

EDICLÉIA APARECIDA BONINI

**ANÁLISES BIOQUÍMICAS DE SOJA CONVENCIONAL E
RESISTENTE AO GLIFOSATO RELACIONADAS AO CONTEÚDO DE
LIGNINA E CHIQUIMATO**

**MARINGÁ
PARANÁ - BRASIL
FEVEREIRO - 2011**

EDICLÉIA APARECIDA BONINI

**ANÁLISES BIOQUÍMICAS DE SOJA CONVENCIONAL E
RESISTENTE AO GLIFOSATO RELACIONADAS AO CONTEÚDO DE
LIGNINA E CHIQUIMATO**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Curso de Pós-graduação em Agronomia, na área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de Doutor em Agronomia.

**MARINGÁ
PARANÁ - BRASIL
Fevereiro - 2011**

EDICLÉIA APARECIDA BONINI

**ANÁLISES BIOQUÍMICAS DE SOJA CONVENCIONAL E
RESISTENTE AO GLIFOSATO RELACIONADAS AO CONTEÚDO DE
LIGNINA E CHIQUIMATO**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Curso de Pós-graduação em Agronomia, na área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de Doutor em Agronomia.

.....

Prof. Dr. Alberto Leão de Lemos Barroso

Prof. Dra. Patricia da Costa Zonetti

Prof. Dr. Sérgio Paulo S. S. Diniz

Prof. Dr. Wanderley Dantas dos Santos

Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese Filho

"Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima."

(Louis Pasteur)

A meus filhos, BRUNO e JULIA, motivo de entusiasmo e paixão
pela vida.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, que independente da nossa vontade nos coloca sob seus planos, nos caminhos certos e junto das pessoas certas.

Ao meu esposo ALYSSON, pelo companheirismo, amor, compreensão e conselhos, fundamentais para a realização dessa conquista.

Aos meus pais, ANTONIO e IRACEMA e a minha querida irmã MÁRCIA, pelo incansável estímulo nos momentos difíceis, pelo carinho, amor e, sobretudo por estarem presente nessa etapa de minha vida.

Aos meus familiares, em especial aos meus sogros, IZABEL e JOAQUIM, que sempre acreditaram em mim.

Ao Prof. Dr. OSVALDO FERRARESE FILHO e a Profa. Dra. MARIA DE LOURDES LUCIO FERRARESE, pela orientação e confiança que depositaram no meu trabalho ao longo desses anos e pela união harmônica entre o conhecimento científico e a simplicidade, que serão exemplos permanentes em minha vida profissional e pessoal.

A minha querida amiga APARECIDA MARIA DANTAS RAMOS, companheira de todas as horas, pelo exemplo de profissionalismo e companheirismo e por ser uma grande benção de Deus em minha vida.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica Vegetal: ALINE, ANDERSON, JENNIFER, PAULA, ANGELA, FLÁVIA, ADRIANA, TATIANI, PAULO E WANDERLEY, pela agradável convivência e amizade.

Aos colegas ROGÉRIO MARCHIOSI, VICTOR HUGO, LUIS HENRIQUE ZOBIOLE, PATRICIA DA COSTA ZONETTI, NATÁLIA

GOMES FERNANDES E NATÁLIA GOMES MATTOS pela contribuição no desenvolvimento desse trabalho e ajuda nos ensaios experimentais.

As amigas e companheiras de laboratório GISELE, GRACIENE, RITA e ANA PAULA, pela oportunidade de dividir conhecimentos, pelos momentos de descontração, amizade, apoio e incentivos constantes.

Ao professor PEDRO CÉSAR DOS SANTOS (UNESP/Ilha Solteira) pelo apoio nas análises estatísticas.

A funcionária da Universidade Estadual de Maringá, FLAUSINA APARECIDA CENERINI, pela colaboração e auxílio dispensados.

À UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ e ao PGA (Programa de Pós-graduação em Agronomia) pela oportunidade concedida.

A todos os PROFESSORES do curso que direta, ou indiretamente auxiliaram na minha formação.

Aos FUNCIONÁRIOS da secretaria do PGA, pela atenção e apoio dispensados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo.

Por fim, agradeço a TODOS que de certa forma contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

EDICLÉIA APARECIDA BONINI, filha de Antonio Bonini e Iracema Mazetto Bonini, nasceu na cidade de São Jorge do Ivaí, Estado do Paraná, no dia 23 de junho de 1981.

Em Março de 2000 iniciou o curso de Ciências Biológicas na Universidade Estadual de Maringá. No ano seguinte, iniciou suas atividades no Laboratório de Bioquímica Vegetal, ingressando como bolsista da CAPES através do Programa de Iniciação Científica.

Graduou-se em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Maringá (UEM), em Maringá, Paraná, em fevereiro de 2005.

Obteve o título de Mestre em Agronomia pela mesma instituição, em fevereiro de 2007. No mês seguinte, iniciou o curso de Doutorado em Agronomia, área de concentração Produção Vegetal, na Universidade Estadual de Maringá.

ÍNDICE

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. A soja transgênica Roundup Read [®]	4
2.2. A via do chiquimato	5
2.3. Lignina	7
2.4. Lignina e o dano mecânico.....	9
2.5. Efeitos bioquímicos do glifosato nas plantas	10
2.6. Métodos de identificação de material transgênico	14
3. REFERÊNCIAS	17
CAPÍTULO I	28
LIGNIFICAÇÃO E ACÚMULO DE CHIQUIMATO EM PLANTAS DE SOJA CONVENCIONAL E TRANSGÊNICA RR APÓS APLICAÇÃO DO HERBICIDA GLIFOSATO	
RESUMO	28
1. INTRODUÇÃO	29
2. MATERIAIS E MÉTODOS	
2.1 Material e condução experimental.....	29
2.2. Sistema experimental	31
2.3. Peso seco da parte aérea e das raízes	32
2.4. Determinação do teor de lignina	32
2.5. Extração do chiquimato	33
2.6. Análise estatística	34
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
3.1. Efeitos do glifosato na lignificação das plantas	34
3.2. Efeitos do glifosato no conteúdo de chiquimato	38
4. CONCLUSÕES	40
REFERÊNCIAS	41

CAPÍTULO II	44
CHIQUIMATO E CHIQUIMATO DESIDROGENASE NAS FOLHAS DE SOJA CONVENCIONAL E TRANSGÊNICA, SUBMETIDAS AO GLIFOSATO	
RESUMO	44
1. INTRODUÇÃO	46
2. MATERIAIS E MÉTODOS	
2.1. Material e condução experimental.....	47
2.2. Extração do chiquimato	48
2.3. Quantificação espectrofotométrica do chiquimato.....	48
2.4. Determinação da atividade da chiquimato desidrogenase	49
2.5. Análise estatística	49
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4. CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS	58
CAPÍTULO III	60
TEORES DE LIGNINA E DE MONOLIGNOIS NOS TEGUMENTOS DE CULTIVARES DE SOJA (<i>Glycine max</i> (L). MERRILL) TRANSGÊNICAS RESISTENTES AO GLIFOSATO E RESPECTIVAS CULTIVARES PARENTAIS	
RESUMO	60
1. INTRODUÇÃO	61
2. MATERIAIS E MÉTODOS	
2.1. Sistema experimental	63
2.2 Obtenção do tegumento das sementes	64
2.3 Quantificação da lignina e monolignois	64
2.4 Análise estatística	65
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4. CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS	72

CAPÍTULO IV	75
PROCESSO PARA DIFERENCIAR SOJA CONVENCIONAL DE SOJA RESISTENTE AO GLIFOSATO POR DETERMINAÇÃO CROMATOCRÁFICA DO CHIQUIMATO	
RESUMO	75
1. INTRODUÇÃO	77
2. MATERIAIS E MÉTODOS	
2.1 Sistema experimental.....	78
2.2 Germinação das sementes	79
2.3 Extração do chiquimato	80
2.4 Análise estatística	81
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
4. CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS	85
ANEXOS	87

RESUMO

BONINI, Edicléia Aparecida, D.S. Universidade Estadual de Maringá. Fevereiro de 2011. **Análises bioquímicas de soja convencional e resistente ao glifosato relacionadas ao conteúdo de lignina e chiquimato.** Professor Orientador: Dr. Osvaldo Ferrarese Filho. Professora Conselheira: Dr^a Maria de Lourdes Lucio Ferrarese.

A presente tese é composta de quatro trabalhos descritos separadamente em capítulos. O objetivo geral foi realizar um estudo comparativo entre cultivares de soja RR (resistente ao glifosato) e respectivas parentais quanto ao à lignificação e ao acúmulo de chiquimato. No primeiro capítulo foram avaliados o conteúdo de chiquimato e os teores de lignina em plantas de soja transgênica e convencional em dois estádios de desenvolvimento, submetidas ou não à pulverização com o herbicida glifosato. As análises realizadas no estádio V3 indicaram acúmulo de chiquimato na cultivar convencional. A cultivar convencional por sua vez, acumulou chiquimato após a aplicação do herbicida, evidenciando sua sensibilidade ao glifosato. No estádio R7 foi possível observar o aumento da lignificação nas plantas, tanto no caule quanto nas folhas. Nessas plantas, o glifosato causou redução no peso seco e na lignificação da cultivar transgênica (BRS 242 RR). O objetivo no segundo estudo foi avaliar os efeitos do glifosato no acúmulo de chiquimato e na atividade da enzima chiquimato desidrogenase (SDH) nas folhas de soja, convencional e transgênica, submetidas à ação do herbicida glifosato. As avaliações se iniciaram imediatamente após a pulverização, caracterizando o tempo zero, e se estenderam por cinco dias. Nas folhas da cultivar convencional, tratada com glifosato, ocorreu crescente acúmulo de chiquimato e aumento na atividade da SDH, evidenciando que a ação do glifosato teve efeitos marcantes na via do chiquimato. Não foi constatado acúmulo de chiquimato na cultivar resistente ao glifosato e, em geral, a atividade da enzima não foi afetada pelo herbicida. O terceiro capítulo teve por objetivo determinar os teores de lignina e a composição dos principais monolignóis, no tegumento de sementes de soja RR e convencional, com o intuito de verificar se a

soja modificada geneticamente, resistente ao glifosato, apresenta diferença nos teores deste polímero nos tegumentos, em comparação com sua cultivar parental. Neste estudo, o teor de lignina no tegumento de sementes variou em apenas um dos seis contrastes avaliados. Por fim, o quarto capítulo traz as análises cromatográficas de seis contrastes diferentes, sendo cada contraste formado por uma cultivar transgênica e sua respectiva cultivar parental convencional, submetidas ou não a embebição com solução de glifosato 0,6%. O acúmulo de chiquimato foi detectado apenas em cultivares convencionais, nas quais as sementes foram previamente embebidas em solução de glifosato 0,6%. Os resultados demonstraram que a detecção de chiquimato pelo método cromatográfico pode ser utilizado como um método rápido e preciso na diferenciação de soja resistente ao glifosato de soja convencional.

Palavras-Chave: lignina, chiquimato, soja transgênica.

ABSTRACT

BONINI , Edicléia Aparecida, D.S. Universidade Estadual de Maringá; February 2011. **Biochemical analysis of conventional and roundup ready soybean related to lignin content and shikimate.** Adviser: Dr. Osvaldo Ferrarese Filho. Committee Member: Dr^a Maria de Lourdes Lucio Ferrarese.

The present thesis is composed by four independent studies which were described as chapters. The general goal was to conduct a comparative study between GR soybean cultivars (resistant to glyphosate) and their parental cultivars with respect to the lignification and shikimate accumulation. In the first chapter, the contents of shikimate and lignin in plants of transgenic and conventional soybean at two stages of development, submitted or not to the herbicide glyphosate were evaluated. Analyses performed at V3 stage indicated an accumulation of shikimate in the conventional cultivar. In turn, the conventional cultivar accumulated shikimate after herbicide application, indicating sensitivity to the glyphosate. In the R7 stage was possible to note an increase of lignification in plants, both in stem and leaves. In these plants, glyphosate reduced dry weight and lignification of transgenic cultivars (BRS 242 RR). The goal of the second study was to evaluate the effects of glyphosate on accumulation of shikimate and activity of shikimate dehydrogenase (SDH) in conventional and transgenic soybean leaves, submitted to the herbicide glyphosate. The analyses were done immediately after spraying (zero time) and up to five days. In leaves of the conventional cultivar, treated with glyphosate, was noted increases of shikimate accumulation and activity of SDH, indicating that the action of glyphosate had significant effects on shikimate pathway. Accumulation of shikimate was not observed in glyphosate-resistant cultivar and, in general, the enzyme activity was not affected by the herbicide. The third chapter aims to determine the lignin concentration and composition of the major monolignol in the seed coat of RR soybeans and conventional, in order to determine whether the genetically modified soybean resistant to glyphosate, shows variation in the levels of polymer in the seed coats, compared with its parental cultivar. In this study, the lignin content in the seed coat varied in only

one of six contrasts tested. Finally, the fourth chapter brings the chromatographic analysis of six different contrasts, each consisting of a contrast transgenic crops and their respective parent cultivar conventional or not subjected to soaking in 0.6% solution of glyphosate. The accumulation of shikimate was detected only in conventional cultivars, in which the seeds were previously soaked in 0.6% solution of glyphosate. The results showed that the detection of shikimate by chromatographic method can be used as a quick and accurate in differentiating glyphosate-resistant soybeans for soy.

Keywords: lignin, shikimate, genetically modified soybeans.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O desenvolvimento de cultivares resistentes a herbicidas surgiu como alternativa no controle de plantas daninhas no manejo da soja, cultura que tornou-se alvo de atenção dos pesquisadores por se destacar como planta de grande retorno financeiro. A obtenção de cultivares resistentes ao glifosato é realizada desde a década de 1980 (SHAN et al., 1986; PADGETTE et al., 1995).

O advento da soja transgênica, tolerante ao herbicida Roundup Ready® (RR), revolucionou o mercado mundial de soja, sendo autorizado seu cultivo definitivo no Brasil, em 2005, com a nova Lei de Biossegurança. Com a introdução da sequência CP4 EPSPS (5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase) no genoma de cultivares comerciais de soja, a qual confere tolerância ao ingrediente ativo glifosato, é produzida a proteína CP4 EPSPS, enzima que participa da biossíntese de aminoácidos aromáticos em plantas e microrganismos. No caso de cultivares convencionais, a inibição dessa enzima pelo glifosato, presente na via do chiquimato, causa deficiência na produção de aminoácidos essenciais e conseqüente morte das plantas, o que não ocorre nas cultivares de soja modificadas geneticamente.

Segundo SHARMA (1986), o glifosato também pode inibir a lignificação devido ao seu modo de ação, bloqueando a via do chiquimato. LIU et al. (1997), em seu trabalho com plântulas de feijão, encontraram que os teores de lignina aumentam com o tempo de desenvolvimento o que não ocorre nas plantas tratadas com glifosato. Deste modo, os efeitos tóxicos do glifosato podem ser atribuídos a (1) impossibilidade da planta de sintetizar os aminoácidos aromáticos e, possivelmente, os ácidos fenólicos e, mais adiante, a lignina; (2) um dreno de energia resultante de ATP e fosfoenolpiruvato gasto no acúmulo de chiquimato e (3) toxicidade dos intermediários acumulados na via do chiquimato (FISHER et al., 1986).

Como o glifosato é um herbicida que interfere na via de síntese de aminoácidos aromáticos e, por sua vez, na síntese de lignina, as determinações deste polímero bem como o acúmulo de chiquimato, em plantas de soja

convencionais e transgênicas, poderão estabelecer possíveis diferenças existentes entre as duas cultivares. Essas observações poderão indicar os efeitos causados pelo herbicida glifosato na presença e na ausência do gene modificado.

O cultivo e o comércio de organismos geneticamente modificados vêm crescendo significativamente no mundo, em que pese o fato de que a utilização da biotecnologia na agricultura é vista de forma diferente nas distintas regiões. Variedades transformadas aprovadas em um país e usadas comumente na agricultura comercial são, às vezes, proibidas em outros países (MUMM & WALTERS, 2001). Isto significa que na comercialização de lotes de sementes convencionais produzidos em países onde as variedades geneticamente modificadas (GM) são utilizadas, para países onde as variedades transgênicas são proibidas ou controladas rigidamente, a presença adventícia de sementes de variedades GM é inevitável (LE BUANEC, 2003).

Técnicas de segregação, rastreabilidade e preservação de identidade dos recursos genéticos e produtos alimentares assumiram caráter estratégico em nosso país, importante fornecedor mundial de soja convencional (PESSANHA & WILKINSON, 2003).

O ensaio *in vivo* é um método utilizado para diagnosticar possível resistência, avaliando o acúmulo de chiquimato em tecido foliar, esta é uma forma de detecção de forma rápida da resistência ao glifosato, sabendo-se que após a aplicação desse produto, ocorre o acúmulo do chiquimato pela inibição da enzima EPSPS. Entre as desvantagens deste teste destaca-se a necessidade de sementes não dormentes e a utilização de mão-de-obra e materiais para análises (VIDAL et al., 2006).

Os principais objetivos deste trabalho foram avaliar se alteração da EPSPS se resume apenas à sua resistência ao glifosato ou se ela também interfere na via da qual faz parte, na presença ou ausência do herbicida, ao longo do desenvolvimento da planta de soja, incluindo a concentração de chiquimato, a atividade da enzima EPSPS e a síntese de lignina. Além de desenvolver uma técnica alternativa, rápida, sensível e segura para diferenciar a soja resistente ao glifosato da soja convencional visando, futuramente, assessorar órgãos

interessados, especialmente empresas ligadas à produção de sementes, nas suas estratégias de controle.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A soja transgênica Roundup Ready®

A soja transgênica RR (Roundup Ready®) foi desenvolvida pela Companhia Monsanto (St. Louis, MO, EUA) na década de 1980, com o objetivo de disponibilizar um material tolerante à ação de herbicidas à base de glifosato. Estes são comumente utilizados para dessecação de vegetação invasora em culturas perenes ou em operações de pré-plantio das anuais, principalmente no sistema de plantio direto, em que o solo não é revolvido e a semeadura se dá sobre palhada da cultura anterior ou das plantas espontâneas do terreno (HEBERLÊ, 2005).

O evento 40-3-2 da Monsanto recebeu o gene CP4 EPSPS, que codifica a enzima CP4 EPSPS, presente na bactéria do solo, *Agrobacterium* sp cepa CP4. Para obtenção do gene, foi usada a técnica de transformação por aceleração de partículas metálicas recobertas com material genético, denominada biobalística. O inserto para transformação, contém uma parte do promotor do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV 35S), seguido do peptídeo de trânsito de cloroplasto da epsps (CTP EPSPS) de petúnia híbrida, a sequência codificadora cp4epsps e parte do terminador de transcrição *nos* da nopalina sintase de *Agrobacterium tumefaciens* (PADGETTE et al., 1996; CONCEIÇÃO; MOREIRA; BINSFELD, 2006). Semelhantes construções foram empregadas, posteriormente, na transformação de algodão, milho, beterraba e canola (DEISINGH & BADRIE, 2005).

A crescente necessidade de aumento de produtividade, com consequente redução de custos, facilidade de manejo e menor efeito residual do novo evento promoveu o rápido crescimento da área cultivada com soja RR no mundo. No Brasil, essa cultura foi responsável por 45,6% do total de área plantada e aproximadamente, 42,71% do total da produção de grãos na safra 2009/2010 (CONAB, 2010).

2.2. A via do chiquimato

A via do chiquimato consiste de uma seqüência de sete passos metabólicos que terminam com a produção de corismato, um precursor biossintético para vários compostos aromáticos. A organização das sete enzimas é marcadamente diferente nos três reinos onde elas estão presentes (reinos Fungi, Monera e Plantae). Na maioria dos procariotos, os sete passos são realizados por enzimas multifuncionais. Em fungos, os passos 2-6 são catalisados por um complexo multifuncional AROM e, em plantas, a enzima bifuncional diidroquinato desidratase-chiquimato desidrogenase catalisa os terceiro e quarto passos da via (SINGH & CHRISTENDAT, 2006).

A via do chiquimato é responsável pela síntese de aminoácidos aromáticos essenciais, como fenilalanina e tirosina (BUCHANAM et al., 2000). Estes aminoácidos, além de constituírem proteínas importantes para o desenvolvimento da planta, podem participar da via dos fenilpropanoides, principal caminho para a síntese de compostos fenólicos, dentre estes os monolignóis, precursores da lignina (ANEXO A). A síntese desta molécula é um processo complexo, o qual envolve inúmeras etapas enzimáticas que compõem o metabolismo secundário das plantas (STRACK, 1997).

A formação do chiquimato ocorre a partir do processo regenerativo do carboidrato eritrose-4-fosfato, sintetizado durante a fotossíntese, além do fosfoenolpiruvato, derivado da glicólise. Ambos iniciam a via biossintética que, por meio de reação de condensação e de várias outras reações transformadoras, forma o chiquimato. Subsequentemente, esta mesma via culminará com a formação de aminoácidos aromáticos e síntese de lignina (ABREU, 1994).

Dentre as etapas metabólicas da via do chiquimato, a quarta reação corresponde à redução, dependente de NADPH, do ácido desidrochiquímico formando o chiquimato, catalisada pela enzima-chave chiquimato desidrogenase (SDH) (EC 1.1.1.25) (SINGH & CHRISTENDAT, 2006). Reversivelmente, a oxidação NADP⁺-dependente do produto da reação, o chiquimato, leva a formação de derivados do ácido benzóico, como os ácidos protocatecuico e

gálico. Nas plantas, a chiquimato desidrogenase responde aos diferentes estresses ambientais como o ataque de insetos mastigadores ou lagartas, de microrganismos, alteração na concentração de íons no solo e a deficiência de nitrogênio (DIAZ et al., 2001).

O chiquimato acumulado pela exposição ao glifosato pode ser usado como substrato por esta enzima podendo causar alterações em sua atividade. Este parâmetro, portanto, pode ser importante para desvendar as alterações metabólicas causadas pelo glifosato. Entretanto, poucos estudos têm sido realizados para determinar a atividade da chiquimato desidrogenase em plantas expostas ao glifosato.

De acordo com ANDERSON et al. (2001), um bioindicador ideal para plantas expostas ao glifosato deve ser específico para esse herbicida, desenvolver-se rapidamente no interior da célula, aí permanecendo durante algum tempo, ser relativamente fácil de extrair e analisar a baixo custo. Nesse contexto, o chiquimato tem demonstrado ser um marcador seletivo para plantas expostas à sub-doses de glifosato e (HARRING et al., 1998; SINGH & SHANER, 1998;), sendo importante na identificação de plantas daninhas com sintomas de resistência.

O acúmulo de ácido chiquímico em resposta a inibição da EPSPS pelo herbicida glifosato é um teste rápido e preciso para quantificar danos em plantas sensíveis a este herbicida. PLINE et al. (2002) analisaram o acúmulo de chiquimato em variedades de algodão resistentes e sensíveis ao glifosato. Todos os tecidos do algodoeiro suscetíveis acumularam chiquimato em resposta ao tratamento com glifosato, enquanto que os tecidos de plantas resistentes ao glifosato acumularam muito menos chiquimato.

2.3. Lignina

A lignina perfaz 15 a 30% da biomassa seca da parede celular, sendo o segundo mais abundante polímero do planeta, após a celulose (APEZZATO-DAGLORIA & CARMELLO-GUERREIRO, 2003).

Além de proporcionar rigidez aos tecidos condutivos das plantas vasculares, a lignina funciona como uma barreira contra a perda excessiva de água (BUCHANAN et al., 2000). A presença de lignina nas plantas é fundamental para as junções entre células vizinhas, expansão e enrijecimento dos tecidos, provendo assim, uma forte barreira física contra a invasão de microrganismos (BOUDET, 2000). Levando em conta a quantidade de lignina na raiz, pressupõe-se que em maior quantidade ofereça à planta maior sustentação no solo.

Estruturalmente, a lignina é um polímero fenólico altamente ramificado e constituído de álcoois fenilpropanoides (BOUDET, 2000). A polimerização ocorre entre uma ou mais unidades precursoras, chamadas monolignóis: os álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico (ANEXO A). Uma vez polimerizado, os resíduos derivados de cada um destes precursores são denominados, respectivamente, H (*p*-hidroxifenil), G (guaiacil) e S (siringil) e os polímeros enriquecidos com estes respectivos resíduos são referidos como ligninas tipos H, G ou S (DEAN, 1997).

O processo metabólico de deposição de lignina na parede celular é necessário em todos os tecidos das plantas, e é uma etapa importante durante a expansão celular e o crescimento da raiz. Além de desempenhar papel importante na absorção, transporte e secreção de substâncias, é responsável pela resistência mecânica de vegetais e é uma das principais formas de defesa da planta (FENGEL & WEGENER, 1984; BUCHANAN et al., 2000). Em geral, a parede celular se torna lignificada quando há um decréscimo da expansão celular, mas também quando está sob estresse, seja ele biótico ou abiótico, ou ainda quando as células, principalmente do xilema, se diferenciam para uma especialização particular (CHRISTENSEN et al., 1998).

Apesar de inúmeros estudos realizados com relação à lignina, muitas questões relativas à sua estrutura química permanecem em debate (ANTEROLA & LEWIS, 2002).

Esse polímero é derivado de unidades fenilpropenoides denominadas C_6C_3 ou, simplesmente, unidades C_9 , repetidas de forma irregular. Ela é uma mistura racêmica de heterobiopolímeros aromáticos composto principalmente, de três álcoois hidroxicinâmicos, diferindo no seu grau de metoxilação. Eles são chamados de monolignóis: álcool *p*-cumarílico álcool coniferílico e álcool sinapílico correspondendo aos monolignóis H, G e S, respectivamente (FREUDENBERG & NEISH, 1968; LI et al., 2008). O álcool *p*-cumarílico não possui metoxila, o coniferílico e o sinapílico possuem, respectivamente, um e dois grupos por molécula. O grupo metoxílico é considerado um grupo funcional característico de ligninas e seus derivados, sendo de grande importância sua determinação (MORAIS, 1992).

Alguns autores têm reconhecido os termos “*core*” e “*não core*” para diferenciar tipos de lignina (JUNG & DEETZ, 1993; LAPIERRE, 1993). Lignina *core* consiste de polímeros fenilpropenoides da parede celular, altamente condensados e muito resistentes à degradação. Eles são compostos de unidades *p*-hidroxifenila (H), guaiacila (G) e siringila (S), em proporções diferentes, de acordo com sua origem. Lignina *não core* consiste de compostos fenólicos de baixo peso molecular, liberados da parede celular por hidrólise, que é representada por ácidos *p*-hidroxicinâmico éster-ligados. Estes ácidos podem estar ligados à lignina *core*, aos polissacarídeos ou a ambos, simultaneamente (JUNG, 1989) e correspondem aos fenólicos extraídos. Com a maturação da planta, reduz-se a concentração dos ésteres dos ácidos fenólicos livres devido sua polimerização, assim, a concentração de lignina verdadeira (*core*) aumenta (VAN SOEST, 1994). A lignina também pode estar quimicamente ligada à hemicelulose por meio da xilose e arabinose (JUNG & VOGEL, 1992), porém não há evidência de ligação covalente com a celulose (CHESSON & FORSBERG, 1988).

A avaliação *in situ* da lignina *core* é normalmente feita através do extrato livre de parede celular, o qual pode ser obtido após extração prévia com solventes orgânicos para eliminar os componentes solúveis. Isto é importante para minimizar os problemas de interferência entre a lignina *core* e outros fenólicos solúveis (MORAIS et al., 1991).

2.4. Lignina e o dano mecânico

A semente de soja é muito sensível ao dano mecânico, uma vez que as partes vitais do eixo embrionário (radícula, hipocótilo e plúmula) estão situadas sob um tegumento pouco espesso, que praticamente não lhe oferece proteção (HENNING & FRANÇA NETO, 1984). A susceptibilidade do tegumento da semente ao dano mecânico constitui-se em caráter importante para a qualidade de sementes de soja, a qual está intimamente relacionada com a variabilidade genética (CARBONELL, 1995).

Em algumas pesquisas, tem sido observado que o teor de lignina no tegumento pode influenciar a qualidade fisiológica das sementes (PANOBIANCO et al., 1999). Nos programas de melhoramento genético, busca-se a seleção de genótipos com teores de lignina superiores a 5%, por apresentarem maior resistência ao impacto mecânico do que cultivares com testa impermeável (ALVAREZ et al., 1997). Porém, ainda não está devidamente esclarecida a relação entre o teor de lignina e a qualidade fisiológica das sementes de soja.

O tegumento da semente é proveniente dos integumentos do óvulo, e o integumento externo, ou primina, origina a testa, enquanto o integumento interno, ou secundina, origina o tégmen. Em um corte transversal da testa de uma semente de soja, podem ser distinguidas quatro camadas a partir da superfície: cutícula, epiderme (células paliçádicas ou macroesclerídeos), hipoderme (células em ampulheta ou células pilares ou osteoesclerídeos) e células parenquimatosas (SWANSON et al., 1985). De acordo com CAVINESS & SIMPSON JUNIOR (1974), a espessura do conjunto das quatro camadas da testa da semente de soja pode variar de 70 a 100µm, e pode existir variação entre cultivares. Essa

característica é constante dentro de cada cultivar e é controlada geneticamente. Na testa das sementes de soja, está presente a lignina, polímero natural associado à qualidade das sementes (LEWIS & YAMAMOTO, 1990).

ALVAREZ et al. (1997) e PANOBIANCO et al. (1999) observaram relação direta entre a resistência das sementes a danos mecânicos e os teores de lignina. Também foi observada grande variabilidade genética para a resistência a dano mecânico (CARBONELL & KRZYZANOWSKI, 1995) e para o teor de lignina (CARBONELL & KRZYZANOWSKI, 1995; ALVAREZ et al., 1997).

A lignificação do tegumento é uma característica relevante, pois confere resistência mecânica ao tecido e protege a parede celulósica do ataque de microrganismos (TAVARES et al., 1987). A lignina é o terceiro maior componente da parede celular e o principal constituinte da substância intercelular, responsável pela manutenção da integridade e coesão estrutural das fibras vegetais (MENEZES et al., 2009).

2.5. Efeitos bioquímicos do glifosato nas plantas

O glifosato foi um dos primeiros herbicidas, comercialmente relevantes, em que se caracterizou a ação sobre uma única enzima não existente em animais. Seu mecanismo de ação é bem definido já que inibe especificamente a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS, EC. 2.5.1.19), que catalisa a condensação do chiquimato-3-fosfato com fosfoenolpiruvato (STEINRUCKEN & AMRHEIN, 1980). Esta etapa está inserida na via do chiquimato, que precede a via biossintética dos aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano) e derivados como ácido indol-3-acético (AIA), vitaminas E, K e ácido fólico, ubiquinonas, antocianinas, fitoalexinas, flavonóides, fenilpropenoides e lignina.

A Companhia Monsanto iniciou a produção de produtos químicos com atividade herbicida em 1952, continuando esta atividade até hoje. O glifosato [*N*-(fosfonometil) glicina] foi primeiramente preparado pela Monsanto, em meados de 1970. É um aminoácido branco, inodoro e cristalino de fórmula empírica $C_3H_8NO_5$ e massa molar de 169,08. A sua solubilidade na água, a 25°C, é de

1,157% e, a 100°C, cerca de 6% (FRANZ et al., 1997). É um herbicida amplamente utilizado na agricultura para o controle de plantas daninhas (FRANZ et al., 1997; GALLI & MONTEZUMA, 2005).

Várias pesquisas indicam que o glifosato pode ser degradado por microrganismos e plantas para produzir ácido aminometilfosfônico (AMPA) e sarcosina (ANEXO B), os quais podem se degradar, na água, até dióxido de carbono e fosfato, embora uma lenta degradação do AMPA tenha sido relatada em alguns casos (TALBOT et al., 1984). A degradação abiótica é também uma importante via de dissipação do glifosato no ambiente. Por outro lado, não ocorre a sua foto-degradação direta (RUEPPEL et al., 1977).

O glifosato é absorvido basicamente pela região clorofilada das plantas, e translocado preferencialmente pelo floema, para os tecidos meristemáticos. Depois que o alvo primário é afetado por um herbicida uma série de eventos bioquímicos e fisiológicos ocorrem em sequência. Estes eventos são frequentemente interligados e relacionados entre si por vias metabólicas complexas, tanto que ligar os eventos secundários aos efeitos primários às vezes é bastante difícil (DEVINE; DUKE; FEDTKE, 1993).

O sítio de ação do glifosato é a via do chiquimato. No entanto, o primeiro sintoma observado é a clorose, especialmente nas folhas mais jovens. A relação desta com a inibição da síntese de aminoácidos aromáticos não é direta (COLE, 1985). Outro indício da ação indireta do glifosato é o fato de muitos estudos relatarem que o desenvolvimento inicial de algumas cultivares de soja de soja RR é prejudicado pelo herbicida (SANTOS et al., 2007; ZABLOTOWICZ; REDDY, 2007), o que não deveria ocorrer devido a presença do gene de resistência nessas plantas. Alguns relatos indicam que plantas de soja, resistentes ao glifosato, são menos eficientes na absorção de manganês (Mn) e, ainda, que o glifosato, nos exsudados das raízes, altera a microflora da rizosfera e é tóxico para organismos redutores de Mn, que são importantes na manutenção do Mn divalente para a absorção radicular (YAMADA, 2005).

Segundo MAROCHI (2002), alguns cultivares de soja resistentes ao glifosato apresentam discreta clorose nos trifólios jovens quando submetidos à

dose de 2.400 g e.a. ha⁻¹. Um dos principais fatores relacionados com a eficiência fotossintética das plantas e, conseqüentemente, com o crescimento e adaptabilidade a diferentes ambientes é a energia luminosa (ENGEL; POGGIANNI, 1991). A restrição de fotoassimilados pode afetar o crescimento da planta e refletir em menor estatura e menor número de nós (MUNDSTOCK; THOMAS, 2005).

Estudos realizados por SANTOS et al. (2007) revelaram discreto efeito tóxico do glifosato nas plantas de soja RR. Atingindo o florescimento, observou-se recuperação das plantas. Entretanto, houve uma diminuição considerável do número de nódulos radiculares produzidos na simbiose entre soja e rizóbio. No mesmo estudo foi possível observar que a aplicação do glifosato diminuiu o teor de nitrogênio (N) nas folhas, o que indica que sua aplicação, ainda que recomendada para a cultura da soja esclareceria relatos de alguns agricultores sobre o insatisfatório desenvolvimento inicial de plantas de soja em cultivos sob sistema de plantio direto. Semelhante ao observado para o N, o teor de cálcio foi reduzido nas folhas das plantas de soja RR, tratadas com glifosato. DUKE et al. (1983) observaram diminuição no conteúdo de cálcio em plantas de soja tratadas com glifosato. Esses autores verificaram que, na presença do herbicida, o cálcio era transportado para raízes e hipocótilo; contudo, a partir de quatro dias da aplicação, a translocação desse nutriente para as folhas de soja era fortemente inibida pelo herbicida.

Alguns trabalhos têm relatado acúmulo de chiquimato em plantas tratadas com glifosato. SINGH & SHANER (1998) observaram que, na soja, o chiquimato acumula após 24 horas da aplicação de uma dose subletal de glifosato; após 96 horas os níveis de glifosato foram menores do que aquele constatado com 24 horas. HARRING et al. (1998) também relataram que o acúmulo de chiquimato foi proporcional a concentração de glifosato. BUEHRING et al. (2007) relataram que, no milho, a exposição ao glifosato resultou em acúmulo de 297% dos teores de chiquimato, 7 dias após a aplicação e de 489%, 5 dias após a aplicação, quando comparado com o controle.

Além das alterações causadas nos conteúdos de chiquimato, a exposição ao glifosato afeta o metabolismo de ácidos fenólicos, elementos indispensáveis nas estruturas anatômicas e morfológicas, das quais muitos constituem partes integrantes das estruturas da parede celular, principalmente em polímeros como lignina e suberinas (STRACK, 1997).

Grande especulação tem sido gerada com relação aos teores de lignina na planta entre cultivares transgênicas (RR) e convencionais (COGHLAN, 1999; KUIPER et al., 2001; NODARI & DESTRO, 2006). Ao obstruir a via do chiquimato, pela inibição da EPSPS, o glifosato pode afetar não só a produção de proteínas da soja, mas também a via metabólica geradora de lignina.

NODARI & DESTRO (2006), em estudo realizado em nove lavouras de soja no Rio Grande do Sul, observaram que na presença de secas e altas temperaturas, as cultivares RR sofreram mais prejuízos que as convencionais. Os autores observaram um grande número de plantas com rachaduras no caule de penetrância elevada, sendo que uma quantidade significativa das mesmas apresentava-se com caules dobrados ou quebrados, cerca de 50% a 70% das plantas, possivelmente devido à superprodução de lignina nos materiais RR.

Segundo COGHLAN (1999), os teores elevados de lignina depositados no caule das plantas de soja estariam ocasionando estas rachaduras devido ao enrijecimento das plantas sob altas temperaturas (45°C), problema também detectado em lavouras de soja transgênica RR nos EUA, o que teria ocasionado, em anos mais quentes, perdas por tombamento de até 40% (NODARI & DESTRO, 2006) em consequência de aproximadamente 20% a mais de lignina em materiais RR (KUIPER et al., 2001).

Embora a causa exata do comportamento da lignina neste mecanismo ainda seja desconhecida, possivelmente as alterações dos teores na planta sejam devido ao fato dos precursores da molécula de lignina serem formados na via do chiquimato, que é inibido pelo herbicida glifosato em plantas convencionais. Desta forma, a sequência CP4 EPSPS, introduzida no genoma de cultivares comerciais de soja, poderia estar apresentando efeito pleiotrópico, modificando assim os teores de lignina na planta.

Além da ação direta do glifosato na via de síntese de lignina, todos os efeitos indiretos relatados também podem interferir na produção dessa molécula nas plantas de soja RR. Não se deve ignorar, ainda, o fato de que ao se alterar a atividade de uma única enzima da via metabólica pode-se modificar o nível de intermediários dessa via, afetando a expressão de outros genes em nível de transcrição (BOERJAN et al., 2003).

2.6. Métodos de identificação de material transgênico

Preocupações com os atributos intrínsecos e extrínsecos de qualidade nos alimentos têm crescido nas últimas décadas e a polêmica se tornou acirrada com a entrada dos alimentos transgênicos no mercado consumidor. Técnicas de segregação, rastreabilidade e preservação de identidade dos recursos genéticos e produtos alimentares assumiram caráter estratégico em nosso país, importante fornecedor mundial de soja convencional (PESSANHA & WILKINSON, 2003). Grande fonte de risco desse sistema de segregação consiste nos testes de detecção utilizados, já que nenhum deles possui absoluta exatidão (HUFFMANN, 2004). A produção mundial de sementes de espécies geneticamente modificadas (GM) atingiu proporções significativas, levando institutos de pesquisa, agências de inspeção e companhias de vários países a desenvolver estratégias e métodos para detecção de sementes de plantas GM. Entretanto, não há um método definitivo (CUNHA et al., 2005).

O Quadro 1 sumariza os diferentes métodos empregados na identificação de sementes de soja resistentes ao glifosato.

Quadro 01. Métodos para a detecção e a quantificação de sementes de soja resistente ao glifosato

Métodos	Vantagens	Desvantagens
Substrato umedecido em solução com herbicida	- menor trabalho para o analista - menor gasto de material	- maior contato com o herbicida - afeta o desenvolvimento da planta GM
Pré-embebição em solução com herbicida	- menor contato com o herbicida - não afeta o desenvolvimento da planta GM - eficiente diferenciação das cultivares GM e não GM	- maior trabalho para o analista - maior gasto de material - interferência da presença de sementes duras
Imersão em solução com herbicida	- menor contato com o herbicida - menor gasto de material - menor trabalho para o analista	- afeta o desenvolvimento da planta GM - ruptura do tegumento - dificuldade de avaliação
<i>Spray</i> de plântulas em laboratório	-----	- difícil condução e avaliação - não aplicável à rotina do laboratório
<i>Spray</i> de plântulas em casa de vegetação	- pode ser realizado pelo produtor	- tempo para avaliação em torno de 30 dias
Sistema hidropônico	- não afeta o desenvolvimento da planta GM - sintomas bem evidentes	- maior trabalho para o analista - equipamento específico
<i>Kit</i> (ELISA)	- fácil condução - aplicável à rotina do laboratório - resultado em 5 minutos	- alto custo - resultado qualitativo
PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	- sensível, preciso e confiável	- equipamento específico - alto custo - difícil execução - requer pessoal especializado
Método colorimétrico (peroxidase)	- eficiente diferenciação das cultivares GM e não GM - fácil aplicação - baixo custo	- resultado qualitativo - tempo para avaliação de 8 dias

Fonte: Tillmann e Miranda (2005)

Da análise do citado Quadro, constata-se que os métodos analíticos de detecção de sementes de espécies GM podem ser divididos entre os baseados em proteína, como o teste de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbant Assay*) que detecta proteínas específicas presentes em sementes de plantas GM e os *kits* (tiras de fluxo lateral) que trabalham com anticorpos. Ambos só oferecem resultados qualitativos, e naqueles baseados no DNA a técnica mais empregada é o PCR (*Polymerase Chain Reaction*), que estuda o gene inserido no DNA do material, e pode ser utilizada para análises qualitativas (detecção e identificação) e quantitativas, através do PCR competitivo e do PCR em tempo real.

Testes de resistência aos herbicidas, conduzidos em conjunto com o teste de germinação, denominado bioensaio, foram propostos por Miranda et al. (2005). Estes testes seguem metodologias de substrato umedecido, imersão das sementes em solução de herbicida, pré-embebição em substrato com herbicida, em sistema hidropônico e pulverização de plântulas em laboratório ou casa-de-vegetação. Todavia, estes testes oferecem somente resultados qualitativos.

Métodos quantitativos para detecção do chiquimato, em plantas tratadas com glifosato, estão sendo aperfeiçoados e utilizados na detecção de plantas sensíveis aos danos provocados por este herbicida, assim como para determinar a eficácia de diferentes formulações de glifosato. O princípio fundamental é o fato do chiquimato se acumular significativamente nos tecidos após a inibição da EPSP sintase pelo glifosato. Em plantas não-tratadas, o chiquimato não é facilmente detectado, pois rapidamente se converte em chiquimato 3-fosfato e, a seguir, em EPSP pela ação da EPSPS. Por outro lado, em plantas tratadas, quando a EPSPS está inibida pelo herbicida, ela se torna incapaz de catalisar a conversão de fosfoenolpiruvato (PEP) e chiquimato 3-fosfato em EPSP ocasionando, por conseguinte, acúmulo de chiquimato (ANEXO C). Portanto, o acúmulo deste composto é o resultado direto da inibição enzimática pelo glifosato, podendo ser quantificado e correlacionado com os danos teciduais induzidos pelo herbicida (LIDON & DUKE, 1988; SINGH et al., 1998; HARRING et al., 1998; DUKE et al., 2003; PLINE et al., 2002; SHANER et al., 2005).

REFERÊNCIAS

ALVAREZ, P. J. C.; KRYZANOWSKI, F. C.; MANDARINO, J. M. G.; FRANÇA NETO, J. B. Relationship between soybean seed coat lignin content and resistance to mechanical damage. **Seed Science and Technology**, v.25, p.209-214, 1997.

ANDERSON, K. A.; COBB, W.T.; LOPER, B. R. Analytical Method for Determination of shikimic acid: Shikimic acid proportional to glyphosate application rates. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 32 (17&18), p. 2831 - 2840, 2001.

ANTEROLA A.M., LEWIS N.G. Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. **Phytochem.** v. 61, p.221-294, 2002.

ABREU, H. S. **Biossíntese da lignificação**. Rio de Janeiro: EDUR, 63 p. 1994.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. **Anatomia Vegetal**. Editora da Universidade Federal de Viçosa, 438p., 2003.

BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER. Lignin biosynthesis. **Annu. Rev. Plant. Biol.** v. 54, p. 519-546, 2003.

BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. Biochemistry and molecular biology of plants. **American Society of Plant Physiologists**, 1367p., 2000.

BUEHRING, N. W., MASSEY, J. H., and REYNOLDS, D. B. Shikimic acid accumulation in field-grown corn (*Zea mays*) following simulated glyphosate drift. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55: p. 819-824, 2007.

CARBONELL, S.A.M.; KRZYZANOWSKI, F.C.; KASTER, M. Avaliação do “teste de queda” para seleção de genótipos de soja com semente resistente ao dano mecânico. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.14, n.2, p.215-219, mar./abr. 1991.

CARBONELL, S.A.M.; KRZYZANOWSKI, F.C. The pendulum test for screening soybean genotypes for seeds resistance to mechanical damage. **Seed Science and Tecnology**, Zurich, v.23, n.2, p.331-339, 1995.

CAVINESS, C.E.; SIMPSON JUNIOR, A.M. Influence of variety and location on seed coat thickness of mature soybean seed. **Proceedings of the Associations of Seed Analysis**, v.64, p.102-108, 1974.

COLE, D.J. Mode of action of glyphosate-a literature analysis. In: GROSSBARD, E.; ATKINSON, D. (Ed.). **The herbicide glyphosate**. London, Butterworths., cap.5, p.48-74, 1985.

CHESSON A., FORSBERG C.W. Polysaccharide degradation by rumen microorganisms. In: HOBSON P.N. (Ed.) **The rumen microbial ecosystem**. London: Elsevier Applied Sci. p.251-284, 1988.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, décimo levantamento, julho/2010**. Disponível em: http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/10graos_08.09.pdf>. Acesso em: 13 jan. 2011.

COGHLAN, A. **Splitting headache**: Monsanto's modified soya beans are cracking up in the heat. Saint Louis: Monsanto, 1999. Disponível em: <<http://www.mindfully.org/GE/Monsanto-RR-Soy-Cracking.htm>>. Acesso em: 10 mar. 2010.

CUNHA, C.S.M. **Comparação de métodos na detecção de sementes de soja geneticamente modificada, tolerante ao glifosato.** 2004. 24f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Sementes). Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel", Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2004.

DEAN J.F.D. 1997. Lignin analysis. In: Dashek, W.V. (Ed.). **Methods in Plant Biochemistry and Molecular Biology.** CRC Press.199-215p.

DEISINGH, A. K.; BADRIE, N. Detection approaches for genetically modified organisms in foods. **Food Research International**, Essex, v. 38, n. 6, p. 639-649, 2005.

DEVINE, M.D.; DUKE S.O.; FEDTKE C. **Physiology of Herbicide Action.** Prentice Hall, NJ. 1993.

DIAZ, J.; BERNAL, A.; POMAR, F.; MERINO, F. Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings in response to copper stress and its relation to lignification. **Plant Science**, v.161, p.179–188, 2001.

DUKE, S.O; RIMANDO, A.G.; PACE, P.F.; REDDY, K.N.; SMEDA, R.J. Isoflavone, glyphosate and aminomethylphosphonic acid levels in seeds of glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.340-344, 2003.

ENGEL, V. L.; POGGIANI, F. Estudo da concentração de clorofila nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 3, n. 1, p. 39-45, 1991.

FENGEL D.; WEGENER G. **Wood, chemistry, ultrastructure, reactions**. New York : Waster & Grugter. 613p. 1984.

FREUDENBERG K.; NEISH A.C. **The constitution and biosynthesis of lignin**. Berlin : Springer-Verlag. 129p. 1968.

FISHER, R.S.; BERRY, A.; GAINES, C.G.; JENSEN, R.A. Comparative action of glyphosate as a trigger of energy drain in Eubacteria. **Journal of Bacteriology**, v.168, p.1147–1154, 1986.

FRANZ, J.E.; MAO, M.K.; SIKORSKI, J.A. Glyphosate's molecular mode of action. In: Glyphosate. A unique global herbicide. **American Chemical Society**. Monograph 189, p.521-615, 1997.

GALLI, A.J.B.; MONTEZUMA, H.C. Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura. **ACADCOM** Editora, 67p., 2005.

HARRING, T., STREIBIG, J. C., and HUSTED, S. Accumulation of shikimic acid: A technique for screening glyphosate efficiency. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46: p.4406-4412, 1998.

HEBERLÊ, A.L.O. Significações dos transgênicos na mídia do Rio Grande do Sul. PhD **São Leopoldo: Universidade do Vale do Rio dos Sinos**. (2005).

HENNING, A.A.; FRANÇA NETO, J.B. & COSTA, N.P. Recomendação de fungicidas para o tratamento de sementes de soja. Londrina, EMBRAPA-CNPSO. (**EMBRAPA-CNPSO. Comunicado Técnico, 31**). 4p.1984.

HUFFMANN, W.E. Production, identify preservation and labeling in a marketplace with genetically modified and non-genetically modified foods. **Plant Physiology**, v.34, p.3-10, 2004

JUNG H.G. Forage lignins and their effects on fiber digestibility. **Agronomy Journal**, v. 81, p. 33-38, 1989.

JUNG H.G., VOGEL K.P. Lignification of switchgrass (*Panicum virgatum*) and big bluestem (*Andropogon gerardii* Vitman) plant parts during maturation and its effect on fibre degradability. **Journal of Science Food and Agriculture**, v. 59, p. 769-776, 1992.

JUNG H.G., DEETZ D.A. Cell wall lignification and degradability. In: JUNG H.G., BUXTON D.R., HATIFIELD R.D. et al. (Ed.) Forage cell wall structure and digestibility. Madison: America Society of Agronomy, **Crop Sci. Society of America, Soil Sci. Society of America**. 315-346p. 1993.

KUIPER, H.A.; KLETER, G.A.; NOTEBORN, H.P.J.M.; KOK, E.J. Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. **The Plant Journal**, Oxford, v.27, n.6, p.503-528, Dec. 2001.

LAPIERRE C. Application of new methods for the investigation of lignin structure. In: JUNG H.G., BUXTON D.R. v. 133, p. 163, 1993.

LE BUANEC, B. Genetically modified varieties and the seed industry. **ISTA News Bulletin**, n.125, p.10, 2003.

LI X., WENG J-K., CHAPPLE C. Improvement of biomass through lignin modification. **The Plant Journal**, v. 54, p. 569-581, 2008.

LIU, L.; PUNJA, K.; RAHE, J.E. Altered root exudation and suppression of induced lignification as mechanisms of predisposition by glyphosate of bean roots (*Phaseolus vulgaris* L.) to colonization by *Pythium* spp. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.51, p.111-127, 1997.

LYDON, J.; DUKE, S.O. Glyphosate induction of elevated levels of hydroxybenzoic acids in higher plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.36, p.813–818, 1988.

LEWIS, N.G.; YAMAMOTO, E. Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.41, p.455-496, 1990.

MAROCHI, A. I. Tolerância da soja Roundup Ready ao glyphosate aplicado em duas épocas de desenvolvimento e diferentes horários de aplicação. In: CONGR. BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 23., 2002, Gramado. Anais. Gramado: 2002. Disponível em: <http://www.monsanto.com.br/produtos/biotecnologia/estudos/pdf/xxiiicongresso/Aroldo%2011.pdf>>. Acesso em: 30 janeiro 2010.

MENEZES, M. ; VON PINHO, E.V.R. ; JOSE, S. C. B. R. ; Baldoni, A. ; MENDES, F.F. . Aspectos químicos e estruturais da qualidade fisiológica de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 1716-1723, 2009.

MORAIS S.A.L., NASCIMENTO E.R., PILÓ-VELOSO D. Studies of lignin and polyphenols content in *Eucalyptus grandis* by infrared spectroscopy. **Journal of Botanic Chemical Society**, v. 2, p. 129-131, 1991.

MORAIS S.A.L. Contribuição ao estudo químico e espectroscópico da lignina de madeira moída do *Eucalyptus grandis*: Isolamento, quantificação e análise estrutural. Belo Horizonte. 260p. **Tese (Doutorado em Química) - UFMG/ICE**x, 1992.

MUNDSTOCK, C. M.; THOMAS, A. L. Soja: fatores que afetam o crescimento e rendimento de grãos. Porto Alegre: **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 31 p. 2005.

MUMM, R.H.; WALTERS, D.S. Quality control in development of transgenic crop seed products. **Crop Science**, v.41, p.1381-1389, 2001.

NODARI, R.O.; DESTRO, D. Relatório sobre a situação de lavouras de soja da região de Palmeira das Missões, RS, safra 2001/2002, cultivadas com cultivares convencionais e com cultivares transgênicas. Disponível em: <<http://www.agirazul.com.br/123/noticias/000000a3.htm>>. Acesso em: 22 abr. 2010.

PADGETTE, S.R.; KOLACZ, K.H.; DELANNAY, X.D.; RE, B.; La VALLEE, B.J.; TINIUS, C.N.; RHODES, W.K.; OTERO, Y.I.; BARRY, G.F.; EICHHOLTZ, D.A.; PESCHKE, W.M.; NIDA, D.L.; TAYLOR, N.B. Development, identification and 36 characterization of a glyphosate tolerant soybean line. **Crop Science**, v.35, p.1451-1461, 1995.

PANOBIANCO, M. Variação na condutividade elétrica de sementes de diferentes genótipos de soja e relação com o conteúdo de lignina no tegumento. **Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal**. 59f. 1997.

PESSANHA, L.D.R.; WILKINSON, J. Transgênicos provocam novo quadro regulatório e novas formas de coordenação do sistema agroalimentar. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v.20, n.2, p.263-303, 2003.

PLINE, W.A.; WILCUT, J.W.; DUKE, S.O.; EDMISTEN, K.L.; WELLS, R. Tolerance and accumulation of shikimic acid in response to glyphosate

applications in glyphosate-resistant and non-resistant cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.506-512, 2002.

REDDY, K. N.; ZABLOTOWICZ, R. M. Glyphosate-resistant soybean response to various salts of glyphosate and glyphosate accumulation in soybean nodules. **Weed Science**, v.51, p.496–502, 2003.

RUEPPEL, M.L; BRIGHTWELL, B.B; SCHAEFER glyphosate-treated, glyphosate resistant soybean. Weed, J; MARVEL, J.T. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. **Journal Agricultural and Chemistry**, v.25, p.723-729, 1977.

SANTOS, E.L. dos; PÓLA, J.N.; BARROS, A.S. do R.; PRETE, C.E.C. Qualidade fisiológica e composição química das sementes de soja com variação na cor do tegumento. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.29, n.1, p.20-26, jan./fev. 2007.

SHANER, D. L.; NADLER-HASSAR, T.; HENRY, H. B.; KOGER, C. H. A rapid *in vivo* shikimate accumulation assay with excised leaf discs. **Weed Science**, v.53, p.769–774, 2005.

SINGH, B. K.; SHANER, D. L. Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants. **Weed Technology**, v.12, p.527-530, 1998.

SINGH, S.A.; CHRISTENDAT, D. Structure of Arabidopsis dehydroquinase dehydratase-shikimate dehydrogenase and implications for metabolic channeling in the shikimate pathway. **Biochemistry**, v.45, p.7787-7796, 2006.

STEINRUCKEN, H. C.; AMRHEIN, N. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl shikimic acid-2-phosphate synthetase. **Biochemistry and Biophysical Research Communications**, v.94, p.1207–1212, 1980.

SHAN, D. M.; HORSCH, R. B.; KLEE, H. J. Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. **Science**, v. 233, p.78-81, 1986.

SHARMA, H.S.S. Effect of glyphosate treatment on lignification of fibers of some flax cultivars. **Tests of Agrochemicals and Cultivars**, v.7, p.114-115, 1986.

STRACK, D. Phenolic metabolism. In: Dey, P.M. and Harborne, J.B (eds.). **Plant Biochemistry**. Academic Press: San Diego/ London. p. 387-416, 1997.

SWANSON, B.G.; HUGHES, J.S.; RASMUSSEN, H.P. Seed microstructure: review of water inhibition in legumes. **Food Microstructure**, v.4, p.115-124, 1985.

TAVARES, D.Q.; MIRANDA, M.A.C.; UMINO, C.Y.; DIAS, G.M. Características estruturais do tegumento de sementes permeáveis e impermeáveis de linhagens de soja, *Glycine max* (L.) Merrill. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.10, n.1, p.147-153, jan./mar. 1987.

TILLMANN, M.A.A.; MIRANDA, D.M. Bioensaios na detecção e quantificação de sementes de soja geneticamente modificada resistente ao glifosato. **Pelotas: Editora Universitária**. Universidade Federal de Pelotas. 71p. 2005.

TALBOT AR, SHIAW MH, HUANG JS, YANG SF, GOO TS, WANG SH, CHEN CL, SANFORD TR. Acute Poisoning with a Glyphosate Surfactant Herbicide (Roundup): A series of 9 cases. **Human and Experimental Toxicology**, v. 10(1), p. 1-8, 1984.

VIDAL, R. A.; LAMENGO, F. P.; TREZZI, M. M. Diagnóstico da resistência aos herbicidas em plantas daninhas. **Planta daninha**. v. 24, n. 3, Viçosa, Jul./Set. 2006.

YAMADA, T.; CASTRO, P.R.C. Efeitos do glifosato nas plantas: implicações fisiológicas e agronômicas. **International Plant Nutrition Institute**. Piracicaba: Informações Agronômicas, 24p. (Boletim Técnico 119), 2007.

CAPÍTULO I

LIGNIFICAÇÃO E ACÚMULO DE CHIQUIMATO EM PLANTAS DE SOJA CONVENCIONAL E TRANSGÊNICA RR APÓS APLICAÇÃO DO HERBICIDA GLIFOSATO

resumo: Sintomas de fitotoxicidade causados pelo glifosato em cultivares de soja transgênicas tem sido relatados por agricultores e pesquisadores da área. A inserção do gene de resistência a esse herbicida ocorre na via do chiquimato, responsável pela síntese de lignina. Estudos indicam que plantas suscetíveis ao glifosato acumulam chiquimato em seus tecidos. Neste trabalho, objetivou-se avaliar o conteúdo de chiquimato e os teores de lignina em plantas de soja transgênica e convencional submetidas à pulverização com o herbicida glifosato. Os ensaios foram conduzidos em casa de vegetação e laboratório. Foi analisada a cultivar transgênica (BRS 242 RR) e sua respectiva cultivar parental (Embrapa 48), cedidas pela Embrapa Soja (Londrina, PR). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com quatro repetições para cada tipo de avaliação. As pulverizações foram realizadas nos estádios de desenvolvimento V3, na dosagem de 2L/ha^{-1} . Foram determinados os teores de lignina no caule e nas folhas e concentração de chiquimato nas folhas. As análises foram realizadas 3 dias após aplicação do herbicida (DAA) e no estágio R7, onde também verificou-se a biomassa seca de raízes e parte aérea. Da análise dos resultados foi possível observar o aumento da lignificação nas plantas no estágio R7, tanto no caule quanto nas folhas. Nessas plantas, o glifosato causou redução no peso seco e na lignificação da cultivar transgênica (BRS 242 RR). A cultivar convencional por sua vez acumulou chiquimato após a aplicação do herbicida, evidenciando sua sensibilidade ao herbicida.

Palavras-chave: lignina, chiquimato, glifosato, soja RR.

1. INTRODUÇÃO

Os sintomas macroscópicos da fitotoxicidade ao glifosato são lentos. A morte de uma planta não transgênica, injuriada, ocorre vários dias após sua aplicação. Todavia, alguns aspectos bioquímicos podem ser verificados em poucas horas. Sem dúvida, o acúmulo do chiquimato é uma consequência fisiológica imediata da injúria causada pelo herbicida, o que pode se tornar útil na rápida detecção de tecidos vegetais afetados (FRANZ et al., 1997; DUKE et al., 2003; KREMER et al., 2005). Fato digno de nota são as constatações de SINGH & SHANER (1998) de que cultivares de soja transgênica, capazes de expressar suficientemente o gene CP4-EPSPS, não acumulam chiquimato quando tratadas com glifosato.

A EPSP sintase atua na via do ácido chiquímico, responsável pela síntese de aminoácidos aromáticos essenciais, como a fenilalanina e a tirosina. Estes aminoácidos, além de constituírem proteínas importantes para o desenvolvimento da planta, participam da via dos fenilpropanoides, principal caminho para a síntese de compostos fenólicos, dentre eles os monolignóis, precursores da lignina. Assim, ao obstruir a via do ácido chiquímico, pela inibição da EPSP sintase, o glifosato pode afetar não só a produção de proteínas de soja convencional, mas também a via metabólica geradora de lignina. Já, para o caso da soja transgênica não existem informações neste contexto.

Sob determinadas condições e formulações do sal de glifosato utilizado no controle das plantas daninhas, a soja resistente ao glifosato também pode sofrer injúrias ocasionadas pelo herbicida (REDDY & ZABLATOWING, 2003). Contudo, são escassos os trabalhos que relatam a ocorrência de reduções na produtividade de grãos de soja resistente ao glifosato, em decorrência da aplicação desse herbicida em pós-emergência na cultura. Resultados obtidos por esses autores indicaram injúrias às plantas de soja, com valores de 29 a 38%, dois dias após a aplicação; todavia, constataram recuperação total das plantas com o desenvolvimento da cultura.

Como o glifosato é um herbicida que interfere na via de síntese de aminoácidos aromáticos e, por sua vez, na síntese de lignina, as determinações deste polímero bem como o acúmulo de chiquimato, em plantas de soja convencionais e transgênicas, poderão estabelecer possíveis diferenças existentes entre as duas cultivares. Essas observações poderão indicar os efeitos causados pelo herbicida glifosato na presença e na ausência do gene modificado.

A questão central deste trabalho foi avaliar se alteração da EPSPS se resume apenas à sua resistência ao glifosato ou se ela também interfere na via da qual faz parte, na presença ou ausência do herbicida, ao longo do desenvolvimento da planta de soja. Nesta linha de raciocínio, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a lignificação e o teor de chiquimato no caule e na folhas dos cultivares Embrapa-58 (convencional parental) e BRS 242 RR (transgênica) após tratamento, ou não, com glifosato.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material e condução experimental

Os experimentos foram conduzidos no segundo semestre de 2008, em casa de vegetação e as análises foram realizadas no Laboratório de Bioquímica Vegetal, ambos pertencentes à Universidade Estadual de Maringá, em Maringá, Paraná.

Foram utilizadas sementes de duas cultivares de soja (*Glycine max* L. Merrill), produzidas na safra 2007/2008. Uma delas não modificada geneticamente (Embrapa 48) e outra, modificada geneticamente (BRS 242 RR), portadora do gene para a resistência ao herbicida glifosato, ambas registradas, protegidas e cedidas pela Embrapa Soja - Londrina, Paraná.

O glifosato de uso comercial utilizado foi o herbicida Roundup Ready[®], 360 g L⁻¹ do equivalente ácido (e.a.), 480 g L⁻¹ de sal de isopropilamina *N*-(fosfonometil) glicina (glyphosate) e 684 g L⁻¹ de ingredientes inertes, adquirido junto a COCAMAR (Maringá, PR). O chiquimato, os sais de tampões, sais da

solução nutritiva e os demais reagentes foram adquiridos da Sigma[®], Merck[®], Reagen[®] e Nuclear[®].

2.2. Sistema experimental

Foram utilizados vasos plásticos com 5 L de capacidade. O solo utilizado para preenchimento dos vasos apresentava textura arenosa, com 920 g kg⁻¹ de areia; 30 g kg⁻¹ de argila; 7,36 g dm⁻³ de C e pH (H₂O) = 6,2. Após o tratamento com fungicida Derosal Plus[®] (carbendazim+Thiram), as sementes foram dispostas em número de dez sementes por vaso, a um centímetro de profundidade. Depois de uma semana foi realizado o desbaste. Os vasos foram irrigados diariamente de forma a manter o solo úmido, e mantidos livres de plantas daninhas por meio de capinas manuais.

O tratamento foi realizado quando as plantas de soja apresentavam a segunda folha trifoliolada completamente desenvolvida (estádio V3 da escala de FEHR & CAVINESS, 1977), através da aplicação do herbicida comercial, na dose de 2 L ha⁻¹, e volume de calda de 150 L ha⁻¹, com o auxílio de um pulverizador costal e pressão constante à base de CO₂, equipado com pontas Teejet 110 02 – pressão de 30 lb pol⁻², sendo que a altura da aplicação foi 50 cm acima da borda dos vasos.

Foram estabelecidos dois sistemas experimentais. Num primeiro ensaio, as avaliações foram realizadas três DAA, utilizando-se para as análises as folhas (2º trifólio) e o caule das plantas. No segundo ensaio, as análises foram realizadas após as plantas atingirem sua maturidade fisiológica, no estágio R7, já no final do ciclo. Nos dois ensaios foram determinados os teores de lignina do caule e das folhas, e o conteúdo foliar de ácido chiquímico.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, sendo realizadas quatro repetições para cada tipo de avaliação. Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial, 2x2. Para cada ensaio foi utilizado uma testemunha, onde se pulverizou água, sem a adição dos tratamentos em estudo.

2.3. Biomassa seca da parte aérea e das raízes das plantas de soja

Após atingirem o estágio de maturidade fisiológica, as plantas foram cortadas rente ao solo e as raízes foram cuidadosamente retiradas do solo. Após lavagem com água corrente, parte aérea e raízes foram acondicionadas em sacos de papel e levadas para secar em estufa com circulação forçada de ar a 65 – 70 °C. Após secagem do material por período suficiente para que o peso se mantivesse constante, foram tomados os pesos da matéria seca por pesagem em balança de precisão.

2.4. Determinação do teor de lignina

A extração da lignina foi efetuada, em gral de porcelana, triturando 0,3 g de matéria seca, proveniente dos caules e das folhas, em 7 mL de tampão fosfato de sódio e potássio (50 mM, pH 7,0) e transferindo o material para um tubo de centrífuga de 15 mL (FERRARESE et al., 2002). Cada tubo constituía uma repetição. Em seguida foi efetuada a centrifugação, a 1.500 g, por 4 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o material restante submetido a mais duas centrifugações com 7,0 mL da mesma solução tampão. O material foi ressuspensionado em 7,0 mL de Triton X-100 (dissolvido a 1% no tampão fosfato) e centrifugado, por duas vezes consecutivas, eliminando-se o sobrenadante. O precipitado foi ressuspensionado com 7 mL de solução de NaCl 1 M (preparado no tampão) e centrifugado. O sobrenadante foi eliminado, repetindo a operação por mais uma vez. O precipitado restante foi ressuspensionado com 7,0 mL de água destilada e centrifugado por 4 minutos a 1.500 g, desprezando-se o sobrenadante. Em seguida, o precipitado obtido anteriormente foi ressuspensionado com 7,0 mL de acetona e centrifugado por 4 minutos a 1.500 g, por duas vezes consecutivas, sendo o sobrenadante eliminado. O precipitado foi acondicionado em estufa, a 60°C, durante 24 horas, e resfriado em dessecador a vácuo. O precipitado obtido representa a parede celular, isenta de proteínas (CHEN et al., 2000). Foi acondicionado em tubos de centrífuga com rosca, 0,150 g do material obtido, juntamente com a mistura reativa de 1,2 mL de ácido tioglicólico e 6 mL de HCl 2 M, sendo aquecido por 4 horas a 95°C, em banho-maria. Após a reação, o material foi centrifugado a 1.500 g, durante 15 minutos. O precipitado foi lavado

três vezes com água destilada e o produto da reação, o ácido lignotioglicólico (LTGA), foi extraído com 7,0 mL de NaOH 0,5 M, a 30°C, por 18 horas, em banho maria com agitação de 115 oscilações · min⁻¹. A mistura resultante foi centrifugada a 1.500 g, durante 10 minutos, e o sobrenadante guardado. O precipitado obtido anteriormente foi lavado novamente com 3,0 mL de NaOH 0,5 M, centrifugado e o sobrenadante adicionado ao anterior. O sobrenadante obtido foi acidificado com 1,8 mL de HCl concentrado e acondicionado em freezer, por uma noite, para precipitar o LTGA. O material foi centrifugado e o precipitado lavado por duas vezes com água destilada, eliminando-se o sobrenadante. O LTGA obtido foi acondicionado em estufa, a 60°C, durante 24 horas sendo, em seguida, armazenado em dessecador a vácuo, até análise. A determinação do LTGA foi efetuada em espectrofotômetro a 280 nm, contra branco apropriado.

2.5. Extração do chiquimato

O tecido vegetal proveniente das folhas foi macerado em gral com HCl 0,25 N (1:3 peso/volume) conforme metodologia descrita por LA ROSSA & SCHLOSS (1984), seguindo as modificações contida em BONINI et al. (2009). A amostra foi centrifugada a 1.200 g, por 10 minutos, e o sobrenadante separado para as análises.

O chiquimato foi quantificado por espectrofotometria (SINGH & SHANER, 1998). Alíquotas de 50 µL da amostra foram adicionadas em 0,5 mL de ácido periódico a 1% para oxidação do chiquimato. Após três horas a reação foi interrompida pela adição de 0,5 mL de NaOH 1N e 0,3 mL de glicina 0,1 M. As amostras foram homogeneizadas e analisadas imediatamente em espectrofotômetro, a 380 nm. A concentração de chiquimato foi expressa em µg g⁻¹ matéria fresca. Uma curva padrão baseada nas áreas dos picos foi efetuada usando conhecidas concentrações (2 a 10 µg mL⁻¹) de chiquimato.

2.6. Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, sendo realizadas quatro repetições para cada tipo de avaliação. Os tratamentos foram

dispostos em esquema fatorial, 2x2. Em seguida, procedeu-se à análise de variância dos dados e as médias foram comparadas pelo teste de F ($p < 0,05$). A análise dos dados foi realizada com auxílio do programa SISVAR, da Universidade Federal de Lavras – MG.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Efeitos do glifosato na lignificação e no peso seco das plantas

Como pode ser observado na Tabela 1, para as duas cultivares o tratamento com glifosato não causou diferenças significativas, pelo Teste F a 5% de probabilidade, em relação aos teores de lignina do caule, tanto no controle, quanto no tratamento, aos 3 DAA. No entanto, ocorreu diferença significativa entre as duas cultivares, sendo que a cultivar transgênica apresentou decréscimo no teor de lignina, em relação a cultivar convencional. Essa diferença foi observada na ausência e na presença do glifosato, sendo que nos dois casos o decréscimo foi de aproximadamente 24%.

Tabela 1 - Teor de lignina (mg LTGA g parede⁻¹) do caule das cultivares Embrapa 48 e BRS 242 RR, no estágio V3, submetidas ou não ao tratamento com glifosato

	Controle	Tratamento
Embrapa 48	16,75 Aa	16,89 Aa
BRS 242 RR	12,72 Bb	12,90 Bb

CV 7,57

¹ Médias seguidas da mesma letra maiúscula, na linha, ou da mesma letra minúscula, na coluna, não difere entre si de acordo com o teste F, a 5% de probabilidade.

A mesma análise realizada no final do ciclo (R7), revelou resultados diferentes daqueles obtidos logo após a aplicação do glifosato.

Como pode ser observado na tabela 2, o conteúdo de lignina aumentou em todas as variáveis analisadas, porém não houve diferença entre as médias da

cultivar convencional em relação a cultivar transgênica. No entanto, houve uma significativa redução (34%) no teor de lignina na cultivar RR que recebeu a aplicação do glifosato. Não foi possível avaliar a cultivar convencional, submetida ao tratamento com glifosato, pois as plantas morreram devido à suscetibilidade ao herbicida.

Tabela 2 - Teor de lignina (mg LTGA g parede⁻¹) do caule das cultivares Embrapa 48 e BRS 242 RR, no estágio R7, submetidas ou não ao tratamento com glifosato

	Controle	Tratamento
Embrapa 48	50,339 a	NA
BRS 242 RR	51,882 Aa	32,46 B

CV 5,38

¹ Médias seguidas da mesma letra maiúscula, na linha, ou da mesma letra minúscula, na coluna, não difere entre si de acordo com o teste F, a 5% de probabilidade.

NA: não avaliado

A redução da lignificação tem sido reportada nas plantas submetidas à ação do glifosato, devido seu modo de ação, como discutido anteriormente. Dados obtidos por MARCHIOSI et al. (2009) demonstram consistência com a hipótese de que o glifosato pode inibir a síntese de lignina devido à diminuição de derivados da via dos fenilpropenóides. No controle, o teor de lignina da cultivar transgênica aumentou em 75% com o tempo de desenvolvimento, e na presença do glifosato esse aumento foi 15% menor (tabela 1 e 2).

No presente trabalho, o teor de lignina foi também determinado nas folhas das plantas de soja. Como é possível observar na Tabela 3, a concentração de lignina não sofreu alterações decorrentes da aplicação do glifosato em nenhuma dos cultivares avaliadas. É possível que isto tenha sido decorrente da reduzida lignificação deste tecido e, ainda, ao curto período de tempo entre a aplicação e a realização das análises.

Os experimentos realizados com um intervalo de tempo maior após o tratamento indicaram redução no teor de lignina nas folhas da cultivar BRS 242

RR (Tabela 4). Esse decréscimo foi de, aproximadamente, 28% e demonstrou comportamento similar ao observado no caule dessas mesmas cultivares.

Tabela 3 - Teor de lignina (mg LTGA g parede⁻¹) das folhas das cultivares Embrapa 48 e BRS 242 RR, no estádio V3, submetidas ou não ao tratamento com glifosato

	Controle	Tratamento
Embrapa 48	1,568 Aa	1,541 Aa
BRS 242 RR	1,625 Aa	1,648 Aa

CV 4,68

¹ Médias seguidas da mesma letra maiúscula, na linha, ou da mesma letra minúscula, na coluna, não difere entre si de acordo com o teste F, a 5% de probabilidade.

Tabela 4 - Teor de lignina (mg LTGA g parede⁻¹) das folhas das cultivares Embrapa 48 e BRS 242 RR, no estádio R7, submetidas ou não ao tratamento com glifosato

	Controle	Tratamento
Embrapa 48	2,140 a	NA
BRS 242 RR	2,832 Aa	2,027 B

CV 13,95

¹ Médias seguidas da mesma letra maiúscula, na linha, ou da mesma letra minúscula, na coluna, não difere entre si de acordo com o teste F, a 5% de probabilidade.

NA: não avaliado

Além de afetar a lignificação, o glifosato causou sintomas, embora discretos, de clorose na cultivar transgênica, logo após a sua aplicação. Contudo, esses sintomas não podem ser comparados àqueles ocorridos na cultivar convencional, que não apresenta o gene de resistência. Ao contrário da sua parental geneticamente modificada, os danos causados pelo herbicida se acentuaram com o passar do tempo e à senescência total das plantas 15 DAA.

Embora a causa exata do comportamento da lignina neste mecanismo ainda seja desconhecida (COGHLAN, 1999), possivelmente as alterações dos teores na planta sejam devido ao fato dos precursores da molécula de lignina serem formados na via do chiquimato, que é inibido pelo herbicida glifosato em plantas convencionais.

O glifosato pode ser parcialmente metabolizado a AMPA (ácido aminometilfosfônico) em plantas de soja RR, o qual tem sido detectado em drenos metabólicos, incluindo sementes e folhas (ARREGUI et al, 2003; DUKE et al, 2003). Este metabolito é conhecido por seu efeito fitotóxico em plantas de soja transgênica, resultando em redução de clorofila e biomassa (REDDY et al., 2004), podendo ser o responsável pelos danos observados nas plantas RR.

Além do teor de lignina, a cultivar transgênica apresentou redução no peso seco de raízes e da parte aérea (Tabela 5 e 6). A biomassa seca das raízes teve um decréscimo de aproximadamente 16%, já na parte aérea essa diminuição chegou a 27%.

Tabela 5 – Biomassa seca de raízes (g planta⁻¹) de plantas de soja, no estágio R7, submetidas ou não ao tratamento com glifosato

Cultivar	Controle	Tratamento
Embrapa 48	7,68 a	NA
BRS 242 RR	8,24 Aa	6,88 B
CV 8,8		

¹ Médias seguidas da mesma letra maiúscula, na linha, ou da mesma letra minúscula, na coluna, não difere entre si de acordo com o teste F, a 5% de probabilidade.
NA: não avaliado

Tabela 6 – Biomassa seca da parte aérea (g planta⁻¹) de plantas de soja, no estágio R7, submetidas ou não ao tratamento com glifosato

Cultivar	Controle	Tratamento
Embrapa 48	13,54 a	NA
BRS 242 RR	12,62 Aa	9,12 B
CV 10,49		

¹ Médias seguidas da mesma letra maiúscula, na linha, ou da mesma letra minúscula, na coluna, não difere entre si de acordo com o teste F, a 5% de probabilidade.
NA: não avaliado

A importância da lignificação está associada principalmente ao suporte mecânico dos órgãos das plantas (BOUDET et al., 2003), permitindo um crescimento e desenvolvimento adequado do vegetal. A ação do glifosato no processo de lignificação pode estar relacionada com a alteração no desenvolvimento dessas plantas, levando à redução da biomassa seca.

3.2. Efeitos do glifosato no conteúdo de chiquimato

Para a detecção do chiquimato, presente nas folhas de plantas de soja, foi aplicada a técnica de espectrofotometria óptica.

A quantificação espectrofotométrica de chiquimato nas folhas de soja convencional (Embrapa 48) e resistente ao herbicida (BRS 242 RR), 3 DAA do herbicida glifosato, pode ser observado na Tabela 6. Controles, sem aplicação de glifosato, foram feitos para as devidas comparações. Os resultados indicam que as quantidades acumuladas de chiquimato nas folhas de soja convencional foram maiores, quando comparadas com a soja transgênica, após aplicação do glifosato. O chiquimato acumulou significativamente ($p < 0,05$) na cultivar Embrapa 48 após o tratamento, alcançando uma concentração cinco vezes maior que o controle. Esse resultado indica a sensibilidade da planta ao glifosato, o qual interrompeu a atividade da enzima EPSPS, causando o acúmulo de seu substrato.

Como é notório, a inserção do gene de resistência ao glifosato permite que a via do chiquimato não sofra a ação do herbicida devido à alta atividade da EPSPS e sua baixa afinidade ao mesmo, resultando na rápida utilização do chiquimato (DELANNAY et al., 1995). CAKMAK et al. (2009) relataram que a aplicação de doses crescentes de glifosato em plantas não modificadas geneticamente causou um aumento significativo nas concentrações de chiquimato, sendo esse aumento mais evidente nas partes jovens das plantas

Apesar de sido bem menor do que o esperado, os experimentos indicaram pequeno acúmulo de chiquimato na soja transgênica. Isto remete às reações químicas envolvidas na técnica utilizada. É possível que o periodato, no meio de

reação, oxide outros ácidos fenólicos presentes nos tecidos, interferindo nos resultados obtidos nestas condições experimentais.

Tabela 7 - Conteúdo de chiquimato ($\mu\text{g g folha}^{-1}$) das folhas dos cultivares Embrapa 48 e BRS 242 RR, no estágio V3, submetidas ou não ao tratamento com glifosato

	Controle	Tratamento
Embrapa 48	247,83 Ab	1203,49 Aa
BRS 242 RR	274,23 Ab	406,21 aB

CV 8,73

¹ Médias seguidas da mesma letra maiúscula, na linha, ou da mesma letra minúscula, na coluna, não difere entre si de acordo com o teste F, a 5% de probabilidade.

Entretanto, no estágio R7 (Tabela 7), o teor de chiquimato na soja RR se manteve constante, após a aplicação do glifosato, sugerindo que o aumento observado na primeira avaliação se deve realmente à concentração de chiquimato, descartando possíveis interferências.

Tabela 8 - Conteúdo de chiquimato ($\mu\text{g g folha}^{-1}$) das folhas dos cultivares Embrapa 48 e BRS 242 RR, no estágio R7, submetidas ou não ao tratamento com glifosato

	Controle	Tratamento
Embrapa 48	208,706 b	NA
BRS 242 RR	216,911 Ab	298,307 A

CV 9,54

¹ Médias seguidas da mesma letra maiúscula, na linha, ou da mesma letra minúscula, na coluna, não difere entre si de acordo com o teste F, a 5% de probabilidade.
NA: não avaliado

4. CONCLUSÕES

- Os teores de lignina do caule e das folhas aumentaram, significativamente, nas plantas avaliadas no estágio R7, indicando que o processo de lignificação está diretamente relacionado com o desenvolvimento da planta.
- Ocorreu uma resposta diferencial para a lignificação do caule entre as cultivares estudadas no estágio V3, sendo menor na cultivar transgênica. Isto sugere que a modificação genética presente nessa cultivar pode interferir no processo de lignificação de tecidos jovens.
- O glifosato causou redução dos teores de lignina do caule e das folhas no final do ciclo de desenvolvimento das plantas, as quais apresentaram ainda diminuição de biomassa seca em suas raízes e na parte aérea. Este fato pressupõe que a cultivar transgênica sofreu injúrias decorrentes de possíveis efeitos secundários causados pelo herbicida ou pela ação fitotóxica de seu metabólito (AMPA).
- A cultivar convencional acumulou chiquimato após a aplicação do herbicida, confirmando sua sensibilidade ao glifosato.

REFERÊNCIAS

[BONINI, E.A.](#); FERRARESE, M.L.L. ; MARCHIOSI, R. ; ZONETTI, P.C. ; FERRARESE-FILHO, OSVALDO . A simple chromatographic assay to discriminate between glyphosate-resistant and susceptible soybean (*Glycine max*) cultivars. **European Journal of Agronomy**, v. 31, p. 173-176, 2009.

BOUDET, A. L.; KAJITA, S.; GRIMA-PETTENATI, J.; GOFFNER, D. Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses. **Trends in Plant Science**. Disponível em: <http://plants.trends.com>. Acesso em: ago. de 2009.

BRENBROOK, C. M. Troubled times amid comercial success for roundup ready soybeans: glyphosate efficacy is slipping and unstable transgene expression erodes plant pefenses and yields. **Ag Biotech Tech Infonet Technical**, n. 4, 2001, 69p. Disponível em: <<http://www.biotech-info.net/troubledtimes.html>>. Acesso em: set. de 2009.

CAKMAK, I. et al. Glyphosate reduced seed and leaf concentrations of calcium, manganese, magnesium, and iron in non-glyphosate resistant soybean. **Europe Journal of Agronomy**, v.31, p.114-119, 2009.

CHEN, M.; SOMMER, A.J.; McCLURE, J.W. Fourier transform-IR determination of protein contamination in thioglycolic acid lignin from radish seedlings, and improved methods for extractive-free cell wall preparation. **Phytochemical Analisis**, v. 11, p. 153-159, 2000.

COGHLAN, A. (1999) Splitting headache. Monsanto's modified soya beans are cracking up in the heat. **New Scientist**, 20 Nov. 1999, p. 25.

DELANNAY, T.T.; BAUMAN, D.H.; BEIGHLEY, M.J.; BUETTNER, H.D.; COBLE, M.S.; DEFELICE, C.W.; DERTING, T.J.; DIEDRICK, J.L.; GRIFFIN, E.S.; HAGOOD, F.G.; HANCOCK, S.E.; HART, B.J.; LAVALLEE, M.M.; LOUX, W.E.; LUESCHEN, K.W.; MATSON, C.K.; MOOTS, E.; MURDOCK, A.D.;

NICKELL, M.D.K.; OWEN, E.H.; PASCHAL II, L.M.; PROCHASKA, P.J.; RAYMOND, D.B.; REYNOLDS, W.K.; RHODES, F.W.; ROETH, P.L.; SPRANKLE, L.J.; TAROCHIONE, C.N.; TINIUS, R.H.; WALKER, L.M.; WAX, W.; PADGETTE, S.R. Yield evaluation of a glyphosate-tolerant soybean line after treatment with glyphosate. **Crop Science**, v.35, p.1461-1467, 1995.

DUKE, S.O.; RIMANDO, A.G.; PACE, P.F.; REDDY, K.N.; SMEDA, R.J. Isoflavone, glyphosate and aminomethylphosphonic acid levels in seeds of glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.340-344, 2003.

FEHR, W.R.; CAVINESS, C.E. **Stage of soybean development special report 80**. Ames, Iowa, Cooperative Extension Service. Iowa State University,. 11p. 1977.

FERRARESE, M. L. L.; ZOTTIS, A.; FERRARESE-FILHO, O. Protein-free lignin quantification in soybean (*Glycine max*) roots. **Biologia Bratislava**, Bratislava, v. 57, n. 4, p. 541-543, 2002.

FRANZ, J.E.; MAO, M.K.; SIKORSKI, J.A. Glyphosate's molecular mode of action. In: Glyphosate. A unique global herbicide. **American Chemical Society**. Monograph 189, 1997. p.521-615.

KREMER, R.J.; MEANS, N.E.; KIM, S. Glyphosate affects soybean root exudation and rhizosphere micro-organisms. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v.85, p.1165-1174, 2005.

LaROSSA, R.A.; SCHLOSS, J.V. The sulfonylurea herbicide sulfometuron methyl is an extremely potent and selective inhibitor of acetolactate synthase in *Salmonella typhimurium*. **Journal of Biological Chemistry**, v.259, p.8753-8757, 1984.

MARCHIOSI, R.; FERRARESE FILHO, M. L.; BONINI, E. A.; FERNANDES, N. G; FERRO, A. P.; FERRARESE FILHO, O. Glyphosate-induced metabolic changes in susceptible and glyphosate-resistant soybean (*Glycine max* L.) Roots. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 21, p. 155-164, 2009

REDDY, K. N.; ZABLOTOWICZ, R. M. Glyphosate-resistant soybean response to various salts of glyphosate and glyphosate accumulation in soybean nodules. **Weed Science**, v.51, p.496–502, 2003.

SINGH, B. K.; SHANER, D. L. Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants. **Weed Technology**, v.12, p.527-530, 1998.

CAPÍTULO II

CHIQUIMATO E CHIQUIMATO DESIDROGENASE NAS FOLHAS DE SOJA CONVENCIONAL E TRANSGÊNICA, SUBMETIDAS AO GLIFOSATO

resumo: A soja, espécie de grande importância econômica, foi uma das primeiras plantas cultivadas a ser alvo da transgenia, tecnologia que facilita a introdução pontual de genes de interesse em um determinado genótipo. Uma das primeiras aplicações práticas dessa tecnologia foi a introdução em seu genoma do gene que codifica a CP4 EPSPS de *Agrobacterium* sp., conferindo-lhe tolerância ao glifosato e alta eficiência catalítica. Glifosato é um herbicida que controla uma gama enorme de plantas daninhas, inibindo a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) que catalisa a condensação do chiquimato com fosfoenolpiruvato, etapa da via do chiquimato. O efeito bioquímico mais evidente da ação do glifosato é o acúmulo de chiquimato em cultivares de soja convencional, o que não ocorre nas cultivares transgênicas. Com isto há possibilidade deste metabólito ser utilizado como substrato pela enzima chiquimato desidrogenase (SDH). Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do glifosato no acúmulo de chiquimato e na atividade da (SDH) nas folhas de soja, convencional e transgênica, submetidas à ação do herbicida glifosato. Para isto, foi aplicada a técnica espectrofotométrica na quantificação de chiquimato e atividade da SDH em folhas de soja convencional e transgênica, submetidas ao tratamento com glifosato. O ensaio experimental foi conduzido em casa de vegetação e as avaliações realizadas no laboratório. As avaliações se iniciaram imediatamente após a pulverização, caracterizando o tempo zero, e se estenderam por cinco dias, sendo utilizadas as folhas do 2º e 3º trifólio para as análises. Foram efetuados controles, com aspersão somente de água. Nas folhas da cultivar convencional, tratada com glifosato, ocorreu crescente acúmulo de chiquimato e aumento na atividade da SDH, evidenciando que a ação do glifosato teve efeitos marcantes na via do chiquimato. Não foi constatado

acúmulo de chiquimato na cultivar resistente ao glifosato e, em geral, a atividade da enzima não foi afetada pelo herbicida.

Palavras-chave: chiquimato, soja transgênica, chiquimato desidrogenase.

1. INTRODUÇÃO

O glifosato [(*N*-fosfonometil) glicina], um herbicida altamente eficaz e de amplo espectro, tem um único modo de ação nas plantas, sendo essencialmente ativo em praticamente todas as plantas anuais e perenes. Ele age pela inibição específica da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), que catalisa um passo essencial na via biossintética dos aminoácidos aromáticos. EPSPS catalisa a reação entre chiquimato-3-fosfato e fosfoenolpiruvato para produzir 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato (EPSP) e fosfato inorgânico.

EPSP é um precursor para a formação de corismato, a molécula base na biossíntese de todos os aminoácidos aromáticos. Desta forma, a inibição da EPSP sintase reduz a biossíntese dos aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina e fenilalanina), que leva a vários distúrbios metabólicos, incluindo diminuição da síntese protéica, inibição da formação de compostos secundários e desregulação da via do chiquimato.

Quando o glifosato inibe a EPSPS, chiquimato, o substrato desfosforilado da enzima, acumula-se em folhas, flores e raízes (BRESNAHAN et al., 2003). O acúmulo de chiquimato e de alguns derivados de benzoato tem sido considerado como efeito primário do glifosato nas plantas suscetíveis. A desregulação da via do chiquimato pode ser acompanhada por um distúrbio metabólico geral que inclui a via dos fenilpropenóides, outra importante rota metabólica, devido a sua participação na síntese de compostos fenólicos e uma ampla variedade de produtos secundários, incluindo lignina (HERMANN et al., 1999).

Devido ao fato de o glifosato ser um herbicida de amplo espectro, ele não discrimina espécies cultivadas de plantas indesejáveis. Isto limita o seu uso em certas aplicações na agricultura, o que tem estimulado a busca por culturas resistente. A soja (*Glycine max* L. Merril) resistente ao glifosato (GR), comercialmente conhecida como soja RR (Roundup® Ready), não é afetada pelo herbicida devido a expressão de uma EPSPS glifosato resistente que possui alta atividade catalítica na presença do glifosato (ARAÚJO et al., 2003).

A expressão da EPSPS glifosato resistente, mantém os níveis normais dos aminoácidos aromáticos na soja RR, quando submetida ao herbicida. Isto também previne os distúrbios metabólicos causados pela inibição da via do chiquimato. Com base nisso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos do glifosato nas vias do chiquimato (acúmulo de chiquimato e atividade da chiquimato desidrogenase) nas folhas de plantas de soja susceptível e resistente ao glifosato, em diferentes períodos após sua aplicação.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material e condução experimental

Em todos os experimentos foram utilizadas sementes de duas cultivares de soja (*Glycine max*), sendo uma não modificada geneticamente (BRS 133) e outra, parental, modificada geneticamente (BRS 245 RR), portadora do gene para a tolerância ao herbicida glifosato, ambas registradas, protegidas e cedidas pela Embrapa Soja - Londrina, Paraná.

O glifosato de uso comercial utilizado foi adquirido junto a Cocamar de Maringá, no Paraná. O chiquimato, os sais de tampões e os demais reagentes foram adquiridos da Vetec[®] e da Sigma[®].

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Bioquímica Vegetal, do Departamento de Bioquímica, e na casa de vegetação do Departamento de Agronomia, da Universidade Estadual de Maringá, Paraná.

Para execução dos experimentos foram utilizados vasos plásticos com 5 L de capacidade. O solo utilizado para preenchimento dos vasos foi de textura arenosa, com 920 g kg⁻¹ de areia; 30 g kg⁻¹ de argila; 7,36 g dm⁻³ de C e pH (H₂O) = 6,2. Após o tratamento com fungicida Derosal Plus[®] (Carbendazim + Thiram) foram semeadas dez sementes por vaso a uma profundidade de 1 cm. Os vasos foram mantidos em bancadas durante todo o período de atividade experimental, com irrigação diária até o encerramento das avaliações. Depois de uma semana foi efetuado o desbaste, deixando seis plantas por vaso. Quatro

semanas após a semeadura foi aplicado o herbicida, em plantas BRS 133 e BRS 245 RR, na dose de 2 L ha⁻¹, e volume de calda de 150 L ha⁻¹, correspondente a uma concentração de 14,2 mM do equivalente ácido, com o auxílio de um pulverizador costal e pressão constante à base de CO₂, equipado com pontas Tjet 110 02 – pressão de 30 lb pol⁻², sendo que a altura da aplicação foi 50 cm acima da borda dos vasos. As avaliações se iniciaram imediatamente após a pulverização, caracterizando o tempo zero, e se estenderam por sete dias, sendo utilizado as folhas do 2º e 3º trifólio para as análises. Foram efetuados controles, com as variedades BRS 133 e BRS 245 RR, com aspersão somente de água.

2.2. Extração do chiquimato

As folhas foram maceradas em graal com HCl 0,25 N (1:3 peso/volume) conforme descrição contida em LA ROSSA E SCHLOSS (1984), modificada por BONINI et al. (2009). As amostras foram centrifugadas a 1200 g, por 10 minutos, e o sobrenadante separado para as análises.

2.3. Quantificação espectrofotométrica do chiquimato

O chiquimato foi quantificado por espectrofotometria, de acordo com a metodologia descrita por HENRY et al. (2007). As amostras foram diluídas de 2 a 40 vezes em água. Alíquotas de 50 µl da amostra diluída foram adicionadas em 0,5 mL de ácido periódico a 1% para oxidação do chiquimato, e a 1,3 mL de água, caracterizando-se o branco. Após três horas a reação foi interrompida pela adição de 0,5 mL de NaOH 1N e 0,3 mL de glicina 0,1 M para a formação do ácido *trans*-2-penteno-1,5- dialdeído-3-carboxílico. As amostras foram homogeneizadas e analisadas imediatamente em espectrofotômetro UV/Vis (Sanyo SP7), a 380 nm. A concentração de chiquimato foi expressa em µg g⁻¹ matéria fresca. Uma curva padrão foi efetuada utilizando conhecidas concentrações (2 a 10 µg mL⁻¹) de chiquimato.

2.4. Determinação da atividade da chiquimato desidrogenase

Para avaliar a atividade da enzima, 0,5g de folhas foram maceradas com 0,1 g de polivinilpirrolidona (PVP) em 2 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,4, contendo 2 mM de L-cisteína, 2 mM de EDTA, 8 mM de 2-mercaptoethanol. Todos os passos foram realizados a 4°C. O ensaio espectrofotométrico para medida da atividade enzimática foi efetuado em meio de reação contendo 4 mM de chiquimato e 1 mM de NADP⁺ em 0,1 M de tampão Tris-HCl, pH 9,0. A reação foi iniciada com a adição do NADP⁺ e acompanhada pela redução a 340 nm, durante 5 minutos (DIAZ et al., 1997). A atividade da chiquimato desidrogenase foi calculada usando o coeficiente de extinção de $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para NADPH, o produto da reação. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol de NADPH min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ matéria fresca.

2.5. Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, sendo realizadas quatro repetições para cada tipo de avaliação. Em seguida os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste Tukey com $P < 0,05$. A análise dos dados foi realizada com auxílio do programa GraphPad Prisma 5.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração de chiquimato foi calculada com base em análise de padrões. A Figura 1 representa a curva padrão do chiquimato obtida pela técnica espectrofotométrica. Linearidade ($R^2 = 0,995$) na curva foi observada para concentrações até $10 \mu\text{g de chiquimato mL}^{-1}$ de meio de reação.

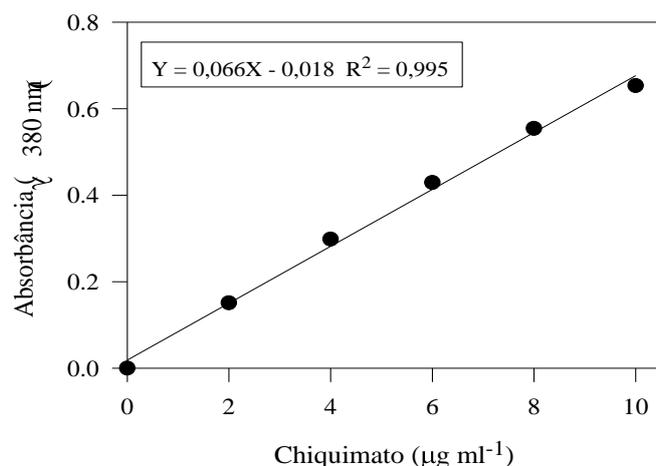


Figura 1. Curva padrão do chiquimato por espectrofotometria.

Os resultados contidos na Figura 2 revelam que a quantidade acumulada de chiquimato nas folhas de soja convencional (BRS 133) foi elevada quando comparada com seu respectivo controle. Esse acúmulo começou a ser significativo 24 horas após o tratamento, com um aumento de 1,8 vezes (188%). Porém, foi a partir de 48 horas após a aplicação do herbicida que se observou as maiores concentrações de chiquimato na cultivar convencional, sendo 3,68 (369%) vezes maiores que seu controle, mantendo uma concentração semelhante 72 horas e 96 horas após aplicação. No quinto dia, esse aumento chegou a 5,6 vezes (542%) maiores que o observado no controle. O mesmo não foi observado com a soja transgênica (BRS 245 RR), uma vez que as concentrações de chiquimato encontrada nos tratamentos, mesmo quando a análise estatística indicou diferenças significativas, não chegou a aumentar nem uma vez em relação aos respectivos controles (figura 3).

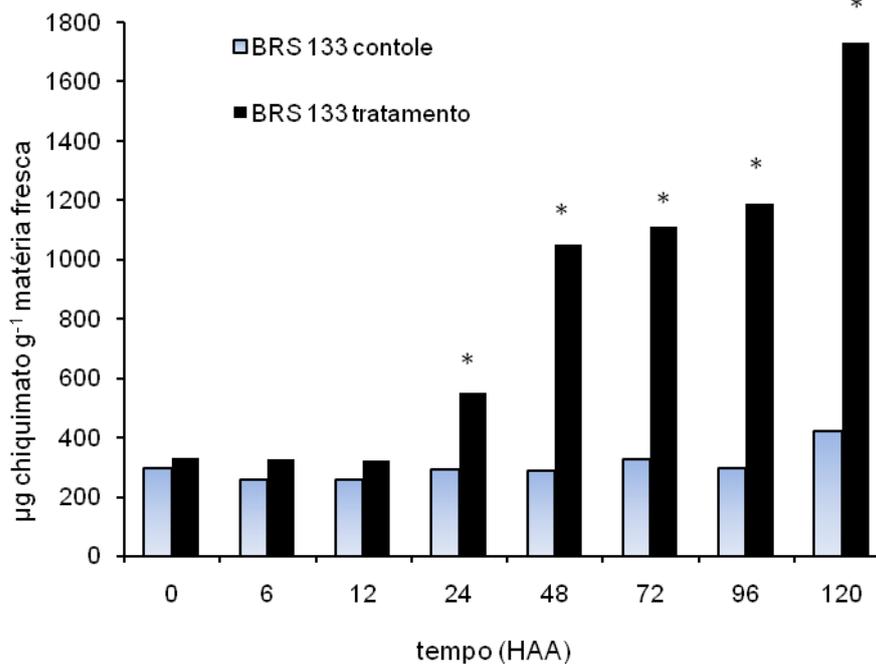


Figura 2 - Determinação espectrofotométrica de chiquimato nas folhas de soja convencional (BRS 133) tratadas ou não com glifosato. Valores médios seguidos por * nas colunas são significativos de acordo o teste de Tukey ($P < 0,05$) para os respectivos controles.

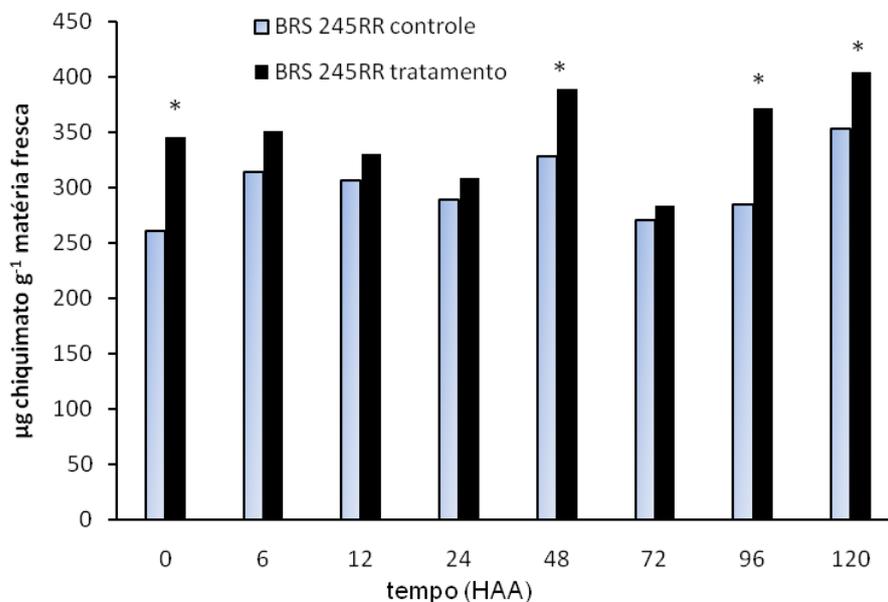


Figura 3- Determinação espectrofotométrica de chiquimato nas folhas de soja transgênica (BRS 245 RR) tratadas ou não com glifosato. Valores médios seguidos por * nas colunas são significativos de acordo o teste de Tukey ($P < 0,05$) para os respectivos controles.

A figura 4 relaciona a concentração de chiquimato nas cultivares convencional (BRS 133) e transgênica (BRS 245 RR), submetidas ao tratamento com glifosato. Observa-se, nitidamente, o acúmulo do chiquimato somente na cultivar convencional. Esse acúmulo é detectado vinte e quatro horas após aplicação do herbicida. Desse período até o final do primeiro dia, a concentração de chiquimato aumentou linearmente. Entre o primeiro e segundo dia ocorreu elevação maior (mais que o dobro) se estabilizando entre o terceiro e quarto dia. No último dia, a concentração de chiquimato atingiu o valor máximo de todo o período experimental.

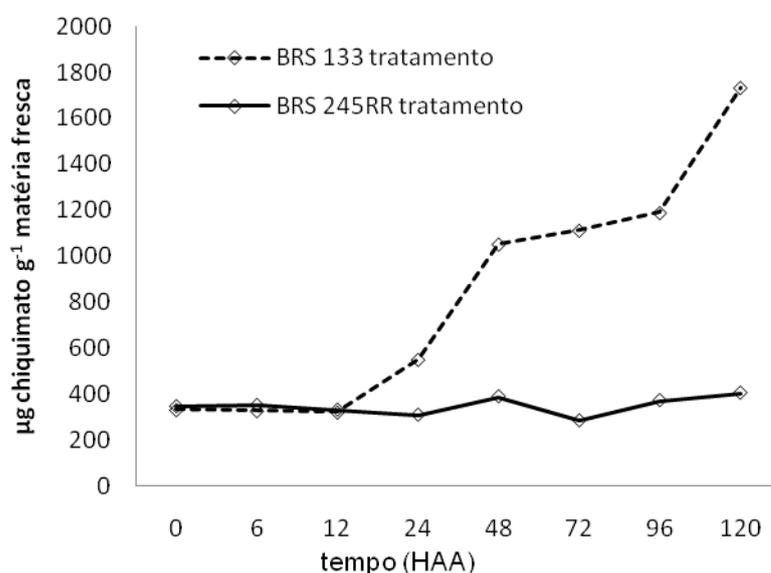


Figura 4 – Concentração de chiquimato nas folhas de soja convencional (BRS 133) e transgênica (BRS 245 RR), tratadas com glifosato.

Alguns trabalhos têm relatado acúmulo de chiquimato em plantas tratadas com glifosato. SINGH & SHANER (1998) observaram que, na soja, o chiquimato acumula após 24 horas da aplicação de uma dose subletal de glifosato e, após 96 horas os níveis de glifosato foram menores do que aquele constatado com 24 horas. BUEHRING et al. (2007) relataram que, no milho, a exposição ao glifosato resultou em acúmulo de 489% dos teores de chiquimato 5 dias após a

aplicação e de 297% 7 dias após a aplicação, quando comparado com o controle. HARRING et al., (1998) também relataram que o acúmulo de chiquimato foi proporcional à concentração de glifosato.

Dentre as etapas metabólicas da via do chiquimato, a quarta reação corresponde à redução, dependente de NADPH, do ácido desidrochiquímico formando o chiquimato, catalisada pela enzima-chave chiquimato desidrogenase. Reversivelmente, a oxidação NADP⁺-dependente do produto da reação, o chiquimato, leva a formação do ácido dehidrochiquímico (SINGH & CHRISTENDAT, 2006).

Com a inibição da EPSP sintase pelo glifosato e, decorrente acúmulo de chiquimato, este composto pode ser usado como substrato pela enzima chiquimato desidrogenase, podendo causar alterações em sua atividade. Este fato indica que o metabólito chiquimato tem sido reversivelmente convertido a dehidrochiquimato, pela ação da SDH (DIAZ et al., 1997).

Ainda que o chiquimato tenha se acumulado nas folhas de soja convencional (BRS 133) nas primeiras horas após o tratamento com glifosato, a enzima chiquimato desidrogenase apresentou aumento significativo em sua atividade somente a partir do terceiro dia, sendo este de 1,98 vezes (97,8%) em comparação ao seu controle. No quarto e quinto dias, o aumento foi de 2,4 vezes (144%) e 2,5 vezes (149,7%), respectivamente (Figura 5).

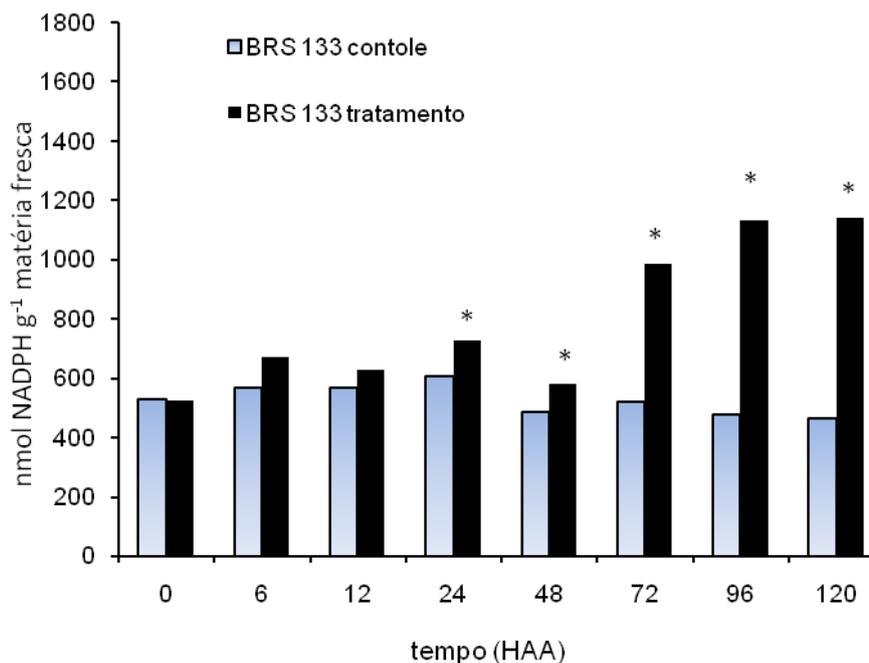


Figura 5 – Atividade da enzima chiquimato desidrogenase ($\mu\text{mol de NADPH min}^{-1} \text{g}^{-1}$ matéria fresca) de folhas de soja convencional (BRS 133) tratadas ou não com glifosato. Valores médios seguidos por * nas colunas são significativos de acordo o teste de Tukey ($P < 0,05$) para os respectivos controles.

Nas folhas de soja transgênica, em geral, o glifosato não apresentou efeito significativo ($p > 0,05$) na atividade da enzima. Um pequeno aumento foi detectado seis horas após a aplicação, o que também ocorreu após vinte e quatro horas (Figura 6).

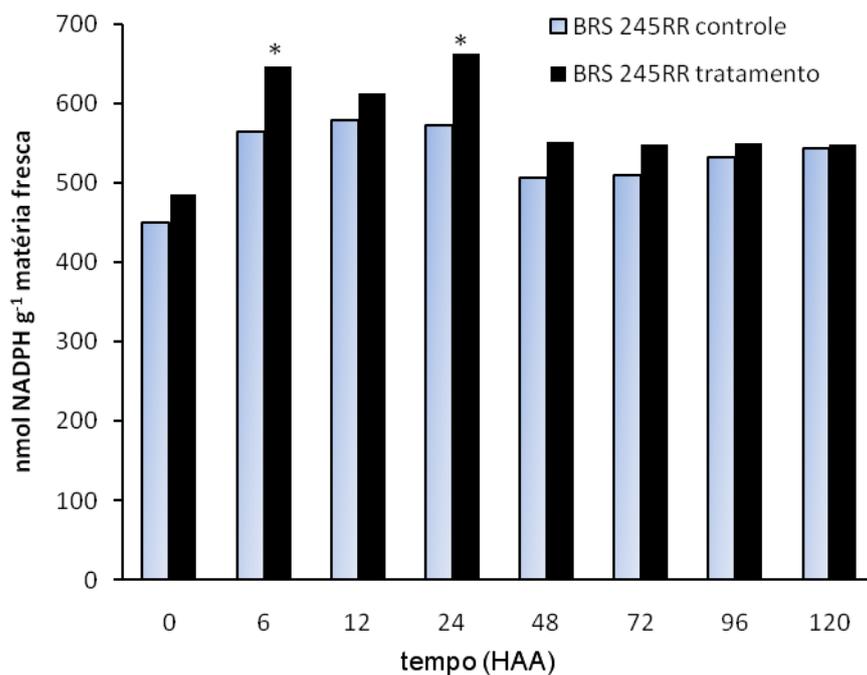


Figura 6 – Atividade da enzima chiquimato desidrogenase (μmol de NADPH $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ matéria fresca) de folhas de soja transgênica (BRS 245 RR), tratadas ou não com glifosato. Valores médios seguidos por * nas colunas são significativos de acordo o teste de Tukey ($P < 0,05$) para os respectivos controles.

A Figura 7 ilustra a atividade da chiquimato desidrogenase nas cultivares convencional (BRS 133) e transgênica (BRS 245 RR) submetidas ao tratamento com glifosato. O aumento na atividade da enzima da cultivar BRS 133 tratada com o herbicida ficou evidente após 24 horas do tratamento. Mas, esse aumento intensifica-se somente após o terceiro dia, atingindo o máximo da atividade enzimática no quarto dia do experimento. Observa-se que a análise comparativa acusou uma diferença significativa ($P < 0,05$) na atividade da enzima, presente na cultivar convencional (BRS 133), tratada com o herbicida após 24 horas. O mesmo se repetiu nas análises subsequentes até o último dia de experimento.

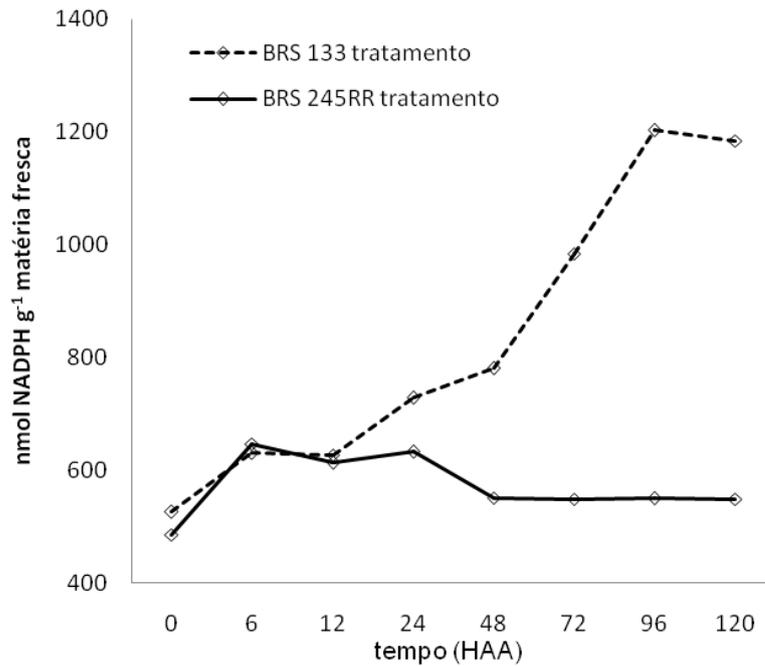


Figura 7 – Atividade da enzima chiquimato desidrogenase (μmol de NADPH $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ matéria fresca) de folhas de soja convencional (BRS 133) e transgênica (BRS 245 RR), tratadas com glifosato.

MARCHIOSI et al. (2009) estudando a ação do glifosato na via do chiquimato de raízes de soja convencional (BRS 133) e transgênica (BRS 245 RR), observaram que na concentração de 1mM de glifosato o acúmulo de chiquimato na cultivar convencional foi 27,8 vezes maior em comparação ao seu controle. De acordo com esses autores, esse fato pode ser o responsável pelo aumento na atividade da SDH que correspondeu a 60% em comparação ao controle. Já, na cultivar transgênica nenhuma alteração significativa para o metabolismo das plantas foi verificada.

4. CONCLUSÕES

- O aumento de NADPH quando as folhas de soja convencional foram submetidas ao glifosato, demonstrou que a enzima chiquimato desidrogenase (SDH) catalisa a reação reversível do chiquimato a disidrochiquimato, tendo como coenzima a NADP^+ .
- O herbicida inibiu a EPSP sintase o que levou ao acúmulo de chiquimato, substrato para a reação reversível da SDH.
- Nas folhas de soja convencional (BRS 133) submetidas à ação do glifosato, a via do chiquimato teve efeitos marcantes, com acúmulo de chiquimato e aumento na atividade da chiquimato desidrogenase.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R.; ABARKELI, R. B. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. **Chemosphere**, v.52, p.799-804, 2003.

BONINI, E.A.; FERRARESE, M.L.L.; MARCHIOSI, R.; ZONETTI, P.C.; FERRARESE-FILHO, O. A simple chromatographic assay to discriminate between glyphosate-resistant and susceptible soybean (*Glycine max*) cultivars. **European Journal of Agronomy**, v. 31, p. 173-176, 2009.

DIAZ, J.; RÓS-BARCELÓ, A.; DE CACERES, F. M. Changes in shikimate dehydrogenase and the end products of the shikimate pathway, chlorogenic acid and lignins, during the early development of seedlings of *Capsicum annuum*. **New Phytologist**, v.136, p. 183–188, 1997.

HARRING, T., STREIBIG, J. C., and HUSTED, S. Accumulation of shikimic acid: A technique for screening glyphosate efficiency. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46: p.4406-4412, 1998.

HENRY, B.W.; SHANER, D.L.; WEST, M.S. Shikimate accumulation in sunflower, wheat and proso millet after glyphosate application. **Weed Science**, v.55: p.1- 5, 2007.

HERMANN, K.M., WEAVER, L.M. The shikimate pathway. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.50, p.473–503, 1999.

LaROSSA, R. A.; SCHLOSS, J. V. The sulfonylurea herbicide sulfometuron methyl is an extremely potent and selective inhibitor of acetolactate synthase in *Salmonella typhimurium*. **Journal of Biological Chemistry**, v.259, p.8753-8757, 1984.

MARCHIOSI, R.; FERRARESE, M.L.L.; BONINI, E. A.; FERNANDES, N. G.; FERRO, A. P.; FERRARESE-FILHO, O. Glyphosate-induced metabolic changes in susceptible and glyphosate-resistant soybean (*Glycine max* L.) roots. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 93, p.28-33, 2009.

SHANER, D. L.; NADLER-HASSAR, T.; HENRY, H. B.; KOGER, C. H. A rapid *in vivo* shikimate accumulation assay with excised leaf discs. **Weed Science**, v.53, p.769-774, 2005.

SINGH, B. K.; SHANER, D. L. Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants. **Weed Technology**, v.12, p.527-530, 1998.

SINGH, S.A.; CHRISTENDAT, D. Structure of Arabidopsis dehydroquinate dehydratase-shikimate dehydrogenase and implications for metabolic channeling in the shikimate pathway. **Biochemistry**, v.45, p.7787-7796, 2006.

CAPÍTULO III

TEORES DE LIGNINA NOS TEGUMENTOS DE CULTIVARES DE SOJA (*Glycine max* L. Merrill) TRANSGÊNICAS RESISTENTES AO GLIFOSATO E RESPECTIVAS CULTIVARES PARENTAIS

resumo: Nas últimas safras foi observada forte e crescente adesão dos agricultores brasileiros à soja transgênica RR. Grande parte das características do tegumento da semente de soja está associada a problemas específicos apresentados nas sementes, como a suscetibilidade aos danos mecânicos, longevidade e potencial de deterioração, que podem ser associados ao teor de lignina. Neste trabalho, objetivou-se determinar os teores de lignina e a composição dos principais monolignóis, no tegumento de sementes de soja RR e convencional, com o intuito de verificar se a soja modificada geneticamente, resistente ao glifosato, apresenta diferença nos teores deste polímero nos tegumentos, em comparação com sua cultivar parental. Para esse propósito, foram constituídos seis grupos, cada um deles contendo uma cultivar RR e sua respectiva cultivar parental. Após análise fisiológica das sementes, os tegumentos das sementes foram retirados manualmente, secos em estufa a 80°C, por 24 horas. Após esse período, procedeu-se a determinação dos teores de lignina e dos monolignóis. Foi realizado estudo de contrastes para comparar cultivares RR e as respectivas parentais. Com exceção do teor de lignina no tegumento de sementes para o contraste BRS 133 vs BRS 245RR, não foram observadas diferenças entre os materiais RR e convencional tendo, neste caso, a cv BRS 245RR apresentado resultados superiores aos da convencional.

Palavras-chaves: lignina, monolignóis, dano mecânico, soja transgênica.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, em torno de 55% do volume total de sementes produzidas é de soja (*Glycine max* L. Merrill), assumindo papel importante no agronegócio como a principal fonte de divisas para o País (MIYAMOTO, 2008). Nessa produção, é preciso considerar a de plantas transgênicas RR (Roundup[®] Ready), com tolerância ao herbicida glifosato, aprovada no Brasil, em 2005, pela Lei de Biossegurança, e que de acordo com dados do CIB (2009), na safra de 2008/09, representou 63,9% da área semeada com soja.

A soja RR codifica uma variante da enzima EPSPS (5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase) que possui baixa afinidade pelo glifosato, conferindo à planta resistência a este herbicida, isto é, a atividade da enzima se mantém independente da presença, ou não, do glifosato (SHAN et al, 1986; PADGETTE et al., 1995; HARRISON et al., 1996). A enzima EPSPS participa da via metabólica do chiquimato, responsável pela síntese de aminoácidos aromáticos essenciais, como a fenilalanina e a tirosina. Esses aminoácidos, além de constituírem proteínas importantes para o desenvolvimento da planta, participam da via dos fenilpropenóides, principal rota para a síntese de compostos fenólicos, dentre eles os monolignóis, precursores da lignina. Ao obstruir a via do chiquimato, pela inibição da EPSPS, o glifosato pode afetar não só a produção de proteínas da soja, mas também a via metabólica geradora de lignina.

A lignina é sintetizada na via dos fenilpropenóides, uma das mais importantes nas plantas, pois está envolvida na síntese de vários produtos secundários. A via tem início com a fenilalanina amônia liase (PAL, EC 4.3.1.5), que desamina a L-fenilalanina em ácido *t*-cinâmico. O segundo passo é a hidroxilação do ácido *t*-cinâmico pela cinamato 4-hidroxilase (C4H, E.C. 1.14.13.11), gerando ácido *p*-cumárico (primeiro fenilpropenóide na forma ácida livre). A seguir, ocorre hidroxilação na posição 3 do *p*-cumarato pela *p*-cumarato 3-hidroxilase (C3H), produzindo cafeato, ferulato, 5-hidroxiferulato e sinapato, respectivamente. As formas ácidas livres dos fenilpropenóides são ligadas a uma

coenzima A pela 4-cumarato: coenzima A ligase (4-CL), reduzidas à forma aldeídica pela cinamoil-CoA redutase (CCR) e, em seguida, reduzidas à forma alcoólica pela ação da cinamil álcool desidrogenase (CAD) (BOERJAN et al., 2003). Finalmente os álcoois são transportados do citosol para o apoplasto, sendo que a forma glicosídica é considerada a de transporte e armazenamento (ESCAMILLA-TREVINO et al., 2006), e são polimerizados em lignina na parede celular, pela ação de enzimas oxidativas como peroxidases (POD) e lacases (BUCHANAN et al., 2000). O polímero de lignina é uma mistura racêmica de três álcoois hidroxicinâmílicos: *p*-cumaril (H), coniferil (G) e sinapil (S), denominados monolignóis, tendo como precursores os ácidos hidroxicinâmílicos (LI et al., 2008).

O conteúdo considerado adequado de lignina pode variar de acordo com a espécie em questão e do tecido vegetal analisado. No eucalipto (*Eucalyptus* sp), o elevado teor de lignina nos tecidos do caule é prejudicial à obtenção de polpa de celulose e papel (ENDT et al., 2000). Em forrageiras, o elevado teor de lignina na parte aérea determina baixa digestibilidade, caracterizando pastagens de má qualidade (LACERDA, 2001). Levando em conta a quantidade de lignina na raiz, pressupõe-se que alta quantidade de lignina ofereça à planta maior sustentação no solo. No entanto, em excesso, pode levar à redução do crescimento do órgão. No tegumento de soja, foi verificada correlação positiva entre o conteúdo de lignina e os mecanismos de resistência aos danos mecânicos, em que o maior conteúdo deste polímero no tegumento ofereceu maior resistência ao dano mecânico, e, portanto, maior vigor para as sementes (CAPELETI et al., 2005).

Alguns autores têm mencionado respostas diferenciais quanto aos teores de lignina na planta entre materiais RR e convencionais, atribuindo este fato ao excesso de lignificação ocorrido em cultivares transgênicas RR (COGHLAN, 2006). No entanto, a pesquisa nessa área é bastante restrita, sendo estas afirmações não baseadas em estudos comparativos dentro do mesmo genótipo.

Neste sentido, tem sido levantada a hipótese de que cultivares de soja geneticamente modificada para resistência ao herbicida glifosato contém maiores

valores de lignina na planta, quando comparadas aos de outras cultivares convencionais. Esta suspeita se baseia no fato de a alteração ter sido realizada na via metabólica do chiquimato, o mesmo utilizado pela planta para produção de lignina. No entanto, a pesquisa nessa área é incipiente, existindo poucos relatos que contrastem cultivares convencionais e suas respectivas versões RR, essencialmente derivada. Assim sendo, torna-se importante estudos também em sementes, uma vez que o acúmulo de lignina pode estar associado à qualidade fisiológica das mesmas.

Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo determinar os teores de lignina e a composição dos monolignóis nos tegumentos de sementes de cultivares de soja RR e suas respectivas cultivares parentais convencionais, com o intuito de verificar possíveis alterações causadas pela modificação genética que resulta na resistência ao herbicida glifosato.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Sistema experimental

Foram analisadas 12 cultivares, cedidas pela Embrapa Soja (Londrina-Pr) e Embrapa Cerrados (DF), compreendendo seis cultivares convencionais e suas versões transgênicas RR (Tabela1). Inicialmente as sementes foram submetidas a teste de germinação, segundo as prescrições contidas nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992), a fim de verificar a qualidade do material utilizado no estudo (ANEXO D).

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bioquímica Vegetal, da Universidade Estadual de Maringá (Maringá-Pr). Os reagentes utilizados nos experimentos foram adquiridos da Sigma[®], Merck[®], Reagen[®] e Nuclear[®].

Tabela 1 – Relação das cultivares avaliadas, todas registradas, protegidas e cedidas pela EMBRAPA Soja - Londrina, Paraná

Cultivar Convencional	Cultivar transgênica
BRS 133	BRS 245 RR
BRS 137	BRS 255 RR
Embrapa 48	BRS 242 RR
Emgopa 313	Emgopa 313 RR
Emgopa 315	Emgopa 315 RR
Emgopa 316	Emgopa 316 RR

2.2. Obtenção do tegumento das sementes

Para cada amostra 200 sementes de cada material genético foram imersas em água por 12 horas. Após esse período, os tegumentos foram retirados das sementes e colocados para secar em estufa a 80°C por 16 horas. A seguir, o material foi esfriado em dessecador a vácuo, as amostras foram trituradas, pesadas, e avaliadas por duas metodologias diferentes quanto ao teor de lignina.

2.3. Quantificação da lignina e composição dos monolignóis

Tegumento seco (0,3 g), foi homogeneizado em 50 mM tampão fosfato pH 7,0 (7 ml) e transferido para um tubo de centrífuga (Ferrarese et al., 2002). O precipitado foi centrifugado (1.400g, 6 min), lavado e centrifugado sucessivamente como segue: mais 2 vezes com 50 mM tampão fosfato pH 7,0 (7 ml); 3 vezes com 1% (v/v) Triton[®] X-100 em tampão pH 7,0 (7 ml); 2 vezes com 1 M NaCl em tampão pH 7,0 (7 ml); 2 vezes com água destilada (7 ml) e 2 vezes com acetona (5 ml). O material foi seco em estufa (80°C, 24 h) e a massa foi definida como a fração da parede celular livre de proteínas. A seguir, esse material foi usado para a determinação do teor total de lignina pelo método da lignina solúvel em brometo de acetila (MORRISON, 1972). Uma porção (20 mg) do material foi acondicionada em tubo de centrífuga e 500 µl de acetilbromida 25% foram acrescentados. As amostras foram aquecidas a 70°C, 30 min, transferidas para banho de gelo e a reação foi interrompida com adição de 0,9 ml

de NaOH 2 M. A seguir, foram adicionados 0,1 ml de hidroxilamina-HCl 7,5 M e 2 ml de ácido acético gelado. As amostras foram centrifugadas (1.000g, 5 min), o sobrenadante diluído e usado para a realização das leituras em espectrofotômetro a 280 nm. A concentração de lignina foi determinada de acordo com uma curva padrão e foi expressa em mg lignina g⁻¹ de parede celular.

Para determinar a composição monomérica da lignina foi usada a oxidação com nitrobenzeno (DEAN, 1997). Uma fração da parede celular livre de proteínas (50 mg) foi colocada em uma ampola Pyrex[®] contendo 1 ml de NaOH 2 M e 100 µl de nitrobenzeno. A ampola foi selada e aquecida a 170°C por 2,5 h, com agitação na metade do tempo de reação. Após oxidação, a amostra foi resfriada, lavada duas vezes com clorofórmio, acidificada com 350 µl de HCl 5 M e extraída duas vezes com clorofórmio. Os extratos orgânicos foram combinados, secos e ressuspensos em metanol. Todas as amostras foram filtradas em filtro de 0,45 µm e analisadas por HPLC, como descrito anteriormente. A fase móvel foi metanol/ácido acético 4% em água (20/80, v/v), com fluxo de 1,2 ml min⁻¹ para corrida isocrática de 20 min. As quantificações de *p*-hidroxibenzaldeído, vanilina e siringaldeído foram realizadas a 290 nm utilizando os padrões correspondentes. Os resultados foram expressos como µg monômero mg⁻¹ de parede celular.

2.4. Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, sendo realizadas quatro repetições para cada tipo de avaliação. Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias entre cultivares transgênicas e respectivas parentais foram comparadas pelo teste F com a opção “contrast” do programa SAS, a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A comparação entre as cultivares RR e respectivas parentais indicou diferença significativa (teste F a 5% de probabilidade) em apenas um grupo analisado, como mostra a Tabela 2.

A cultivar convencional que compõe o contraste 1 apresentou menor conteúdo de lignina no tegumento em relação com a cultivar transgênica, indicando uma redução de 24%. Já, nos demais contrastes, as cultivares não apresentaram diferenças significativas no conteúdo de lignina no tegumento das sementes.

Tabela 2 – Valores médios do teor de lignina e dos monômeros (H+G+S) no tegumento de soja transgênica resistente ao glifosato (RR) e suas respectivas parentais

Cultivares	Lignina (mg lignina g ⁻¹ parede celular)	H + G + S (µg mg ⁻¹ de parede celular)
Contraste 1		
BRS133	54,12 ^a	0,13 ^a
BRS 245RR	71,80 ^b	0,26 ^b
Contraste 2		
BRS 137	67,46 ^a	0,32 ^a
BRS 255RR	63,85 ^a	0,31 ^a
Contraste 3		
Embrapa 48	67,72 ^a	0,26 ^a
BRS 242RR	66,74 ^a	0,28 ^a
Contraste 4		
Emgopa 313	67,65 ^a	0,34 ^a
Emgopa 313RR	71,13 ^a	0,46 ^b
Contraste 5		
Emgopa 315	68,11 ^a	0,28 ^a
Emgopa 315RR	70,35 ^a	0,21 ^b
Contraste 6		
Emgopa 316	53,22 ^a	0,21 ^a
Emgopa 316RR	53,61 ^a	0,25 ^a

Médias seguidas da mesma letra, dentro de contrastes, não diferem significativamente pelo teste F, respectivamente, a 5% de probabilidade.

Alguns trabalhos tratam do aumento da lignificação em plantas transgênicas de soja que passaram por um período de estresse fisiológico. NODARI & DESTRO (2006), em estudo realizado em nove lavouras de soja no Rio Grande do Sul, observaram que na presença de secas e altas temperaturas, as cultivares RR sofreram mais prejuízos que as convencionais. Os autores observaram um grande número de plantas com rachaduras no caule de penetrância elevada, sendo que uma quantidade significativa das mesmas apresentava-se com caules dobrados ou quebrados (cerca de 50% a 70% das plantas), possivelmente devido à superprodução de lignina nos materiais RR. Segundo COGHLAN (1999), os teores elevados de lignina depositados no caule das plantas de soja estariam ocasionando estas rachaduras devido ao enrijecimento das plantas sob altas temperaturas (45°C), problema também detectado em lavouras de soja transgênica RR nos EUA, o que teria ocasionado, em anos mais quentes, perdas por tombamento de até 40% (NODARI & DESTRO, 2006) em consequência de um aumento de 20% a mais de lignina em materiais RR (KUIPER et al., 2001).

Ao investigar o teor de lignina no tegumento de sementes de cinco diferentes contrastes formados por soja convencional e transgênica RR, GRIS, et al. (2010) encontraram diferenças significativas ($p < 0,05$) apenas no contraste Jataí vs Silvânia RR, no qual a cultivar transgênica apresentou uma lignificação 27% maior que cultivar convencional.

O comportamento diferenciado em relação ao conteúdo de lignina encontrado nos resultados não foi observado em todos os contrastes. Este fato pode indicar possíveis interferências na identificação dessa molécula, ou ainda, deve ser levado em conta que em virtude do fato das linhagens RR serem obtidas por métodos de retrocruzamentos, elas não são 100% isogênicas com suas parentais, e é possível alguma variabilidade genética capaz de interferir na característica.

Outro fator que não se pode descartar é a complexidade estrutural da molécula de lignina (ANEXO E), fato este que dificulta sua quantificação em diferentes tecidos. Isto ocorre porque a maioria das técnicas usadas para este fim

envolve leituras na faixa do ultravioleta, mais especificamente em comprimento de onda de 280 nm. É sabido que nesta faixa espectral, proteínas e compostos aromáticos absorvem energia e, portanto, a presença destas substâncias pode interferir na quantificação da lignina. Diante disto, é importante destacar que vários autores têm divulgado seus resultados recorrendo à clássica técnica de determinação gravimétrica da lignina (FERREIRA, 2003). Entretanto, a metodologia para determinação do teor de lignina utilizada neste trabalho foi desenvolvida com o intuito de eliminar interferências presentes em outras técnicas. Ela se baseia em uma estratégia utilizada para retirar as proteínas interferentes, permitindo uma análise mais precisa da lignina.

Os resultados obtidos até o momento indicam comportamento diferenciado dos materiais RR quanto ao teor de lignina presente no tegumento das sementes de soja, apenas no contraste BRS 133 vs BRS 245RR. Entretanto, estes dados ainda não são suficientes para afirmar que a sequência CP4 EPSPS, introduzida no genoma de cultivares comerciais de soja, possa ser responsável por esta alteração. Não obstante, devido ao fato de que na soja RR a inserção do gene de resistência ao glifosato ocorre na mesma via de síntese da molécula de lignina, possíveis alterações podem ocorrer na formação desse polímero. Por isso, após analisar o conteúdo de lignina, o próximo objetivo do trabalho foi quantificar sua composição monomérica, para verificar se o processo de lignificação sofre alguma alteração nas cultivares de soja transgênicas.

Assim como ocorreu na lignificação, o contraste BRS 133 vs BRS 245RR (Tabela 01) indicou diferença significativamente quanto a composição dos monolignóis (H+G+S), os quais apresentaram um aumento de aproximadamente 50% na cultivar transgênica. Houve um acréscimo significativo nos monômeros H e G (Tabela 02), sendo a produção do monômero H a mais alterada (66% maior). No contraste Emgopa 313 vs Emgopa 313RR a cultivar transgênica também apresentou uma maior quantidade dos monômeros (H+G+S), no entanto diferentemente do contraste anterior, a incorporação dos monômeros H, G e S foi significativa, com um aumento de aproximadamente 25, 23 e 24%. O Contraste Emgopa 315 vs Emgopa 315RR indicou um comportamento diferenciado entre

as cultivares, onde a cultivar transgênica teve uma redução significativa na incorporação do monômero G (33% menor).

Tabela 02. Valores médios da composição monomérica de lignina no tegumento de soja transgênica resistente ao glifosato (RR) e suas respectivas parentais

Cultivar	Monômero ($\mu\text{g} \times \text{mg}^{-1}$ de parede celular)				%
	H	G	S	H+G+S	
BRS133	$0,02 \pm 0,003^a$	$0,1 \pm 0,014^a$	$0,01 \pm 0,003^a$	$0,13 \pm 0,018^a$	16 : 73 : 11
BRS 245RR	$0,06 \pm 0,004^b$	$0,17 \pm 0,004^b$	$0,02 \pm 0,002^a$	$0,26 \pm 0,01^b$	25 : 67 : 8
BRS 137	$0,08 \pm 0,004^a$	$0,18 \pm 0,001^a$	$0,04 \pm 0,003^a$	$0,32 \pm 0,019^a$	26 : 59 : 15
BRS 255RR	$0,06 \pm 0,005^a$	$0,22 \pm 0,01^a$	$0,03 \pm 0,004^a$	$0,31 \pm 0,017^a$	19 : 70 : 9
Embrapa 48	$0,08 \pm 0,006^a$	$0,15 \pm 0,002^a$	$0,02 \pm 0,002^a$	$0,26 \pm 0,009^a$	31 : 60 : 9
BRS 242RR	$0,07 \pm 0,005^a$	$0,17 \pm 0,001^a$	$0,03 \pm 0,007^a$	$0,28 \pm 0,02^a$	29 : 61 : 10
Emgopa 313	$0,06 \pm 0,004^a$	$0,23 \pm 0,014^a$	$0,06 \pm 0,005^a$	$0,34 \pm 0,023^a$	16 : 67 : 17
Emgopa 313RR	$0,08 \pm 0,004^b$	$0,3 \pm 0,025^b$	$0,08 \pm 0,008^b$	$0,46 \pm 0,038^b$	18 : 65 : 17
Emgopa 315	$0,05 \pm 0,004^a$	$0,18 \pm 0,01^a$	$0,04 \pm 0,028^a$	$0,28 \pm 0,01^a$	20 : 66 : 14
Emgopa 315RR	$0,06 \pm 0,005^a$	$0,12 \pm 0,002^b$	$0,03 \pm 0,002^a$	$0,21 \pm 0,01^b$	24 : 58 : 18
Emgopa 316	$0,06 \pm 0,004^a$	$0,13 \pm 0,007^a$	$0,03 \pm 0,003^a$	$0,22 \pm 0,014^a$	27 : 58 : 15
Emgopa 316RR	$0,07 \pm 0,004^a$	$0,14 \pm 0,006^a$	$0,04 \pm 0,002^a$	$0,25 \pm 0,015^a$	28 : 59 : 13

Médias seguidas da mesma letra, dentro de contrastes, não diferem significativamente pelo teste F, respectivamente, a 5% de probabilidade.

4. CONCLUSÕES

- O teor de lignina no tegumento de sementes variou somente entre as cultivares BRS 133 e BRS 245RR.
- Quanto à composição dos monolignóis, três contrastes apresentaram diferenças significativas, sendo que em dois deles as cultivares transgênicas BRS 245RR e EMGOPA 313 RR indicaram maior incorporação das formas H, G e S.
- Os resultados obtidos até o momento indicam comportamento diferenciado de alguns materiais RR quanto ao teor de lignina presente no tegumento das sementes de soja. Entretanto, estes dados ainda não são suficientes para afirmar que a sequência CP4 EPSPS, introduzida no genoma de cultivares comerciais de soja, possa ser responsável por esta alteração.

REFERÊNCIAS

BOERJAN W., RALPH J., BAUCHER M. Lignin biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, p. 519-546. 2003.

CAPELETI, I.; BONINI, E. A.; FERRARESE, M. L. L.; TEIXEIRA, A. C. N.; KRYZANOWSKI, F. C.; FERRARESE-FILHO, O. Lignin content and peroxidase activity in soybean seed coat susceptible and resistant to mechanical damage. **Acta Physiologiae Plantarum**, Wasazawa, v. 27, n. 1, p. 103-108, 2005.

COGHLAN, A. Splitting headache: Monsanto's modified soya beans are cracking up in the heat. Saint Louis: Monsanto, 1999. Disponível em: <<http://www.mindfully.org/GE/Monsanto-RR-Soy-Cracking.htm>>. Acesso em: 10 mar. 2010.

CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA. Adoção e consumo no Brasil e no mundo. In.: **O que você precisa saber sobre transgênicos**. São Paulo, p.16-17, 2009.

GRIS, C. F. Qualidade fisiológica de sementes de soja convencional e RR associada ao conteúdo de lignina. **Tese (Doutorado em Agronomia)**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2010.

ENDT, D. V.; COSTA, P.; ZAGO, M. K.; ZANETTINI, M. H. B.; PASQUALI, G. Genes de lignificação. **Biotecnologia Ciência & Tecnologia**, Brasília, DF, v. 3, n. 15, p. 152-159, 2000.

ESCAMILLA-TREVINO L.L.; CHEN W.; CARD M.L.; SHIH M.C.; CHENG C.L.; POULTON J.E.; *Arabidopsis thaliana* beta-glucosidases BGLU45 and BGLU46 hydrolyse monolignol glucosides. **Phytochemistry**, v. 67, p. 1651-1660. 2006.

FERREIRA, I.C. Lignina de tegumentos de sementes de soja (*Glycine max* (L.) *merr.*) e suas relações com a resistência aos danos mecânicos. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 43p. **Dissertação (Mestrado em Agronomia)**. 2003.

HARRISON, L.A; BAILEY, M.R.; NAYLOR, M.; REAM, J.; HAMMOND, D.L. The expressed protein in synthase in glyphosate-tolerant soybeans, 5-enolpyruvylshiquimate-3-phosphate synthase from *Agrobacterium* sp. Strain CP4, is rapidly digested and is not toxic to mice upon acute administration. **Journal of Nutrition**, v.128, p.756-761, 1996.

KUIPER, H.A.; KLETER, G.A.; NOTEBORN, H.P.J.M.; KOK, E.J. Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. **The Plant Journal**, Oxford, v.27, n.6, p.503-528, 2001.

LACERDA, R. S. Teores de lignina estimados através do método espectrofotométrico “lignina solúvel em Brometo de Acetila” em alguns cultivares de aveia. Pirassununga: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, 2001. p. 93, **Tese (mestrado em Zootecnia)- FZEA-USP**, 2001.

LI X., WENG J-K., CHAPPLE C. Improvement of biomass through lignin modification. **The Plant Journal**, v. 54, p. 569-581. 2008.

MIYAMOTO, Y. Abrasem garante oferta de sementes, mas preço deve subir. Disponível em: http://ultimosegundo.ig.com.br/economia/2008/05/13/abrasem_garante_oferta_e_sementes_mas_preco_deve_subir_1310334.html>. Acesso em: 15 out. 2009.

MORRISON I.M. A semi-micro method for the determination of lignin and its use in predicting the digestibility of forage crops. **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 23, p. 455. 1972.

NODARI, R. O; DESTRO, D. Relatório sobre a situação de lavouras de soja da região de palmeira das missões, RS, safra 2001/2002, cultivadas com cultivares convencionais e com cultivares transgênicas. In <http://www.agirazul.com.br/123/noticias/000000a3.htm>> Acesso em: nov. 2009.

PADGETTE, S.R.; KOLACZ , K.H.; DELANNAY, X.D.; La VALLEE, B.J.; TINIUS, C.N.; RHODES, W.K.; OTERO, Y.I.; BARRY; G.F.; EICHHOLTAZ, D.A.; PESCHKE, W.M.; NIDA, D.L.; TAYLOR, N.B. Development, identification and characterization of a glyphosate tolerant soybean line. **Crop Science**, v.35, p.1451-1461, 1995.

SHAN, D. M.; HORSCH, R. B.; KLEE, H. J. Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. **Science**, v. 233, p.78-81, 1986.

CAPÍTULO IV

PROCESSO PARA DIFERENCIAR SOJA CONVENCIONAL DE SOJA RESISTENTE AO GLIFOSATO POR DETERMINAÇÃO CROMATOCRÁFICA DO CHIQUIMATO

resumo: O presente trabalho estabelece um processo, sensível e confiável, em que se aplica cromatografia líquida de alta eficiência para detectar chiquimato em sementes de soja, visando discriminar variedades convencionais daquelas geneticamente modificadas, resistentes ao glifosato. O mecanismo de ação do glifosato é bem definido, pois se trata do único herbicida que inibe especificamente a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSP sintase, E.C. 2.5.1.19), que catalisa a condensação do chiquimato com fosfoenolpiruvato. O trabalho está pautado no fato do chiquimato se acumular significativamente nos tecidos vegetais de soja convencional, após a inibição da EPSP sintase pelo glifosato. Em plantas não submetidas ao glifosato, o chiquimato não é facilmente detectado, pois rapidamente se converte em chiquimato 3-fosfato e, a seguir, em 5-enolpiruvilchiquimato 3-fosfato, pela ação da EPSP sintase. Por outro lado, em plantas não geneticamente modificadas submetidas ao glifosato, a metabolização do chiquimato é prejudicada, resultando em seu acúmulo. Este metabólito pode ser detectado em quantidades extremamente baixas (na faixa de μg), por cromatografia líquida de alta eficiência. Foram analisados seis contrastes diferentes, sendo cada contraste formado por uma cultivar transgênica e sua respectiva cultivar parental convencional, submetidas ou não a embebição com solução de glifosato 0,6%. As análises cromatográficas indicaram o acúmulo de chiquimato apenas em cultivares convencionais, nas quais as sementes foram previamente embebidas em solução de glifosato 0,6%. Os resultados demonstraram que a detecção de chiquimato pelo método cromatográfico nas radículas de sementes, germinadas após pré-embebição com glifosato, pode ser utilizado como um método rápido e preciso na diferenciação de soja resistente ao glifosato de soja convencional.

Palavras-Chave: *Glycine max*, chiquimato, transgenia, soja RR, HPLC.

1. INTRODUÇÃO

A cultura da soja (*Glycine max* L. Merrill.) ocupa atualmente, no Brasil, aproximadamente 58% da área plantada, sendo a espécie com maior extensão de cultivo (IBGE, 2009), 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 diversas cultivares de soja tolerantes ao herbicida Roundup Ready (RR) no país.

O cultivo e o comércio de organismos geneticamente modificados vêm crescendo significativamente no mundo, em que pese o fato de que a utilização da biotecnologia na agricultura é vista de forma diferente nas distintas regiões. Variedades transformadas aprovadas em um país e usadas comumente na agricultura comercial são, às vezes, proibidas em outros países (MUMM & WALTERS, 2001). Isto significa que na comercialização de lotes de sementes convencionais, produzidos em países onde as variedades geneticamente modificadas (GM) são utilizadas, para países onde as variedades transgênicas são proibidas ou controladas rigidamente, a presença adventícia de sementes de variedades GM é inevitável (LE BUANEC, 2003).

Grande fonte de risco desse sistema de segregação consiste nos testes de detecção utilizados porque nenhum deles apresenta absoluta exatidão (HUFFMANN, 2004). A produção mundial de sementes de espécies GM atingiu proporções significativas, levando institutos de pesquisa, agências de inspeção e companhias de vários países a desenvolver estratégias e métodos para detecção de sementes de plantas GM. Embora diversas pesquisas tenham sido conduzidas com o objetivo de detectar variedades GM não há um método padronizado (CUNHA et al., 2005).

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

Nas plantas os sintomas macroscópicos da fitotoxicidade ao glifosato são lentos. A morte de uma planta não transgênica, injuriada, ocorre vários dias após sua aplicação. Todavia, alguns aspectos bioquímicos podem ser verificados em poucas horas. BONINI et al. (2009) indicam o acúmulo de chiquimato em folhas, raízes e radículas de cultivares de soja convencional após exposição ao glifosato. Sem dúvida, o acúmulo do chiquimato é uma consequência fisiológica imediata da injúria causada pelo herbicida, o que pode se tornar útil na rápida detecção de tecidos vegetais afetados (DUKE et al., 2003; KREMER et al., 2005). Sabendo que o acúmulo do chiquimato é o resultado direto da inibição enzimática pelo glifosato, sua quantificação pode ser correlacionada com a inserção do gene de resistência ao herbicida, como é o caso da soja RR.

Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo desenvolver uma técnica alternativa, rápida, sensível e segura para diferenciar a soja resistente ao glifosato da soja convencional visando, futuramente, assessorar órgãos interessados, especialmente empresas ligadas à produção de sementes, nas suas estratégias de controle. Para isto foi aplicada a técnica cromatográfica para a quantificação de chiquimato em radículas de soja convencional e transgênica, submetidas ao tratamento com o herbicida glifosato de uso comercial.

2. MATERIAL E CONDUÇÃO EXPERIMENTAL

2.1. Sistema experimental

Foram analisadas 12 cultivares, cedidas pela Embrapa Soja (Londrina-Pr) e CTPA - Centro Tecnológico para Pesquisas Agropecuárias (GO), compreendendo seis cultivares convencionais e suas versões transgênicas RR (Tabela1).

Tabela 1 – Relação das cultivares avaliadas:

Cultivar convencional	Cultivar transgênica
BRS 133	BRS 245 RR
BRS 137	BRS 255 RR
Embrapa 48	BRS 242 RR
Emgopa 313	Emgopa 313 RR
Emgopa 315	Emgopa 315 RR
Emgopa 316	Emgopa 316 RR

Os demais materiais utilizados nos experimentos, assim como, os sais dos tampões, polivinilpirrolidona (PVPP) e demais reagentes e materiais como, papel Germitest CEL-060, foram adquiridos de fontes confiáveis e seguras (Sigma[®], Merck[®], Reagen[®], Nuclear[®] e JT Baker[®]). O glifosato de uso comercial utilizado apresentava em sua formulação 360 g L⁻¹ do equivalente ácido (e.a.), 480 g L⁻¹ de sal de isopropilamina *N*-(fosfometil) glicina (Glyphosate) (C₃H₈NO₅P) e 684 g L⁻¹ de ingredientes inertes, sendo adquirido junto a Cocamar de Maringá, Paraná.

Todos os experimentos foram realizados em condições apropriadas e conduzidos no Laboratório de Bioquímica Vegetal (Bloco I-89), do Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá, Paraná.

2.1. Germinação das sementes

As sementes foram imersas em 300 ml de solução de herbicida comercial (Roundup Ready[®] 0,6% - sal de isopropilamina de *N*-(fosfometil) glicina 480 g L⁻¹; equivalente ácido de glifosato 360 g L⁻¹; ingredientes inertes 692 g L⁻¹) no caso do tratamento, durante 4 horas. As variáveis tempo e concentração foram determinados através de curva de embebição determinada em prévios experimentos realizados no Laboratório de Bioquímica Vegetal. Já, no caso do controle, as condições foram as mesmas, porém as sementes foram embebidas em água.

Após o período de imersão (4 h), as sementes foram acondicionadas entre duas folhas de papel Germitest CEL-060, umedecidas com água, enroladas

(foram confeccionados em média 4 rolos, de cada cultivar, contendo 25 sementes cada um), acondicionadas em tubos de PVC contendo um pequeno filme de água para manutenção da umidade e postas a germinar em câmara escura (Tecnal TE 400, Brasil), a 25°C e 80% de umidade relativa, durante 24 horas. Após esse período, realizou-se a extração do chiquimato a partir das radículas retiradas das plântulas.

2.2. Extração do chiquimato

Após a obtenção do material básico foi realizada a extração do chiquimato. O tecido vegetal foi macerado em gral com HCl 0,25 N (1:3 peso/volume) conforme descrição contida em BONINI et al. (2010). As amostras foram centrifugadas a 1200g por 10 minutos e o sobrenadante separado para as análises.

Para a identificação e quantificação do chiquimato o material foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), técnica de separação fundamentada na distribuição dos componentes de uma mistura de duas fases imiscíveis, a fase móvel, líquida e a fase estacionária, contida em uma coluna. As separações são alcançadas por partição, adsorção, troca iônica, exclusão por tamanho ou interações estereoquímicas, dependendo do tipo de fase estacionária utilizada.

As amostras obtidas anteriormente foram diluídas (50 – 100 vezes) em fase móvel (solução aquosa de H_3PO_4 3,5mM) e filtradas por meio de seringa adaptada a um filtro com membrana de difluoreto de polivinilideno, de porosidade 0,45 μ m. A seguir, e com o auxílio de seringa apropriada, a amostra foi injetada em um cromatógrafo constituído de uma bomba de alta pressão, um injetor e um detector UV-Vis. A eluição foi efetuada, em condição isocrática, durante 10 minutos e o chiquimato identificado a 220 nm. Chiquimato, nas amostras, foi identificado pela comparação do seu tempo de retenção com aquele de um padrão, a 3,5 μ g/mL, preparado e injetado nas mesmas condições descritas para as amostras.

A quantidade de chiquimato nas amostras foi determinada de acordo com

a fórmula: Chiquimato ($\mu\text{g g}^{-1}$) = F x (Área da amostra / Área do padrão) x Diluição, onde: Área da amostra e Área do padrão são as áreas calculadas, e fornecidas pelo cromatógrafo, referentes à amostra e ao padrão, eluídos pela fase móvel; Diluição representa o número de vezes em que a amostra é diluída (50 – 100 vezes) na fase móvel e F ($= 10,5\mu\text{g g}^{-1}$) é o fator de cálculo obtido pela relação entre a concentração do padrão ($3,5\mu\text{g/mL}$) e o extrato do tecido vegetal ($0,5\text{ g}$ de matéria fresca extraída em $1,5\text{ mL}$ de HCl $0,25\text{N}$), de acordo com a fórmula: $F = 3,5\mu\text{g mL}^{-1} \times 1,5\text{mL} \div 0,5\text{g}$. Todos os resultados foram expressos em μg de chiquimato g^{-1} tecido vegetal fresco.

2.3. Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, sendo realizadas quatro repetições. Por se tratar de uma metodologia qualitativa, os resultados foram analisados através de teste média.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um padrão de ácido chiquímico $20\ \mu\text{M}$ foi injetado a cada dia antes do início das análises em HPLC e o tempo de retenção do cromatograma padrão foi utilizado para identificação do chiquimato nas amostras analisadas.

A Figura 01 representa os perfis cromatográficos obtidos com um padrão de chiquimato e amostras de chiquimato extraídas de radículas de soja convencional (BRS 133) e transgênica (BRS 245RR). Pode-se constatar que a soja convencional tratada com $0,6\%$ do equivalente ácido (e.a) do herbicida comercial acumulou chiquimato, o que não ocorreu na cultivar transgênica.

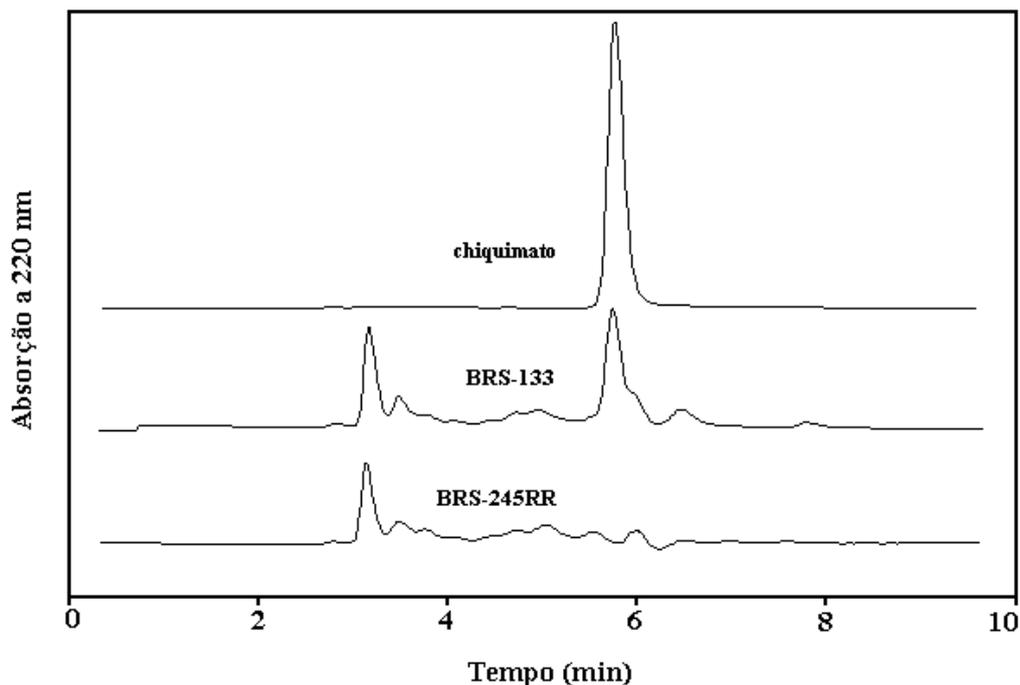


Figura 1. Cromatogramas representativos mostrando o padrão de chiquimato 20 μM (tempo de retenção, $R_t = 5,68$ min); chiquimato ($R_t = 5,70$ min) acumulado nas radículas de soja convencional (BRS-133) tratadas com o herbicida comercial e a ausência de chiquimato nas radículas de soja resistente ao glifosato (BRS-245RR), tratadas com 0,6% do equivalente ácido (e.a.) do herbicida glifosato.

DUKE et al. (2002) avaliaram a eficiência da técnica cromatográfica comparada com a técnica espectrofotométrica em estudos com algodão (*Gossypium hirsutum* L.) resistente, ou suscetível, ao glifosato. Tanto a espectrofotometria quanto a cromatografia por HPLC demonstraram o acúmulo de chiquimato em plantas convencionais, tratadas com glifosato, no entanto, a técnica espectrofotométrica detectou 73% de chiquimato, após aplicação do herbicida, ao passo que a cromatografia detectou 100% do composto. A eficácia desses métodos também foi comprovada por BONINI et al. (2010) e MARCHIOSI et al. (2009) que identificaram o acúmulo de chiquimato em diferentes tecidos de plantas de soja convencional, tratadas com glifosato. Por seu lado, em todos os estudos citados, os resultados obtidos deixam claro que a técnica cromatográfica quantifica efetivamente o chiquimato presente nas amostras, sem a interferência encontrada nos resultados de análises espectrofotométricas, evidenciando uma maior confiabilidade ao método empregado no presente trabalho.

Visando estabelecer um protocolo confiável foram utilizadas várias comparações entre sementes de soja convencionais e transgênicas, os resultados podem ser vistos na Tabela 2.

De fato, o chiquimato acumulou significativamente nas radículas das cultivares convencional ($> 952,4 \mu\text{g g}^{-1}$) após tratamentos com glifosato. O mesmo não ocorreu com os tecidos de soja transgênica, onde o chiquimato não foi detectado. Como se sabe, a inserção do gene de tolerância ao glifosato permite que a via do chiquimato não sofra a ação do herbicida devido à alta atividade da EPSP sintase e sua baixa afinidade ao mesmo, resultando na rápida utilização do chiquimato na via metabólica (DELANNAY et al., 1995).

Tabela 2 – Teores de chiquimato em radículas de soja convencional e resistente ao glifosato, tratadas com herbicida comercial (0,6%).

Cultivar	Chiquimato ($\mu\text{g chiquimato g}^{-1}$ matéria fresca)
BRS 137	1.238,1 \pm 52,5
BRS 255RR	nd
BRS 133	1.197,2 \pm 20,3
BRS 245RR	nd
EMGOPA 316	1.107,6 \pm 19,4
EMGOPA 316RR	nd
EMGOPA 313	1.030,8 \pm 24,3
EMGOPA 313RR	nd
EMGOPA 315	1.020,5 \pm 72,7
EMGOPA 315RR	nd
EMBRAPA 58	952,4 \pm 32,5
BRS 242RR	nd

Médias ($N = 4 \pm$ erro padrão da média)

nd = não detectado

A Figura 2 traz o cromatograma obtido em análises realizadas a partir de radículas das cultivares BRS 137 e BRS 255RR (embebidas em solução de glifosato), juntamente com o padrão de chiquimato 20 μ M. As análises realizadas a partir de sementes embebidas apenas em água não indicaram o acúmulo de chiquimato em nenhuma das cultivares, como demonstrado na figura 03. Esses perfis cromatográficos foram constatados em todos os contratos avaliados. O chiquimato foi detectado em elevada concentração nas cultivares que não possuem o gene de resistência ao glifosato, enquanto que nas cultivares RR ele não foi detectado, permitindo diferenciar com clareza as cultivares convencionais das cultivares transgênicas.

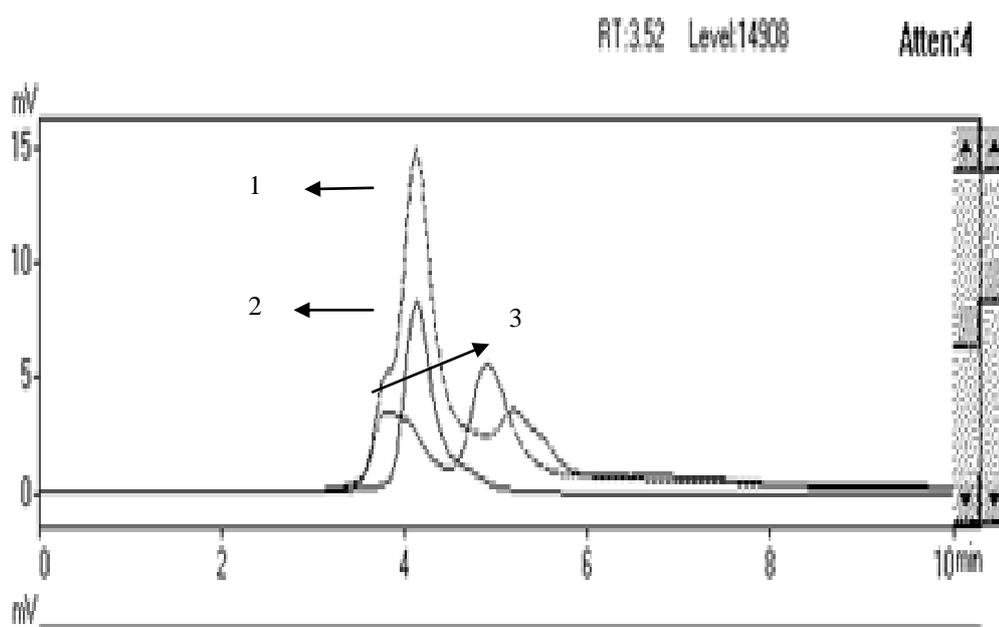


Figura 02. Cromatogramas representativos mostrando o padrão de chiquimato 20 μ M (1); chiquimato presente na cultivar BRS 137 (2) e a ausência de chiquimato nas radículas da cultivar BRS 255RR (3), ambas tratadas com 0,6% do equivalente ácido (e.a.) do herbicida glifosato.

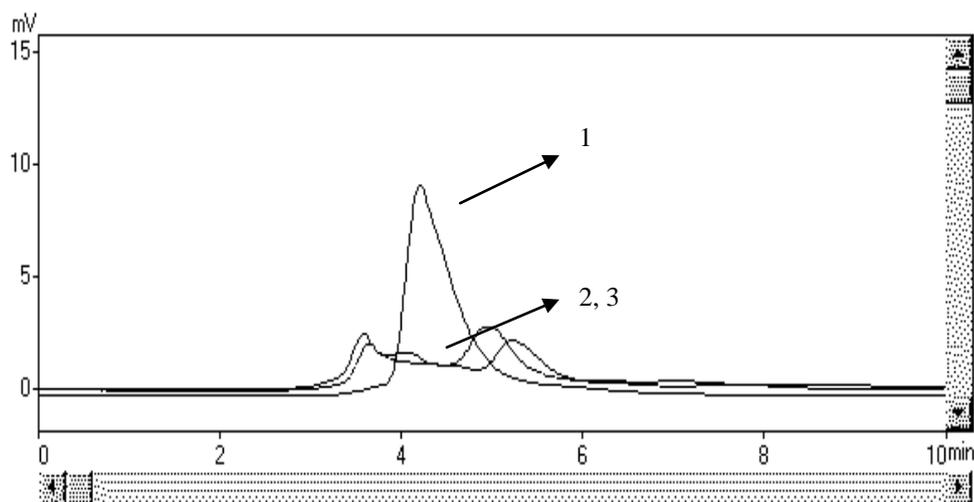


Figura 03. Cromatogramas representativos mostrando o padrão de chiquimato 20 μM (1) e a ausência de chiquimato nas radículas das cultivares BRS 137 (2) BRS 255RR (3), ambas embebidas em água.

4. CONCLUSÕES

- A identificação do chiquimato através da técnica cromatográfica permite diferenciar soja convencional de resistente ao glifosato.
- A diferenciação entre cultivares de soja convencional e geneticamente modificada por meio de análises rápidas, torna o presente trabalho adequado para rastreabilidade da soja.
- A técnica apresentada permite análises qualitativas quanto à presença de soja RR e poderá contribuir no processo de certificação de sementes.

REFERÊNCIAS

BONINI, E.A.; FERRARESE, M.L.L. ; MARCHIOSI, R. ; ZONETTI, P.C. ; FERRARESE-FILHO, OSVALDO . A simple chromatographic assay to discriminate between glyphosate-resistant and susceptible soybean (*Glycine max*) cultivars. **European Journal of Agronomy**, v. 31, p. 173-176, 2009.

CUNHA, C.S.M. **Comparação de métodos na detecção de sementes de soja geneticamente modificada, tolerante ao glifosato**. 2004. 24f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Sementes). Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel", Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2004.

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

DUKE, S.O. Glyphosate. p. 1–70. In P.C. Kearney and D.D. Kaufman (ed.) **Herbicides: Chemistry, degradation, and mode of action**. v.3, p. 243-287, 1988.

DUKE, S.O; RIMANDO, A.G.; PACE, P.F.; REDDY, K.N.; SMEDA, R.J. Isoflavone, glyphosate and aminomethylphosphonic acid levels in seeds of glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.340-344, 2003.

HUFFMANN, W.E. Production, identify preservation and labeling in a marketplace with genetically modified and non-genetically modified foods. **Plant Physiology**, v.34, p.3-10, 2004

KREMER, R.J.; MEANS, N.E.; KIM, S. Glyphosate affects soybean root exudation and rhizosphere micro-organisms. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v.85, p.1165-1174, 2005.

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

MARCHIOSI, R.; FERRARESE, M.L.L.; BONINI, E. A.; FERNANDES, N. G.; FERRO, A. P.; FERRARESE-FILHO, O. Glyphosate-induced metabolic changes in susceptible and glyphosate-resistant soybean (*Glycine max* L.) roots. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v. 21, p. 155-164, 2009.

MUMM, R.H.; WALTERS, D.S. Quality control in development of transgenicas crop seed products. **Crop Science**, v.41, p.1381-1389, 2001.

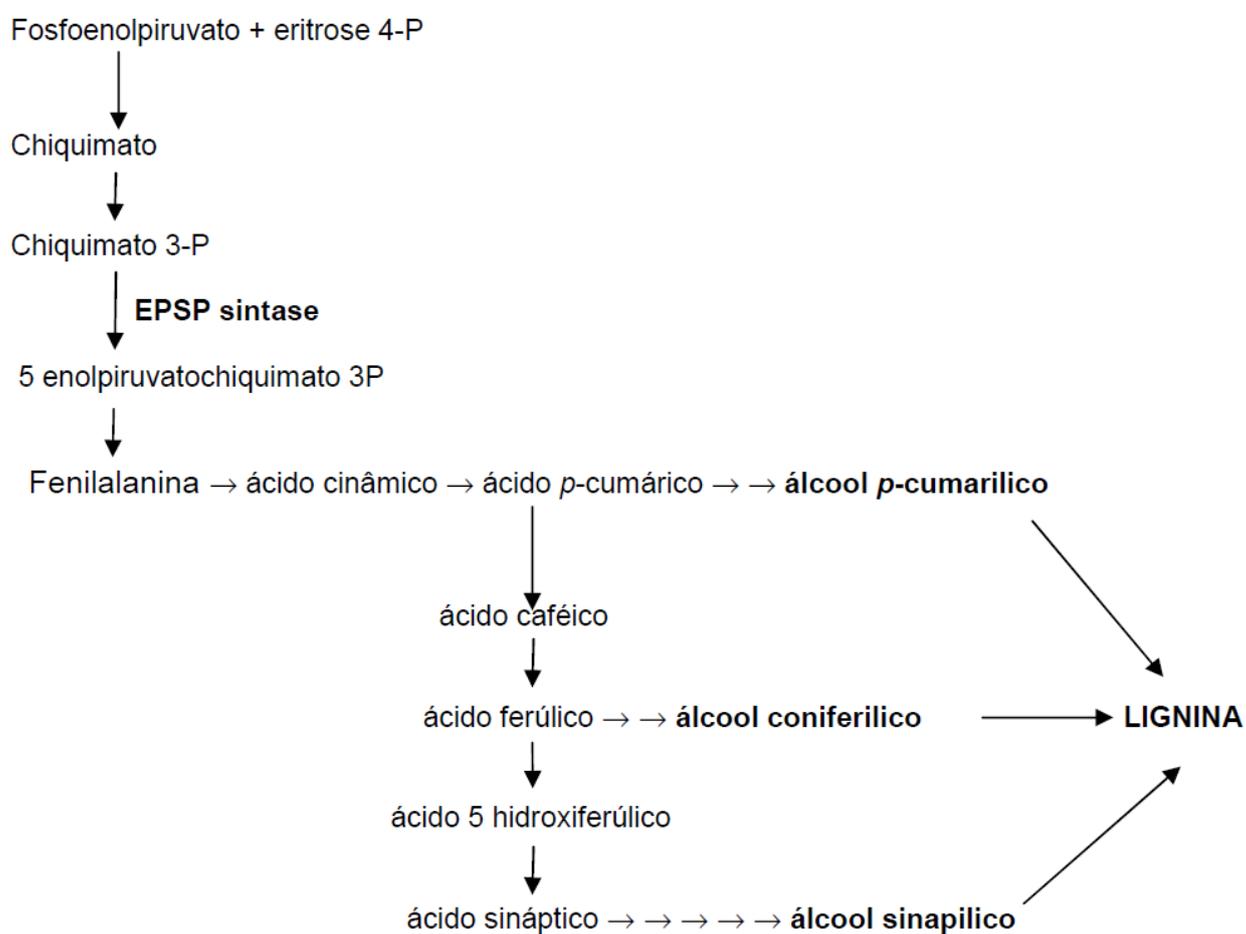
PADGETTE, S.R.; KOLACZ, K.H.; DELANNAY, X.D.; La VALLEE, B.J.; TINIUS, C.N.; RHODES, W.K.; OTERO, Y.I.; BARRY, G.F.; EICHHOLTZ, D.A.; PESCHKE, W.M.; NIDA, D.L.; TAYLOR, N.B. Development, identification and characterization of a glyphosate tolerant soybean line. **Crop Science**, v.35, p.1451-1461, 1995.

ANEXOS

ANEXO A

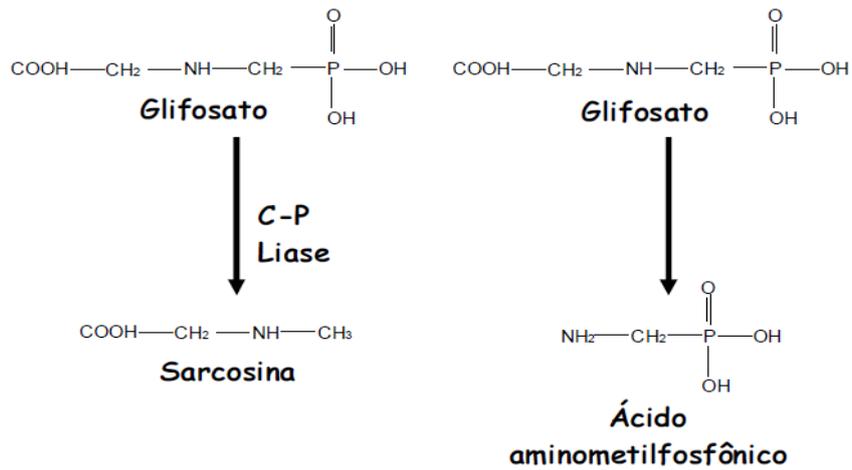
PARTE DA VIA METABÓLICA DO CHIQUIMATO E FENILPROPENÓIDES.

BIOSSÍNTESE DE LIGNINA (EM NEGRITO, MONOLIGNOIS)



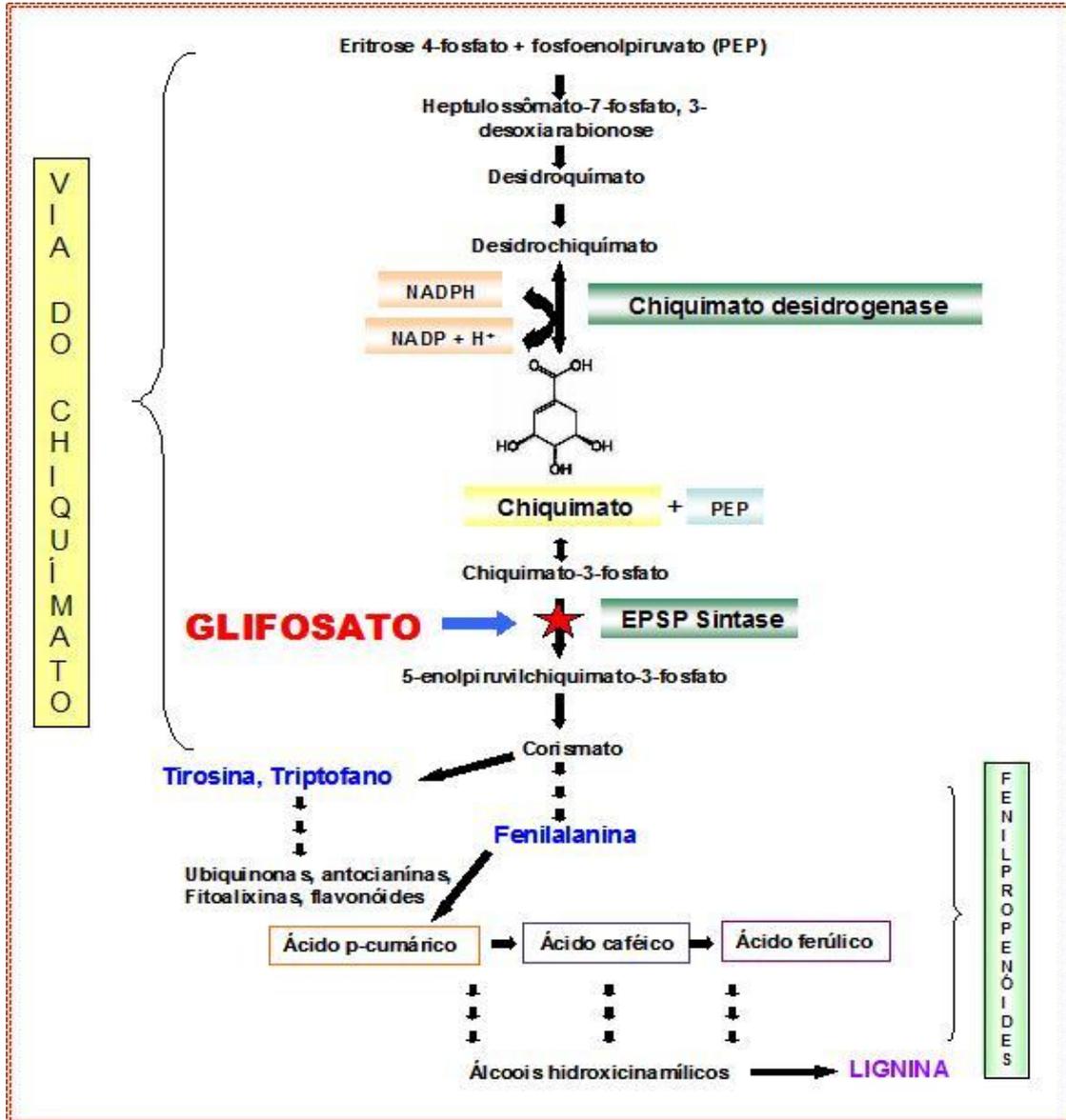
ANEXO B

PRINCIPAIS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DO GLIFOSATO NO SOLO.



ANEXO C

VIAS DO CHIQUIMATO E DOS FENILPROPANOIDES E A AÇÃO DO GLIFOSATO NAS PLANTAS. A INIBIÇÃO DA EPSP SINTASE PELO GLIFOSATO AFETA A BIOSÍNTESE DE AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS E O CRESCIMENTO DAS PLANTAS SUSCETÍVEIS.



ANEXO D

PORCENTAGEM DE PLÂNTULAS NORMAIS OBTIDA NA PRIMEIRA CONTAGEM E NA CONTAGEM FINAL DO TESTE DE GERMINAÇÃO DAS CULTIVARES UTILIZADAS NO TRABALHO.

Cultivar	Germ.(1ª contagem) %	Germ. (contagem final) %
BRS133	74	82
BRS 245RR	77	83
BRS 137	79	85
BRS 255RR	72	80
Embrapa 48	65	71
BRS 242RR	74	82
Emgopa 313	55	60
Emgopa 313RR	65	71
Emgopa 315	57	60
Emgopa 315RR	63	69
Emgopa 316	58	66
Emgopa 316RR	61	69

ANEXO E

ESTRUTURA QUÍMICA DETALHADA DE UMA MOLÉCULA DE LIGNINA. AS UNIDADES DE FENILPROPENÓIDES NÃO SE ENCONTRAM LIGADAS DE FORMA SIMPLES E DE UMA ÚNICA MANEIRA (TAIZ; ZEIGER, 1998).

