

**XVI Curso sobre Tecnologia de Produção de Sementes de Hortaliças**  
**Areia/PB – 19 a 21 de outubro de 2016**

**Análise de sementes de hortaliças**

**Patrícia P. Silva**

Universidade Federal de Pelotas  
patybio55@yahoo.com.br

**Warley M. Nascimento**

Embrapa Hortaliças  
warley.nascimento@embrapa.br

**Introdução**

O uso de sementes de qualidade é um elemento essencial para o sucesso do estabelecimento de um campo de produção. A qualidade de sementes considera 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. Esses atributos são verificados por diversos testes, que seguem normas rígidas na sua realização. Inicialmente, é necessário atender o conjunto de requisitos mínimos estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para a comercialização de sementes de espécies olerícolas. Como exemplo, a tabela 1 apresenta os requisitos mínimos para a comercialização de sementes de algumas espécies olerícolas.

**Tabela 1.** Padrões vigentes para a comercialização de sementes de algumas espécies de hortaliças (MAPA, 1986)

Característica	Espécie				
	Abóbora	Alface	Cebola	Cenoura	Tomate
Pureza física mínima (%)	98	95	98	95	98
Germinação mínima (%)	75	70	70	65	75
Sementes cultivadas (Número máximo/amostra)	04	15	02	02	04
Sementes silvestres (Número máximo em 3g)	05	15	04	10	08
Sementes nocivas (Número máximo/amostra)	05	15	10	15	05
a) Toleradas					
b) Proibidas	00	00	00	00	00

Assim, se um lote de sementes de qualquer dessas espécies citadas acima, for constituído por sementes com alta qualidade genética, física e sanitária, mas não apresentar uma qualidade fisiológica dentro dos padrões estabelecidos, como por exemplo, uma germinação de 50%, esse lote não pode ser comercializado. Dessa forma, é importante que empresas de sementes possuam um programa de controle de qualidade, de amplitude externa

e interna, através de diretrizes normatizadas durante as diversas fases envolvidas na produção, processamento, armazenamento, distribuição e comercialização de suas sementes.

### **Importância dos atributos**

Qualidade fisiológica - o atributo qualidade fisiologia é a capacidade que as sementes apresentam de desempenhar funções vitais relacionadas à sua germinação, vigor e longevidade. Esses fatores, devidamente balanceados, proporcionam maior homogeneidade de população e, conseqüentemente, maior qualidade e produtividade.

O uso de sementes com elevada qualidade fisiológica vai levar a uma germinação mais rápida, gerando plântulas com maior tolerância às adversidades ambientais e com maturidade mais uniforme, resultando no aumento da produtividade da lavoura.

Qualidade física - esse atributo está relacionado com a pureza e o estado físico do lote. A pureza física se caracteriza pela proporção dos diferentes componentes físicos presentes no lote de sementes, como por exemplo, sementes puras, sementes silvestres, sementes de outras cultivares e material inerte. A utilização de um lote de sementes com baixa pureza física resulta em um campo de produção com presença de plantas fora do padrão desejado, no potencial produtivo do campo. Além disso, a qualidade física das sementes envolve outras características além da sua integridade e aparência, sendo igualmente importantes o grau de contaminação com outras espécies e a quantidade de material inerte existente.

Qualidade sanitária - entende-se por qualidade sanitária a situação em que se encontra um lote de sementes quanto à presença de pragas e doenças. A qualidade sanitária é resultante da ação dos diversos fatores ocorridos durante todo o processo de produção das sementes, devendo ser adequadamente avaliados para evitar que a associação de patógenos às sementes

comprometa a qualidade das mesmas, o que acabará causando redução na produtividade. A presença de microrganismos ou insetos nas sementes provocam reflexos negativos no estabelecimento da cultura no campo, podendo afetar a germinação, o vigor e a produtividade, por causar morte da semente, redução do estande e doenças das plantas.

Qualidade genética - os atributos genéticos são representados pela pureza varietal, potencial de produtividade, resistência a pragas e doenças, precocidade, resistência a condições adversas de solo e clima, dentre outros. Um campo de produção estabelecido com sementes de uma cultivar com baixa pureza genética terá a sua produtividade final afetada, comprometendo a viabilidade econômica final.

No caso especial das hortaliças, devido a grande utilização de híbridos, a pureza genética é considerada uma prioridade básica e merece destaque na avaliação da eficiência e credibilidade da empresa produtora de sementes. Assim, é necessário cuidado especial durante a multiplicação das sementes, a partir das sementes genéticas (obtidas pelo melhorista), até atingir a quantidade necessária para a comercialização; assim, a pureza genética é a principal característica a ser preservada.

### **Avaliação da qualidade de sementes de hortaliças**

O controle de qualidade de sementes é de fundamental importância para o estabelecimento de um campo de produção, sendo esta impulsionada principalmente pela competitividade do mercado. A determinação da qualidade das sementes deve ser feita através de exame pormenorizado e crítico de uma amostra, tendo como objetivo primordial de avaliar a qualidade do lote em questão; esses exames envolvem um conjunto de testes, mas cada um deles, por si só, também é uma análise. A análise conduzida de forma padronizada permite obter resultados confiáveis, consistentes e, mediante sua interpretação cuidadosa, fornece

subsídios para a tomada de decisões corretas e/ou avanços do conhecimento disponível. A utilização da análise de sementes, de forma padronizada, como componente do sistema de produção e comercialização somente é possível devido à existência da Regras para Análise de Sementes - RAS.

Nas 'RAS' encontram-se os procedimentos padrões para a obtenção de amostras e para a execução dos testes de pureza física, de verificação de espécies e cultivares, para o exame de sementes nocivas, de germinação, de determinação do grau de umidade, de sanidade de sementes entre outros. As RAS tiveram sua 1ª edição pelo Ministério da Agricultura, em 1967 e a partir de então, foram publicadas outras atualizações. A última atualização ocorreu em 2009, substituindo a edição de 1992 e, é composta de três volumes: Regras para Análise de Sementes, Manual de Análise Sanitária de Sementes (anexo ao Capítulo 9 – Teste de Sanidade de Sementes) e o Glossário Ilustrado de Morfologia. Mas outros testes não incluídos nas RAS são utilizados, com sucesso, em programas internos de controle de qualidade.

1. Avaliação da qualidade fisiológica - o potencial fisiológico é avaliado rotineiramente através dos testes de germinação e em algumas espécies, do teste de tetrazólio (viabilidade). Porém, nem sempre o teste de germinação é eficiente, uma vez que as condições em que é conduzido no laboratório geralmente não são as mesmas que a semente vai encontrar no campo. Desta forma, muitas vezes, os resultados são diferentes e, dependendo das condições extremas do campo, poderá ocorrer comprometimento do estande da lavoura, levando à uma redução na produtividade final. Entretanto, o teste de germinação pode ser considerado eficiente sob dois pontos de vista:

a) quando a necessidade é fornecer informações sobre o potencial de um lote para germinar sob condições ótimas de ambiente;

b) é um teste padronizado, e dessa forma possui ampla possibilidade de repetição dos resultados, desde que sejam seguidas as instruções estabelecidas nas RAS.

Para obtenção de um resultado confiável no teste de germinação a semente deve dispor de condições favoráveis de ambiente. Os fatores ambientais essenciais à germinação das sementes são a água, o oxigênio e a temperatura. O grau de exigências desses fatores é variável de espécie por espécie. Sendo que a temperatura é o fator fundamental para que o teste decorra de maneira rápida e eficiente. As sementes apresentam capacidade de germinar sob ampla faixa de temperatura, não havendo uma temperatura ótima e uniforme de germinação para todas as espécies, no entanto, em geral, a mesma pode ser expressa em termos de temperaturas cardiais, isto é, mínima, máxima e ótima.

Outro fator que deve ser levado em consideração é o substrato, este apresenta inegável importância no processo germinativo, pois fatores como estrutura, aeração, capacidade de retenção de água e grau de infestação de patógenos, podem variar de acordo com o tipo de material utilizado.

A luz por sua vez é importante, principalmente para aquelas espécies fotoblásticas positivas e para algumas sementes que apresentam um certo grau de dormência; nesses casos a luz se torna vital para a sua germinação. Entretanto, ainda que o uso da luz seja benéfico para a germinação de algumas sementes que apresentem dormência, há algumas poucas espécies em que a presença desta faz com que este processo seja inibido.

O fato do teste de germinação não ser adequado e seguro para estimar efetivamente o percentual de germinação nas condições de campo foi o responsável pelo desenvolvimento do conceito de vigor, devido ao fato do vigor ser considerado um parâmetro mais sensível do que a germinação para avaliar a qualidade fisiológica de um lote de sementes. De acordo com a Association of Official Seed Analysts (AOSA), o vigor de sementes é representado pelas

propriedades que determinam o potencial de germinação e emergência das plantas de forma rápida e uniforme, garantindo o desenvolvimento de plântulas normais sob uma ampla diversidade de condições ambientais.

Os testes de vigor vêm sendo tornando cada vez mais frequentes para a determinação do potencial fisiológico de lotes de sementes, tendo como finalidade solucionar problemas surgidos a partir do processo de maturação e para garantir o desempenho adequado das sementes comercializadas. Assim, os testes de vigor são recomendados para atender pelo menos três objetivos básicos:

- a) Complementar as informações fornecidas pelo teste de germinação, através da detecção de diferenças significativas no potencial fisiológico de lotes com germinação semelhante.
- b) Distinguir, com alta margem de segurança, lotes de alto dos de baixo vigor.
- c) Separar lotes em diferentes níveis de vigor, de maneira proporcional ao comportamento quanto à emergência das plântulas, resistência ao transporte e potencial de armazenamento.

O vigor das sementes é influenciado pela junção das características genéticas da própria semente e pelas condições ambientais durante a sua produção. A presença e desenvolvimento de microrganismos patogênicos, bem como a forma e tipo de tratamento das sementes também poderá contribuir para a manutenção ou não do vigor das sementes.

Embora a maioria dos testes de vigor não sejam reconhecidos pelas RAS, por não terem uma metodologia padronizada, estes são utilizados pelas empresas produtoras de sementes com inúmeras finalidades, sendo a principal delas a determinação do potencial de armazenamento das sementes. Todo programa de controle de qualidade na produção de sementes de uma determinada espécie deve incluir o vigor como característica a ser avaliada, sob condições de laboratório. As informações sobre o vigor de sementes são bem mais relevantes para sementes de maior valor comercial, como as de várias hortaliças.

Várias classificações já foram propostas para identificar os testes mais precisos para à avaliação do vigor de sementes, mas a mais completa deve ser atribuída a McDonald (1975) pois, além de ser precisa, tem permitido a inclusão de novos métodos, sem se tornar, apesar de ter sido proposta no ano de 1975, desatualizada. De acordo com essa classificação, os testes passaram a ser distribuídos da seguinte maneira:

Testes físicos: esses testes avaliam aspectos morfológicos ou características físicas das sementes possivelmente associadas ao vigor, incluindo tamanho, massa unitária, densidade e coloração das sementes.

Testes fisiológicos: determinam atividades fisiológicas específicas, cuja manifestação depende do vigor. Como por exemplo, primeira contagem de germinação, velocidade de germinação ou de emergência de plântulas, crescimento das plântulas, classificação do vigor das plântulas.

Testes bioquímicos: analisam alterações bioquímicas relacionadas ao vigor das sementes. Compreendem vários testes, dentre eles o de tetrazólio e de condutividade elétrica.

Testes de resistência a estresses: são recomendados para avaliar o desempenho de sementes quando expostas a condições desfavoráveis de ambiente. Os mais utilizados são o de envelhecimento acelerado, deterioração controlada, teste de frio e de germinação a baixas temperaturas.

Até o momento, os únicos testes incluídos nas regras internacionais de análise de sementes (ISTA) é o envelhecimento acelerado, em soja, e condutividade elétrica, para ervilha e soja, deterioração controlada em brássicas e emergência da raiz primária em milho. Assim, mesmo que os testes disponíveis e mais recomendados separem, de maneira segura, lotes de alto e baixo vigor, ainda é difícil avaliar com certa precisão os resultados obtidos pelos testes de vigor.

O teste de tetrazólio pode ser utilizado como ferramenta importante em programas de controle de qualidade, que é um teste bioquímico que tem como finalidade determinar rapidamente a viabilidade de sementes, principalmente daquelas que apresentam dormência, das espécies recalcitrantes e as que germinam lentamente ou não germinaram ao final do teste de germinação. Também pode ser usado para avaliar o vigor, determinar a viabilidade das sementes após tratamentos pré-germinativos, avaliar os danos por secagem, por insetos e por umidade bem como, para detectar danos mecânicos de colheita e/ou beneficiamento. Como a integridade física é estreitamente relacionada ao potencial fisiológico, os resultados do teste de tetrazólio contribuem significativamente para a formulação de diagnóstico preciso, permitindo a identificação de problemas que comprometem o desempenho das sementes e a proposta de soluções, em período relativamente curto.

O teste de tetrazólio baseia-se na coloração dos tecidos vivos da semente que reagem com o sal de tetrazólio. Há delimitação das áreas saudias e doentes e, assim, é possível distinguir os tecidos vivos dos mortos e estabelecer o nível de viabilidade da semente. Apesar das vantagens verificadas na sua utilização, não deve ser considerado como um substituto para o teste de germinação, pois os resultados não caracterizam as anormalidades e outros distúrbios das plântulas, a presença de microrganismos e a dormência das sementes.

2. Avaliação da qualidade física - essa avaliação é feita através do teste de análise de pureza física, cuja a metodologia é estabelecida pela RAS. O objetivo é determinar a composição da amostra em exame e, conseqüentemente, a composição do lote de sementes, e a identidade das espécies de sementes e das partículas inertes que constituem a amostra. A

análise de pureza das sementes de hortaliças é, em geral, mais difícil, devido ao tamanho reduzido das mesmas.

A pureza física determina a composição da amostra e a proporção em que os componentes estão presentes; a indicação das sementes fisicamente puras é expressa em peso da amostra, em porcentagem. Na amostra são consideradas:

- Sementes puras (%): da espécie predominante e fragmentos maiores que  $\frac{1}{2}$  do tamanho original da semente. São também sementes puras: as intactas; os fragmentos maiores que  $\frac{1}{2}$  do tamanho original da semente; as imaturas, enrugadas, em início de germinação e alteradas por microrganismos, desde que possam ser identificadas como sendo da espécie em análise.
- Outras sementes (por número): de qualquer espécie diferente da semente pura;
- Material inerte (%): sementes e outros materiais que não são definidos como sementes puras ou outras sementes.

Na edição atual da RAS, para a caracterização da semente pura considera-se apenas a espécie, a identificação de cultivares é feita em análise separada. Outras informações que podem ser obtidas a partir da análise de pureza física são: conhecer melhor as condições de produção e a presença de sementes de plantas invasoras, inferir sobre a ocorrência de doenças, pragas e danos mecânicos, direcionar o beneficiamento, estabelecer o preço das sementes, indicar causas de descarte de lotes, obter subsídios para estabelecer padrões e auxiliar na fiscalização do comércio.

O exame de sementes silvestres nocivas indica o número de sementes dessas espécies encontradas na amostra. A relação de sementes nocivas é definida pela legislação. As principais implicações da presença dessas sementes em um lote são: impedir a sua

comercialização, introduzir ou aumentar a incidência dessas espécies em áreas de produção, promover a disseminação de microrganismos e aumentar o custo na produção das hortaliças.

Em função das características da análise de pureza, esse teste é considerado insuficiente para identificar devidamente todos os aspectos que contribuem para caracterizar a condição ou integridade física do lote de sementes, pois esta também é associada a modificações em sua estrutura ou aparência, que podem afetar o potencial fisiológico e a sanidade.

A avaliação da qualidade física também pode ser feita através de outros testes para detecção de injúrias mecânicas, (hipoclorito de sódio, iodo, verde rápido), distribuição do tamanho (“teste de peneiras”), peso volumétrico, peso de 1000 sementes, verificação da aparência (cor, brilho, manchas etc.) e determinação do grau de umidade.

3. Avaliação da qualidade sanitária - a avaliação da sanidade de sementes pode ser efetuada com a utilização de vários procedimentos descritos nas RAS. O objetivo do teste de sanidade é determinar o estado sanitário de uma amostra de sementes. A análise de sanidade permite identificar e quantificar os microrganismos associados às sementes, ou seja, presença ou ausência de agentes patogênicos, tais como fungos, bactérias, vírus, nematóides e insetos.

Diferente das versões anteriores, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, na versão mais recente das RAS, atualizada em 2009, dedica um volume inteiro para tratar de Sanidade de Sementes. O objetivo central deste manual é suprir o analista de laboratório com informações sobre os métodos mais comuns de detecção de fitopatógenos em sementes, com protocolos simplificados e ilustrações fotográficas que visam facilitar as análises de rotina.

Existem vários testes que podem ser aplicados para a detecção de microrganismos associados às sementes. Esses testes variam quanto a sensibilidade e o objetivo, sendo que

alguns métodos exigem incubação das sementes, enquanto que outros permitem a identificação do patógeno através de descolorações e de anormalidades do tegumento das sementes.

4. Avaliação da qualidade genética - nas etapas de obtenção e multiplicação das sementes, atenção especial é dada a sua pureza genética, pois esta é a garantia que as características de interesse acrescentadas aos materiais comerciais sejam mantidas e expressas nos cultivos subsequentes. A avaliação desse atributo é de grande importância na produção de sementes de hortaliças, devido ao fato do grande número de híbridos existentes. Assim, é essencial um sistema que permita monitorar e rastrear contaminações genéticas que ocorrem no campo, permitindo o fornecimento de sementes com elevados padrões de pureza genética.

A avaliação da pureza genética geralmente é realizada por meio de marcadores morfológicos baseados em características das sementes, plântulas, plantas em desenvolvimento. Mas a pesquisa na área de qualidade de sementes vem evoluindo nos últimos anos, e com isso novas técnicas na avaliação dos atributos genéticos vêm apresentado 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.

Atualmente, 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 e 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 morfolologicamente 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 têm permitido dirimir dúvidas entre cultivares semelhantes e auxiliado 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 um 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)** - 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) que 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 cultivares 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, além da 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 do 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 sequências, 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.

### Outras análises em sementes

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 utilizada é a de sequências expressas (EST). Esta 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 sequências 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, sequências 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 microarranjos (*microarrays*), tem sido uma estratégia bastante informativa.

A técnica de *microarrays* ou *chips* de DNA 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 identifica padrões de expressão em tecidos específicos.

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; esta 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, como por exemplo, *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 Reverse 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.

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 possuam 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. No primeiro grupo encontram-se os estudos relacionados a metodologias para conferir 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 químicos específicos.

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 benefícios 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 utilizadas encontram-se aquelas relacionadas às proteínas, 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 de grandes culturas, 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.

### **Análise de imagem para determinar a qualidade das sementes**

A análise de imagens tem sido utilizada para várias finalidades, constituindo uma valiosa ferramenta para caracterizar a evolução da maturação e identificar as alterações morfológicas e sua associação com o potencial fisiológico das sementes. Entre as técnicas de análise de imagem mais utilizadas encontram-se:

- **Raios - X:** o teste é indicado pela ISTA - *International Seed Testing Association* desde 1993 e pelas RAS desde 2009, para diferenciação entre sementes bem formadas (estruturadas)

ou parcialmente formadas, danificadas mecanicamente ou por organismos nocivos; permite, ainda, efetuar verificações da evolução do desenvolvimento das sementes, avaliando o grau de normalidade desse processo, mediante o exame do progresso da diferenciação dos tecidos embrionários e de suas relações com os tecidos de reserva.

O princípio da técnica de raios-X baseia-se na impressão de uma película sensível logo após sua exposição a uma fonte de radiação e na consequente obtenção de uma imagem do objeto irradiado. Esta pode ser conservada, reproduzida e examinada a qualquer momento.

O teste de raios-X deve ser executado com o conhecimento necessário das condições adequadas de exposição das sementes à radiação. Assim, a qualidade ou o poder de penetração dos raios-X é determinado pela quilovoltagem do equipamento. O período de exposição, juntamente com a miliamperagem fixa do equipamento, regulam a quantidade de raios-x que determina a densidade radiográfica ou o grau de escurecimento. Nesse sentido, diferentes interações entre voltagem e período de exposição para a obtenção de alta fidelidade das imagens radiográficas de sementes têm sido adotadas em função da espécie, do equipamento de raios-X e da sensibilidade da película fotográfica utilizada.

O método apresenta a particularidade de não destruir os objetos examinados, ser rápido e permitir a avaliação morfológica das estruturas internas da semente, como o embrião e os tecidos de reserva; desta maneira, é possível associar o estado de áreas vitais ao desempenho das sementes. Além disso, as imagens obtidas poderão ser catalogadas, arquivadas e utilizadas posteriormente para a definição de critérios de avaliação não subjetivos, padronizados e, conseqüentemente, mais precisos que os provenientes daqueles baseados apenas na visão humana.

A partir de trabalhos iniciais realizados com o emprego de raios-X, a evolução do conhecimento conduziu aos estudos sobre imagens digitais, com a utilização de “scanners” e

câmeras fotográficas digitais, envolvendo o processamento em computador, a associação entre raios-x e o potencial fisiológico, com o auxílio de programas computacionais (“softwares”) específicos. Essa análise consiste na obtenção de informações a respeito de objetos registrados em uma imagem digital, com base em algumas características como cor, textura, entre outras. As informações são mais detalhadas quando é efetuada a combinação entre as imagens digitais e as radiografias, permitindo identificar tanto as alterações de maior como as de menor extensão (“microdanos”), além de efetuar a associação entre os tipos, localização e extensão das injúrias (externas e internas) e o desempenho das sementes.

Deve-se destacar também que a identificação da época e momento de maturidade fisiológica das sementes é fundamental para o estabelecimento de diretrizes visando o manejo adequado durante e após a colheita, procurando minimizar a velocidade e a intensidade da deterioração. Este tema tem sido estudado para várias espécies de importância econômica, mas em menor escala para as hortaliças, incluindo cucurbitáceas e outras caracterizadas pela produção de frutos carnosos. Nestas, há dificuldade para identificação da maturidade dos frutos e sementes, pois sua formação é contínua.

- *Seed Vigor Imaging System – SVIS®*: a técnica teve início com a análise computadorizada de imagens de plântulas de alface, levando em consideração a intensidade, velocidade e uniformidade de desenvolvimento das plântulas. O programa capta imagens de plântulas e efetua determinações simultâneas do comprimento do hipocótilo, da raiz primária, da plântula inteira e da relação raiz/hipocótilo, durante a germinação das sementes. Após a captura dessas imagens, as mesmas são processadas em um computador, o qual gera valores referentes ao índice de vigor (valores de 0 a 1000, diretamente proporcionais ao vigor), uniformidade de desenvolvimento (também de 0 a 1000) e comprimento de plântulas.

O procedimento para avaliação do vigor de sementes por meio do SVIS<sup>®</sup> é bem simples e o resultado é obtido entre dois a três minutos. O sistema também elimina o erro humano aumentando, assim, a confiabilidade dos dados para posterior comparação, além de ser um procedimento de baixo custo. Já existem estudos recomendando sua realização para avaliação do vigor de sementes de várias hortaliças.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

De modo geral, a pesquisa em sementes no Brasil é realizada desde 1917. No entanto, até a década de 50 foram poucos os trabalhos focando nessa área. Somente a partir da década de 60, com a solidificação do setor sementeiro, começou uma maior percepção, tanto pública quanto privada, do quão importante era a obtenção de sementes com boa qualidade física, fisiológica e sanitária. Atualmente, a pesquisa na área de sementes no país é altamente reconhecida pela comunidade científica internacional, devido ao desenvolvimento de novas metodologias e os avanços tecnológicos, principalmente os da área de informática e biologia molecular. 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.

## **Referências**

- 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., 2004.

ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALISTS (AOSA). Seed Vigor Test Committee. **Seed vigour testing handbook**. Lincoln, 1983. 88p. (Contribution, 32).

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

BARBEDO, C.J.; NAKAGAWA, J.; BARBEDO, A.S.C.; ZANIN, A.C.W. Influência da idade e do período de repouso pós-colheita de frutos de pepino cv. Rubi na qualidade fisiológica de sementes. **Horticultura Brasileira**, v.12, n.2, p.118-124, 1994.

BENNET M.A. Determination and standardization challenges of vigor tests of vegetable seeds. **Informativo Abrates**, v.11, p.58-62, 2001.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009, 399p.

CARVALHO, M.L.M.; AELST, A.C.; ECK, J.W.; HOEKSTRA, F.A. Pre-harvest stress cracks in maize (*Zea mays* L.) kernels as characterized by visual, X-ray and low temperature scanning electron microscopical analysis: effect on kernel quality. **Seed Science Research**, v.9, p.227-236, 1999.

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.

GOMES JUNIOR, F.G.; MONDO, V.H.V.; CICERO, S.M.; McDONALD, M.B.; BENNETT, M.A. Evaluation of priming effects on sweet corn seeds by SVIS. **Seed Technology**, v.31, n.1, p.95-100, 2009.

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

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION - ISTA. **Seed vigour testing**. In: ISTA. International rules for seed testing. Bassersdorf: ISTA, 2004.

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

MACHADO, J.C. **Patologia de sementes**: fundamentos e aplicações. Lavras:ESAL/FAEPE, 1988. 107p.

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, 2005. 495p.

MARCOS-FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: KRZYZANOVSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA-NETO, J.B. Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina: **ABRATES**, cap. 3, 1999.

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

McDONALD-JUNIOR, M.B. A review and evaluation of seed vigor tests. Proc. **Assoc. Off. Seed Anal.**, v.65, p.109-39, 1975.

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.

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.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. 2.ed., Brasília: ABRATES, 1985. 289p

POPINIGIS, F.; CAMARGO, C. P Situação da pesquisa em sementes no Brasil. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 3, n. 2, p. 31-39, 1981.

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**, v. 1074, n. 2, p. 277-283, July 1991.

SAKO, Y.; MCDONALD, M.B.; FUJIMURA, K.; EVANS, A. F.; BENNETT, M.A. A system of automated seed vigour assessment. **Seed Science and Technology**, v 29, n.3, p. 625-636, 2001.

SILVA, G.C.; GOMES, D.P.; KRONKA, A.Z.; MORAES, M.H. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) provenientes do estado de Goiás.

**Semina: Ciências Agrárias**, v.29, n.1, p.29-34, jan./mar. 2008.

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.