

## DETECÇÃO DE SOJA GENETICAMENTE MODIFICADA TOLERANTE AO GLIFOSATO POR MÉTODOS BASEADOS NA ATIVIDADE DE ENZIMAS <sup>1</sup>

SABRINA MECCA DE MENEZES<sup>2</sup>, MARIA ÂNGELA ANDRE TILLMANN<sup>3</sup>, LUCIANA BICCA DODE<sup>4</sup>, FRANCISCO AMARAL VILLELA<sup>3</sup>

RESUMO - Avanços na engenharia genética permitiram a obtenção de plantas geneticamente modificadas tolerantes a determinados herbicidas. O uso de sementes de plantas geneticamente modificadas está aumentando rapidamente, havendo a necessidade de desenvolver métodos de identificação e detecção rápidos, práticos e de baixo custo, que possam ser padronizados. O objetivo desta pesquisa foi desenvolver um método bioquímico de detecção de soja tolerante ao glifosato. Foram comparados dois genótipos de soja, um tolerante ao glifosato e seu parental não geneticamente modificado. As sementes foram submetidas a tratamentos de pré-embebição por 16 horas, em água e em solução de herbicida contendo 0,6% do ingrediente ativo e, mantidas a seguir em germinador à temperatura de 25°C por sete dias. Após, foi realizada a extração e a determinação da atividade da enzima peroxidase pela avaliação dos eletroforegramas e de reação colorimétrica. Os resultados obtidos permitiram concluir que é possível diferenciar cultivares de soja quanto à tolerância ao herbicida glifosato através da reação colorimétrica. Há diferença nos eletroforegramas de atividade da enzima peroxidase entre os cultivares tolerante e suscetível ao glifosato.

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

### DETECTION OF SOYBEAN GENETICALLY MODIFIED TOLERANT TO GLYPHOSATE METHODS BASED ON THE ACTIVITY OF ENZYMES .

ABSTRACT. Progress in genetic engineering allow the production of genetically modified plants tolerant to the use of certain herbicides. The use of seeds of genetically modified plants is increasing quickly, and fast, practical and low cost detection methods need to be developed. The objective of this research was to establish a method for detection of soybean tolerant to glyphosate. Two soy cultivars were compared, one tolerant to glyphosate and its genetically unmodified parent. The seeds were submitted to treatments of pre-imbibition for 16 hours, in water and herbicide solution containing 0,6% of the active ingredient at the temperature of 25°C for seven days. Afterwards, the extraction and the determination of the activity of the enzyme peroxidase were carried out through the evaluation of the eletroforesis and of color reaction. The obtained results allowed the conclusion that it is possible to differentiate soy tolerance to herbicide glyphosate through color reaction. Differences were observed in the enzyme peroxidase activity tolerant and susceptible to glyphosate cultivars.

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

<sup>1</sup>Submetido em 27/04/2004. Aceito para publicação em 06/10/2004. Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor, apresentada à Universidade Federal de Pelotas.

<sup>2</sup>Eng<sup>a</sup>. Agr<sup>a</sup>., Mestre, e-mail: smeccam@aol.com

<sup>3</sup>Prof. Adjunto, Dr. , bolsista de produtividade em pesquisa do CNPq, Departamento de Fitotecnia, FAEM/UFPel, caixa postal 354, 96010-900, Pelotas, RS.

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

## INTRODUÇÃO

O cultivo de soja no Brasil, ocupa hoje uma área de aproximadamente 18 milhões de hectares, totalizando uma produção de 52 milhões de toneladas. No Rio Grande do Sul, a área total é de três milhões de hectares (CONAB, 2003), evidenciando a grande importância econômica da cultura para o Estado. Do total de soja produzido no país, foi estimado que três milhões de hectares foram cultivados com soja geneticamente modificada (GM) para a tolerância ao herbicida glifosato (James, 2003). A presença constante de sementes de soja GM em lotes de sementes convencionais tornou-se um crescente problema para o comércio internacional de sementes (ISTA, 2001).

O herbicida glifosato [sal isopropilamina de N-(fosfonometil) glicina], é um herbicida sistêmico de largo espectro, não-seletivo, pós-emergente, amplamente utilizado na agricultura onde o controle total da vegetação é requerido. Atua na inibição da enzima 5-enolpiruvil shiquimato-3-fosfato ácido sintetase (EPSP), comprometendo a biossíntese de triptofano, aminoácidos aromáticos e de clorofila, provavelmente devido à inibição da síntese de AIA (ácido indolacético), alterando estruturas e provocando danos celulares irreversíveis, tais como a ruptura parcial do cloroplasto e a perda de água do retículo endoplasmático rugoso (Silva, 2002). Além disso, a enzima EPSP é responsável pela síntese de numerosos produtos secundários essenciais à vida das plantas (Bevilaqua et al., 2000).

A tolerância ao glifosato é conferida através da inserção de um gene na planta de soja que codifica a proteína CP4, extraído de uma espécie de *Agrobacterium*, microorganismo comumente encontrado no solo. Esta proteína é funcionalmente semelhante à EPSP, exceto em sua tolerância ao herbicida glifosato. A ação da proteína CP4 somada à ação da enzima EPSP confere a tolerância à soja em relação ao princípio ativo do glifosato. Deste modo, a inibição da síntese de EPSP em plantas que não possuem o gene que sintetiza a proteína CP4 é particularmente estratégica (Kruse et al., 2000).

Nesse contexto, as empresas de sementes tem solicitado o desenvolvimento de testes de rotina para a detecção de sementes de soja geneticamente modificada. Assim, várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de auxiliar na determinação da pureza genética em análise de sementes, particularmente sobre o uso de técnicas baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e marcadores moleculares. Entretanto, o estudo da atividade enzimática em sementes de soja geneticamente modificada, constitui uma nova alternativa

na detecção destas sementes.

A enzima peroxidase encontra-se amplamente distribuída nos vegetais, exercendo várias funções importantes em seu crescimento e no processo de diferenciação e desenvolvimento celular. O papel da peroxidase no crescimento das plantas, demonstrado em muitas espécies, evidencia que ela está diretamente envolvida na modulação do crescimento do hipocótilo em determinadas espécies que ativa o aumento da peroxidase e conseqüentemente, o alongamento do tecido (Aouad et al., 1998). Outras funções estão associadas a esta enzima: lignificação da parede celular, oxidação do ácido indolacético, do etileno e participação no processo de dormência das sementes, sendo que em alguns casos o seu efeito pode ser acentuado quando associado a fatores bióticos e abióticos (Bewley & Black, 1994).

A peroxidase funciona como uma espécie de termômetro geral das atividades fisiológicas da planta, pois suas atividades são altamente influenciadas pelas condições externas, tais como infecções (Buxton et al., 1993). A atividade desta enzima, que utiliza H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para oxidar grande número de doadores de hidrogênio é controlada por um gene dominante. A alta atividade resulta de pelo menos um alelo dominante (EpEp ou Epep), enquanto que a baixa atividade significa a presença do par recessivo (epep). Esta atividade varia entre as cultivares de soja e é utilizada como técnica alternativa ou complementar na identificação de cultivares.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de desenvolver um método bioquímico, de baixo custo e com possibilidade de padronização, para a detecção de sementes de soja geneticamente modificada.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial que possui certificado de Biossegurança (CQB), e no Laboratório de Bio-Sementes do Departamento de Fitotecnia, ambos na Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas.

Foram utilizadas sementes de duas cultivares de soja (*Glycine max* L. Merr.), produzidas na safra 2001/2002, sendo uma não geneticamente modificada (CD 201) e outra parental geneticamente modificada (CD 214 RR), portadora do gene para a tolerância ao herbicida glifosato, ambas registradas e protegidas em nome da COODETEC (Cooperativa Central Agropecuária de Desenvolvimento Tecnológico e Econômico Ltda).

Inicialmente, foi avaliada a qualidade fisiológica das sementes através do teste de germinação, conforme as Regras para Análise de Sementes – RAS (Brasil, 1992). Os resultados do teste mostraram que os lotes apresentaram germinação superior a 90%.

O produto comercial herbicida glifosato utilizado possui formulação contendo 480 g L<sup>-1</sup> de ingrediente ativo sal de isopropilamina de N-(fosfonometil) glicina e 360 g L<sup>-1</sup> de equivalente ácido de N – (fosfonometil) glicina.

#### **Ensaio 1 – Extração de enzimas e determinação da atividade enzimática através de padrões eletroforéticos.**

Foram determinadas a atividade das enzimas GOT, esterase, fosfatase ácida e peroxidase nas duas cultivares, após submetidas as sementes aos tratamentos de pré-embebição em água (testemunha) e em solução de herbicida.

Na pré-embebição, as sementes de soja GM e não GM foram semeadas com quatro repetições de 50 sementes, em substrato umedecido com solução de 0,6% do ingrediente ativo (i.a.) de glifosato, permanecendo por 16 horas em germinador a temperatura de 25°C (Tillmann & West, 2004). Na testemunha, o substrato foi umedecido com água destilada.

Transcorrido o período estabelecido, as sementes foram transferidas para substrato umedecido em água destilada, permanecendo no germinador a mesma temperatura, sendo avaliadas em diferentes períodos (do 2º ao 8º dia, após o início do tratamento) com o objetivo de determinar o período de maior atividade enzimática para cada sistema avaliado. Para a avaliação da atividade enzimática, foram utilizados diferentes tecidos vegetais macerados em graal: eixo embrionário, parte aérea, hipocótilo e raiz.

A extração de proteínas foi conduzida conforme o método de Scandális (1969). A porção de tecido vegetal, após a maceração foi dividida em alíquotas semelhantes em tubos eppendorf, que foram pesadas em balança analítica. Para cada peso de amostra foi acrescentado duas vezes o peso em solução extratora de proteína. As amostras foram agitadas para a homogeneização da solução.

Após o processo de extração de proteínas totais, as amostras permaneceram em ambiente refrigerado (4°C), durante 24 horas. As amostras foram mantidas a baixa temperatura, durante todo o processo (armazenamento das amostras, centrifugação e eletroforese), com o objetivo de evitar a desnaturação de proteínas e conseqüentemente a perda da atividade enzimática (Alfenas, 1998).

Após a retirada do refrigerador, as amostras foram centrifugadas durante cinco minutos a 14000 rpm, em

ambiente refrigerado. O sobrenadante foi retirado, aplicado em gel de poliacrilamida (7%) e, posteriormente submetido à eletroforese em ambiente refrigerado. Os géis obtidos foram mantidos por um minuto em solução reveladora específica para os correspondentes sistemas enzimáticos.

#### **Ensaio 2 – Extração da enzima peroxidase e determinação da atividade enzimática através da reação colorimétrica**

Este estudo foi conduzido com base no teste de peroxidase descrito nas RAS (Brasil, 1992). Inicialmente, as sementes das duas cultivares foram submetidas ao teste de peroxidase descrito nas RAS, para verificar a atividade da enzima no tegumento. A seguir, amostras de sementes de ambas as cultivares foram submetidas aos tratamentos de pré-embebição, à germinação e ao processo de extração de proteínas totais (metodologia descrita no ensaio 1).

Após o processo de extração de proteínas totais, 400ml de cada amostra (sobrenadante) foram transferidos para novos tubos eppendorf e adicionados 300ml de guaiacol. Após 10 minutos, 460ml de água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foram acrescentados à solução. Por titulação, foi estabelecida a quantidade apropriada para determinar a atividade da enzima.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **Ensaio 1 – Extração de enzimas e determinação da atividade enzimática através de padrões eletroforéticos**

Na avaliação da atividade enzimática, apenas a enzima peroxidase extraída do sistema radicular das plântulas no sétimo dia, incluindo o período de pré-embebição, apresentou resultados satisfatórios. Para as demais enzimas estudadas (GOT, esterase e fosfatase ácida) não foi detectada a presença de atividade nos tecidos, nos períodos avaliados.

A avaliação da atividade da peroxidase nos tecidos não apresentou resultados satisfatórios devido à total ausência de atividade enzimática. Um dos principais problemas encontrados na extração de proteínas e enzimas de plantas é a presença de compostos fenólicos liberados durante a trituração do tecido. Tais fenóis presentes em grande quantidade no tegumento, quando descompartmentalizados, são prontamente oxidados a quinonas por enzimas da própria planta. Tanto os compostos fenólicos não oxidados, quanto as quinonas reagem com as proteínas, causando inativação de enzimas ou alteração da mobilidade das moléculas de proteína. Tecidos jovens e tenros

têm sido preferidos para avaliar a atividade da peroxidase por oferecer facilidade de obtenção e extração de proteínas, constituindo assim um material adequado para análise de polimorfismo isoenzimático (Alfenas, 1998).

No tratamento de pré-embebição em substrato umedecido com água (testemunha), através da análise dos eletroforegramas, foi constatada a atividade da enzima peroxidase de forma similar para as duas cultivares (Figura 1A). Para o tratamento de pré-embebição em substrato umedecido com solução herbicida, observou-se diferença nos padrões eletroforéticos entre as duas cultivares estudadas, o que possibilita a detecção das cultivares não geneticamente modificada e geneticamente modificada (Figura 1B).

Comparando a atividade da peroxidase nas cultivares não-GM e GM, após a pré-embebição das sementes em solução de herbicida foi possível observar maior intensidade de bandas na cultivar GM, o que demonstra o aumento da atividade da peroxidase. As sementes da cultivar GM formaram, no processo de germinação, plântulas normais e bem desenvolvidas mesmo na presença do herbicida, enquanto as não-GM apenas iniciaram a fase 3 da germinação, não atendendo aos critérios de plântulas normais. Desse modo, pode-se dizer que, as plântulas provenientes das sementes de soja GM são submetidas a um estresse mais acentuado, tendo em vista a necessidade de superar essas condições para a formação de plântulas normais.

A verificação desta diferença pode estar relacionada ao fato da enzima peroxidase ser considerada uma espécie de termômetro das condições adversas, ou seja, do estresse a qual a planta está sendo submetida. O aumento da atividade da peroxidase ocorre mais rapidamente em plantas que apresentam resistência ao agente causador do estresse comparativamente à planta mais suscetível, justificando deste modo o aumento da atividade da peroxidase nas sementes da cultivar tolerante ao herbicida glifosato. O aumento acentuado da atividade da peroxidase, segundo Buxton et al., 1993, pode também ser reflexo do dano celular causado na planta por determinadas condições.

Em soja não-GM, o glifosato inibe a enzima 5-enolpiruvil shiquimato-3-fosfato ácido sintetase (EPSP) e impede que a planta forme aminoácidos essenciais para a síntese de proteínas e de alguns metabólitos secundários (Kruse et al., 2000). Embora a síntese de EPSP seja interrompida mediante o tratamento com o herbicida glifosato, plantas tratadas podem levar até três semanas para morrer, o que pode ser justificado pelo tempo necessário para ocorrer a redução das fontes de aminoácidos aromáticos das plantas, causando conseqüentemente a redução da síntese de proteínas e morte

da planta. Além da ação na síntese de EPSP, estudos sugerem que certas doses de glifosato podem causar aumento passageiro na atividade da liase, enzima importante no metabolismo de fenilpropanol, de forma que a elevação nos níveis de fenóis inibiriam o crescimento natural (Cobb, 1992). Estas citações justificam os resultados obtidos nesta pesquisa, pois as sementes da cultivar não-GM, na presença do herbicida apenas iniciaram o processo germinativo não produzindo plântulas normais.

### **Ensaio 2 – Extração da enzima peroxidase e determinação da atividade enzimática através da reação colorimétrica**

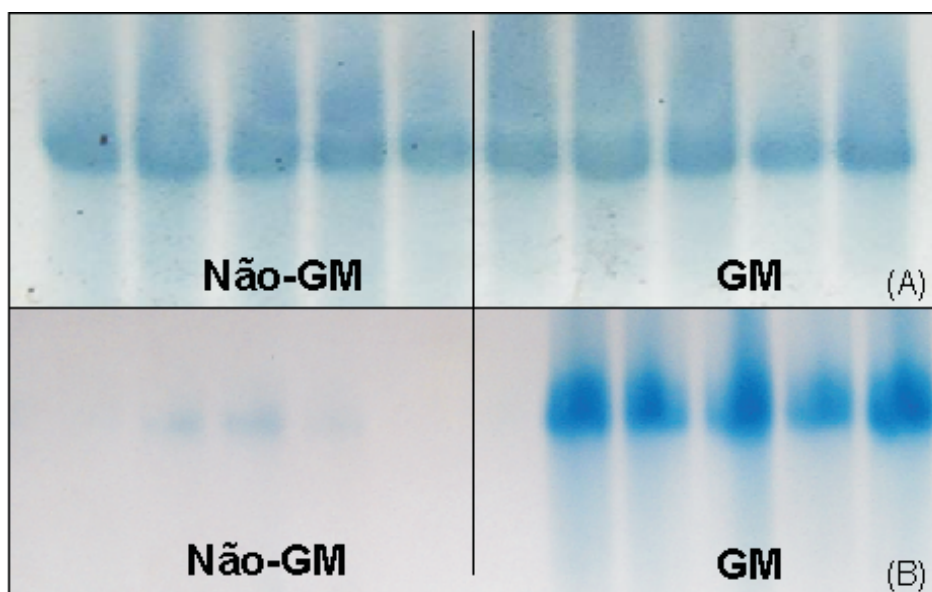
No teste de peroxidase descrito nas RAS (Brasil, 1992), realizado inicialmente, ambas as cultivares mostraram resultado positivo para a atividade da enzima peroxidase no tegumento.

Comparando as duas cultivares submetidas ao tratamento de pré-embebição em substrato umedecido com água, foi possível observar a ausência de coloração nas amostras, o que corresponde a baixa atividade da peroxidase (Figura 2A). Assim, pode-se afirmar que a quantidade de água oxigenada, necessária para diferenciar amostras tratadas com herbicida não foi suficiente para detectar a baixa atividade da enzima mostrada nos eletroforegramas. A peroxidase catalisa a degradação de  $H_2O_2$ , liberando  $O_2$ , que reage com o guaiacol. Se a atividade da peroxidase é baixa, a  $H_2O_2$  não é degradada e a solução permanece incolor (reação negativa). Se a atividade é alta, conduz a uma reação positiva e a solução assume coloração marrom avermelhada (Brasil, 1992).

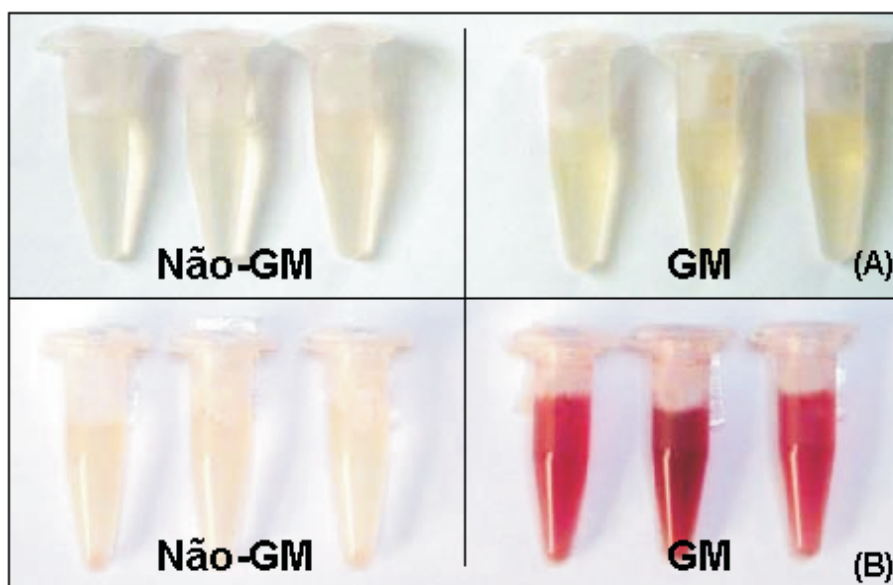
Os resultados obtidos com o tratamento de pré-embebição em substrato umedecido com solução herbicida (0,6%) mostraram similaridade com os padrões obtidos nos eletroforegramas, tornando possível a diferenciação visual das amostras através da coloração marrom avermelhada presente nas amostras provenientes da cultivar GM (Figura 2B). A reação positiva constatada pela alteração da coloração da solução, evidencia a elevada atividade da enzima peroxidase na cultivar tolerante ao glifosato em consequência do estresse causado pelo herbicida, associado à formação de plântulas normais.

Uma análise geral dos resultados alcançados permite verificar a possibilidade de diferenciação entre cultivares de soja geneticamente modificada e não-GM, por meio de padrões eletroforéticos e do método colorimétrico, aplicado após a semeadura em substrato umedecido com solução de 0,6% de glifosato.

O método colorimétrico além de eficiente na diferenciação



**FIGURA 1.** Diferenciação entre cultivares de soja não-GM e GM através de padrões eletroforéticos, com pré-embebição das sementes: (A) em substrato umedecido com água e (B) em substrato umedecido em solução de herbicida glifosato (0,6%).



**FIGURA 2.** Diferenciação entre cultivares de soja não-GM e GM através do método colorimétrico, com pré-embebição das sementes: (A) em substrato umedecido com água e (B) em substrato umedecido com solução de herbicida glifosato (0,6%).

das cultivares avaliadas é de fácil aplicação e baixo custo, mostrando-se vantajoso, nestes aspectos, sobre os demais métodos de detecção já existentes.

Com relação ao tempo necessário para a detecção de sementes de soja geneticamente modificadas, o prazo de sete dias foi similar aos obtidos por Goggi & Stahr (1997) e nascimento et al. (2000), empregando o a metodologia de

bioensaios, cuja detecção ocorreu entre sete e dez dias. Também através de bioensaios Tillmann & West (2004) conseguiram detectar em seis dias, utilizando pré-embebição das sementes em substrato umedecido, e em três dias, por meio da imersão em solução do herbicida. Da mesma forma, Funguetto et al. (2004) detectaram em cinco dias, através da análise conjunta das características morfológicas das plântulas.

A metodologia da reação colorimétrica da atividade da enzima peroxidase aplicada após a pré-umedeção das sementes de soja em substrato umedecido com solução de glifosato constitui-se em importante alternativa na detecção de sementes de soja geneticamente modificada, pela possibilidade de padronização, viabilizando sua implementação na cadeia produtiva de sementes.

## CONCLUSÕES

É possível diferenciar cultivares de soja geneticamente modificada tolerante ao herbicida glifosato através da reação colorimétrica da atividade da enzima peroxidase.

Há diferença nos eletroforegramas de atividade da enzima peroxidase entre as cultivares de soja tolerante e suscetível ao glifosato.

## REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C. Extração de proteínas para a eletroforese. In: ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa/MG, 1998. n. 2, p. 85-95.
- AOUAD, A.; BAAZIZ, M.; MERGOUM, M. Quantitative aspects of peroxidases in some moroccan cereal varieties. In: **Actes des Premieres Journees de l'Arbre**. Laboratoire de Biochimie Amélioration des Plantes. Université Cadi Ayyad. Marrocco. 1998. 7p.
- BEVILAQUA, G. A. P.; BONATO, E. R.; ROMAN, E. S. Identificação de soja tolerante ao glifosato 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**. 2 ed. New York. Plenum Press, 1994, 445p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNTA/DNPV/CLAV, 1992. 365 p.
- BUXTON, D. R.; SHIBLES, R.; FORSBERG, R. A.; BLAD, B. L.; ASSAY, R. H.; PAULSEN, G. M.; WILSON, R. F. Crop Science Society of America, Inc. 677. **International Crop Science**. Madison, USA. 1993. p. 757. – **Livro ou periódico**
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento, **Título do Documento disponível em: <http://www.conab.gov.br>**. Acesso em 21 ago. 2004.
- COBB, A. **Herbicides and plant physiology**. Florida/USA: Department of Life Sciences Nottingham Polytechnic, 1992, 176 p.
- FUNGUETTO, C. I.; TILLMANN, M. A. A.; VILLELA, F. A.; DODE, L. B. Detecção de sementes de soja geneticamente modificada tolerante ao herbicida glifosato. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 26, n. 1, P. 130-138, 2004-10-18
- GOGGI, A. S.; STAHR, M. G. Roundup™ pre-emergende 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.
- ISTA. International Seed Testing Association. **ISTA's strategy regarding methods for the detection, identification and quantification of genetically modified seeds in conventional seed lots**, Zürich: ISTA, 2001.
- JAMES, C. **Global status of commercialized transgenic crops: 2003**. Ithaca: ISSA, 2003. 83p. (Brief 30: Preview)
- 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.
- SCANDÁLIOS, J. G. Genetic control os multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. **Biochemical genetics**, New York. V. 3, p. 37-79, 1969.
- SILVA, M. D. da. **Diagnóstico da qualidade da água na microbacia Arroio do Pilão**. 2002. 72f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2002.
- TILLMANN, M. A. A.; WEST, S. H. Identification of genetically modified soybean (*Glycine max* L. Merr.) seeds resistant to glifosate. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.61, n.3, p.336-341, 2004

