

DETECÇÃO DE SEMENTES DE SOJA GENETICAMENTE MODIFICADA TOLERANTE AO HERBICIDA GLIFOSATO¹

CLAUDETE IZABEL FUNGUETTO²; MARIA ÂNGELA ANDRÉ TILLMANN³;
FRANCISCO AMARAL VILLELA³; LUCIANA BICCA DODE⁴

RESUMO - Esta pesquisa teve por objetivos ajustar as metodologias de bioensaios para detecção de sementes de soja tolerante ao herbicida glifosato, estabelecendo o tempo mínimo necessário para uma avaliação segura, bem como a caracterização dos sintomas causados pelo herbicida nas plântulas não geneticamente modificadas. Foram conduzidos três bioensaios, baseados no teste de germinação. No Ensaio 1, as sementes foram pré-embebidas durante 16 horas em substrato umedecido com solução do herbicida. No Ensaio 2, o substrato foi mantido permanentemente umedecido em solução do herbicida. No Ensaio 3, as sementes foram imersas em solução do herbicida. Os parâmetros de avaliação foram: percentagem e velocidade de germinação, comprimentos da plântula, do hipocótilo e da raiz primária, percentagem de plântulas com raízes secundárias e caracterização morfológica. Concluiu-se que os bioensaios permitem detectar sementes de soja geneticamente modificada, tolerante ao glifosato, no prazo de cinco dias. As metodologias da sementeira em substrato umedecido com solução do herbicida, na concentração de 0,03% da formulação 480 g/L de i.a. e a da pré-embebição das sementes durante 16 horas, com solução contendo 0,4% e 0,6% de glifosato da formulação 480 g/L de i.a. são as recomendadas para utilização em rotina de Laboratório de Análise de Sementes. O glifosato causa anormalidade em plântulas de soja não geneticamente modificada. As plântulas apresentam engrossamento, estrias longitudinais e amarelecimento gradativo do hipocótilo, inibição do desenvolvimento da raiz primária e da emissão de raízes secundárias, sendo o hipocótilo proporcionalmente maior do que a raiz primária.

Termos para indexação: *Glycine max*, metodologia de detecção, OGM, caracterização de sintomas.

BIO ASSAYS FOR DETECTION OF SOYBEAN SEEDS TOLERANT TO GLYPHOSATE HERBICIDE¹

ABSTRACT - The objective of this study was to adjust methodology to detect soybean seeds tolerant to glyphosate, to characterize the symptoms, to establish the necessary minimum time capable to allow safe and possible evaluation of being reproduced. Three independent assays were done, based on the germination test. In study 1, seeds were pre-imbibed in a substrate containing herbicide solution for 16 hours. In study 2 the substratum was imbibed with the herbicide. In the study 3, seeds were immersed in solution of the herbicide. The standard germination test, speed of germination, length of seedling root and shoot and percentage of seedling secondary roots were used as evaluation parameters. Evaluations were made in the fourth day, until the final count, on the eighth day. All three methods allowed detection of soybean seeds tolerant to the herbicide glyphosate, in the period of five days. The most recommended methodologies for routine use in seed analysis laboratory were sowing in substratum moistened with solution of the herbicide, at the concentration of 0,03% (480 g/l active ingredient) and pre-imbibing of the seeds for 16 hours, with solution containing 0,4% and 0,6% of glyphosate (480 g/l active ingredient) because they allow germination and the normal development of the aerial parts and root system of genetically modified seedlings. The following symptoms were observed in non GM seedlings : thickened points, longitudinal

¹ Submetido em 10/10/2003. Aceito para publicação em 02/04/2004; parte da dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Sementes, pelo primeiro autor – FAEM/UFPEL.

² Eng^a Agrôn^a, M.Sc., Departamento de Fitotecnia, FAEM/UFPEL,

C.P. 354, 96010-900, Pelotas, RS. e-mail: cifunguetto@ig.com.br.

³ Prof. Adjunto, Dr., Departamento de Fitotecnia, FAEM/UFPEL, Cx. Postal 354, 96010-900, Pelotas, RS.

⁴ Prof^a, Dr^a., Universidade Católica de Pelotas, 96015-560, Pelotas, RS.

grooves and with yellowing of the hypocotyl, inhibition of the development of the primary root and of the emission of secondary roots, and the hypocotyl was proportionally larger than the primary root.

Key-words: *Glycine max*, detection methodology, GMO, symptoms characterization.

INTRODUÇÃO

A cultura da soja (*Glycine max* L. Merrill.) ocupa atualmente, no Brasil, uma área de 18,4 milhões de hectares, sendo a espécie com maior extensão de cultivo (IBGE, 2003), tendo relevante importância econômica no país. O cultivo de lavouras de soja geneticamente modificada (GM) está em expansão no Brasil e já foram concedidos certificados de proteção para 23 cultivares de soja tolerantes ao herbicida Roundup Ready (RR) no país (Brasil, 2003).

Apesar da produção de sementes de espécies GM atingir proporções mundialmente significativas, muitas pesquisas estão sendo conduzidas objetivando a detecção de genótipos GM resistentes à herbicidas, visto que ainda não há nenhum método padronizado.

O glifosato é um ingrediente ativo herbicida que inibe a enzima 5-enolpiruvil shiquimato-3-fosfato sintetase (EPSP sintetase ou EPSPS) e impede que a planta forme aminoácidos essenciais para a síntese de proteínas e também alguns metabólitos secundários (Kruse et al., 2000).

Existem vários métodos eficazes na detecção de soja GM tolerante a herbicida, baseados em características celulares e/ou moleculares dos genótipos e que diferem quanto ao nível de sofisticação, tempo de execução e custo.

A metodologia dos bioensaios é conduzida de forma similar ao teste de germinação, procedimento básico exigido no sistema de produção de sementes. Não exige equipamentos sofisticados, nem mão-de-obra específica, apresentando resultados confiáveis com baixo custo. Goggi & Stahr (1997) detectaram sementes de cultivar de soja tolerantes a herbicida, submetendo sementes ao contato de 18 horas com o herbicida; Bevilaqua et al. (2000), empregaram o herbicida na água de embebição do substrato, na dose de 280 mg i. a. /litro; Nascimento et al. (2000), utilizaram substrato umedecido em solução de glifosato; Tillmann & West (2004) usaram imersão de sementes em solução do herbicida, na concentração de 0,12%, e substrato pré-embebido a 0,6%, durante 16 horas.

Considerando o avanço dos cultivos GM no país e no mundo, torna-se relevante o uso de técnicas de detecção eficientes, rápidas, de baixo custo e cujos resultados possam ser reproduzidos por diferentes laboratórios.

Os objetivos da pesquisa foram ajustar as metodologias de bioensaios para detecção de sementes de soja tolerante ao glifosato, estabelecendo o tempo mínimo necessário capaz de permitir avaliação segura e possível de

ser reproduzida, bem como a caracterização dos sintomas causados pelo herbicida glifosato em plântulas não GM.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido na Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas. Foram realizados três ensaios independentes, baseados no teste de germinação, de acordo com as Regras para Análise de Sementes - RAS (Brasil, 1992), utilizando duas cultivares de soja, sendo uma delas GM (CD 213RR), tolerante ao herbicida glifosato e outra parental (OC 14), não tolerante, ambas protegidas em nome da Coodetec (Cooperativa Central Agropecuária de Desenvolvimento Tecnológico e Econômico Ltda). No ensaio 1, as sementes eram provenientes da safra 2001/2002 e nos ensaios 2 e 3, da safra 2002/2003.

O produto comercial herbicida glifosato utilizado possuía formulação contendo 480 g/L do ingrediente ativo sal de isopropilamina de N-(fosfometil) glicina e 36% de equivalente ácido de N-(forfonometil) glicina.

Foram efetuadas avaliações do percentual de germinação, velocidade de germinação, comprimento de plântulas e percentual de plântulas com raízes secundárias, empregando-se 200 sementes por repetição (oito sub-amostras de 25 sementes) distribuídas manualmente no substrato, segundo recomendação de Krzyzanowski (1991).

A germinação foi realizada de acordo com as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992) e a determinação da velocidade de germinação conforme Nakagawa (1999). O comprimento de plântulas de acordo com Krzyzanowski (1991) e a percentagem de plântulas com raízes secundárias foi realizada na contagem final, computando-se as plântulas normais e anormais. As médias de germinação e de plântulas com raízes secundárias foram expressas em percentagem, a velocidade de germinação, em dias e os comprimentos, em centímetros.

A caracterização dos sintomas causados pelo herbicida foi feita através de observação visual de plântulas e descrição das evidências morfológicas verificadas.

Os parâmetros foram avaliados a partir do 4º dia, pois até então não haviam raízes secundárias suficientemente desenvolvidas em plântulas GM e seguiram-se diariamente até a contagem final (8º dia). As plântulas foram consideradas normais quando apresentaram comprimento total mínimo de 3cm e presença de raízes secundárias desenvolvidas.

1 – Ensaio 1 – Pré-embebição das sementes em substrato umedecido com solução do herbicida.

Cada repetição de 200 sementes (duas sub-amostras de 100 sementes) foi colocada em substrato umedecido com solução do herbicida glifosato, onde permaneceu durante 16 horas. Foram utilizadas concentrações de 0,0%; 0,4%; 0,6% e 0,82% do herbicida comercial. Transcorrido o período estabelecido, foram transferidas para substrato umedecido com água destilada (oito sub-amostras de 25 sementes) e levadas ao germinador à temperatura de 25°C.

2 – Ensaio 2 – Umedecimento do substrato com solução do herbicida

Cada repetição de 200 sementes (oito sub-amostras de 25 sementes) foi semeada diretamente no substrato umedecido com solução contendo as concentrações de 0,0%; 0,03%; 0,06% e 0,12% do herbicida comercial e colocadas no germinador à temperatura de 25°C.

3 – Ensaio 3 – Imersão das sementes em solução do herbicida

Cada repetição de 200 sementes foi dividida em duas sub-amostras de 100, que foram colocadas em copos plásticos de 100 mL, contendo 50 mL de solução do herbicida glifosato, nas concentrações de 0,0%; 0,06%; 0,12% e 0,24% do herbicida comercial, mantidos em germinador a 25°C, durante uma hora. Após, foram retiradas, lavadas em água corrente e transferidas para substrato umedecido com água destilada, (oito sub-amostras de 25 sementes) e conduzido o teste de germinação à temperatura de 25°C. A testemunha foi submetida a imersão em água.

4 – Procedimento estatístico

Os resultados foram analisados segundo o delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Os dados médios das avaliações foram apresentadas graficamente. Na execução das análises estatísticas foi utilizado o Sistema de Análise Estatística para Windows – WinStat – Versão 2.0 (Machado & Conceição, 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos três ensaios (Figura 1) mostram que é possível detectar, pela percentagem de germinação, a diferença entre a cultivar GM e a não GM nas concentrações utilizadas.

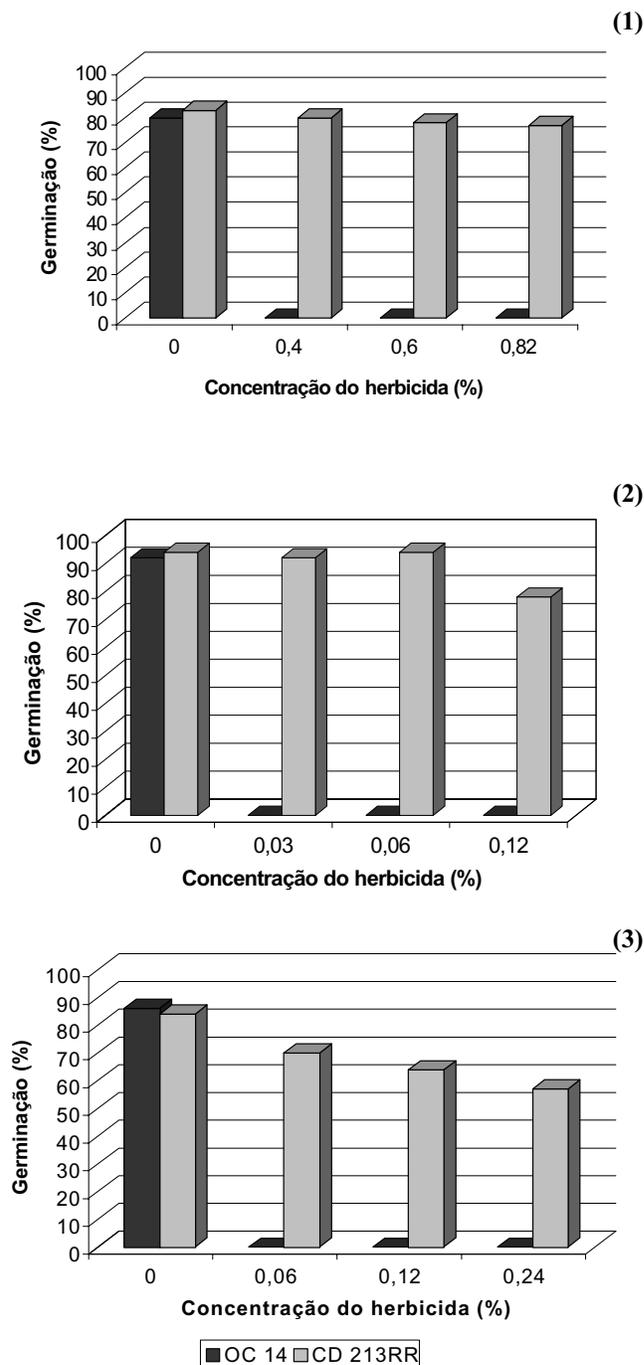


FIGURA 1. Percentagem de germinação obtida nos ensaios: (1) pré-embebição das sementes em substrato umedecido com solução do herbicida; (2) umedecimento do substrato com solução do herbicida e (3) imersão das sementes em solução do herbicida.

No ensaio 1, pré embebição das sementes em substrato umedecido com solução do herbicida, o poder germinativo da cultivar GM foi similar ao da testemunha em todas as concentrações. No ensaio 2, somente na concentração mais alta do herbicida (0,12%) houve decréscimo na percentagem de germinação em relação à testemunha, observando-se redução de 16 pontos percentuais. No ensaio 3, imersão das sementes em solução do herbicida, todas as concentrações utilizadas causaram redução na percentagem de germinação das sementes.

Nos três ensaios, as sementes da cultivar GM apresentaram plântulas normais bem desenvolvidas mesmo na presença do herbicida e as não GM apenas iniciaram o processo germinativo não atendendo aos critérios de plântulas normais. Em soja não GM, o glifosato inibe a enzima 5-enolpiruvil shiquimato-3-fosfato sintetase (EPSPS) e impede que a planta forme aminoácidos essenciais para a síntese de proteínas e também alguns metabólicos secundários (Kruze et al., 2000). Já a cultivar GM possui o gene de resistência ao herbicida permitindo seu desenvolvimento e formação de plântulas normais. Tillmann & West (2004), utilizando a pré-embebição em sementes de soja, também constataram a inibição do processo germinativo de sementes da cultivar não GM, em presença do herbicida, indicando a concentração de 0,6% como a mais adequada. Em bioensaios utilizando rolos de papel embebidos em solução contendo o princípio ativo glufosinato de amônio, Magalhães et al. (2000), observaram inibição na germinação do genótipo de arroz não GM e diminuição drástica na germinação do genótipo GM na dose de 0,5%.

A presença de plântulas com raízes secundárias (Figura 2) foi um bom parâmetro para diferenciar a cultivar GM da não GM. As plântulas GM apresentaram, nos três ensaios, raízes secundárias abundantes e bem desenvolvidas, e as não GM mostraram ausência total de raízes secundárias (Figura 3). Identificou-se também que plântulas anormais GM, apresentavam raízes secundárias, importante parâmetro a ser observado na diferenciação entre plântulas anormais GM e plântulas não GM.

Quanto ao efeito das concentrações do herbicida na percentagem de plântulas com raízes secundárias, observou-se no ensaio 1, que não houve diferença em relação à testemunha nas concentrações utilizadas; no ensaio 2, apenas na dose mais elevada de 0,12% evidenciou-se redução e no ensaio 3, houve crescente diminuição das raízes secundárias com o aumento da concentração do herbicida. Os resultados obtidos estão de acordo com Nascimento et al. (2000), que constataram sistema radicular normal bem desenvolvido em plântulas de soja GM e inibição parcial no desenvolvimento da raiz primária e secundária de plântulas não GM. Também Goggi & Stahr (1997) e Tillmann & West (2004), submetendo sementes de soja GM a pré-embebição por 16 e 18 horas,

respectivamente, descreveram resultados semelhantes ao do presente estudo.

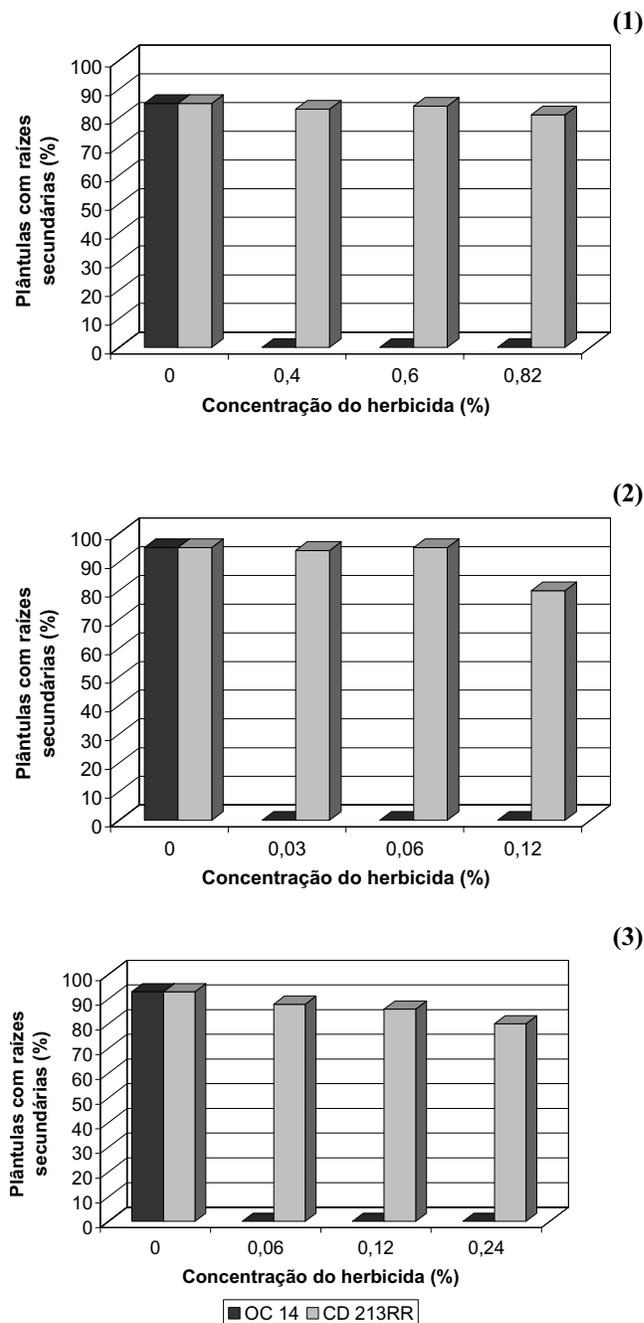


FIGURA 2. Percentagem de plântulas com raízes secundárias obtidos nos ensaios: (1) pré-embebição das sementes em substrato umedecido com solução do herbicida; (2) umedecimento do substrato com solução do herbicida e (3) imersão das sementes em solução do herbicida.

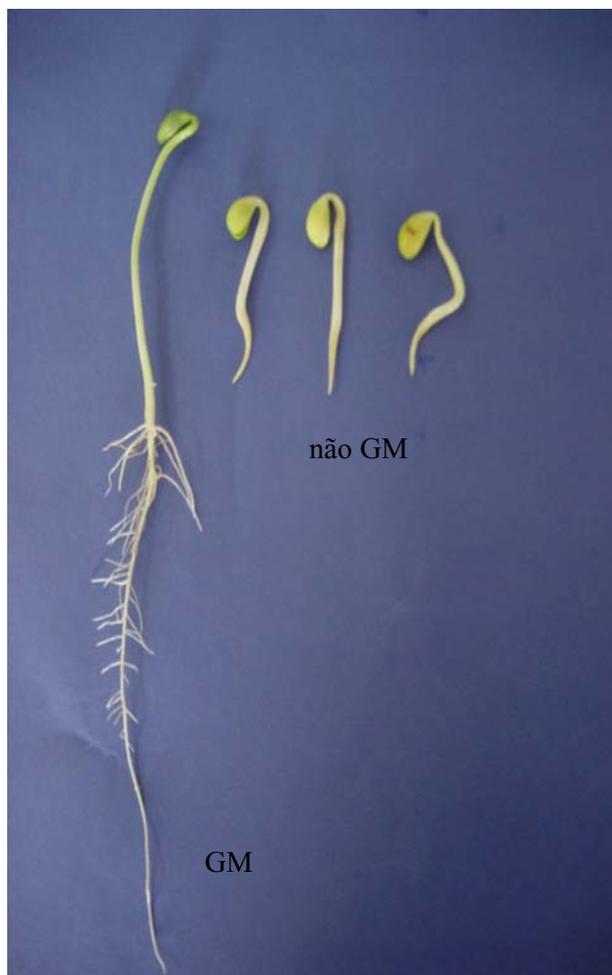


Figura 3. Plântulas de soja, cultivar OC 14 (não GM), comparadas à cultivar CD 213 RR (GM) na presença do herbicida glifosato.

A velocidade de germinação também permitiu a diferenciação da cultivar GM da não GM, nos ensaios conduzidos (Figura 4). Foi possível diferenciar as plântulas tolerantes já no quinto dia, independente da concentração e do procedimento utilizado, através da análise conjunta dos caracteres morfológicos. Avaliações anteriores ao quinto dia não permitiram clara diferenciação, pois as plântulas de ambos os genótipos apresentavam pouco desenvolvimento e não haviam raízes secundárias suficientemente desenvolvidas em plântulas GM. Em soja, Goggi & Stahr (1997) e Nascimento et al. (2000) verificaram possibilidade de detecção entre sete e dez dias; Tillmann & West (2004) obtiveram resultados positivos em seis dias através do procedimento de pré-embebição de sementes e em três dias, através de imersão. Em arroz, o período considerado adequado para a identificação de plântulas GM por Magalhães et al. (2000) foi dez dias e para Lilge et al. (2003) foi sete dias.

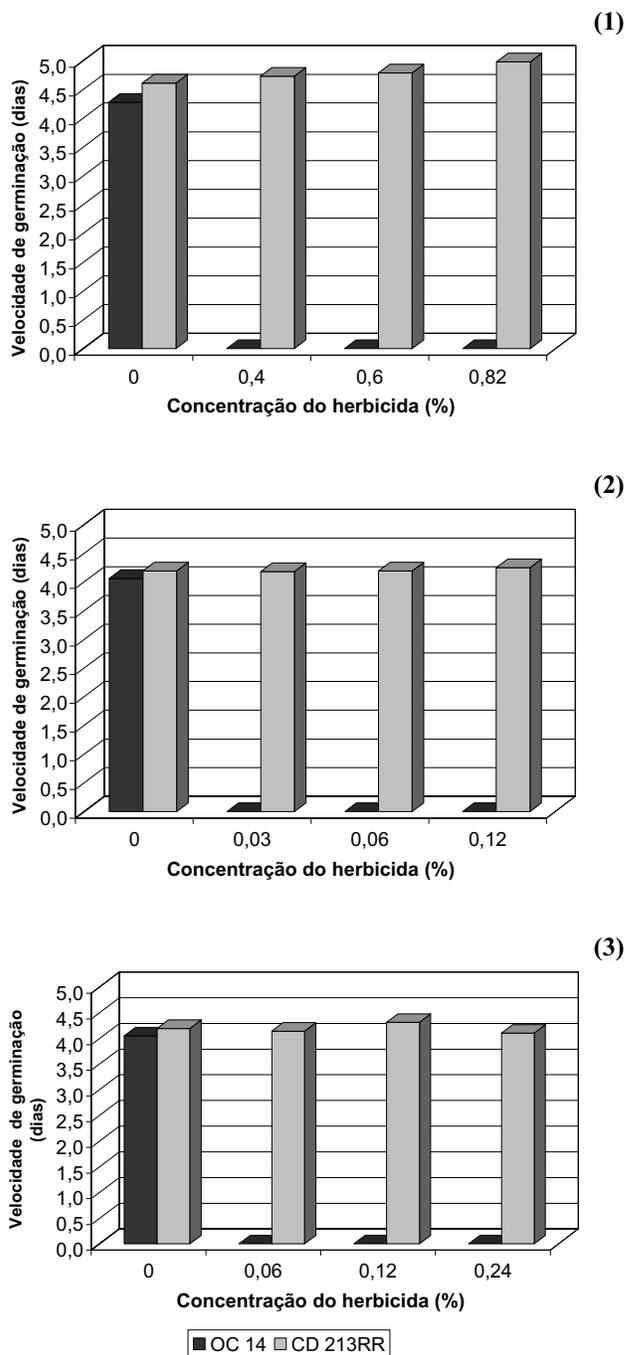


FIGURA 4. Velocidade de germinação obtida nos ensaios: (1) pré-embebição das sementes em substrato umedecido com solução do herbicida; (2) umedecimento do substrato com solução do herbicida e (3) imersão das sementes em solução do herbicida.

Em relação ao efeito do herbicida glifosato sobre o crescimento das plântulas de soja, observou-se (Figuras 5, 6, e 7) que os processos fisiológicos capazes de garantir o desenvolvimento das plântulas não GM, em presença do herbicida, foram drasticamente afetados. Já a cultivar GM, mesmo na presença do herbicida, foi capaz de produzir plântulas normais, com hipocótilo e raiz primária bem desenvolvidos.

Observa-se (Figura 5) que houve redução no comprimento total das plântulas GM na presença do herbicida, tanto no bioensaio que utiliza a pré-embebição quanto no umedecimento do substrato com solução do herbicida (Figura 8). Quando utilizada a imersão das sementes em solução do herbicida, observou-se efeitos prejudiciais apenas na concentração mais alta (0,24%), fato que se justifica pelo menor contato das sementes com o herbicida, ou seja, 1 hora, que corresponde ao início da Fase I do processo de hidratação (Bewley & Black, 1994).

Em relação aos comprimentos do hipocótilo e da raiz primária (Figuras 6 e 7), observou-se que a redução no sistema radicular foi mais drástica que no comprimento do hipocótilo, para os três ensaios, indicando que a redução no comprimento das plântulas GM foi devido principalmente à diminuição da raiz primária. Efeitos semelhantes, do herbicida sobre a parte aérea e sistema radicular de soja GM, foram relatados por Goggi & Stahr (1997), Bevilaqua et al. (2000), Nascimento et al. (2000) e Tillmann & West (2004).

Os sintomas causados pelo herbicida nas plântulas não GM foram semelhantes para os bioensaios estudados. As plântulas de soja não GM apresentaram engrossamento, estrias longitudinais e amarelecimento gradativo do hipocótilo, inibição do desenvolvimento da raiz primária e da emissão de raízes secundárias, sendo o hipocótilo proporcionalmente maior que a raiz primária, caracterizando anormalidade (Figura 9). Já as plântulas GM, mesmo na presença do herbicida, produziram plântulas normais bem desenvolvidas com raízes secundárias abundantes. Magalhães et al. (2000) observaram necrose nas raízes das plântulas na fase inicial da germinação quando utilizaram doses mais elevadas de glufosinato de amônio em arroz GM. O tempo mínimo necessário capaz de permitir avaliação segura de plântulas de soja GM, através dos bioensaios, foi de 5 dias. Embora todas as metodologias utilizadas tenham se mostrado eficientes, a da pré-embebição nas concentrações de 0,4% e de 0,6% e do umedecimento do substrato na dose de 0,03% são as mais recomendadas. Nestas concentrações não houve redução no poder germinativo da cultivar tolerante, os testes foram de fácil execução, apresentando possibilidade de padronização e adoção imediata pelos Laboratórios de Análise de Sementes.

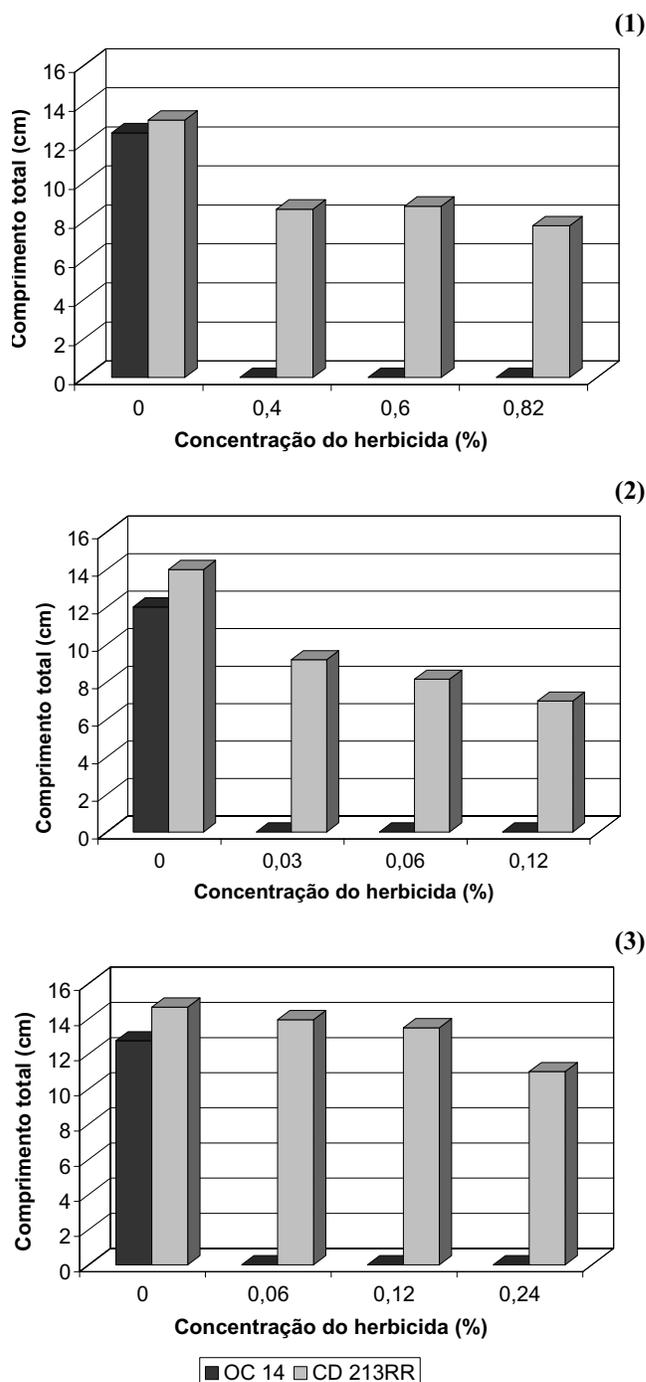


FIGURA 5. Comprimento total de plântulas obtidos nos ensaios: (1) pré-embebição das sementes em substrato umedecido com solução do herbicida; (2) umedecimento do substrato com solução do herbicida e (3) imersão das sementes em solução do herbicida.

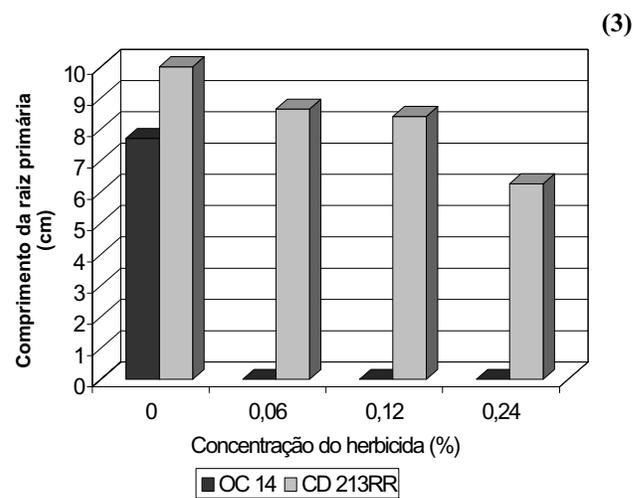
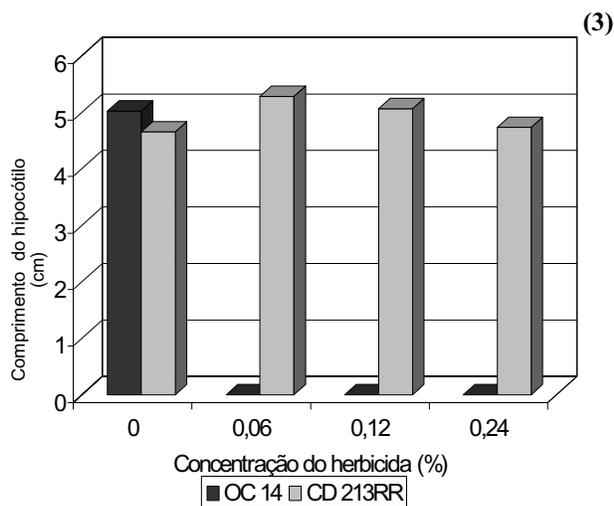
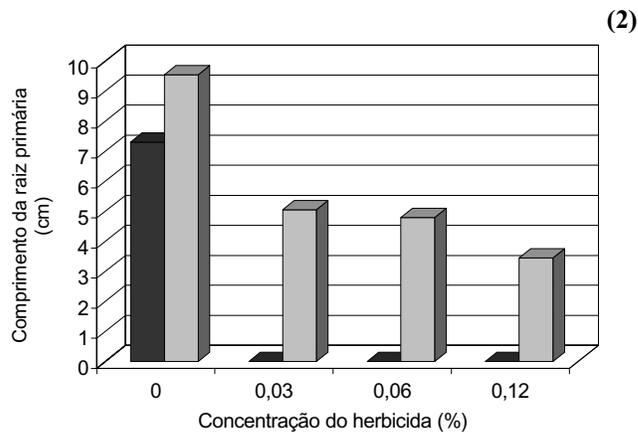
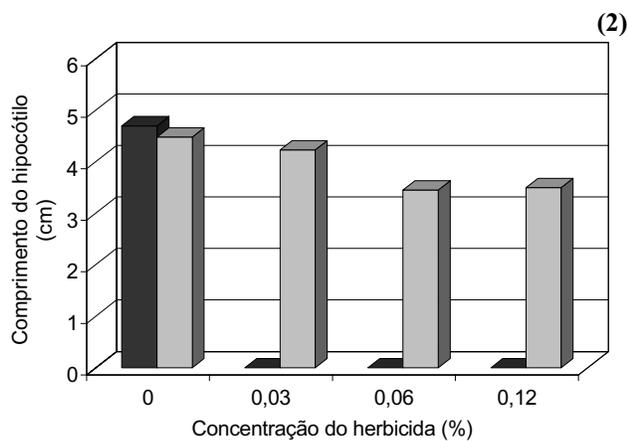
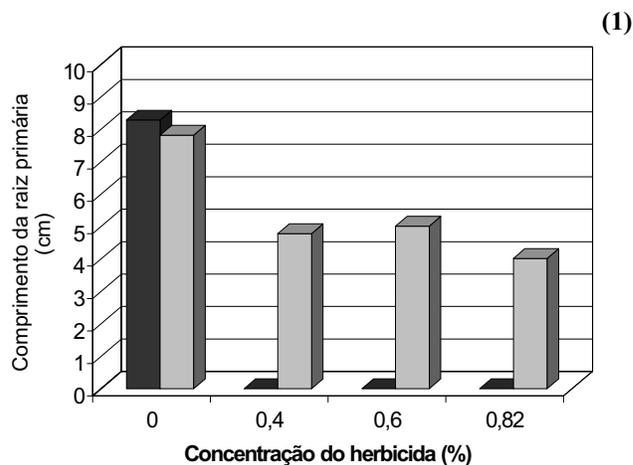
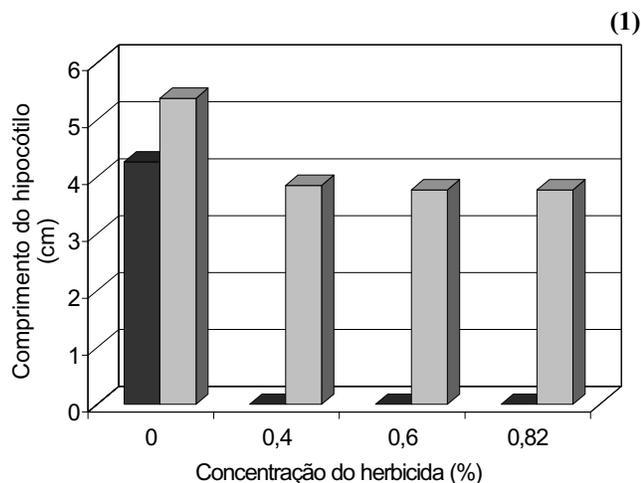


FIGURA 6. Comprimento do hipocótilo obtido nos ensaios: (1) pré-embrição das sementes em substrato umedecido com solução do herbicida; (2) umedecimento do substrato com solução do herbicida e (3) imersão das sementes em solução do herbicida.

FIGURA 7. Comprimento de raiz primária obtido nos ensaios: (1) pré-embrição das sementes em substrato umedecido com solução do herbicida; (2) umedecimento do substrato com solução do herbicida e (3) imersão das sementes em solução do herbicida.

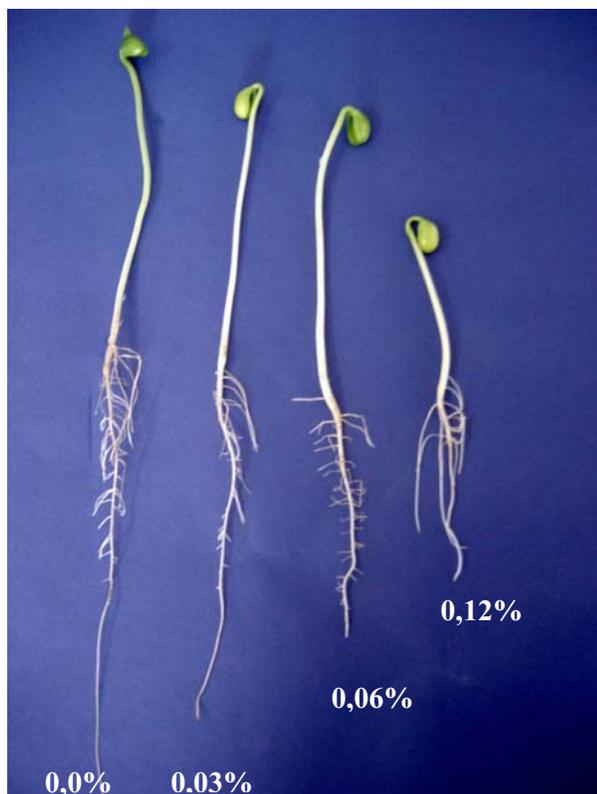


FIGURA 8. Efeito do glifosato sobre o comprimento total de plântulas de soja GM, em substrato umedecido com diferentes concentrações do herbicida.



FIGURA 9. Sintomas apresentados em plântulas de soja não GM submetidas ao herbicida glifosato.

O procedimento de imersão das sementes em solução do herbicida permitiu a utilização de pequenas quantidades, evitando contato do analista com o produto ao longo do teste. No entanto, evidenciou efeitos expressivos sobre a germinação das sementes da cultivar GM e mostrou-se de execução pouco prática, devido à fragilidade do tegumento após a imersão. As sementes partiam-se com frequência, visto que o tegumento hidratado rompia-se com facilidade. Foi necessário colocar em imersão mais sementes do que o efetivamente necessário, algo em torno de 10% a mais. Apesar de pouco vantajosa para utilização como teste de rotina em Laboratório de Análise de Sementes, não se descarta sua utilização em programas de melhoramento genético.

CONCLUSÕES

Os bioensaios permitem detectar sementes de soja tolerante ao herbicida glifosato, no prazo de cinco dias.

As metodologias da sementeira em substrato umedecido com solução do herbicida, nas concentrações de 0,03% da formulação 480 g/L de i.a. e da pré-embebição das sementes durante 16 horas em solução contendo 0,4% e 0,6% de glifosato da formulação 480 g/L de i.a. são recomendadas para utilização em rotina de Laboratório de Análise de Sementes;

O glifosato causa anormalidade em plântulas de soja não geneticamente modificada. As plântulas apresentam engrossamento, estrias longitudinais e amarelecimento gradativo do hipocótilo; inibição do desenvolvimento da raiz primária e da emissão de raízes secundárias, sendo o hipocótilo proporcionalmente maior do que a raiz primária.

REFERÊNCIAS

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*, Brasília, v. 1, n. 3, p. 261-265, 2000.

BEWLEY, J.D. & BLACK, M. *Seeds: physiology of development and germination*. 2ed. New York: Plenum Press, 1994, 445p.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **SNPC – Lista de cultivares protegidas**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/snpc/lst_1200.htm>. Acesso em: 08 set. 2003.

- 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**, Kentucky, v. 19, n. 1, p.99 – 102, 1997.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento Sistemático da Produção agrícola**. Disponível em: <<http://www1.ibge.gov.br/home/estatística/indicadores/agropecuaria/lspa04200304.shtm>>. Acesso em: 14 jun. 2003.
- KRZYZANOWSKI, F. C. Teste de comprimento de raiz de plântulas de soja. **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 2, n. 1, p. 11-14, 1991.
- KRUSE, N. D.; TREZZI, M. M.; VIDAL, R. A. Herbicidas inibidores da EPSPS: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Herbicidas**, Brasília, v. 1, n. 2, p. 139-146, 2000.
- LILGE, C.G; TILLMANN, M.A.A.; VILLELA, F.A.; DODE, L.B. Identificação de sementes de arroz transformado geneticamente resistente ao herbicida glufosinato de amônio. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.25, n.1, p.87-94, 2003.
- MACHADO, A. A.; CONCEIÇÃO, A. R. **Sistema de análise estatística para Windows. WinStat. Versão 2.0**. UFPel, 2003.
- MAGALHÃES, A.M.; FRANCO, D.F.; ANDRES, A.; ANTUNES, P.; DODE, L.B.; TILLMANN, M.A.A.; SILVA, M.P. Método para identificação de arroz transgênico resistente ao herbicida glufosinato de amônio. **Agropecuária Clima Temperado**, Pelotas, v. 3, n. 1, p. 31-37, 2000.
- NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999, p. 1-24.
- NASCIMENTO, W.M.; TORRES, A.C.; FERREIRA, A.T.; PAIVA. Bioensaio para detecção de plantas transgênicas de soja tolerantes ao herbicida glifosato. In: XVII SEMINARIO PANAMERICANO DE SEMILLAS, 17., Punta del Este. **Anais...** Punta del Este: FELAS, 2000, v. 1, p. 102.
- TILLMANN, M.A.A.; WEST, S.H. Identification of genetically modified soybean (*Glycine max* L. Merr.) seeds resistant to glyphosate. **Scientia agricola**, Piracicaba, v.61, n.3, 2004.

