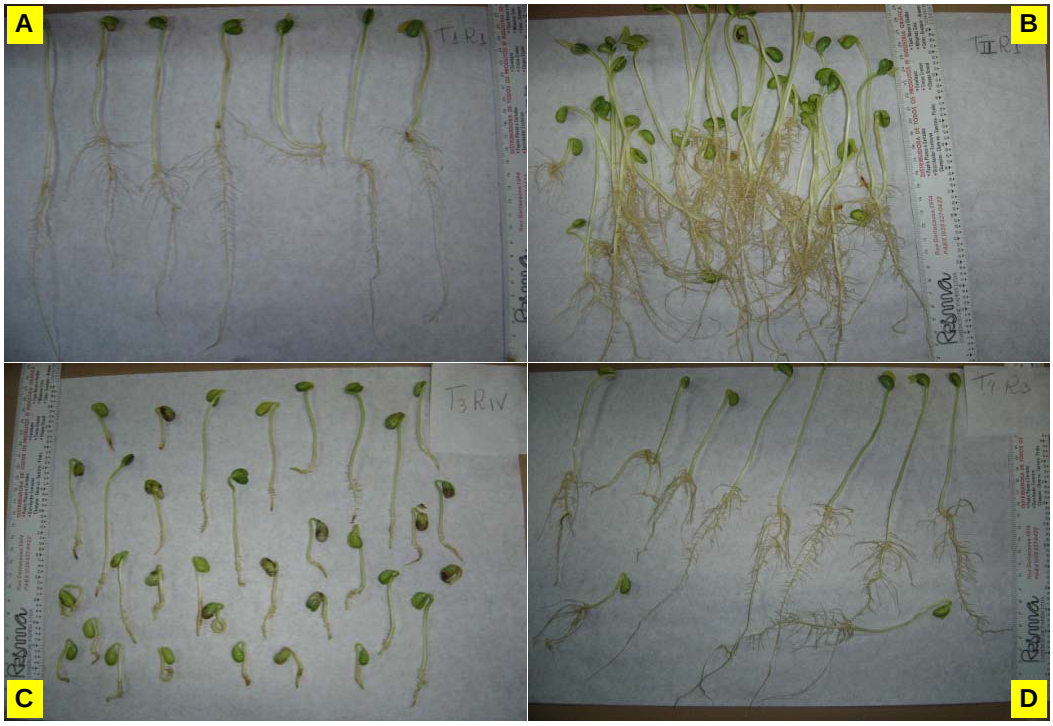
TREZZI, M.M.; KRUSE, N.D.; VIDAL, R.A. Inibidores de EPSPS. In: VIDAL, R.A.; MEROTTO JR, A. (Eds.). **Herbicidologia**, Porto Alegre, p.37-45, 2001.

VERNETTI, F.J.; BONATO, E.R.; TERESAWA, F.; GASTAL, M.F.C. Observações sobre a taxa de cruzamentos naturais em soja, em Pelotas e Sertão, RS e Ponta Grossa, PR. **Ciência e Cultura**, v.1, n.24, p.36-41, 1972.

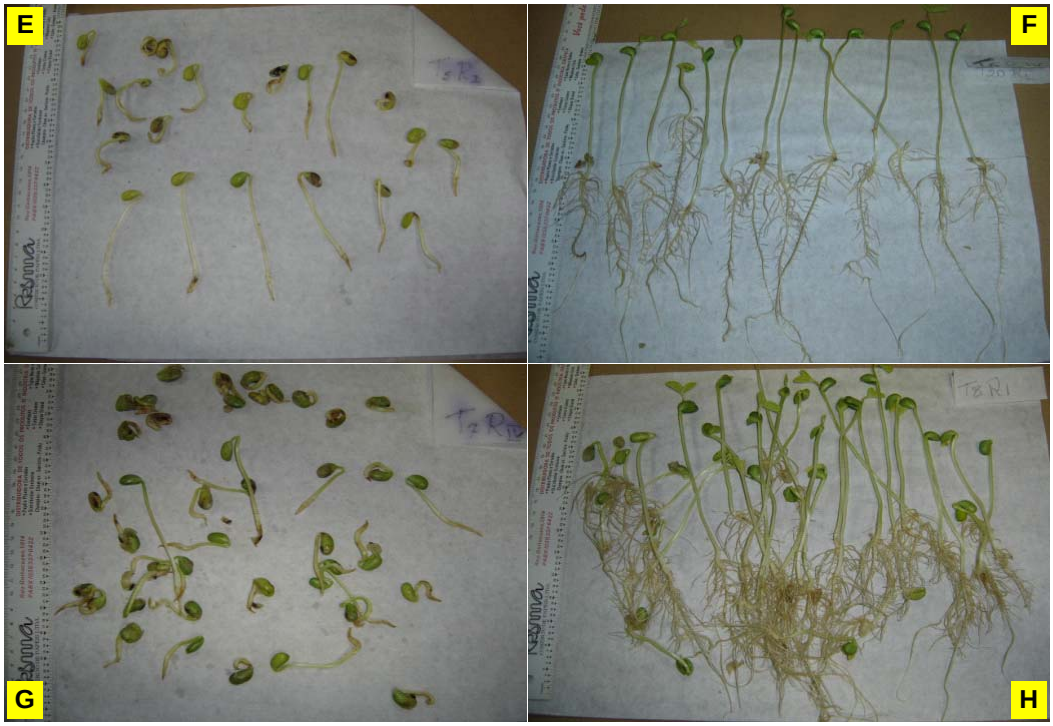
VIEIRA, R.C.; CABRAL, L.C.; DE PAULA, A.C.O. Composição centesimal e conteúdo de aminoácidos graxos e minerais de seis cultivares de soja destinadas à alimentação humana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.7, p.1277-1283, 1999.

WEBER, C.R.; HANSON, W.D. Natural hybridization with and without ionizing radiation in soybeans. **Crop Science**, 1: 389-392, 1971.

Anexo I – Plântulas observadas aos sete dias de teste de germinação após imersão das sementes em solução do herbicida por uma hora



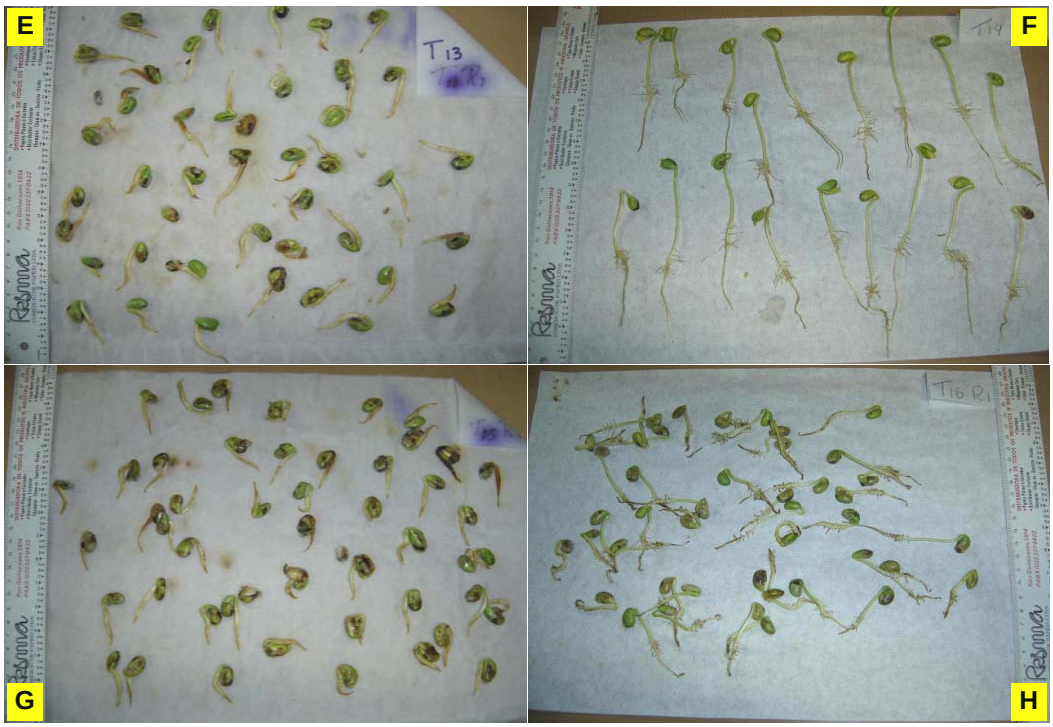
A - Variedade Elite em tratamento com água; B - Variedade CD219 em tratamento em água; C - Variedade Elite em tratamento com 0,03% i.a.; D - Variedade CD219 em tratamento com 0,03% i.a.



E - Variedade Elite em tratamento com 0,06% i.a.; F - Variedade CD219 em tratamento com 0,06% i.a.; G - Variedade Elite em tratamento com 0,12% i.a.; H - Variedade CD219 em tratamento com 0,12% i.a.

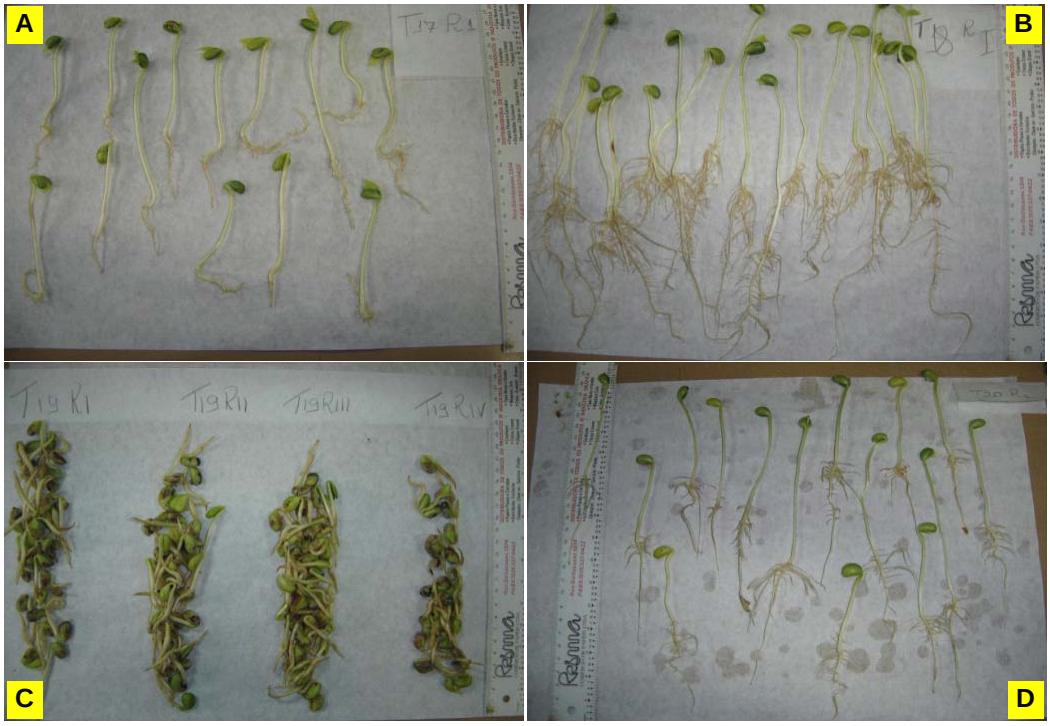
Anexo II – Plântulas observadas aos sete dias de teste de germinação em papel germiteste umedecido com solução do herbicida

A - Variedade Elite em tratamento com água; B - Variedade CD219 em tratamento em água; C - Variedade Elite em tratamento com 0,03% i.a.; D - Variedade CD219 em tratamento com 0,03% i.a.

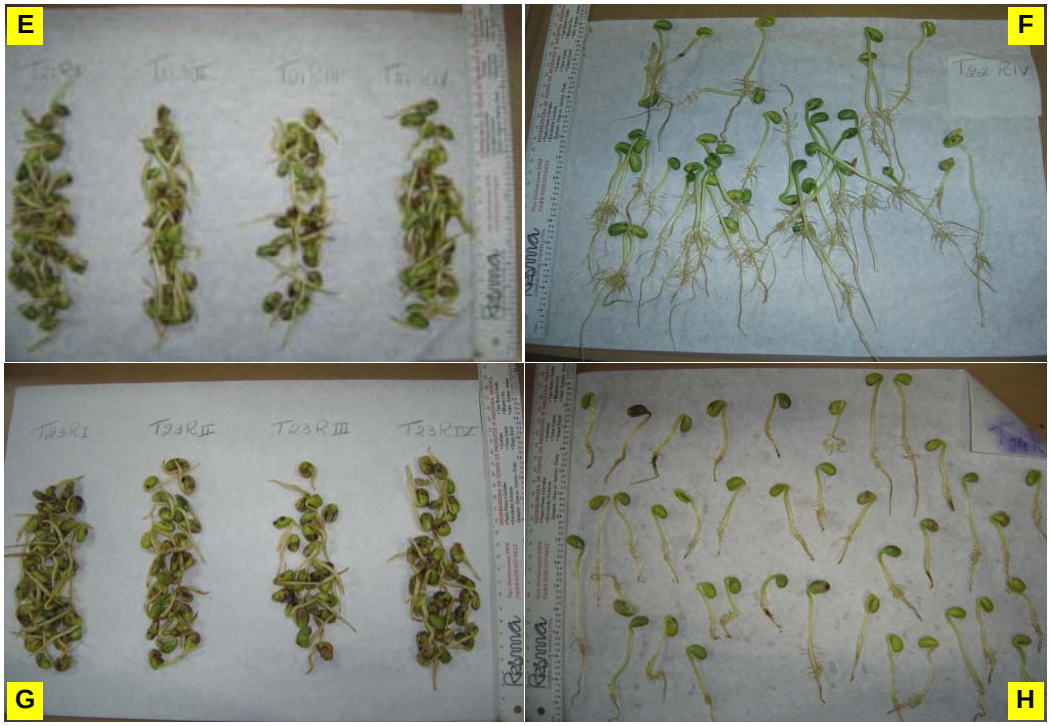


E - Variedade Elite em tratamento com 0,06% i.a.; F - Variedade CD219 em tratamento com 0,06% i.a.; G - Variedade Elite em tratamento com 0,12% i.a.; H - Variedade CD219 em tratamento com 0,12% i.a.

Anexo III – Plântulas observadas aos sete dias de teste de germinação das sementes pré-embebidas por 24 horas em papel germiteste umedecido com solução do herbicida



A - Variedade Elite em tratamento com água; B - Variedade CD219 em tratamento em água; C - Variedade Elite em tratamento com 0,30% i.a.; D - Variedade CD219 em tratamento com 0,30% i.a.



E - Variedade Elite em tratamento com 0,60% i.a.; F - Variedade CD219 em tratamento com 0,60% i.a.; G - Variedade Elite em tratamento com 1,20% i.a.; H - Variedade CD219 em tratamento com 1,20% i.a.