

XI Curso sobre Tecnologia de Produção de Sementes de Hortaliças
Porto Alegre/RS - 16 a 18 de novembro de 2011

**APLICAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES NA AVALIAÇÃO
DA QUALIDADE DE SEMENTES DE HORTALIÇAS**

Patrícia P. Silva

Biól. MSc. - Doutoranda em Ciência e Tecnologia de Sementes
Universidade de Pelotas
patybio55@yahoo.com.br

Warley Marcos Nascimento

Ph. D. em Fisiologia de Sementes
wmn@cnph.embrapa.br

Quando falamos em qualidade de sementes, estamos considerando os atributos físicos, fisiológicos, sanitários e genéticos. Este conjunto de características é demasiadamente importante no conhecimento do potencial de utilização de um lote de sementes. Os atributos genéticos são representados pela pureza varietal, potencial de produtividade, resistência a pragas e doenças, precocidade, qualidade das sementes e resistência a condições adversas de solo e clima.

A pesquisa na área de qualidade de sementes vem evoluindo nos últimos anos, e com isso novas técnicas na avaliação dos atributos genéticos vêm apresentando resultados bem satisfatórios. Como por exemplo, o uso de marcadores moleculares, que além de auxiliar na elucidação dos fatores que afetam a qualidade das sementes, vem ajudando na seleção de genótipos com características desejadas, na identificação do material genético, bem como na preservação desses materiais.

O aumento no número de cultivares, em decorrência do crescimento do mercado de sementes, vem provocando uma sinalização positiva para a utilização de marcadores moleculares na caracterização de cultivares, seguindo recomendações da Associação Internacional para Testes de Sementes (ISTA), cujas normas são adotadas pela União Internacional para a

Proteção de Novas Variedades de Plantas (UPOV), da qual o Brasil é signatário.

Mas ainda hoje o uso de descritores morfológicos é considerado o “cartão de apresentação” de uma nova variedade. Mesmo sabendo que o uso desses descritores apresenta uma série de inconvenientes, como por exemplo, podem variar de acordo com o tecido analisado; necessidade de amplo espaço físico para a avaliação do material; necessidade de um grande número desses descritores. Além disso, a expressão das características morfológicas é influenciada por fatores ambientais. Em muitos casos, cultivares geneticamente próximas são morfológicamente muito similares e difíceis de diferenciar mediante comparação botânica.

Para contornar as limitações dos marcadores morfológicos na diferenciação, caracterização e identificação de cultivares, o uso de marcadores moleculares vem crescendo, por serem mais versáteis, rápidos e seguros. Apesar de ainda não serem utilizados para registro e proteção de cultivares, exames baseados em DNA tem permitido dirimir dúvidas entre cultivares semelhantes e auxiliando no manejo de coleções de germoplasma. Com a aprovação da Lei de Proteção de cultivares nº 9.456, de 25 de abril de 1997, espera-se que o *fingerprinting* genético seja também utilizado na caracterização de cultivares e que assegure os direitos da propriedade intelectual.

Um grupo de proteínas que apresentam uma grande potencial para identificação de cultivares é o de proteínas resistentes ao calor. Essas proteínas são hidrofílicas, abundantes, extraídas em condições de altas temperaturas, e são armazenadas nos últimos estádios de desenvolvimento das sementes, além de serem codificadas em vários locos. Mas no caso de espécies autógamas pode ocorrer uma base genética estreita, dificultando a certificação da pureza genética através da técnica.

Outros tipos de marcadores que vem sendo utilizados para caracterização de cultivares é a técnica de eletroforese de isoenzimas, esses marcadores detectam de forma indireta, polimorfismo em sequências de DNA e na carga elétrica de proteínas com função enzimática, gerado por mutações na sequência gênica.

Em sementes de hortaliças, marcadores de isoenzimas vêm sendo utilizados para a caracterização de cultivares de abóbora, batata-doce, cenoura, tomate, pimentão etc. Os sistemas enzimáticos mais utilizados são: aspartato transaminase, enzimas álcool desidrogenase, malato desidrogenase, peroxidase e superóxido dismutase. Entretanto, os marcadores isoenzimáticos possuem a desvantagem de evidenciar um número limitado de polimorfismo entre genótipos próximos.

Já os marcadores moleculares, baseados em DNA ou RNA, possibilitam resultados precisos em relação às linhagens e cultivares comerciais, e a identificação de novos alelos de genes relacionados a características de interesse. Este tipo de marcador pode revelar diferenças entre os genótipos de forma mais eficiente, pois atuam diretamente sobre o genoma do organismo.

Os principais tipos de marcadores moleculares utilizados para caracterização de cultivares são:

Fragmentos de restrição de segmentos polimórficos (RFLP) - nessa técnica, o DNA é digerido com enzimas de restrição, que clivam a fita dupla de DNA em sequências específicas, gerando um grande número de fragmentos de diferentes tamanhos. Os mesmos são separados por eletroforese, posteriormente desnaturados e transferidos para uma membrana de nitrocelulose (processo denominado *Southern blot*). A membrana é exposta a uma solução contendo sonda radioativa, que hibridiza com a região homóloga de DNA, permitindo a visualização destes fragmentos através do processo de autorradiografia. O polimorfismo ocorre devido à variação na distribuição dos sítios de restrição na fita de DNA, gerando fragmentos de diferentes tamanhos, que resultam em diferenças na posição das bandas no gel.

Os marcadores RFLP têm a vantagem de cobrir, potencialmente, todo o genoma, propiciando um alto nível de discriminação entre indivíduos. Possuem expressão co-dominante, permitindo identificar genótipos heterozigotos e homozigotos; o número de marcadores é praticamente ilimitado; e apresentam alta consistência e repetitividade dos resultados e tem apresentado resultados positivos quando da sua utilização na identificação de cultivares de hortaliças. Entretanto, a técnica é laboriosa, exige disponibilidade de biblioteca de sondas, utiliza material radioativo e o custo é bastante elevado.

Polimorfismo do DNA amplificado ao acaso (RAPD) - consiste na amplificação de segmentos de DNA ao acaso, utilizando um único primer composto de sequências curtas é arbitrária de oligonucleotídeos. Essa técnica molecular é considerada simples, rápida, com custo relativamente baixo e com alto nível de polimorfismo. As principais limitações consistem em falhas na reprodutibilidade e uma restrita informação genética por loco, devido à sua expressão dominante (não distinguindo heterozigotos de homozigotos), fatores que comprometem grandemente a precisão e a praticidade do uso da técnica para análise de pureza genética.

Sequência simples repetida (SSRs) - também conhecidos como microssatélites, são marcadores baseados na amplificação de DNA por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) consistem de pequenas sequências, com 1 a 6 nucleotídeos de comprimento, repetidas *in tandem*, podendo ocorrer tanto em regiões codificadoras, quanto em regiões não codificadoras. Comparado com as demais técnicas, é altamente polimórfica e apresenta elevada capacidade para detectar polimorfismo entre os diferentes acessos, espécies ou indivíduos de uma mesma população. Devido a sua expressão codominante e ao multialelismo, os microssatélites são os marcadores que apresentam o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo, podendo ser rapidamente isolados em bibliotecas genômicas. Cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo diferente do mesmo loco. Os microssatélites vêm sendo usados para a caracterização e certificação da pureza genética em sementes híbridas e em variedades de várias hortaliças.

Fragmentos de comprimento polimórfico amplificado (AFLP) – a técnica de AFLP combina as técnicas RFLP e RAPD, o DNA genômico é clivado com duas enzimas de restrição, uma de corte raro e outra de corte frequente e, posteriormente, ligado a adaptadores específicos que possuem terminais complementares às extremidades resultantes da clivagem pelas enzimas de restrição. Em seguida, os fragmentos obtidos são amplificados via PCR a partir de *primers* específicos e complementares.

O AFLP tem como vantagens o grande número de marcadores analisados em um único gel, com alto poder de detecção de variabilidade genética; não requer informação prévia de sequência de DNA; e há a possibilidade de robustez dos resultados, quando comparados com a técnica

RAPD. Entretanto, a principal limitação dos marcadores AFLP, é o baixo conteúdo de informação genética por loco, pois, assim como os marcadores RAPD, são marcadores dominantes.

Polimorfismo de um simples nucleotídeo (SNP) - os SNP's são alterações genômicas, nas quais apenas uma base nitrogenada está alterada com frequência de pelo menos 1%. Os SNP's são marcadores bi-alélicos, podendo ocorrer tri-alélicos em uma proporção menor, de forma que o conteúdo informativo em um único SNP é limitado, em comparação com os marcadores microssatélites (SSR) que são polialélicos. A grande vantagem dos SNP's em comparação aos outros marcadores reside na abundância de polimorfismos entre alelos de um determinado gene.

A escolha da melhor método molecular irá depender do objetivo do estudo. De um modo geral, os marcadores considerados multilocos utilizados em DNA *fingerprinting* (RAPD, AFLP, etc) são recomendados para estudos de identidade genética e variabilidade dentro de uma mesma espécie. Já os marcadores que se baseiam nos comprimentos de fragmentos de restrição com, por exemplo, o RFLP, são mais utilizados em estudos de diversidade genética de espécies fortemente relacionadas. Já para análise de espécies com alto nível de divergência evolucionária, os marcadores baseados em análises de sequencias, como por exemplo, a PCR são os mais indicados.

Os marcadores moleculares podem ser utilizados também para determinar a pureza genética das sementes de hortaliças. A determinação da pureza genética é feita por meio da estimativa do parentesco genético entre as sementes baseando-se na similaridade genética calculada. É possível, por exemplo, quantificar taxas de polinização cruzada e determinar contaminações genéticas em amostras de sementes de determinado acesso.

O processo de maturação das sementes envolve várias alterações bioquímicas, fisiológicas e morfológicas que são responsáveis desde a fertilização do óvulo até a colheita das sementes. Esse processo é marcado pela divisão celular e uma diferenciação dos tecidos. Após esse passo ocorre uma fase de aumento progressivo da massa seca das sementes e na capacidade de germinação das mesmas. A fase final desse processo é marcada pelo conteúdo máximo de matéria seca das sementes, caracterizando

o ponto de maturidade fisiológica. Com isso a desidratação das sementes intensifica. Nas fases iniciais do desenvolvimento, as sementes não são capazes de tolerar a dessecação. A aquisição dessa tolerância está relacionada com a síntese de proteína LEA (*Late Embriogenesis Accumulating*). Com isso o estudo das proteínas LEA tem sido utilizado como um dos indicativos de tolerância à dessecação das sementes.

A deterioração das sementes também está relacionada com a perda da integridade das membranas celulares. Por serem constituídas de uma dupla camada lipídica, as membranas são o sítio principal do processo de peroxidação de lipídeos, que levam a produção de radicais livres altamente reativos, causando uma desorganização celular e, em consequência, provocando um declínio no vigor das sementes. No entanto, as células possuem um complexo sistema de defesa de antioxidantes para proteção causados pelos radicais livres. Nesse mecanismo de proteção estão envolvidos várias enzimas e peróxidos, tais como superóxidos dismutase, catalase, peroxidase e ascorbato peroxidase. Estudar as variações nos perfis das enzimas envolvidas no processo de deterioração pode trazer informações importantes sobre as alterações bioquímicas resultante da deterioração nas sementes.

A pesquisa na área de biologia molecular associada ao controle de qualidade de sementes tem evoluído rapidamente e novas técnicas têm-se mostrado úteis na obtenção de classes distintas de marcadores moleculares. Essas técnicas visam estudar o indicativo de quanto um gene está sendo expresso e a concentração relativa dos transcritos desse gene em uma célula, ou seja, o quanto a célula está investindo do seu maquinário bioquímico para produzir a proteína codificada pelo gene.

Com isso, foram desenvolvidas novas metodologias que visam medir a concentração dos transcritos dos genes em células e tecidos. Em hortaliças, por exemplo, o uso dessas técnicas tem como objetivo isolar genes responsáveis por indução de resistência a doenças, como por exemplo, nematoide de cisto em batata, viroses em batata e tomate, antracnose em feijão vagem; míldio em alface, entre outros.

Para análise de expressão genica, a metodologia que vem sendo muito utilizadas são as sequências expressas (EST), Essa técnica tem mostrado ser bastante informativa uma vez que permite identificar os genes que são expressos em uma linguagem celular ou em um determinado tecido durante um estágio de desenvolvimento específico. As EST são sequencias parciais de uma extremidade da molécula de DNA complementar (cDNA), que é o resultado do sequenciamento sistemático dos clones de uma biblioteca de cDNA. São, portanto, sequencias dos RNA mensageiros (mRNA) expressos em uma célula da forma de cDNA, permitindo a caracterização preliminar do transcriptoma de um organismo. A EST também representa uma alternativa para a análise de organismos com organizações cromossômicas complexas, como certas plantas que apresentam altos níveis de poliploidia. Essas sequências têm sido muito utilizadas em estudos de expressão gênica em sementes. Como por exemplo, na germinação das sementes, onde estão envolvidos vários hormônios e que sugere a presença de uma ação cruzada pelos hormônios GA, ABA e o etileno; assim a utilização de sequências expressa (EST), por meio da técnica de *microarrays*, tem sido uma estratégia bastante informativa.

Os microarranjos (*microarrays*) ou *chips* de DNA é uma técnica que permite a investigação de milhares de genes de maneira simultânea. Os *microarrays* oferecem a possibilidade de estudo de centenas de genes envolvidos em diferentes estágios de desenvolvimento das sementes, bem como identificar padrões de expressão em tecidos específicos. Por meio dessa técnica já estão disponíveis microarrays representando quase a totalidade dos 26 mil genes de *Arabidopsis*. Estes recursos no estudo de *Arabidopsis* abrem um leque bastante grande de potencialidades para o seu uso na pesquisa.

Atualmente, os avanços tecnológicos permitem que os métodos para análise de expressão gênica em larga escala sejam utilizados rotineiramente. Um destes métodos é a técnica baseada na análise de EST e que vem sendo bastante utilizada em análise de sementes, essa técnica é conhecida como Serial da Expressão Gênica (SAGE). A técnica baseia-se em três princípios: primeiro, uma pequena sequência de cDNA de 9-14 pares de bases (tag ou etiqueta) é isolada de uma posição definida dentro de cada transcrito; segundo, múltiplos tags podem ser concatenados e sequenciados, revelando a

sequência de milhares de tags simultaneamente; terceiro, este resultado é uma estimativa quantitativa e qualitativa da expressão gênica dada pela determinação da abundância de tags individuais e a identificação do gene correspondente a cada respectivo tag.

O desenvolvimento destas tecnologias permite determinar o nível de expressão de milhares de genes em uma única amostra. Essa técnica vem sendo utilizada na caracterização da expressão de genes durante o desenvolvimento das sementes, incluindo a expressão de glicina, albumina e lipoxigenases.

Outra técnica muito utilizada em estudos de expressão gênica é a transcrição reversa associada à reação de PCR, RT-PCR, essa técnica revolucionou o estudo da expressão gênica. Baseia-se na síntese de cDNA sobre um molde de mRNA realizada pela enzima transcriptase reversa, seguida de amplificação por meio de PCR. Com a utilização dessa técnica é possível detectar os transcritos de qualquer gene, independente da quantidade de material inicial. Na reação de RT-PCR, o RNA molde é duplicado com a geração de uma fita de DNA complementar (cDNA) através da enzima transcriptase reversa. A sequência de cDNA de interesse é então amplificada exponencialmente usando a PCR. A detecção dos produtos de PCR é realizada através de gel de poliacrilamida.

A RT-PCR vem sendo usada em estudos de expressão de genes durante o desenvolvimento do endosperma das sementes e acúmulo da enzima estaquiase sintase no desenvolvimento de sementes de *Vigna angularis*. E vem sendo utilizada, também, em estudo da contribuição dos genomas maternal ou paternal nas sementes.

Dentre as metodologias utilizadas para a identificação e o isolamento de um grande número de importantes genes expressos em sementes, o 'Differential Display Transcriptase Reversa PCR (DD-RT-PCR) é um método baseado em PCR que permite a análise da expressão gênica durante as interações patógeno hospedeiro, permitindo a identificação de genes diferencialmente expressos durante o processo de infecção, em amostras vindas de células ou tecidos, de diferentes estágios ou condições de desenvolvimento.

Outra técnica para analisar os ácidos nucleicos, é conhecida como hibridização do tipo dot ou blot, Southern e Northern, e hibridização *in situ*. A técnica de Northern blot tem sido utilizada para analisar mRNAs da proteína de armazenamento, gliadina e de proteínas de choque térmicos em sementes.

A transformação genética vem sendo, cada vez mais, incorporada aos programas de melhoramento de plantas. É uma técnica que se baseia na transferência de genes específicos e que possuem importâncias agronômicas para uma determinada variedade, em um tempo bem inferior quanto comparado a obtenção de uma nova variedade através do melhoramento convencional.

Toda essa revolução biotecnológica está apenas no início; estudiosos garantem que essa revolução se divide em quatro grupos. Onde o primeiro grupo encontram-se os estudos relacionados a metodologias para conferirem resistência e tolerância a herbicidas. O segundo grupo é formado por plantas com maior qualidade nutricional; já o terceiro e quarto são compostos por plantas com características farmacêuticas e químicas específicas.

A produção e utilização de plantas transgênicas vem causando uma grande discussão tanto da comunidade científica como na mídia. Toda essa discussão vem apresentando diferentes pontos de vista sobre o benefício e risco do uso dessa tecnologia. A presença constante de sementes de plantas geneticamente modificadas (GM) em lotes de sementes convencionais tornou-se um crescente problema para o comércio internacional e, em alguns casos acarretando em sérias consequências para as empresas exportadoras que as comercializam. Com isso, levando-se em conta que o maior veículo dessa tecnologia é a semente, é preciso que se utilizem técnicas seguras e precisas na detecção, identificação e quantificação dessas sementes de plantas transgênicas.

Entre as técnicas de identificação de sementes de espécies GM mais usadas, encontra-se os baseados em proteína, como o teste de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbant Assay*) que baseia-se em reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas e os kits (tiras de fluxo lateral) que trabalham com anticorpos; ambos só oferecem resultado qualitativo e os baseados na reação de PCR que estuda o gene inserido no DNA do material,

pode ser utilizado para ambas análises: qualitativa (detecção e identificação) e quantitativa através do PCR competitivo e do PCR em tempo real.

O teste de Elisa, utilizado na detecção e quantificação de OGMs, fundamenta-se no ensaio de duplo anticorpo ou “sanduíche”, que utiliza dois anticorpos específicos para a proteína transgênica (antígeno). Um deles é utilizado na sensibilização da microplaca, visando à captura do antígeno presente na amostra, e o outro geralmente está conjugado a uma enzima (peroxidase ou fosfatase alcalina), que revela a reação, através da cor. Outra variação do teste de ELISA, que também é utilizada na detecção e quantificação de OGM's, é o ensaio competitivo, onde o antígeno presente na amostra e um padrão (um antígeno conjugado com uma enzima) competem pela ligação do anticorpo de captura. Neste ensaio, a concentração de antígeno é inversamente proporcional à intensidade colorimétrica produzida.

O teste de Elisa é um método sensível, específico, seguro, robusto, rápido e que geralmente não requer muito treinamento. Mas infelizmente apresenta algumas limitações na sua aplicação, como por exemplo, o conteúdo de proteína que pode variar consideravelmente e a quantificação neste caso não pode ser considerada exata.

O método de tira de fluxo lateral, ou Kits, é geralmente utilizado em unidades de beneficiamento de sementes, onde é necessário determinar rapidamente a presença de sementes de plantas GM. Requer apenas 10 a 20 minutos para sua excursão. As tiras utilizadas possuem um duplo anticorpo no formato de ‘sanduiche’.

Assim, anticorpos específicos à proteína alvo são acoplados a um reagente colorido e incorporados na tira. Quando esse anticorpo é colocado em contato com o extrato que contenha a proteína proveniente da modificação genética, um complexo proteína-anticorpo é formado com parte do anticorpo incorporado ao reagente colorido. Estas zonas de captura apresentam uma coloração avermelhada quando o complexo e/ou o reagente colorido são capturados. A presença de apenas uma linha na membrana indica um resultado negativo (linha de controle). Já o aparecimento de duas linhas indica que uma amostra é positiva. A desvantagem deste tipo de teste é que ele não pode quantificar o conteúdo de OGM presente na amostra. Além disso, Kits comerciais estão

disponíveis para poucos produtos OGM, sendo que cada um deles pode detectar somente uma proteína específica.

A tecnologia da PCR para a análise de OGM é a técnica mais aceita internacionalmente. Baseia-se na amplificação de um segmento da construção gênica inserida na planta. O segmento a ser amplificado pode ser o promotor, o terminador, o marcador de seleção, o gene de interesse agrônômico ou outra região por ventura inserida. É um método sensível, específico, seguro, capaz de detectar uma ampla série de eventos e de distinguir as variedades GM que apresentam diferentes construções gênicas, porém expressam a mesma proteína.

A PCR apresenta algumas limitações, como por exemplo, dificuldade na construção dos iniciadores, uma vez que a informação sobre a sequência da modificação genética geralmente é confidencial e um elevado custo, pois cada teste é específico para uma única modificação genética.

Ainda não existe um método padronizado para detecção, identificação e quantificação de OGM em lotes de sementes. A Associação Internacional de Análise de Sementes (ISTA) publicou um documento estabelecendo estratégias para o desenvolvimento de testes para análise de sementes geneticamente modificadas, além da inclusão de um capítulo nas Regras Internacionais de Sementes sobre detecção, identificação e quantificação de sementes GM.

Nas últimas décadas, acompanhando o desenvolvimento de novas metodologias e os avanços tecnológicos, principalmente os da área de informática, a biologia molecular tem evoluído bastante. Essa evolução das técnicas moleculares tem possibilitando uma maior segurança e confiabilidade dos resultados no controle de qualidade das análises de sementes. No entanto, ainda há necessidade de muitas pesquisas, antes de ser estabelecido como uma ferramenta decisiva nos programas de controle de qualidade das sementes.

Literatura consultada

AHMED, F. E. Detection of genetically modified organisms in foods. **Trends In Biotechnology**, V. 20, n.5, p.215-223, 2002.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 4.ed. - Porto Alegre: Artmed, 2004.

BALLESTER, J; VICENTE, C. Determination of F1 hybrid seed purity in pepper using PCR-based markers. **Euphytica**, v.103, p.223-226, 1998.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seed: Physiology of development and germination**. 2ed. Plenum Press, 445p.1994.

CHAMBERLAIN, J. S.; CHAMBERLAIN, J. R. Optimization of multiplex PCRs. In: **The Polymerase Chain Reaction**. MULLIS, K.B.; FERRÉ, F.; GIBBS, R. A. eds. p.38-46. Birkhauser Boston Press. 1994.

DELLA VECCHIA, P.T; SILVA, C.A.R; TERCENIANO SOBRINHO, P. Use of molecular marker techniques in seed testing by Brazilian seed companies. **Scientia Agrícola**, v. 55, p. 79-82, 1998.

EISEN, M.B.; BROWN, P.O. DNA arrays for analysis of gene expression. **Methods in Enzymology**, v. 303, p.199-205, 1999.

GELETA, L.F; LABUSCHAGNE, M.T; VILJOEN, C.D. Relationship between heterosis and genetic distance based on morphological traits and AFLP markers in pepper. **Plant Breeding**, v. 123, p. 467-473, 2004.

GLICK, B.R.; PASTERNAK, J.J.; **Molecular Biotechnology – Principles & Applications of Recombinant DNA**. ASM press. 500 p. 1994.

GUT, M. Detection of genetically modified organisms (GMO) in food. GeneAmp 5700 sequence detection system. PE Biossistems. **Application Report**. 2001.

HOLST-JENSEN, A. et al. PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.375, p.985- 993, 2003.

LAYTON, D. Testing seeds and seedlings for genetically enhanced traits using Imunoassay technology. **Seed World**. Agosto, 2000.

MCDONALD, M.B. Seed Deterioration: Physiology repair and assessment **Seed Science and Tecnology**, v.22,n.3, p.531-539,1999.

MARCOS FILHO, J.; BENNETT, M.A.; MCDONALD, M.B.; EVANS, A.E.; GRASSBAUGH, E.M. Assessment of melon seed vigour by an automated computer imaging system compared to traditional procedures. **Seed Science and Technology**, v. 34, n. 2, p. 507-519, 2006.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 495p.2005.

MUKHLESUR, R.M; HIRATA, Y; ALAM, S.E. Genetic Variation Within *Brassica rapa* Cultivars Using SDS-PAGE for Seed Protein and Isozyme Analysis. **Journal of Biological Sciences**, v. 4., p. 239-242, 2004.

MUKHLESUR,R;HIRATA,Y. Genetic Diversity in *Brassica* Species Using SDS-PAGE Analysis. **Journal of Biological Sciences**, v.4, n 2, p. 234-238, 2004.

PALLOTTINI,L;SOATTIN,M;LAZZARIN,R;PARRINI,P;LUCCHINI,M.Genomic DNA fingerprints as a tool for identifying cultivated typesof radicchio (*Cichorium intybus* L.) from Veneto, Italy. **Plant Breeding**, v.122, p.178-183, 2003.

PUNTARULO, S.; GALLEANO, M.; SÁNCHEZ, R. A.; BOVERIS, A. Superoxide anion and hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes during germination. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1074, n. 2, p. 277-283, July 1991.

TENGEL, C.; SCHÜßLER, P.; SETZKE, E.; BALLE, J.; SPRENGER-HAUßELS, M. PCR-based detection of genetically modified soybean and maize

in raw and highly processed foodstuffs. *BioTechniques* 31, p.426-429, 2001.

WINDELS, P.; TAVERNIERS, I.; DEPICKER, A.; BOCKSTAELE, E. V.; DE LOOSE, M. Characterization of the Roundup Ready soybean insert. *European Food Research and Technology*. V. 213, p.107-112, 2001.

WURZ, A.; BLUTH, A. ; ZELTZ, P.; PFEIFER, C.; WILLMUND, R. Quantitative analysis of genetically modified organisms (GMO) in processed food by PCR-based methods. **Food Control** 10, p.385-389, 1999.