



HUGO OLIVEIRA NOVAIS

**GERMINAÇÃO SOB EFEITO DO GLIFOSATO AFETA
MORFOLOGIA, ANATOMIA E CICLO CELULAR DE
PLÂNTULAS DE SOJA**

**LAVRAS - MG
2019**

HUGO OLIVEIRA NOVAIS

**GERMINAÇÃO SOB EFEITO DO GLIFOSATO AFETA MORFOLOGIA,
ANATOMIA E CICLO CELULAR DE PLÂNTULAS DE SOJA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte da exigência do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Welison Andrade Pereira
Orientador

**LAVRAS - MG
2019**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Novais, Hugo Oliveira.

Germinação sob efeito doglifosato afeta morfologia, anatomia e ciclo celular de plântulas de soja / Hugo Oliveira Novais. - 2019.
46 p.

Orientador(a): Welison Andrade Pereira.

Coorientador(a): Vânia Helena Techio, Thiago Alves
Magalhães.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Glycine max. 2. Qualidade fisiológica. 3. Índice mitótico. I.
Pereira, Welison Andrade. II. Techio, Vânia Helena. III. Magalhães,
Thiago Alves. IV. Título.

HUGO OLIVEIRA NOVAIS

**GERMINATION UNDER EFFECT OF GLYPHOSATE AFFECTS MORPHOLOGY,
ANATOMY AND CELL CYCLE OF SOYBEAN SEEDLINGS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte da exigência do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 30 de agosto de 2019.

Dra. Vânia Helena Techio – UFLA
Dr. Thiago Alves Magalhães – UFLA
Dr. Felipe Lopes da Silva – UFV

Prof. Dr. Welison Andrade Pereira
Orientador

**LAVRAS - MG
2019**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço especialmente a Deus, e a minha família, por todo amor, carinho, e apoio em todos os momentos de minha vida, especialmente nesses últimos anos de mestrado.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Biologia, pela oportunidade de aprimorar meus conhecimentos em Genética e melhoramento de Plantas e obter o título de Mestre. Ao programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade de cursar o mestrado, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa durante os dois anos de mestrado.

Aos órgãos de fomento ao estudo e pesquisa, dentre eles FAPEMIG e CAPES, que nos auxiliou de forma direta e indireta, no financiamento de todas as pesquisas no laboratório.

Ao professor e orientador Welison Andrade Pereira, pelos ensinamentos transmitidos, paciência, confiança, orientação e disponibilidade durante o curso. Aos professores do programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, por todos os ensinamentos e experiência transmitidos.

Aos amigos do laboratório de genética molecular, sempre dispostos a ajudar, dentre eles Antônio Carlos Porto, Fernanda Lopes, Luciana Miguel, Caroline Silva e Rafael Novaes, e em especial, ao Lamartine. Aos integrantes e técnicos dos laboratórios de Botânica, Citogenética e Sementes, que me auxiliaram e me orientaram nesses anos.

A todos os funcionários do DBI que me auxiliaram direta ou indiretamente, na realização do meu trabalho, dentre eles, Cléber, Lilian, Zélia, Rafaela, Iron e Patrícia. Ao Grupo de Estudos em Genética GEN, sempre presente e disposto a contribuir para o crescimento acadêmico dos discentes do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas.

Aos amigos adquiridos da cidade de Lavras e a todos os amigos de minha cidade natal. A todos os meus sinceros agradecimentos.

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

A soja é uma cultura de grande interesse econômico no agronegócio mundial, sendo que a mais cultivada é a transgênica, tolerante ao herbicida não seletivo, glifosato. O glifosato caracteriza-se por intervir na via de biossíntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, triptofano e tirosina, inibindo a síntese de proteínas, levando as plantas sensíveis à senescência e morte. O estudo aprofundado em nível anatômico e citológico é importante, tendo em vista que pesquisas mostram o glifosato gerando efeito fitotóxico, afetando a eficiência no uso da água, na fotossíntese, no acúmulo de biomassa, na síntese de aminoácidos e compostos secundários na soja. Este trabalho investiga o comportamento da soja transgênica e convencional, germinadas em diferentes concentrações de glifosato. Três cultivares de soja foram avaliadas, sendo: uma transgênica de primeira geração P98Y11; NS6906IPRO transgênica de segunda geração; e uma convencional UFV-16. Os testes de germinação, comprimento de plântulas e distribuição de massa seca foram empregados para avaliar a qualidade fisiológica da soja, correlacionando com os possíveis efeitos do glifosato para esses parâmetros. Em nível citológico, o ciclo celular foi estudado, avaliando-se o índice mitótico (IM) e verificando a presença de anormalidades em cada fase do ciclo. No âmbito da botânica, o estudo se voltou para a anatomia interna das plântulas, avaliando alterações nas medidas diamétricas dos tecidos integrantes do eixo caule-radicular avaliados. Os resultados confirmam a redução mais acentuada do índice mitótico na UFV-16 esta relacionado com maior comprometimento da germinação, comprimento das plântulas, mobilização da massa seca, adaptações anatômicas e ciclo celular. As cultivares P98Y11 e NS6906IPRO, mesmo com a isoforma da enzima EPSPS que atribui resistência ao herbicida, mostrou-se tolerante, mas não resistente, sendo acometida aos efeitos do glifosato, em menor intensidade, comprometendo a qualidade fisiológica, anatomia e ciclo celular

Palavra chave: *Glycine max*; soja transgênica; Qualidade fisiológica; Índice mitótico; Anatomia.

ABSTRACT

Soybean is a crop of great economic interest in the world's agribusiness, and the most cultivated is transgenic, tolerant to the non-selective herbicide glyphosate. Glyphosate is characterized by intervening in the biosynthesis pathway of aromatic amino acids phenylalanine, tryptophan and tyrosine, inhibiting protein synthesis, leading plants sensitive to senescence and death. In-depth study at the anatomical and cytological levels is important, as research shows glyphosate generating a phytotoxic effect, affecting water use efficiency, photosynthesis, biomass accumulation, amino acid synthesis and secondary compounds in soybean. This work investigates the behavior of transgenic and conventional soybean germinated in different glyphosate concentrations. Three soybean cultivars were evaluated: one first-generation transgenic P98Y11; Second generation transgenic NS6906IPRO; and a conventional UFV-16. Germination, seedling length and dry mass distribution tests were used to evaluate the physiological quality of soybean, correlating with the possible effects of glyphosate for these parameters. At the cytological level, the cell cycle was studied by evaluating the mitotic index (MI) and checking for the presence of abnormalities in each phase of the cycle. In the field of botany, the study turned to the internal anatomy of the seedlings, evaluating changes in the diametrical measurements of the stem-root tissues evaluated. The results confirm the most pronounced reduction of the UFV-16 mitotic index is related to greater impairment of germination, seedling length, dry mass mobilization, anatomical adaptations, and cell cycle. The cultivars P98Y11 and NS6906IPRO, even with the EPSPS enzyme isoform that gives resistance to the herbicide, were tolerant but not resistant, being affected to the effects of glyphosate to a lesser extent, compromising the physiological quality, anatomy and cell cycle.

Keywords: Glycine max; transgenic soybean; Physiological quality; Mitotic index; Anatomy.

SUMÁRIO

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 9 |
| 2 | REFERÊNCIAL TEÓRICO | 11 |
| 2.1 | SOJA TRANSGÊNICA | 11 |
| 2.2 | IDENTIFICAÇÃO DE SOJA TRANSGÊNICA | 14 |
| 2.3 | RESISTÊNCIA AO GLIFOSATO | 16 |
| 2.4 | EFEITO ANATÔMICO-MORFOLÓGICO DO GLIFOSATO | 17 |
| 2.5 | EFEITO CITOGENÉTICO DO GLIFOSATO | 18 |
| | REFERÊNCIAS..... | 20 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 26 |
| 3.1 | GENÓTIPOS | 26 |
| 3.2 | TESTE DE GERMINAÇÃO | 26 |
| 3.3 | TESTE DE COMPRIMENTO DE PLÂNTULA | 27 |
| 3.4 | DISTRIBUIÇÃO DA MASSA SECA | 28 |
| 3.5 | AValiação DO CICLO CELULAR | 28 |
| 3.6 | AValiação ANATÔMICA..... | 29 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 30 |
| 4.1 | TESTE DE GERMINAÇÃO | 30 |
| 4.2 | TESTE DE COMPRIMENTO DE PLÂNTULA | 33 |
| 4.3 | DISTRIBUIÇÃO DA MASSA SECA | 35 |
| 4.4 | ANÁLISE DO CICLO CELULAR | 37 |
| 4.5 | ESTUDO ANATÔMICO..... | 39 |
| 5 | CONCLUSÕES | 42 |
| | REFERÊNCIAS..... | 43 |

1 INTRODUÇÃO

A introdução de cultivares de soja (*Glycine max*) transgênicas, contribuiu para a cultura da soja atingir sua atual produtividade. Estas cultivares são caracterizadas por sua tolerância ao herbicida glifosato, o que levou a uma mudança nos produtos utilizados para o manejo das plantas daninhas na cultura (PELAEZ et al., 2004; JAMES, 2016). O glifosato é um herbicida não seletivo, sistêmico de ação total, e seu uso impede que a planta forme aminoácidos aromáticos, necessários para a síntese de proteínas (Kruse et al., 2000; MARCHIOSI, 2008; GOMES et al., 2017).

Neste contexto, o advento das cultivares geneticamente modificadas, especialmente aquelas conhecidas por *Herbicide Tolerant* (HT), contribuiu para a soja atingir sua atual condição no cenário mundial, considerando a adoção massiva nos principais países produtores, entre eles os EUA e o Brasil (ISAAA, 2017). A tolerância ao herbicida glifosato pode ser considerada o evento biotecnológico de maior impacto na história recente do melhoramento genético da soja. Este herbicida caracteriza-se por ser não seletivo, de amplo espectro, de ação sistêmica e de aplicação na pós-emergência (SILVA et al., 2018), e o seu alvo é a enzima 5-enol-piruvil-shiquimato-3-fosfato-sintase (DUKE, 2018).

Bioquimicamente, o glifosato impede às plantas de sintetizarem os aminoácidos aromáticos derivados do corismato fenilalanina, tirosina e triptofano, fundamentais para a síntese de proteínas (KRUSE et al., 2000). Obviamente, a ação do herbicida acarreta a senescência e morte dos indivíduos sensíveis ao glifosato. Do contrário, as plantas HT toleram dosagens comerciais do herbicida e completam o seu ciclo normalmente, o que, em princípio, torna o controle das plantas daninhas uma prática flexível e eficiente. A utilização do glifosato tem se mostrado satisfatória no controle das plantas daninhas que são difíceis de controlar, sendo altamente seletivo, por não interferir no rendimento produtivo das cultivares de soja tolerante ao glifosato (ALONSO et al., 2013).

O melhoramento genético de plantas transgênicas é fundamental para a obtenção de cultivares mais produtivas, adaptadas a diferentes agroecossistemas e resistentes a doenças (FALEIRO E ANDRADE, 2009). Com o objetivo de melhorar as cultivares de soja RR, tolerante a herbicidas à base de glifosato (Roundup Ready), é importante entender a interação das cultivares com o glifosato em nível celular, aperfeiçoando o manejo da cultura.

Bioquimicamente, o glifosato impede às plantas de sintetizarem os aminoácidos aromáticos derivados do corismato fenilalanina, tirosina e triptofano, fundamentais para a síntese de proteínas (KRUSE et al., 2000). Obviamente, a ação do herbicida acarreta a senescência e morte dos indivíduos sensíveis ao glifosato. Do contrário, as plantas HT

toleram dosagens comerciais do herbicida e completam o seu ciclo normalmente, o que, em princípio, torna o controle das plantas daninhas uma prática flexível e eficiente. A utilização do glifosato tem se mostrado satisfatória no controle das plantas daninhas que são difíceis de controlar, sendo altamente seletivo, por não interferir no rendimento produtivo das cultivares de soja tolerante ao glifosato (ALONSO et al., 2013).

Há relatos de modificações das características morfológicas e anatômicas em plantas de soja submetidas ao glifosato (POLIZEL et al., 2011; GALMÉS et al., 2013). A ação do herbicida inibe o desenvolvimento de plântulas normais na cultivar convencional, provocando déficit de aminoácidos aromáticos tendo, como consequência, a redução no seu vigor (Nagata et al., 2000). Apesar da soja transgênica ser afetada negativamente pelo gene RR, reduzindo sua qualidade fisiológica, a semente é tolerante a subdoses do glifosato, sendo pouco afetada pela aplicação do herbicida (MENAGATTI E BARROS, 2007; CARVALHO et al., 2012).

A diferença de comportamento entre as cultivares transgênicas e convencionais, expostas ao herbicida, pode ser utilizada na detecção e quantificação de genótipos de soja contrastantes em teste de germinação (BEVILAQUA et al., 2000; TORRES et al., 2003; FUNGUETTO ET AL., 2004; TILLMANN AND WEST , 2004; MIRANDA et al., 2005; PEREIRA et al., 2009; HEINZ et al., 2011; PADUA et al., 2012; MELO et al., 2013). A tolerância ao herbicida está relacionada, principalmente, às sementes transgênicas que germinam em contato com solução de glifosato e apresentam um desenvolvimento normal, enquanto sementes de soja não-transgênicas desenvolvem plântulas com anormalidades (TORRES et al., 2003; FUNGUETTO et al., 2004; PEREIRA et al., 2009; HEINZ et al., 2011). Nos trabalhos de Funguetto et al, 2004; Cunha, 2004, Tillmann e West, 2004; Miranda, 2004 e Bertagnolli, 2005, Heinz et al. (2011) a ação do glifosato em plântulas de soja levou a uma redução no comprimento, parte aérea e raiz, que apresentou engrossamento e inibição da emissão de raízes secundárias.

O glifosato afeta a massa de matéria seca das plântulas de soja, convencional e transgênica, o que pode ser explicado pela interrupção do processo de mitose e ruptura dos plastídios, como efeito indireto e secundário desse herbicida (BARTELS, 1985). De acordo com El-Ghamery ET AL.,2000, o glifosato possui efeitos mitodepressivos em *Allium cepa*, podendo resultar na inibição do metabolismo do DNA e da síntese proteica, sendo sustentado pela maior taxa de anomalias (EL-GHAMERY et al.,2000). Dentre as principais anomalias, em cevada o herbicida induz falha de orientação na metáfase e surgimento de estruturas fusiformes mitóticas, enquanto as células apoptóticas comprovam o seu efeito citotóxico (TRUTA et al.,2011).

Em estudo encontrado na literatura, observou-se que, de fato, o desenvolvimento das plântulas estaria paralisado na presença do herbicida, mas não em caráter definitivo. Isto foi verificado quando as plântulas obtidas do teste de germinação em substrato umedecido com glifosato foram transferidas para o solo e ali recuperaram o seu desenvolvimento vegetativo e reprodutivo, produzindo, contudo, sementes em quantidades menores do que aquelas obtidas sob tratamento controle (PEREIRA et al., 2018).

A utilização do glifosato tem se mostrado satisfatório no controle das plantas daninhas que são difíceis de reprimir, sendo altamente seletivo, por não interferir no rendimento produtivo das cultivares de soja resistente ao glifosato (ALONSO et al., 2013).

Contudo, uma preocupação existente é que com o uso do glifosato em larga escala por anos consecutivos, vários biótipos de plantas daninhas resistentes vêm sendo selecionados em áreas agrícolas (GAINES et al., 2012). O estudo aprofundado em nível anatômico, bem como citológico, do comportamento de plantas transgênicas e convencionais submetidas ao uso de glifosato em diversas condições é de fundamental importância para a adoção do manejo correto dessa cultura (MELHORANÇA FILHO et al. 2011).

Neste contexto, questiona-se sobre o comportamento das plântulas submetidas ao tratamento com o glifosato quanto ao ciclo celular em suas zonas meristemáticas, pois caso o desenvolvimento esteja paralisado, possíveis efeitos sobre o índice mitótico poderiam ser observados, bem como anormalidades cromossômicas.

Esta pesquisa objetivou investigar o comportamento de duas cultivares de soja transgênicas, de primeira e segunda geração, e uma convencional, submetidas à germinação em substrato umedecido com glifosato. O estudo avaliou a qualidade fisiológica de sementes, bem como, aspectos morfológicos, anatômicos e referentes ao ciclo celular. Os resultados podem auxiliar na obtenção de uma melhor compreensão do mecanismo de resistência ao glifosato, característica potencialmente utilizada como estratégia em programas de melhoramento de plantas.

2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 Soja transgênica

A soja (*Glycine max*) é a principal oleaginosa produzida e consumida no mundo, sendo o quarto produto mais utilizado no consumo humano e o mais importante em produção e comercialização (FAO, 2013). No mercado mundial do agronegócio, a produção de soja está entre as atividades econômicas que apresentaram maiores crescimentos, chegando a 336,699 milhões de toneladas em uma área de 124,580 milhões de hectares plantados (EMBRAPA,

2018). A produção do grão é liderada pelos países Estados Unidos, Brasil e Argentina, responsáveis por aproximadamente 258 milhões de toneladas (USDA, 2015).

A área cultivada com soja no Brasil cresceu de forma expressiva, passando de 1,3 milhão de hectare em 1970 para 35,822 milhões de hectares em 2018 (CONAB, 2018). As exportações totais brasileiras em 2014 somaram US\$ 225.100 bilhões encabeçando a pauta de exportações do agronegócio (USDA, 2015). A soja é a principal cultura agrícola do Brasil em termos de quantidade produzida e área plantada. Em 2019, a produção de soja está estimada em 115,1 milhões de toneladas, representando um decréscimo de 3,5 % em relação à safra anterior, ainda assim, se consolidando como a segunda maior produção de soja na série histórica da Conab (Conab, 2019).

A introdução de novas tecnologias, como a transgenia, contribuiu para tornar o Brasil um dos maiores produtores de soja no mundo (Silva et al., 2011). Segundo dados do International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications (ISAAA), nos últimos 20 anos, 2 bilhões de hectares de culturas biotecnológicas têm sido cultivadas, colocando o Brasil como segundo país no ranking mundial de plantio transgênico (ISAAA, 2017).

A biotecnologia moderna contempla, a partir das análises dos ácidos nucleicos (DNA e RNA), genômica, transcriptômica, proteômica, a possibilidade de modificações genéticas específicas de quaisquer espécies microbiológicas, vegetais ou animais. De fato, a engenharia genética já demonstrou e prossegue demonstrando um papel extraordinário no desenvolvimento de novos produtos animais, vegetais, fúngicos e bacterianos (Ortiz, 2012). Utilizando os conhecimentos provenientes da engenharia genética e genômica, a obtenção de cultivares geneticamente modificadas marca o início de um novo patamar no melhoramento de plantas, não alcançado por meio do melhoramento genético convencional (CARRER et al., 2010; JAMES, 2013). As cultivares transgênicas não se limitam à resistência de herbicida/inseto, tendo as características de alto valor agregado como uma tendência, possibilitando obter cultivares com amadurecimento mais rápido e altos níveis de nutrientes (GERDES et al., 2014; RIBEIRO e MARIN, 2012).

O primeiro plantio com organismo geneticamente modificado (OGM) ocorreu em 1994, e em 2017 a área plantada com sementes transgênicas alcançou 189,8 milhões de hectares, fazendo com que os transgênicos pudessem ser considerados como a tecnologia agrícola mais rapidamente adotada na história recente da agricultura (JAMES, 2018).

A soja transgênica, tecnologia Roundup Ready (RR®), consiste em um vegetal geneticamente modificado, tendo como característica a tolerância ao glifosato, herbicida de amplo espectro, não-seletivo, aplicado na pós-emergência da lavoura. No desenvolvimento

deste genótipo, foi utilizado o gene cp4 epsps isolado a partir de uma bactéria comumente encontrada no solo, a *Agrobacterium* sp., cepa CP4. A inserção deste gene conferiu à planta a resistência ao glifosato, princípio ativo do herbicida Roundup® (KLEBA, 1998; CREMONEZI, 2009; BERVALD et al., 2010).

A sequência de DNA isolada da *Agrobacterium* sp, codifica uma isoforma da enzima EPSPS (5-enolpiruvil shiquimato-3-fosfato sintase), que atribui resistência da soja ao herbicida, mantendo desinibida a via biossintética de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptofano e tirosina) nas plantas. Naturalmente, a via do chiquimato é inibida pelo glifosato em vegetais não modificados, impossibilitando a enzima EPSPS de catalisar a condensação do chiquimato 3-fosfato e fosfofenolpiruvato bloqueando, assim, a via para a formação dos aminoácidos aromáticos levando à morte (BOHM, 2010; GOMES et al., 2017). A diminuição da síntese dos aminoácidos leva à diminuição da síntese proteica, inibição de compostos secundários e desregulação da via do chiquimato (MARCHIOSI, 2008).

A soja RR1, além de possuir resistência ao glifosato, apresenta benefícios como o aumento de produtividade, redução no teor de impureza e umidade nos grãos colhidos (BATISTA, 2011; PELAEZ et al., 2004). Uma preocupação que não deve ser negligenciada é que, em virtude da resistência ao herbicida, Qaim & Traxler (2005) indicaram um aumento de 108% na quantidade total de herbicidas utilizada no cultivo da soja RR. Neste cenário, é relevante a existência de estudos que explorem o efeito do glifosato ao nível celular na soja convencional e RR, tendo em vista que as quantidades de herbicida utilizadas vêm aumentando (BENBROOK, 2001; SWANSON et al. 2014; SILVA et al., 2017). O conhecimento aprofundado dos efeitos do glifosato na soja complementa as diretrizes para um manejo eficiente, auxiliando em inovações incrementais e dando suporte para o melhoramento tradicional dirigido ao aumento da produtividade.

Além da tecnologia RR®, a necessidade de impedir a ocorrência de insetos praga levou ao desenvolvimento da tecnologia Intacta RR2®, desenvolvida especialmente para o mercado brasileiro, a qual proporciona o controle contra as principais lagartas que atacam a cultura da soja (DALLASTRA, 2013). De acordo com Silva (2013) a tecnologia leva a expressão de genes que codificam a proteína Cry1Ac, oriunda do *Bacillus thuringiensis*, levando à solubilização de cristais proteicos no intestino médio do inseto, paralisia e morte, atingindo apenas o inseto-alvo.

2.2 Identificação de soja transgênica

A diferenciação entre soja transgênica e convencional pode ser obtida por inúmeras metodologias com diversos princípios, mas poucas fornecem uma solução rápida, confiável e barata (FUNGUETTO et al., 2004). Os métodos de detecção empregados vão desde os considerados simples, como o teste de tolerância a herbicidas denominados bioensaios, aos mais específicos como o teste de Elisa, PCR e qPCR (CUNHA et al., 2005).

A técnica Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem sido recomendada por órgãos internacionais de regulamentação, pesquisa e comércio, devido à maior estabilidade destas moléculas quando comparadas às proteínas (THOMSON, 2003; MIAW et al., 2014). Na PCR convencional, aplicada às análises qualitativas, o DNA é extraído, purificado e amplificado utilizando primers desenhados especificamente para o cassete gênico do transgene. Esta é uma técnica relativamente rápida, barata e segura, utilizada nos testes de triagem de OGM, através da qual a produção de fragmentos de amplificação específicos nos perfis de eletroforese da amostra e do controle positivo, demonstra a provável presença de OGM (OLIVEIRA, 2010).

A PCR multiplex, utilizada em análises qualitativas e quantitativas, também é rápida e confiável, permitindo, detectar várias sequências de DNA simultaneamente. Essa técnica viabiliza a obtenção de um grande número de informações em pouco tempo, ao combinar diversos pares de iniciadores em uma mesma reação, significando economia de reagentes e de tempo em relação à PCR convencional. A PCR multiplex, entretanto, é mais trabalhosa por demandar um trabalho de padronização da reação, dado que a combinação de diferentes iniciadores pode resultar na amplificação de sequências não alvo e formação de heterodímeros (CONCEIÇÃO et al., 2006).

A Nested PCR consiste em uma técnica qualitativa, tendo como princípio a amplificação de sequências específicas de DNA a partir de uma mistura complexa de DNA. Na Nested PCR dois pares de iniciadores são usados para um único locus; o primeiro par amplifica o locus, como na PCR convencional e o segundo liga-se a uma região mais interna do produto da primeira, produzindo um fragmento mais curto do que o primeiro. A vantagem da Nested PCR é que, se o fragmento amplificado não for o esperado, a probabilidade da segunda região ser amplificada pelo segundo conjunto de iniciadores é reduzida (CONCEIÇÃO et al., 2006).

A PCR em tempo real é utilizada tanto em análises qualitativas quanto em quantitativas, sendo recomendada pelo Joint Research Center (JRC) para detecção e quantificação de OGM em alimentos e rações. A reação é monitorada, associando a amplificação do alvo que emite uma determinada quantidade de fluorescência ao final de cada

ciclo, originada durante a hibridização do DNA alvo com sondas marcadas com fluoróforos específicos. A intensidade de sinal emitida é proporcional à quantidade do DNA alvo amplificado e aumenta, exponencialmente, a cada ciclo de amplificação. A PCR em Tempo Real tem como vantagens a reduzida probabilidade de contaminação, processamento automatizado, monitoramento em tempo real e a não necessidade de análise pós-reação. As desvantagens são o elevado custo do equipamento e as elevadas exigências técnicas e científicas requeridas para o correto manuseio e manutenção do equipamento (PELT-VERKUIL et al., 2008; GROHMANN, 2010).

Os bioensaios geralmente são testes rápidos e confiáveis, consistindo na aplicação de uma solução contendo glifosato comercial na pré-emergência de sementes de soja, avaliando as características morfológicas de plântulas, e permitindo a fácil detecção de sua susceptibilidade ao glifosato (CUNHA, 2005). A tolerância ao herbicida é verificada de forma prática. Sementes de cultivares transgênicas germinam e se desenvolvem em plântulas normais, enquanto que as sementes convencionais germinam, mas não desenvolvem plântulas normais (TORRES et al., 2003; FUNGUETTO et al., 2004; PEREIRA et al., 2009; HEINZ et al., 2011).

Nos trabalhos de FUNGUETTO et al. (2004), CUNHA et al. (2004), TILLMANN e WEST (2004), MIRANDA et al. (2004), BERTAGNOLLI et al. (2005) e HEINZ et al. (2011) a ação do glifosato em plântulas de soja levou a redução no comprimento, parte aérea e raiz, na qual ainda se deu um engrossamento, acompanhado da inibição na emissão de raízes secundárias. A diferença de comportamento entre as cultivares transgênicas e convencionais, que acontece com o uso do herbicida, permite a utilização do teste de germinação na detecção e quantificação de genótipos de soja contrastantes (BEVILAQUA et al., 2000; TORRES et al., 2003; FUNGUETTO et al., 2004; TILLMANN e WEST, 2004; MIRANDA et al., 2005; PEREIRA et al., 2009; HEINZ et al., 2011; PADUA et al., 2012; MELO et al., 2013). Outras metodologias de bioensaios, como a utilização de substrato umedecido com solução herbicida, imersão das sementes em solução herbicida, sistema hidropônico com glifosato e palitos embebidos em glifosato, são eficientes para identificar as cultivares de soja RR e, além disso, permite classificá-las em grupos de sensibilidade aos sintomas causados pelo glifosato (BERTAGNOLLI et al., 2006; MELO et al., 2013; SILVA et al., 2015). A qualidade fisiológica da semente de soja é comprometida negativamente por danos mecânicos, os quais afetam a integridade física da semente, interferindo na germinação e emergência de plântulas (KRZYZANOWSKI et al., 2018), podendo influenciar diretamente nos resultados dos

bioensaios, o que evidencia a necessidade de uma avaliação ao nível celular para que se possa verificar a intensidade dos danos causados pelo glifosato em diferentes cultivares de soja.

2.3 Resistência ao glifosato

A formulação do glifosato, N-(fosfometil) glicina, foi produzida pela primeira vez em 1950, sendo utilizada como herbicida em 1971, requerida e patenteada pela Monsanto® (AGUIAR et al., 2016). Em 1974 foi introduzida no mercado sob o nome comercial Round up®, atualmente produzido e comercializado por mais de 50 empresas sob os mais diferentes nomes, tornando-se do herbicida mais comercializado do mundo para o controle de plantas invasoras em áreas agrícolas (RODRIGUES, 2016). A utilização de glifosato na cultivar de soja RR é indicada no estágio de 20 a 30 dias após a emergência, sendo que, realizar aplicações antes deste período pode afetar o desenvolvimento das plântulas e elevar o risco de fitotoxicidade do herbicida na soja transgênica (BERVALD et al., 2010).

O glifosato é o herbicida mais amplamente utilizado em cultivos GM em todo o mundo (SAMSEL E SENEFF, 2013). A liberação de mais culturas tolerantes ao glifosato tem aumentado cada vez mais seu uso na agricultura, ocasionando no aumento da pressão de seleção, favorecendo o aumento de espécies tolerantes e de biótipos resistentes a este herbicida (SWANSON et al. 2014; SILVA et al., 2017). No Brasil, o cultivo da soja RR® contribuiu para aumentar em mais de 150% o consumo deste herbicida (ANVISA, 2005). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), na safra 2010/2011 o consumo total de agrotóxicos atingiu 936 mil toneladas e movimentou 8,5 bilhões de dólares no país (Anvisa e UTFPR, 2012).

A utilização do glifosato tem se mostrado satisfatória no controle das plantas daninhas de difícil controle, sendo altamente seletivo e não interferindo no rendimento produtivo dos cultivares de soja tolerante ao glifosato (ALONSO et al., 2013). O uso do glifosato em larga escala, e por anos consecutivos, tem levado à seleção de vários biótipos de plantas daninhas resistentes em áreas agrícolas, provocando mudanças nas frequências gênicas ou alélicas e, por consequência, na flora destas regiões (MAXWELL & MORTIMER, 1994; GAINES et al., 2012).

As populações de plantas daninhas submetidas ao glifosato podem adquirir resistência a este herbicida por diversos mecanismos, tais como: a substituição de alguns aminoácidos usados na síntese de proteínas produzindo proteínas mais tolerantes; a inibição da translocação do glifosato nas plantas; diminuição do bombeamento do glifosato para o interior de vacúolos prevenindo seu contato com os cloroplastos; o aumento significativo da

produção da enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintetase (EPSPS), e inibição da enzima pela ação do glifosato (CHRISTOFOLETI E LOPES, 2008).

Estudos sobre mecanismos de resistência mostram que qualquer substituição de um aminoácido na posição ou sequência codificadora da enzima EPSPs pode levar a uma resistência ao glifosato (BRUNHARO et al., 2016). Outro mecanismo de resistência está relacionado a diferenças na absorção devido a alterações morfológicas nas folhas, possibilitando a redução da entrada de herbicida na planta e diminuindo a susceptibilidade ao glifosato (PROCÓPIO et al., 2013). Os fatores que afetam na absorção foliar são: deposição e composição de ceras epicuticulares; espaçamento da cutícula; densidade do tricoma e estômatos (CRUZ-HIPOLITO et al., 2011). A escassez de trabalhos investigando os efeitos do glifosato ao nível celular em cultivares de soja transgênica e convencional, não condiz com a importância associada ao tema, tendo em vista uma melhor compreensão do mecanismo de resistências ao glifosato.

2.4 Efeito anatômico-morfológico do glifosato

Com base em estudos encontrados na literatura, o glifosato causa anormalidades em plântulas de soja convencionais, tais como estrias longitudinais, amarelecimento gradativo do hipocótilo, inibição do desenvolvimento da raiz primária e da emissão de raízes secundárias afinadas, de modo proporcional ao aumento da concentração de solução do herbicida (BERTAGNOLLI et al., 2006). Ainda utilizando o teste de germinação em laboratório com sementes convencionais e transgênicas, Pereira et al. (2018) mostraram que a soja sensível ao herbicida consegue completar o ciclo após germinar em ambiente contendo 0,06% de glifosato, desde que seja transferida para um novo ambiente, livre do herbicida. Sob tratamento com o herbicida, o desenvolvimento das plântulas é paralisado, mas acaba sendo retomado caso as plântulas sejam removidas do contato com o glifosato. O estudo aprofundado em nível anatômico do comportamento de plantas transgênicas e convencionais, submetidas ao herbicida, é de fundamental importância para compreensão de como se dá a paralização do crescimento em nível anatômico e celular.

Como já citado, a ação do glifosato inibe o desenvolvimento de plântulas normais na cultivar convencional, pois as mesmas apresentam o comprometimento das raízes secundárias pelo fato do glifosato provocar o déficit de aminoácidos aromáticos e compostos fenólicos secundários, reduzindo, conseqüentemente, o vigor que está relacionado diretamente com a produtividade, enquanto que, nas cultivares transgênicas, são pouco afetadas e consideradas normais (NAGATA et al., 2000).

A qualidade fisiológica de sementes de soja é, em grande parte, influenciada pelo genótipo que, ao ser expresso, revela as características anatômicas particulares de cada cultivar. Fatores ambientais afetam diretamente a qualidade fisiológica da semente e, conseqüentemente, a sua anatomia e desenvolvimento. A literatura relata modificações das características anatômicas causadas pelo uso do glifosato, sendo consequência de um processo adaptativo específico que regula o seu metabolismo com a finalidade de atingir novamente a homeostase (POLIZEL et al., 2011; GALMÉS et al., 2013).

Uma pesquisa apresentou os efeitos dos herbicidas em plantas de tubérculos de batata, mostrando redução no crescimento e na produtividade, comprometendo a qualidade dos tubérculos, o que levou a alterações anatômicas nos tecidos analisados, o córtex e a periderme (DIAS et al., 2017). Em outro estudo, foram apresentados os efeitos morfoanatomicos foliar de seis clones de *Eucalyptus grandis* submetidos ao glifosato, sendo constatadas injúrias a partir do mesofilo da epiderme, oriundas de plasmólise, hipertrofia, colapso celular, hiperplasia e formação de tecido de cicatrização. O herbicida levou ao colapso do parênquima lacunoso adjacente, ocasionando o rompimento da parede periclinal externa da epiderme e, concomitantemente, o colapso de tecidos mais internos nos quais se verifica a formação do tecido de cicatrização observado no mesofilo, e a plasmólise de quase todos os tecidos, exceto o xilema, que permaneceu intacto (TUFFI SANTOS et al., 2008). Tais modificações estão relacionadas a mudanças na arquitetura das plantas, diminuição ou aumento do número de folhas, diminuição ou aumento da expansão foliar, alteração da relação xilema/floema, redução ou aumento dos diâmetros dos vasos do xilema, diâmetros das células parenquimáticas, aumento do tecido vascular e espessura da parede celular (POLIZEL et al., 2011; GALMÉS et al., 2013).

Estudos com soja também mostram mudanças anatômicas quando submetidas ao estresse. Uma pesquisa avaliou a soja plantada em solo contaminado com petróleo, respondendo a esse estresse com redução no sistema radicular, reduzindo, conseqüentemente, o crescimento da parte aérea e afetando a produção de biomassa (TAIZ & ZEIGER, 2009; AGUIAR et al., 2012). Além disso, foram constatadas variações na densidade estomática, devido à redução da área foliar, relacionada a uma menor disponibilidade hídrica (AGUIAR et al., 2012).

2.5 Efeito citogenético do glifosato

Plântulas de soja convencional e transgênica podem ser afetadas pelo aumento das doses de glifosato, levando à interrupção do processo de mitose e ruptura dos plastídios, como

efeito indireto e secundário desse herbicida (BARTELS, 1985). Estudos mostram que o glifosato, mesmo aplicado em concentrações variáveis, apresenta efeito de fitotoxicidade sobre a cultura da soja, estando diretamente relacionado com baixas produtividades da soja transgênica e convencional, apontando que há relação direta de interferência do glifosato no metabolismo da planta (LIMA 2007; FOLONI 2015). De acordo com a pesquisa de SANTOS et al. (2007), soja RR é afetada pelo glifosato, principalmente, nos estádios iniciais, prejudicando o seu desenvolvimento, o que leva à conclusão de que estes efeitos prejudiciais podem estar ligados ao aumento da dose aplicada.

Os efeitos tóxicos do glifosato em células podem ser avaliadas em plantas modelo, tais como, *Allium cepa* L. (Amaryllidaceae), os quais foram investigados avaliando-se a porcentagem de germinação, comprimento de raiz, peso de plântulas, frequência de micronúcleos, aberrações cromossômicas e índice mitótico como indicadores de toxicidade. Neste estudo, verificou-se que o glifosato tem ação mitodepressiva, levando a uma redução do índice mitótico, agravado com o aumento da dosagem de glifosato, indicando efeitos tóxicos significativos nas células da raiz de *A. cepa*, alterando suas características fisiológicas, anatômicas e bioquímicas (ÇAVUŞOĞLU ET AL., 2011).

As ferramentas citogenéticas possibilitam compreender as modificações genéticas de plantas submetidas ao glifosato, o que é fundamental para a caracterização de materiais utilizados em programas de melhoramento. Nesse sentido, uma pesquisa avaliou os efeitos genotóxicos promovidos pelo glifosato em *Hordeum vulgare*. O herbicida aumentou o número de distúrbios da metáfase, modificando o fuso mitótico, e influenciou negativamente o crescimento das plântulas. Isso mostra que o herbicida Roundup pode apresentar um potencial genotóxico relativamente alto, ratificado pela ocorrência de taxas notavelmente aumentadas de aberrações cromossômicas e outros distúrbios mitóticos em meristemas provenientes da ponta de raiz (TRUTA et al., 2011). A aplicação do herbicida atrazina na concentração 3.75 g/l em *Allium cepa* levou a efeitos mitodepressivos, podendo resultar na inibição do DNA e da síntese proteica, sendo sustentado pela maior taxa de aberração entre adenina e timina (EL-GHAMERY et al., 2000). O herbicida induziu a falha de orientação da placa equatorial das anáfases e telófases, surgimento de estruturas fusiformes mitóticas, enquanto as células apoptóticas comprovaram o seu efeito citotóxico (TRUTA et al., 2011).

Os estudos citogenéticos são importantes pelo fato de explicar a estrutura e o comportamento dos cromossomos, que garantem a função de conservar a informação genética que é transmitida. Dessa maneira, o estudo dos efeitos citogenéticos provocados por herbicida

em soja se mostra importante na avaliação dos efeitos citotóxicos do glifosato em diferentes concentrações.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C. R. C.; LOPES, B. C.; BARBOSA, M. V. D.; BALIEIRO, F. C., & GOMES, M. M. Fitorremediação de Solos Contaminados por Petróleo. **Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas**, 6, 3–9, 2012.
- AIRA, M.; SAMPEDRO, L.; MONROY, F.; DOMINGUEZ, J.. Detritivorous earthworms directly modify the structure, thus altering the functioning of a microdecomposer food web. *Soil Biology & Biochemistry*, v.40, p.2511- 2516, 2008.
- ANTONIOU, M. et al. Teratogenic effects of glyphosate-based herbicides: divergence of regulatory decisions from scientific evidence. **J Environ Anal Toxicol S**, v. 4, n. 006, p. 2161-0525, 2012.
- BARTELS, P.G. Effects of herbicides on chloroplast and cellular development. **Herbicide physiology**, Boca Raton, v.2, p.63-90, 1985.
- BAWA, A. S.; ANILAKUMAR, K. R. Genetically modified foods: safety, risks and public concerns—a review. **Journal of food science and technology**, v. 50, n. 6, p. 1035-1046, 2013.
- BENBROOK, Charles. Troubled times amid commercial success for Roundup ready soybeans [electronic resource]. 2001.
- BERTAGNOLLI, C.M. Detecção e quantificação de sementes de soja geneticamente modificada resistente ao glifosato em sistema hidropônico. **Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Sementes) – Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2005.**
- BERTAGNOLLI, Carla Medianeira; TILLMANN, MAA; VILLELA, Francisco Amaral. Sistema hidropônico com uso de solução de herbicida na detecção de soja geneticamente modificada resistente ao glifosato. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 2, p. 182-192, 2006.
- BERVALD, Clauber Mateus Priebe et al. Desempenho fisiológico de sementes de soja de cultivares convencional e transgênica submetidas ao glifosato. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 2, p. 009-018, 2010.
- BEVILAQUA, G.A.P.; BONATO, E.R.; ROMAN, E.S. Identificação de soja tolerante a glyphosate através do teste de germinação. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.1, n.3,p.261-265, 2000.
- BLACK, R. J. Complexo soja: fundamentos, situação atual e perspectivas. In: CÂMARA, G. M. S. (Ed.). **Soja: tecnologia da produção II**. Piracicaba: ESALQ, LPV, 2000. p. 1-18.
- BOHM, G. M. B.; ROMBALDI, C.V. Transformação genética e aplicação de glifosato na microbiota do solo, fixação biológica de nitrogênio, qualidade e segurança de grãos de soja geneticamente modificada. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 1, p. 213-221, jan. 2010.
- BRIEFS, ISAAA. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2017: Biotech crop adoption surges as economic benefits accumulate in 22 years. 2017.
- BRUNHARO, Caio ACG et al. Confirmation and mechanism of glyphosate resistance in tall windmill grass (*Chloris elata*) from Brazil. **Pest management science**, v. 72, n. 9, p. 1758-1764, 2016.
- BUKATSCH, F. **Bemerkungen zur Doppelfarbung Astrablau - Safranina**. Mikrokosmos, 1972.

- BUNHARO, C.A.C.G; PATTERSON, D.R.C.; MELO, M.S.C.; NICOLAI, M.; GAINES, T.A.; NISSEN, S.J.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Confirmation and mechanism of glyphosate resistance in tall windmill grass (*Chloris elata*) from Brazil. **Pest management Science**, v. 72, n.9, p- 1227-1802, 2016.
- CARNEIRO, F. F. et al. Ministério da Saúde. **Fundação Oswaldo Cruz. Escola politécnica de Saúde Joaquim Venâncio. Dossiê ABRASCO: Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro: EPSJV, 2015.**
- CARRER, Helaine; BARBOSA, André Luiz; RAMIRO, Daniel Alves. Biotecnologia na agricultura. **estudos avançados**, v. 24, n. 70, p. 149-164, 2010.
- CATACORA-VARGAS, G. et al. Soybean production in the Southern Cone of the Americas: Update on land and pesticide use. **Cochabamba, Genok/UFSC/REDES-AT/BASE-Is**, p. 3, 2012.
- ÇAVUŞOĞLU, K.; YALCIN, E.; TÜRKMEN, Z.; YAPAR, K., & CICEK, F. Investigation of toxic effects of the glyphosate on allium cepa. **Tarım Bilimleri Dergisi-Journal of Agricultural Sciences**, 17(454), 131–142, 2011.
- CONCEIÇÃO, Fabricio Rochedo; MOREIRA, Ângela Nunes; BINSFELD, Pedro Canisio. Detecção e quantificação de organismos geneticamente modificados em alimentos e ingredientes alimentares. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 315-324, 2006.
- CREMONEZI, S.M.N., et al. Avaliação dos riscos alimentares e ambientais: estudo de caso da soja geneticamente modificada utilizando o método GMP-RAM. **Brazilian Journal of Food Technology**, II SSA, janeiro, 2009.
- CRUZ- HIPOLITO, H.; ROJANO-DELGADO, A.; DOMINGUEZ-VALENZUELA, J.; HEREDIA, A.; CASTRO, M.; PRADO, R. Glyphosate tolerance by *Clitoria ternatea* na *Neonotonia wightii* plants involves differential absorption and translocation of the herbicide. **Plant soil**, v.347, p.221-230. 2011.
- CUNHA, C.S.M. **Comparação de métodos na detecção de sementes de soja geneticamente modificada, tolerante ao glifosato**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Sementes) - Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, Pelotas, 2004.
- CUNHA, C.S.M.; TILLMANN, M.A.A.; VILLELA, F.A.; DODE, L.B.; BALERINI, F. Comparação de métodos na detecção de sementes de soja geneticamente modificada resistente ao glifosato. **Revista Brasileira de Sementes**, v.27, n.1, p.167-175, 2005.
- DA COSTA, N. P. et al. Teste de tetrazólio em semente de soja com condicionamento abreviado: série sementes. **Embrapa Soja-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2008.
- DA SILVA, Alexandre Ferreira et al. Monitoramento de Resistência de Plantas Daninhas a Herbicidas no Estado de Mato Grosso–Safrá 2016/2017. **Embrapa Milho e Sorgo-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2017.
- DALL'AGNOL, Amélio et al. O complexo agroindustrial da soja brasileira. **Embrapa Soja-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2007.
- DALLASTRA, Anderson. **Abordagem multivariada na seleção de progênies de soja superiores e portadoras do gene RR**. 2013.
- DE AGUIAR, Lais Mattos et al. Glyphosate-based herbicide exposure causes antioxidant defence responses in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 185, p. 94-101, 2016.
- DIAS, R.C.; BARBOSA A. R.; SILVA G.S.; ASSIS A.C.L.P.; MELO C.A.D.; SILVA D.V.; REIS M.R. Efeito de herbicidas no crescimento, produtividade e qualidade de tubérculos de batata, **Magistra**, V. 29, N.1 p.71-79, Mar. 2017.
- EICHELBERGER L., & BERTAGNOLLI, P. F. (2014). **Produção de semente genética de soja na Embrapa Trigo em 2013 / 2014**.

El-Ghamery, A. A.; El-Nahas, A. I.; Mansour, M. M. The action of atrazine herbicide as an inhibitor of cell division on chromosomes and nucleic acid content in root meristems of *Allium cepa* and *Vicia faba*. **Cytologia** 65, 277–287, 2000.

ELMORE, R.W. et al. Glyphosate-resistant soybean cultivar yields compared with sister lines. **Agronomy Journal**, v.93, p.408-412, 2001

EMBRAPA – **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Soja em números (safra 2017/2018)**. Embrapa Soja, 2018

FERREIRA, E.A.; PROCÓPIO, S.O.; SILVA, E.A.; SILVA, A.A.; REFINO, R.J.N. Estudos anatômicos de folhas de espécies de plantas daninhas de grande ocorrência no Brasil. **Planta Daninha**, v.21, n.2, p.263-271, 2013.

FOLONI, Luiz Lonardon et al. Aplicação de glifosato em pós-emergência, em soja transgênica cultivada no cerrado. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 4, n. 3, p. 47-58, 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS-FAO. 2013. Disponível em: <http://www.fao.org/countryprofiles/index/en/?lang=es&iso3=PRY> Acesso em: 10 de agosto de 2019

FORD RUNGE, C; RYAN, B. The economic status and performance of plant biotechnology in 2003: Adoption, research and development in 2003. **Council for Biotechnology Information**, Washington, 122 p, 2003.

FRANZ, J.E.; MAO, M.K.; SIKORSKI, J.A. **Glyphosate: a unique global herbicide**. Washington, DC: ACS monograph, 653p. 1997.

FUNGUETTO, C.I.; TILLMANN, M.A.A.; VILLELA, F.A.; DODE, L.B. Detecção de sementes de soja geneticamente modificada tolerante ao herbicida glifosato. **Revista Brasileira de Sementes**, v.26, n.1, p.130-138, 2004.

GAINES, T. A.; CRIPPS, A.; POWLES, S. B. Evolved resistance to glyphosate in junglerice (*Echinochloa colona*) from the Tropical Ord River Region in Australia. **Weed Technology**, v. 26, n. 3, p. 480-484, 2012.

GIESY, J.P., DOBSON, S.; SOLOMON, K.R. 2000. Avaliação de risco ecotoxicológico para o herbicida Roundup®. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**. v.167, p.35-120, 2000.

GLIESSMAN, Stephen R. **Agroecology: the ecology of sustainable food systems**. CRC press, 2014.

GOGGI, A.S.; STAHR, M.G. Roundup™ pre-emergence treatment to determine the presence of the Roundup Ready™ gene in soybean seed: a laboratory test. **Seed Technology**, v.19, n.1, p.99-102, 1997.

GOMES, Marcelo Pedrosa et al. Effects of glyphosate acid and the glyphosate-commercial formulation (Roundup) on *Dimorphandra wilsonii* seed germination: interference of seed respiratory metabolism. **Environmental pollution**, v. 220, p. 452-459, 2017.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia prático de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Editora Fumpec, p. 131, 2002.

HEAP, I. International Survey of Herbicide Resistant. Disponível em: www.weedscience.org/in.asp . Acesso: 09 de agosto de 2018.

HEINZ, R.; VIEGAS NETO, A. L.; VALENTE, T. O. Detecção de sementes de soja geneticamente modificada por meio de teste de germinação. **Revista Agrarian**, v. 4, n. 11, p. 20-26, 2011.

- HILBECK, Angelika et al. No scientific consensus on GMO safety. **Environmental Sciences Europe**, v. 27, n. 1, p. 4, 2015.
- JAMES, C. Executive Summary: Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2014, Brief 52. **International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications**, 2016.
- JAMES, Clive. **From the Land of Shadows**. Pan Macmillan, 2014.
- JAMES, Clive. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2013: ISAAA Brief**. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA), 2013.
- JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. 2.ed. New York: Mc Graw-Hill, 523 p, 1940.
- KIM, Ki-Hyun; KABIR, Ehsanul; JAHAN, Shamin Ara. Exposure to pesticides and the associated human health effects. **Science of the Total Environment**, v. 575, p. 525-535, 2017.
- KLEBA, John B. Riscos e benefícios de plantas transgênicas resistentes a herbicidas: o caso da soja RR da Monsanto. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 15, n. 3, p. 9-42, 1998.
- KOLCHINSKI, E.M.; SCHUCH, L.O.B.; PESKE, S.T. Vigor de sementes e competição intra-específica em soja. **Ciência Rural**, v.35, n.6, p.1248-1256, 2005.
- KRZYŻANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D. e FRANÇA-NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina, p.2.1-2.24, 1999.
- KRZYŻANOWSKI, Francisco Carlos; FRANÇA-NETO, J. B.; HENNING, Ademir Assis. A alta qualidade da semente de soja: fator importante para a produção da cultura. **Embrapa Soja-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2018.
- LACADENA, L. R. **Citogenética**. Editorial Complutense, p. 928, 1996.
- LAMEGO, F. P. et al. Habilidade competitiva de cultivares de trigo com plantas daninhas. **Planta Daninha**, v. 31, n. 3, p. 521-531, 2013.
- LANDRIGAN, Philip J.; BENBROOK, Charles. GMOs, herbicides, and public health. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 8, p. 693-695, 2015.
- LIMA, G. R. G.; **Glifosato: características e possíveis efeitos na planta (Soja RR e Convencional)**. 2007. 23 f. p. 5-20. Monografia (graduação do curso de agronomia) - ESCOLA SUPERIOR DE AGRONOMIA DE PARAGUAÇU PAULISTA, Paraguaçu Paulista – SP, 2007
- MARCHIOSI, ROGÉRIO. **Efeitos metabólicos nas raízes de soja, susceptível e resistente ao glifosato, após exposição das sementes ao herbicida**. 2008. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Maringá.
- MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, cap.3.1, p.3.24, 1999.
- MARCOS FILHO, JULIO MARCOS FILHO. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Fealq, 2005.
- MAXWELL, B. D.; MORTIMER, A. M. Selection for herbicide resistance. In: POWLES, S. B.; HOLTUM, J. A. M. **Herbicide resistance in plants: biology and biochemistry**. Boca Raton: CRC Press, p. 1-25, 1994.
- Melo, L. F.; Fagioli, M.; Sá, M. E. Alternative methods for detecting soybean seeds genetically modified for resistance to herbicide glyphosate. **Journal of Seed Science**, v.35, n.3, p.381-386, 2013.
- MELO, Lilian Faria de; FAGIOLI, Marcelo; SÁ, Marco Eustáquio de. Alternative methods for detecting soybean seeds genetically modified for resistance to herbicide glyphosate. **Journal of Seed Science**, v. 35, n. 3, p. 381-386, 2013.

- MERVOSH, TL.; BALKE, N.E. Effects of calcium, magnesium, and phosphate on glyphosate absorption by cultured plant cells. **Weed Science**, Champaign, v. 39, n. 3, p. 347- 353, 1991.
- MIRANDA, D.M.; TILLMANN, M.A.A.; BALERINI, F.; VILLELA, F.A. Bioensaios na detecção e quantificação de sementes de soja geneticamente modificada resistente ao glifosato. **Revista Brasileira de Sementes**, v.27, n.1, p.93-103, 2005.
- MONQUERO, P.A. **Plantas Transgênicas Resistentes aos Herbicidas: Situação e Perspectivas**, Campinas, v. 64, n. 4, p. 517-531, 2005.
- MONSANTO. Monsanto anuncia o lançamento comercial da soja INTACTA RR2 PRO™.
- MORILLO, E.; UNDABEYTIA, T; MAQUEDA, C. Adsorption of glyphosate on clay mineral montmorillonite: effect of Cu(II) in solution and adsorbed on the mineral. **Environmental Science Technology**, v. 31, n. 12, p. 3588-3592, 1997.
- NAGATA, R.T.; DUSKY, J.A.; FERL, R.J.; TORRES, A.C.; CANTLIFFE, D.J. Evaluation of glyphosate resistance in transgenic lettuce. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.125, p.669-672, 2000.
- NAKAGAWA, J. et al. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. **Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina: ABRATES**, v. 1, p. 20-31, 1999.
- NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas, 1999.
- OLIVEIRA, Tania Maria dos Santos. PCR em tempo real: métodos e aplicações. **Dissertações de Mestrado. Universidade de Aveiro**, 2010.
- ORTIZ, Rodomiro. La adopción de la biotecnología moderna y su compatibilidad con una agricultura sustentable. **Idesia (Arica)**, v. 30, n. 3, p. 3-10, 2012.
- PADGETTE, S.R.; KOLACZ, K.H.; DELANNAY, X. et al. Development, identification and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. **Crop Science**, Madison, n.35, p.1451-1461, 1995.
- PÁDUA, G.P.; JESUS, ADRIANA.M.S.; FRONZA, V.; ARANTES, N.E.; ZITO, R.K. Detecção de presença adventícia de semente geneticamente modificada em lotes de soja não transgênica. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 34, nº 4 p. 573 - 579, 2012.
- PELAEZ, Victor; ALBERGONI, Leide; GUERRA, Miguel Pedro. Soja transgênica versus soja convencional: uma análise comparativa de custos e benefícios. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 21, n. 2, p. 279-309, 2004.
- PEREIRA W.A.; LISBOA S.P.; DIAS D.C.F.S.; ALVARENGA E.M.; BORÉM A. Ajuste De Metodologias Para a Identificação De Cultivares De Soja Quanto À Tolerância Ao Glifosato. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 31, nº 4, p.133-144, 2009.
- PEREIRA W.A.; SILVA A.S.L.; NOBRE D.A.C.; PAULA G.S.; SILVA F.L. Performance of transgenic and conventional soybean plants subjected to bioassay for detection of glyphosate tolerant seeds. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** - 18: 39-46, 2018.
- PEREIRA, Sávio Rafael. A evolução do complexo soja e a questão da transgenia. **Revista de Política Agrícola**, v. 13, n. 2, p. 26-32, 2015.
- PESSOA, M.C.P.Y.; SILVA, A.S.; CAMARGO, C.P. Qualidade e certificação de produtos agropecuários. **Embrapa Informação Tecnológica**, Brasília, 2002.
- PROCÓPIO, S. O. et al. Plantas Daninhas. **Cana-deaçúcar: do plantio à colheita. 1ed. Viçosa/MG: UFV**, p. 117-152, 2013.

- QAIM, Matin; TRAXLER, Greg. Roundup Ready soybeans in Argentina: farm level and aggregate welfare effects. **Agricultural economics**, v. 32, n. 1, p. 73-86, 2005.
- RIBEIRO, Isabelle Geoffroy; MARIN, Victor Augustus. A falta de informação sobre os Organismos Geneticamente Modificados no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17, p. 359-368, 2012.
- RIGSBY, B.; BOARD, J.E. Identification of soybean cultivars that yield well at low plant populations. **Crop Science**, v.43, p.234-239, 2003.
- RODRIGUES, A.P.M.S; JUNIOR, A.F.M; TORRES,S.B; NOGUEIRA, N.W; FREITAS, R.M.O- **Teste de tetrazólio para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de *vigna unguiculata* (L.) Walp** – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015
- RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. **Guia de herbicidas**. 4. Ed. Londrina: IAPAR, 1998.648 p.
- RODRIGUES, Laís de Brito et al. Efeitos ecotoxicológicos do glifosato e formulações em diferentes organismos. 2016.
- SAMSEL, Anthony; SENEFF, Stephanie. Glyphosate, pathways to modern diseases II: Celiac sprue and gluten intolerance. **Interdisciplinary toxicology**, v. 6, n. 4, p. 159-184, 2013.
- SANTOS, J. B. et al. Avaliação de formulações de glyphosate sobre soja Roundup Ready. **Planta Daninha**, v. 25, n. 1, p. 165-171, 2007.
- SILVA, Fabiana Mota da et al. Toothpick test: a methodology for the detection of RR soybean plants1. **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, n. 2, p. 436-442, 2015.
- SINGH, R. J. **Plant cytogenetics**. University of Illinois, p. 391, 1993.
- SIQUEIRA, S.C. de; MOREIRA, M.A.; MOSQUIM, P.R.; JOSÉ, I.C.; FERREIRA, F.A.; SEDIYAMA, C.S. Simulação da soja geneticamente modificada tolerante ao glifosato por meio do cultivo de explantes. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.11, n.1, p.13-20, 1999.
- SWANSON, Nancy L. et al. Genetically engineered crops, glyphosate and the deterioration of health in the United States of America. **Journal of Organic Systems**, v. 9, n. 2, p. 6-37, 2014.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre, 2009.
- THOMSON, Jennifer. 3. Genetically modified food crops for improving agricultural practice and their effects on human health. **Trends in Food Science & Technology**, v. 5, n. 14, p. 210-228, 2003.
- TILLMANN, M.A.A.; WEST, S.H. Identification of genetically modified soybean (*Glycine max* L. Merr.) seeds resistant to glyphosate. **Scientia Agricola**, v.61, n.3, p.336-341, 2004.
- TORRES, A.C.; NASCIMENTO, W.M.; PAIVA, S.A.V.; ARAGÃO, F.A.S. Bioassay for detection of transgenic soybean seeds tolerant to glyphosate. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.9, p.1053-1057, 2003.
- Truta, E.; Vochita, G.; Rosu, C.; Zamfirache, M.-M.; Olteanu, Z. Evaluation of roundup-induced toxicity on genetic material and on length growth of barley seedlings. **Acta Biologica Hungarica**, 62(3), 290–301 ,2011.
- TUFFI SANTOS, L.D., SANT'ANNA-SANTOS, B.F., MEIRA, R.M.S.A., TIBURCIO, R.A.S., FERREIRA, F.A., MELO, C.A.D. e SILVA, E.F.S. Danos visuais e anatômicos causados pelo glyphosate em folhas de *Eucalyptus grandis*. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 26, n. 1, p. 9-16, 2008.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE- USDA. **Oilseeds: world markets and trade**. Foreign Agricultural Service/USDA March 2015 Office of Global Analysis. Disponível em:< <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/oilseeds.pdf>>. Acesso em 10 de Agosto de 2019

VAN PELT-VERKUIL, Elizabeth; VAN BELKUM, Alex; HAYS, John P. **Principles and technical aspects of PCR amplification**. Springer Science & Business Media, 2008.

VARGAS, Bruna Damaceno et al. BIOTECNOLOGIA E ALIMENTOS GENETICAMENTE MODIFICADOS: UMA REVISÃO. **Revista Contexto & Saúde**, v. 18, n. 35, p. 19-26, 2018.

VIDAL, R. A. **Herbicidas: mecanismos de ação e resistência de plantas**. Porto Alegre: Ribas Vida I, 165 p. 1997.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Genótipos

Para este estudo foram selecionadas três cultivares: UFV-16, P98Y11 e NS6906IPRO, tendo como características fundamentais para os fins desta pesquisa o fato de serem convencional, transgênica de primeira geração e transgênica de segunda geração, respectivamente. A cultivar, NS6906IPRO, apresenta também resistência a insetos, fato pelo qual pode ser referenciada como RR2. A cultivar P98Y11 transgênica de primeira geração, indicada como RR1, e a UFV-16 como convencional. Inicialmente, as amostras de trabalho foram caracterizadas, avaliando o teor de água das amostras de trabalho foi obtido com medidor de umidade digital automático GAC2100 da marca DICKEY-john, e o peso de 1000 sementes foram avaliados de acordo com as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009).

Uma vez caracterizadas as cultivares, todas as sementes foram tratadas com Standak Top (Fipronil), anteriormente aos experimentos, de acordo com a diluição recomendada pelo fabricante BASF, no intuito de prevenir efeitos não controlados por fungo durante os experimentos e oferecendo proteção do potencial genético das sementes de soja.

3.2 Teste de germinação

O teste de germinação foi conduzido utilizando-se quatro repetições por tratamento, sendo cada parcela experimental constituída por 50 sementes distribuídas sobre duas folhas de papel de germinação cobertas por uma terceira folha, possibilitando a confecção de um rolo como substrato para a germinação (Brasil, 2009).

Os tratamentos analisados neste ensaio foram adaptados do teste de germinação. Enquanto no tratamento controle as folhas de papel de germinação foram umedecidas com água destilada, na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco, nos demais tratamentos o umedecimento foi realizado com soluções do herbicida a 0,06 e 0,12 % do equivalente ácido do herbicida (Pereira et al., 2009).

Uma vez confeccionados os rolos para o teste de germinação, estes foram acondicionados em sacos plásticos e conduzidos em posição vertical para a câmara de germinação, do tipo BOD, a 25°C.

As avaliações foram realizadas no quinto e oitavo dias após a semeadura (Brasil, 2009), fornecendo os dados referentes à primeira contagem e contagem final da germinação, respectivamente. As plântulas foram classificadas como normais, apresentando raiz secundária, ou anormais, sem emissão de raiz secundária, e as sementes não germinadas computadas à parte.

O delineamento experimental empregado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 cultivares x 3 dosagens do herbicida, com quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

3.3 Teste de comprimento de plântula

O teste de comprimento de plântula foi conduzido conforme procedimentos descritos por Pereira et al. (2009). Para os fins deste ensaio, os mesmos princípios de montagem dos rolos no teste de germinação foram aplicados, incluindo: i) o umedecimento das folhas de papel com água destilada e soluções do herbicida a 0,06 ou 0,12 %; ii) a confecção do rolo de germinação; e, iii) o acondicionamento em sacola plástica. A diferença para o teste de germinação, entretanto, ficou no número de sementes colocadas em cada parcela experimental. Neste caso, foram 10 sementes regularmente espaçadas entre si, posicionadas longitudinalmente no terço superior da folha, a aproximadamente 3 cm da borda e com os hilos direcionados para baixo, considerando o rolo na vertical.

Uma vez confeccionados, os rolos foram acomodados verticalmente no germinador, tipo BOD por sete dias, a 25°C. Ao final deste período, foram tomadas medidas em centímetros, referentes aos comprimentos do hipocótilo e radícula, e conseqüentemente, comprimento total de plântula, desde a ponta da raiz até a inserção dos cotilédones (Krzyzanowski et al., 1999), utilizando para esta finalidade régua milimetrada.

O delineamento experimental empregado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 cultivares x 3 dosagens do herbicida, com 10 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

3.4 Distribuição da massa seca

Este teste foi conduzido em conjunto com o teste de comprimento de plântulas (Pereira et al., 2015). Ao final da avaliação do comprimento das plântulas, cotilédones, hipocótilos e radículas foram separados, utilizando um estilete para esta finalidade. Adicionalmente, sementes não germinadas e plântulas infectadas, que não foram medidas no teste de comprimento de plântulas, foram descartados. Assim, para cada parcela experimental foram formados três grupos de materiais biológicos para a secagem e posterior pesagem: Hipocótilos, radículas, cotilédones.

Para a acomodação dos materiais biológicos, utilizou-se de envelopes de papel, os quais foram devidamente etiquetados e enumerados, antes de serem acondicionados em estufa com temperatura regulada a 81°C pelo período mínimo de 24 horas. Passado este período, cada parcela foi pesada em balança de precisão de 0,01 g, para a obtenção dos pesos de massa seca do hipocótilo, radícula e cotilédones.

Para fins de comparação, os pesos dos cotilédones, hipocótilos e radículas em miligramas foram divididos pelo número de plântulas analisadas em cada parcela experimental, fornecendo os valores médios por plântula. Somando estes valores, têm-se uma estimativa da massa seca total e, a partir desta, o quanto de massa seca foi mobilizada dos cotilédones para o hipocótilo e radícula, bem como o quanto de massa seca persistiu sem ser mobilizada nos cotilédones. Desta forma, estimou-se a mobilização de reservas nas plântulas de soja submetidas a diferentes doses de glifosato.

O delineamento experimental neste ensaio foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial, 3 cultivares x 3 doses do glifosato, com 10 repetições. Sobre os dados coletados, realizou-se análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

3.5 Avaliação do ciclo celular

Inicialmente, um conjunto de 20 sementes foi submetido à germinação, conforme o teste de germinação previamente descrito, inclusive no que se refere ao umedecimento do substrato com as soluções do herbicida. Três dias após a semeadura, 10 raízes foram obtidas de cada tratamento avaliado (cultivar x dose do glifosato).

Imediatamente após a coleta, as raízes foram fixadas em *Carnoy* (3 etanol: 1 ácido acético) por 10 a 15 minutos a temperatura ambiente, com posterior substituição por um novo fixador *Carnoy* por mais 24 horas a temperatura ambiente, seguido de armazenamento em freezer (-20°C) até o momento de uso.

Para o preparo das lâminas, as regiões meristemáticas foram submetidas à digestão enzimática em pectinase: celulase (100U:200U, pH 4.8) por aproximadamente 80 minutos, a 37°C. Subsequentemente, as lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento em ácido acético 45% e coradas em Giemsa 10% por 30 minutos (GUERRA; SOUZA, 2002). Após a secagem, as lâminas foram montadas em Enttalan[®]. Para cada tratamento foram confeccionadas cinco lâminas e contadas 2500 células. Para a avaliação das lâminas utilizou-se de microscópio de luz (Carl Zeiss, Axio Lab A1), acoplado a câmera AxioCam ERc 5s, observando e computando-se células em interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase, com o objetivo final de se calcular o Índice Mitótico (IM). As ocorrências de alterações cromossômicas também foram quantificadas (presença de núcleos lobulados ou fragmentados, pontes em anáfase e telófase, fuso tripolar, cromossomos não orientados na metáfase, C-metáfases e micronúcleos). Para obtenção do índice mitótico (IM), utilizou-se da fórmula:

$$\text{IM (\%)} = (\text{n}^\circ \text{ de células em divisão} / \text{Total de células presentes nos campos}) \times 100.$$

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial, 3 cultivares x 3 doses do glifosato, 5 repetições com 500 células contadas. As médias foram analisadas quanto à variância e comparadas pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

3.6 Avaliação anatômica

Inicialmente, um conjunto de 35 sementes foi submetido à germinação, exatamente conforme o teste de germinação previamente descrito, inclusive no que se refere ao umedecimento do substrato com as soluções do herbicida. Aos sete dias após a semeadura, as plântulas foram obtidas dos rolos da germinação.

Para as análises foram coletadas amostras de caule e raiz de 20 plântulas de cada tratamento (Cultivar x Dose do herbicida). Imediatamente após a coleta, as amostras foram fixadas em FAA 70% (formaldeído, ácido acético e álcool etílico), por 48 horas, e posteriormente conservadas em álcool etílico 70% (JOHANSEN, 1940).

Amostras do caule e raiz foram preparadas para o emblocamento em resina. O material foi submetido à desidratação em série etílica (álcool etílico 70%, álcool etílico 80%, álcool etílico comercial 92,8% e álcool etílico P.A), sendo mantido por 2 horas em cada concentração. As amostras foram colocadas em solução de pré-infiltração (resina base e etanol 95%, na proporção 1:1), durante duas horas em vácuo, permanecendo em resina base (solução de infiltração) por 48 horas. Após este processo, o material foi transferido para moldes de polietileno contendo solução de polimerização (resina base/endurecedor 15:1) e desbloqueados no dia seguinte. Secções transversais foram obtidas, com auxílio de um

micrótomo semi-automático, realizando cortes de 6 μm de espessura. O material foi corado com azul de toluidina 0,05% e as lâminas montadas em verniz vitral incolor 500®. (DE MENEZES et al., 2018)

As fotomicrografias e as medidas dos tecidos vegetais foram obtidas em microscópio binocular Olympus cx41, com câmera de vídeo Digital Moticam 2500 com 5,0 megapixels e processada utilizando-se o programa de captura de imagem ImageJ.

O experimento foi analisado com base no delineamento inteiramente casualizado, com em esquema fatorial, 3 cultivares x 3 doses do glifosato, contendo 5 repetições de 3 plântulas cada. As médias obtidas, após análise de variância, foram comparadas pelo teste Tukey a 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Teste de germinação

Inicialmente, as amostras de trabalho foram caracterizadas quanto ao teor de água (%) e peso de 1000 sementes em gramas (g), obtendo-se 9,7 % e 194g na P98Y11, 10,8 % e 131g na cultivar NS6906IPRO e 11,5 % e 146g na UFV-16.

Os dados relativos às porcentagens de plântulas normais, anormais e de sementes não germinadas de cada tratamento avaliado encontram-se apresentados na Tabela 1. Iniciando pela porcentagem de sementes não germinadas ou sementes mortas, foi possível notar que esta característica não foi afetada pela presença do herbicida, uma vez que, independente da cultivar e da dose do herbicida, não se observou interação neste sentido.

Tabela 1. Porcentagens médias de plântulas normais, anormais e de sementes mortas/não germinadas, em cada tratamento (cultivar x dose) submetido ao teste de germinação.

| CULTIVAR/DOSE | Plântula normal | Plântula anormal | Semente morta |
|----------------------|------------------|------------------|------------------|
| UFV-16 Dose 0 | 95 ^{Aa} | 04 ^{Bc} | 1 ^{Aa} |
| UFV-16 Dose 0,06 | 0 ^{Bb} | 99 ^{Aa} | 1 ^{Aa} |
| UFV-16 Dose 0,12 | 0 ^{Bb} | 99 ^{Aa} | 1 ^{Aa} |
| P98Y11 Dose 0 | 79 ^{Ab} | 15 ^{Bb} | 6 ^{Aa} |
| P98Y11 Dose 0,06 | 77 ^{Aa} | 19 ^{Bb} | 4 ^{Aa} |
| P98Y11 Dose 0,12 | 40 ^{Ba} | 50 ^{Ab} | 10 ^{Aa} |
| NS6906IPRO Dose 0 | 76 ^{Ab} | 20 ^{Ba} | 4 ^{Aa} |
| NS6906IPRO Dose 0,06 | 77 ^{Aa} | 18 ^{Bb} | 5 ^{Aa} |
| NS6906IPRO Dose 0,12 | 43 ^{Ba} | 50 ^{Ab} | 7 ^{Aa} |

Letras maiúsculas comparam dose dentro de cada cultivar e as letras minúsculas comparam as cultivares dentro da mesma dose. Médias seguidas de mesma letra não diferem de acordo com o teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Em relação às porcentagens de plântulas normais e anormais foi possível observar interações entre os tratamentos (Tabela 1). Considerando a cultivar UFV-16, convencional sensível ao herbicida, observou-se que a partir da dose 0,06 % do herbicida, a taxa de plântulas normais zerou (Figura 1). Em contra partida, a taxa de plântulas anormais apresentou um aumento. Para as cultivares geneticamente modificadas, P98Y11 (RR1) e NS6906IPRO (RR2), os comportamentos foram diferentes daqueles observados para a cultivar UFV-16. A dosagem de 0,06 % do herbicida não reduziu significativamente as taxas de normalidade e anormalidade, diferente da dose 0,12 % provocando um aumento das anormalidades. Este resultado é condizente com a tolerância ao herbicida como verificado em outros estudos avaliando cultivares diferentes (CUNHA et al., 2005; PEREIRA et al., 2009; BERVALD et al., 2010; PEREIRA et al., 2018).

De modo geral, o fato de alguns tratamentos com o herbicida afetarem drasticamente a taxa de germinação de cultivares convencionais, mas, não de cultivares geneticamente modificadas, já foi apresentado por outros autores, estudando diversos genótipos (FUNGUETTO et al., 2004; TILLMANN AND WEST, 2004; MIRANDA et al., 2005; PEREIRA et al., 2009; HEINZ et al., 2011; MELO et al., 2013). As respostas das cultivares transgênicas foram similares e diferiram da cultivar convencional (Figura 1).

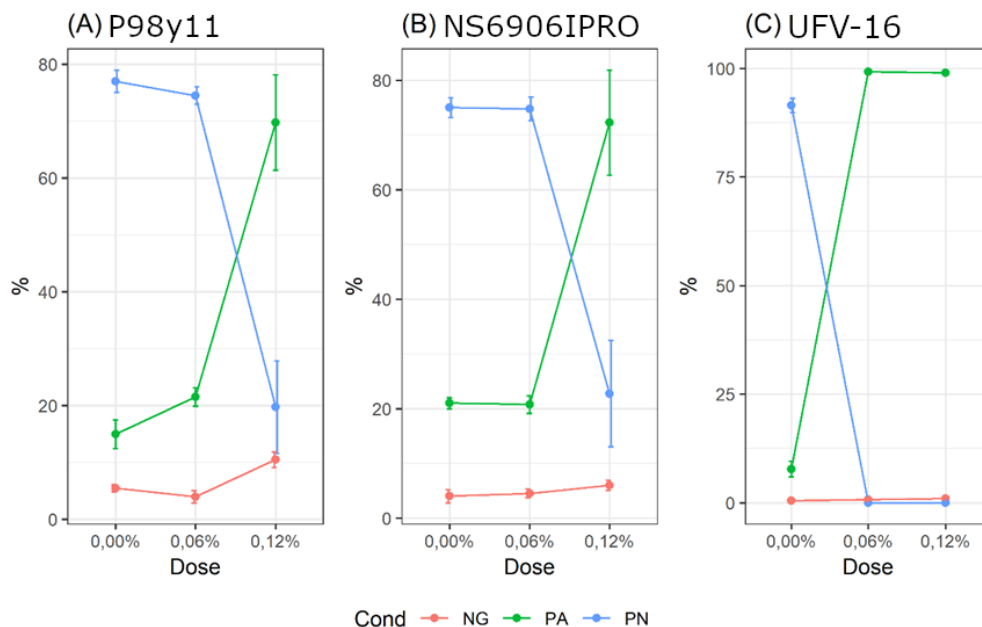


Figura 1 - Interação entre condição das sementes de soja em diferentes dosagens de glifosato. COND: Condições; NG: Não germinadas; PA: Plântulas anormais; PN: Plântulas normais.

Comparando as cultivares entre si no tratamento controle, notou-se que a cultivar UFV-16 apresentou porcentagem de plântulas normais maior que as cultivares RR (Tabela 1). Sobre este cenário, duas hipóteses são lançadas na literatura. A primeira se refere à diferença entre as cultivares em termos de qualidade fisiológica do próprio lote de sementes. A segunda se baseia no próprio fato da inserção do transgene de tolerância ao herbicida (Carvalho et al. 2012), que por sua vez, afetaria negativamente esta característica da soja, em função de sua influência no uso da água, fotossíntese e acúmulo de biomassa (MANEGATTI E BARROS, 2007; ALBRECHT & ÁVILA, 2010; ZOBIOLE et al., 2010; CARVALHO et al., 2012).

No caso deste estudo, a explicação mais plausível é de que os materiais tenham apresentado qualidades fisiológicas distintas antes dos experimentos, tendo em vista que são genótipos distintos. A inexistência de versões alternativas (transgênica e convencional) para cada genótipo estudado aumenta a variabilidade genética entre as cultivares avaliadas, assim, comprometendo inferências quanto aos efeitos da transgenia. Estudos posteriores poderão se ocupar deste questionamento.

A suscetibilidade da UFV-16 ao glifosato, evidenciada pela acentuada redução na emissão de radículas normais após tratamento com o herbicida (Figura 2), indica a ocorrência da inibição da via do chiquimato, prejudicando a formação do aminoácido aromático triptofano, cofator importante para o enraizamento. Este aminoácido é convertido em AIA (ácido indolacético), através de várias rotas metabólicas, sendo importante para o início do desenvolvimento e estabelecimento do eixo raiz-parte aérea das plantas (TAIZ e ZEIGER, 2004). Nas cultivares transgênicas, que codificam uma isoforma da enzima EPSPS (5-enolpiruvil shiquimato-3-fosfato sintase), são mantidas, entre outras, as vias de biossíntese de triptofano que auxilia no enraizamento (DUTRA et al., 2002). Por isso, P98Y11 e NS6906IPRO sofreram redução menos intensa de plântulas normais, corroborando com sua tolerância ao herbicida.



Figura 2 - Padrões morfológicos das plântulas de soja. UFV-16 submetido a dose 0 (A), 0,06% (B) e 0,12% (C) de glifosato. NS6906IPRO submetida a dose 0 (D), 0,06% (E) e 0,12% (F).

4.2 Teste de comprimento de plântula

Os resultados encontrados demonstraram que o efeito negativo do glifosato sobre o comprimento das plântulas está relacionado com a concentração do herbicida (Tabela 2). No que se refere ao comprimento do hipocótilo, as reduções foram progressivas em função das doses do herbicida para as três cultivares (Tabela 2). No entanto, para a cultivar convencional, tais reduções foram mais proeminentes ao apresentar as menores medidas comparado com as cultivares RR. Esta observação é coerente com o resultado encontrado na literatura (PEREIRA et al., 2009).

O comportamento das cultivares no que se refere ao comprimento da radícula apresentou-se de forma distinta daquela observada para o hipocótilo. Todas as cultivares apresentaram similarmente redução no comprimento da radícula em função do contato com o herbicida na dose 0,06%, mantendo esta condição na dose 0,12%. No que diz respeito ao comprimento total de plântulas, o efeito de redução foi mais contundente para a cultivar convencional na dose 0,06%.

Tabela 2. Comprimentos médios em centímetros do hipocótilo, radícula e plântula nos tratamentos (cultivar x dose).

| CULTIVAR/DOSE | Hipocótilo | Radícula | Plântula |
|----------------------|--------------------|----------------------|---------------------|
| UFV-16 Dose 0 | 9,72 ^{Aa} | 14,55 ^{Ab} | 24,34 ^{Ab} |
| UFV-16 Dose 0,06 | 2,55 ^{Bb} | 1,88 ^{Ba} | 4,43 ^{Bb} |
| UFV-16 Dose 0,12 | 1,37 ^{Cb} | 1,75 ^{Ba} | 3,13 ^{Bb} |
| P98Y11 Dose 0 | 8,41 ^{Ab} | 19,25 ^{Aa} | 27,66 ^{Aa} |
| P98Y11 Dose 0,06 | 5,71 ^{Ba} | 2,14 ^{Ba} | 7,85 ^{Ba} |
| P98Y11 Dose 0,12 | 3,33 ^{Ca} | 2,15 ^{Ba} | 5,49 ^{Ca} |
| NS6906IPRO Dose 0 | 9,47 ^{Aa} | 14,981 ^{Ab} | 24,45 ^{Ab} |
| NS6906IPRO Dose 0,06 | 6,06 ^{Ba} | 2,419 ^{Ba} | 8,48 ^{Ba} |
| NS6906IPRO Dose 0,12 | 3,37 ^{Ca} | 1,53 ^{Ba} | 4,91 ^{Cab} |

Letras maiúsculas comparam as doses dentro de cada cultivar e as letras minúsculas comparam as cultivares dentro da mesma dose. Médias seguidas de mesma letra não diferem de acordo com o teste Tukey a 5% de probabilidade.

De modo geral, sob tratamento com glifosato, as plântulas de todas as cultivares sofreram redução em relação ao seu comprimento. As cultivares P98Y11 e NS6906IPRO apresentaram o maior comprimento na dose 0 reduzindo significativamente nas doses 0,06% e 0,12% (Tabela 2). Para a cultivar UFV-16, convencional, a dose 0,06% foi suficiente para reduzir drasticamente o seu desenvolvimento em tamanho de plântula, o que persistiu na dose 0,12% (Tabela 2). Resultados semelhantes foram apresentados por TILLMANN E WEST (2004), FUNGUETTO et al. (2004) e BERTAGNOLLI, (2005) que verificaram redução do comprimento total de plântulas de soja convencional tratadas com glifosato na concentração de 360g.L-1. BERTAGNOLLI (2005) e PEREIRA et al. (2009) observaram o decréscimo no tamanho das plântulas de soja resistentes ao glifosato proporcionalmente ao aumento da concentração da solução herbicida. A medida do hipocótilo de todas as cultivares apresentaram redução significativa com o aumento da concentração de glifosato, menor tamanho na dose 0,12%, seguido da dose 0,06% e 0 correspondendo ao maior comprimento. Os comprimentos das raízes de todas as cultivares tiveram o mesmo comportamento, reduzindo significativamente sob tratamento com 0,06% de glifosato, mas mantendo este tamanho na dose 0,12%. FUNGUETTO et al, (2004), TILLMANN e WEST, (2004) MIRANDA, (2004) e BERTAGNOLLI, (2005), utilizando bioensaios observaram que a ação do glifosato reduz o comprimento das plântulas, parte aérea e raiz, além de inibir a emissão de raízes secundárias das cultivares transgênicas e convencionais.

A acentuada redução do comprimento da plântula indica um comprometimento na via do chiquimato, logo, por consequência, da produção dos aminoácidos aromáticos como o triptofano, relacionado ao desenvolvimento das raízes das plântulas. Segundo Lima (1998), o

triptofano influencia de forma positiva o número de raízes das plântulas. A redução acentuada no comprimento da raiz na cultivar convencional corrobora com a suscetibilidade da via do chiquimato ao glifosato, diferentemente do que se observa nas cultivares transgênicas. A redução na síntese de aminoácidos, como fenilalanina e tirosina, pode também afetar as respostas de defesa da planta.

4.3 Distribuição da massa seca

As medidas que foram tomadas relativamente às massas secas do hipocótilo, radícula e cotilédones possibilitaram a realização de inferências sobre o progresso do desenvolvimento das plântulas em termos de acúmulo de massa seca durante o período de germinação. Enquanto as plântulas não realizam fotossíntese, seu desenvolvimento depende da mobilização de reservas dos cotilédones para as partes aérea e radicular. No caso da germinação em substrato umedecido com o glifosato, ficou evidente que plântulas das cultivares RR reduzem a velocidade desse progresso, enquanto plântulas da cultivar convencional paralisam seu desenvolvimento logo após emissão da raiz primária. Em outras palavras, o herbicida afeta tanto as plântulas sensíveis quanto aquelas que são tolerantes, mas, de forma menos intensa nestas últimas (Figura 3). Este resultado corrobora com aqueles que foram observados no teste de comprimento das plântulas.

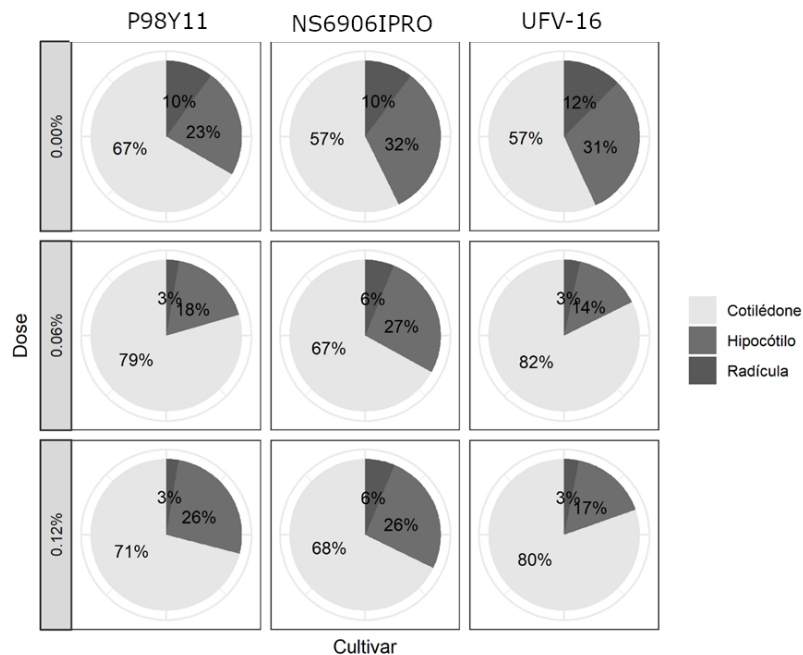


Figura 3. Distribuição da massa seca em cotilédone, hipocótilo e radícula de soja submetidas a germinação em solução com diferentes dosagens de glifosato.

Iniciando com a cultivar convencional, UFV-16, é possível observar significativa redução no peso de massa seca do hipocótilo nos tratamentos 0,06 e 0,12 % do herbicida, mesmo comportamento constatado para as cultivares geneticamente modificadas (Tabela 3). É possível notar que para a cultivar P98Y11, o peso de massa seca do hipocótilo no tratamento com glifosato na concentração de 0,12 % foi similar àquela do tratamento controle. No caso da cultivar NS6906IPRO, foi observada redução no acúmulo de massa seca nos tratamentos com glifosato, relativamente ao tratamento controle, assim como também foi observado para a cultivar convencional, UFV-16. No entanto, a massa seca acumulada no hipocótilo desta cultivar foi sistematicamente menor do que nas cultivares geneticamente modificadas.

O acúmulo de massa seca na raiz apresentou comportamento semelhante entre todas as cultivares, corroborando os resultados obtidos no teste de comprimento de plântulas. O acúmulo de massa seca na radícula reduziu de forma semelhante no tratamento com o glifosato, demonstrando que a radícula é o órgão da planta potencialmente mais prejudicado do que o hipocótilo. No caso da cultivar NS6906IPRO, também se observou redução do acúmulo de massa seca nas radículas sob tratamento com o glifosato, mas, considerando os três genótipos, observou-se que a NS6906IPRO foi menos prejudicada do que as demais, acumulando mais matéria seca nas radículas (Tabela 3). Estas informações podem ser corroboradas pela observação do peso de massa seca encontrado nos cotilédones. Observa-se que em todas as cultivares há mais reserva não mobilizada quando as plântulas estão sob tratamento com o herbicida. Contudo, no caso do tratamento 0,12 % do equivalente ácido do herbicida, restou mais reserva a ser mobilizada na cultivar convencional (Tabela 3).

Tabela 3. Peso de massa seca de plântulas de soja submetidas a germinação em solução com diferentes dosagens de glifosato.

| CULTIVAR/DOSE | Hipocótilo | Radícula | Cotilédone |
|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| UFV-16 Dose 0 | 30,76 ^{Aa} | 12,44 ^{Aa} | 56,79 ^{Bb} |
| UFV-16 Dose 0,06 | 14,32 ^{Bb} | 3,36 ^{Bb} | 82,31 ^{Aa} |
| UFV-16 Dose 0,12 | 16,5 ^{Bb} | 3,11 ^{Bb} | 80,38 ^{Aa} |
| P98Y11 Dose 0 | 23,24 ^{Ab} | 10,08 ^{Ab} | 66,67 ^{Ba} |
| P98Y11 Dose 0,06 | 17,88 ^{Bb} | 2,69 ^{Bb} | 79,41 ^{Aa} |
| P98Y11 Dose 0,12 | 26,41 ^{Aa} | 2,58 ^{Bb} | 70,99 ^{Bb} |
| NS6906IPRO Dose 0 | 32,46 ^{Aa} | 10,23 ^{Ab} | 57,3 ^{Bb} |
| NS6906IPRO Dose 0,06 | 26,83 ^{Ba} | 6,15 ^{Ba} | 67 ^{Ab} |
| NS6906IPRO Dose 0,12 | 25,89 ^{Ba} | 6,32 ^{Ba} | 67,78 ^{Ab} |

Letras maiúsculas comparam dose dentro de cada cultivar e as letras minúsculas comparam as cultivares dentro da mesma dose. Médias seguidas de mesma letra não diferem de acordo com o teste Tukey a 5% de probabilidade.

Conforme observado na Tabela 3 e Figura 2, as maiores porcentagens de massa seca podem ser observadas nos cotilédones da cultivar convencional nos tratamentos 0,06 e 0,12 %, correspondendo a 82 e 80 %, respectivamente. Tomados juntos estes valores e os comportamentos, é plausível refletir que, de fato, a velocidade no desenvolvimento das plântulas é alterada sob tratamento com o herbicida, tendo a cultivar convencional respostas distintas daquelas observadas nas cultivares RR. De acordo com Dvoranen et al. (2007) e Silva¹ et al. (2018) o glifosato reduz a qualidade das sementes, justificando a diminuição da massa seca. Estudo realizado por Pereira et al. (2018) demonstrou que, apesar das plântulas da cultivar convencional recuperarem o seu desenvolvimento vegetativo após o tratamento com o herbicida durante a etapa de germinação, esta recuperação não é completa, afetando inclusive a produção de sementes.

4.4 Análise do ciclo celular

Todos os genótipos apresentaram redução do índice mitótico quando submetidos ao tratamento com o herbicida (Tabela 4). No entanto, a cultivar convencional apresentou os menores valores entre as cultivares avaliadas. Ainda no tratamento controle, a cultivar UFV-16 apresentou índice mitótico baixo comparativamente às cultivares tolerantes ao herbicida (Tabela 4). Quando as sementes de cultivares convencionais de soja são submetidas ao teste de germinação em substrato umedecido com o glifosato, as plântulas germinam emitindo sua raiz primária, mas, logo cessam o seu desenvolvimento (Pereira et al., 2009; Pereira et al., 2018).

Tabela 4. Frequência de anormalidades (%), número de células em divisão e índice mitótico (IM) de cultivares de soja submetidas à germinação em solução com diferentes dosagens de glifosato.

| CULTIVAR/DOSE | Interfase | Prófase | Metáfase | Anáfase | Telófase | IM Total |
|----------------------|-----------|------------|------------|-----------|----------|--------------------|
| UFV-16 Dose 0 | 0 (2113) | 0 (213) | 0,85 (118) | 3,33 (30) | 0 (24) | 15,48 ^A |
| UFV-16 Dose 0,06 | 0 (2357) | 0 (55) | 6,67 (45) | 3,33 (30) | 0 (9) | 5,72 ^B |
| UFV-16 Dose 0,12 | 0 (2836) | 6,2 (64) | 21,05 (19) | 9,09 (11) | 0 (11) | 4,56 ^B |
| P98Y11 Dose 0 | 0 (1800) | 0 (334) | 3,21 (218) | 1,16 (86) | 0 (54) | 28,00 ^A |
| P98Y11 Dose 0,06 | 0 (2261) | 4,8 (67) | 14,85 (85) | 5,17 (52) | 0 (14) | 9,56 ^B |
| P98Y11 Dose 0,12 | 0 (2281) | 16,5 (109) | 38,10 (42) | 8,82 (34) | 0 (18) | 8,76 ^B |
| NS6906IPRO Dose 0 | 0 (1698) | 0 (405) | 3,9 (226) | 3,9 (129) | 0 (28) | 32,08 ^A |
| NS6906IPRO Dose 0,06 | 0 (2131) | 4,8 (90) | 14,8 (110) | 5,2 (101) | 0 (43) | 14,76 ^B |
| NS6906IPRO Dose 0,12 | 0 (2273) | 9,9 (131) | 37,5 (48) | 5,9 (17) | 0 (13) | 9,08 ^C |

Para cada cultivar letras maiúsculas iguais na coluna não difere entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Dados da literatura demonstram que alguns herbicidas, como trifluralina, induzem ruptura ou quebra de cromossomos, causando eliminações, adições e rearranjos dos cromossomos em *Allium cepa* (ATEEQ et al., 2002; BOLLE et al., 2004; FERNANDES et al., 2007). Outros herbicidas, atrazina e glifosato, têm o potencial de interferir diretamente no ciclo celular das plantas causando aberrações cromossômicas induzidas pela formação de micronúcleos e aberrações mitóticas (LINCK, 1979; SRIVASTAVA; MISHRA, 2009).

A redução do índice mitótico causado pelo glifosato pode justificar os efeitos relacionados ao comprometimento do desenvolvimento de plântulas, afetando negativamente a qualidade fisiológica das sementes e a mobilização de reserva, reduzindo também o comprimento de plântula e estruturas internas. Segundo Lopes et al. (2016), a avaliação citogenética pode ser usada para avaliar indiretamente o sistema de reparo do DNA, que é muito importante para o entendimento da perda da qualidade fisiológica de sementes. A aplicação de glifosato nas doses 0,06 e 0,12 % elevou substancialmente a quantidade de anormalidades citogenéticas em todas as cultivares (Tabela 4), com a observação de cromossomo não orientado (Figura 4C), c-metáfases (Figura 4D) e pontes em anáfases (Figura 4 E). A toxicidade de outros herbicidas como Fusilade e Sencor também já foi avaliada no ciclo celular de soja (SOLIMAN et al., 2017). Assim como no presente estudo, as maiores taxas de anormalidades foram observadas em metáfase. Além disso, o herbicida Fusilade apresentou ação mitodepressiva enquanto Sencor apresentou efeito mitopromotor.

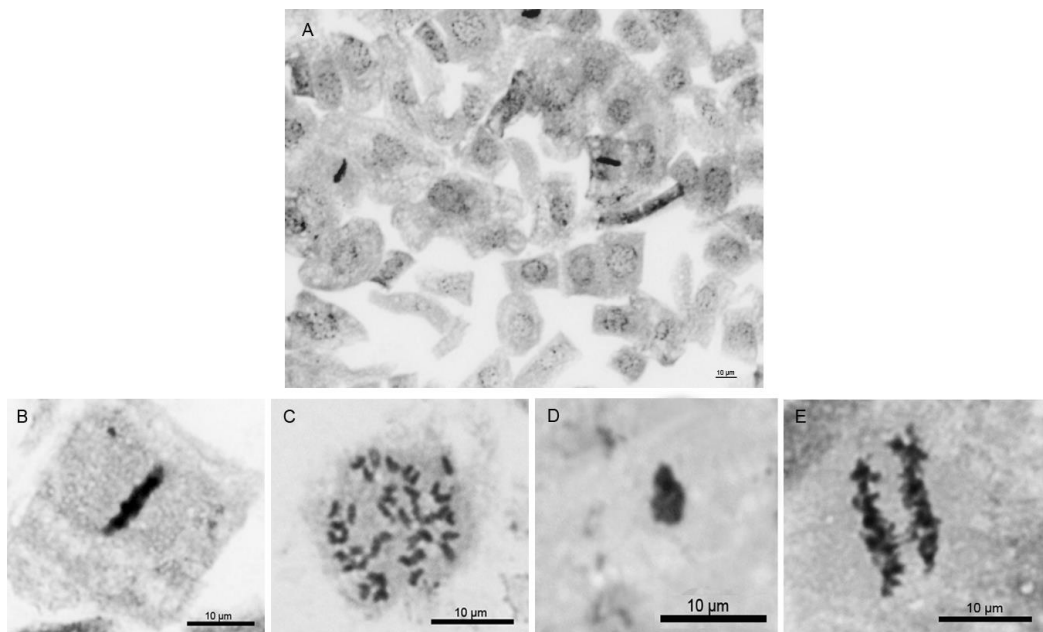


Figura 4 – Avaliação do ciclo celular. (A) campo de avaliação (B) metáfase com cromossomo c orientado (C) C-metáfase (D) Metáfase com cromossomos aderentes (E) Anáfase com ponte.

O aumento na frequência de células com anormalidades anômalos pode indicar que o sistema de controle do ciclo celular torna-se menos eficiente na presença de glifosato. Bolle et al. (2004), Liman et al. (2015) e Silveira et al. (2016) mostraram que, além da redução do índice mitótico, a genotoxicidade de herbicidas causa danos ao DNA e aumento no número de cromossomos anormais. No entanto, vale ressaltar que nenhuma anormalidade foi observada em telófase, o que pode indicar possíveis apoptoses ou mecanismos de reparo da célula durante a divisão.

4.5 Estudo anatômico

As medidas relacionadas ao diâmetro da raiz, córtex, feixe vascular e medula (Figura 5) aumentaram nas doses 0,06 e 0,12 % de herbicida, enquanto que para a epiderme, este aumento se deu apenas na dose 0,12 % (Tabela 5). Para a cultivar NS6906IPRO foi observado aumento nas medidas do diâmetro da raiz, córtex e medula nas doses 0,06 e 0,12% de herbicida, diferentemente da epiderme e feixe vascular que aumentaram suas medidas apenas na dose 0,06% (Tabela 5). No caso da UFV-16, a epiderme não sofreu alterações nas diferentes doses de glifosato, diferente do diâmetro da raiz e do córtex, que engrossaram o seu comprimento na dose 0,06 %, sendo que o feixe vascular aumentou acentuadamente nas doses 0,06 e 0,12 % de herbicida, assim como a medula (Tabela 5). Segundo Güvenç et al. (2010) e Makbul et al. (2011) soja submetida a estresse abiótico, como contaminação por petróleo, sofre alterações no diâmetro do vaso em raiz, no caule e na folha, bem como na largura do córtex e feixe vascular, quando comparado com as que não foram estressadas.

A partir da submissão das sementes ao teste de germinação em substrato umedecido com solução do herbicida, as plântulas tendem a ter o diâmetro do eixo hipocótilo-radicular modificado (PEREIRA et al., 2009). Há trabalhos relatando o incremento em espessura no caso de cultivares convencionais, gerando o questionamento se este resultado resultaria do aumento no número de células e de quais tipos. Sabe-se que cultivares tolerantes ao herbicida apresentam maior crescimento das raízes comparando com aquelas que são sensíveis (ZONETTI et al., 2011). Em diferentes estudos foram relatados tanto a perda em comprimento quanto o aumento em espessura das raízes de plântulas de cultivares sensíveis, como consequência do tratamento com o glifosato (PEREIRA et al., 2009).

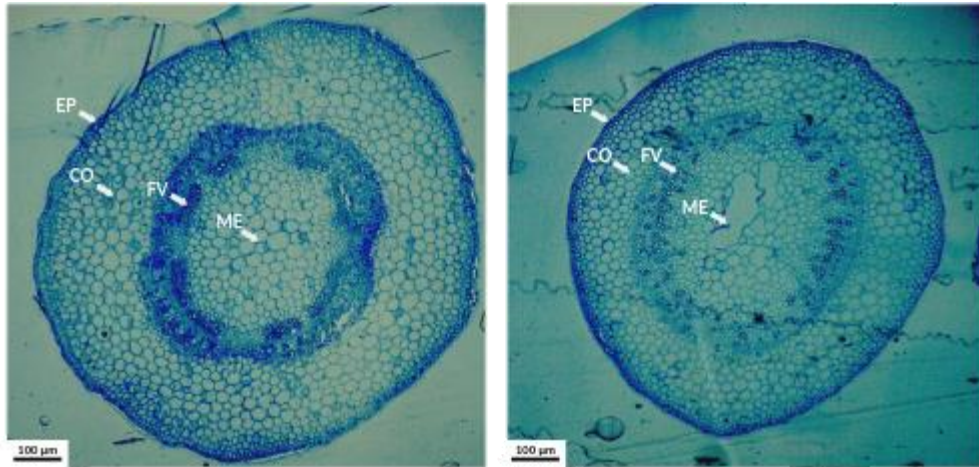


Figura 5 - Secção transversal do hypocótilo da cultivar UFV-16. Esquerda plântula submetida a 0,12% de glifosato. Direita plântula na dose 0% de herbicida. EP = Epiderme; CO = Córtex, FV = Feixe vascular, ME = Medula.

Dentre as modificações encontradas na raiz, todas as estruturas engrossaram, exceto a epiderme da cultivar UFV-16. A epiderme tem a função de revestir os órgãos da planta, sendo uma barreira seletiva controlando a entrada e saída de moléculas na planta protegendo-a, desta forma, contra substâncias tóxicas e perda excessiva de água (STERN E JUDD, 2001). A ausência de resposta da epiderme da UFV-16 submetida a doses de glifosato, indica um comprometimento no mecanismo de proteção ao herbicida, justificando a sua maior suscetibilidade e danos causados nas plântulas.

Tabela 5. Medidas (μm) da estrutura interna da raiz de diferentes cultivares de soja submetidas à germinação em substrato umedecido com diferentes dosagens de glifosato.

| CULTIVAR/DOSE | Diâmetro Total | Epiderme | Córtex | Feixe Vascular | Medula |
|----------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| UFV-16/Dose 0 | 934,138 ^B | 16,403 ^A | 266,792 ^B | 107,782 ^C | 161,071 ^C |
| UFV-16/Dose 0,06 | 2205,635 ^A | 20,823 ^A | 547,923 ^A | 144,704 ^B | 605,456 ^A |
| UFV-16/Dose 0,12 | 2025,180 ^A | 17,512 ^A | 503,051 ^A | 239,716 ^A | 466,172 ^B |
| P98Y11/Dose 0 | 1002,965 ^C | 15,082 ^B | 252,160 ^C | 92,266 ^C | 247,043 ^C |
| P98Y11/Dose 0,06 | 1991,342 ^B | 16,903 ^B | 508,957 ^B | 155,895 ^B | 508,843 ^B |
| P98Y11/Dose 0,12 | 2946,164 ^A | 27,936 ^A | 721,345 ^A | 222,357 ^A | 618,390 ^A |
| NS6906IPRO/Dose 0 | 946,408 ^C | 14,026 ^B | 223,056 ^C | 96,612 ^B | 233,923 ^C |
| NS6906IPRO/Dose 0,06 | 1829,403 ^B | 22,499 ^A | 503,036 ^B | 144,510 ^A | 390,393 ^B |
| NS6906IPRO/Dose 0,12 | 2428,993 ^A | 24,598 ^A | 689,602 ^A | 148,690 ^A | 605,129 ^A |

Para cada cultivar letras maiúsculas iguais na coluna, não difere entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Quando os cortes transversais foram realizados em nível do hipocótilo, a cultivar P98Y11 mostrou que a medula e epiderme não apresentaram diferenças significativas nas doses de glifosato, enquanto o diâmetro do hipocótilo, a epiderme e o córtex sofreram um aumento gradual em suas medidas proporcionalmente ao aumento da dose do herbicida (Tabela 6). A cultivar NS6906IPRO apresentou um engrossamento significativo em quase todas as estruturas anatômicas avaliadas, ocorrendo no hipocótilo, epiderme, córtex e feixe vascular na dose 0,12 %, exceto na medula, que não foi afetada nas doses de glifosato. A cultivar convencional, UFV-16, sofreu modificações nas medidas da epiderme, córtex, diâmetro do hipocótilo e feixe vascular, apresentando um aumento no tamanho das estruturas quando submetidas ao glifosato e, em contrapartida, a medula na dose 0,06 % apresentou uma redução significativa em sua medida (Tabela 6).

A absorção de glifosato e sua translocação provocam modificações anatômicas devido à toxicidade ocasionada pela formação de metabolitos tóxicos. As cultivares apresentaram modificações anatômicas semelhantes no hipocótilo, à exceção da medula na UFV-16, reduzindo sua medida com a aplicação de glifosato (Figura 5). A medula está relacionada com o transporte de moléculas e sustentação, e a sua redução na UFV-16 pode levar a dificuldades na vascularização prejudicando o desenvolvimento das plântulas (FLETCHER & DALE, 1974; MCCALL, 1934).

Tabela 6. Medidas (μm) da estrutura interna do hipocótilo de cultivares de soja submetidas a germinação em substrato umedecido com diferentes dosagens de glifosato.

| Cultivar/Dose | Diâmetro Total | Epiderme | Córtex | Feixe Vascular | Medula |
|----------------------|------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| UFV-16 Dose 0 | 2436,370 ^B | 26,315 ^B | 417,555 ^B | 183,284 ^{AB} | 1018,040 ^A |
| UFV-16 Dose 0,06 | 2212,752 ^B | 38,546 ^A | 417,898 ^B | 165,158 ^B | 744,726 ^B |
| UFV-16 Dose 0,12 | 2778,579 ^A | 29,606 ^{AB} | 588,502 ^A | 203,424 ^A | 843,104 ^B |
| P98Y11 Dose 0 | 2100,505 ^B | 28,187 ^A | 334,522 ^B | 190,690 ^B | 788,328 ^A |
| P98Y11 Dose 0,06 | 2273,912 ^{AB} | 31,714 ^A | 380,845 ^{AB} | 202,561 ^{AB} | 785,965 ^A |
| P98Y11 Dose 0,12 | 2408,704 ^A | 29,093 ^A | 448,331 ^A | 223,383 ^A | 733,510 ^A |
| NS6906IPRO Dose 0 | 2217,858 ^B | 30,383 ^B | 344,968 ^B | 190,187 ^B | 898,117 ^A |
| NS6906IPRO Dose 0,06 | 2226,393 ^B | 26,781 ^B | 362,040 ^B | 188,071 ^B | 830,028 ^A |
| NS6906IPRO Dose 0,12 | 3981,943 ^A | 41,250 ^A | 978,317 ^A | 256,949 ^A | 833,464 ^A |

Para cada cultivar letras maiúsculas iguais na coluna, não difere entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

As modificações anatômicas foram constatadas em todas as cultivares, tendo as cultivares transgênicas comportamentos semelhantes entre si, e ambas, diferentemente da cultivar convencional. O fato pode ser justificado pela ausência do gene que atribuiu

resistência ao glifosato, modificando a intensidade dos efeitos do glifosato sobre as estruturas da epiderme, córtex, feixe vascular e medula da raiz e hipocótilo.

5 CONCLUSÕES

O glifosato compromete o desenvolvimento inicial da plântula de soja, evidenciado pelos testes de germinação, comprimento das plântulas, massa seca, mobilização da massa seca, adaptações anatômicas e ciclo celular, ocorrendo em diferentes proporções entre as cultivares. Nesse sentido, concluímos:

- No teste de germinação, plântulas da cultivar UFV-16 são mais afetadas pelo glifosato, por terem um acentuado aumento no número de plântulas anormais, diferentemente do que foi observado para as plântulas tolerantes ao herbicida.
- O teste de comprimento de plântulas, evidencia a maior suscetibilidade da cultivar convencional ao glifosato, a qual mostrou redução mais aguda em suas medidas quando comparada com as cultivares transgênicas.
- A distribuição de massa seca é alterada sob tratamento com o herbicida, sendo a cultivar convencional mais prejudicada ao apresentar maior acúmulo de massa no cotilédono, comportamento visto em menor intensidade nas cultivares transgênicas.
- Há uma redução e não paralisação do índice mitótico. Em todas as cultivares ocorre um aumento das anomalias em função do aumento da dose de glifosato. A UFV-16 é suscetível ao herbicida, apresentando os menores índices mitóticos ao ser submetida ao glifosato, diferentemente das transgênicas HT que conseguiram sustentar maiores valores.
- As modificações anatômicas ocorrem em todas as cultivares, tendo as cultivares transgênicas comportamentos semelhantes entre si, e ambas, diferentemente das mudanças encontradas nas estruturas internas da cultivar convencional.

A redução mais acentuada do índice mitótico na UFV-16 está relacionada com maior comprometimento da germinação, comprimento das plântulas, mobilização da massa seca, adaptações anatômicas e ciclo celular. As cultivares P98Y11 e NS6906IPRO, mesmo com a isoforma da enzima EPSPS que atribui resistência ao herbicida, mostrou-se tolerante, mas não resistente, sendo acometida aos efeitos do glifosato, em menor intensidade, comprometendo a qualidade fisiológica, anatomia e ciclo celular.

REFERÊNCIAS

- AATEEQ, Bushra et al. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2, 4-D and butachlor evaluated by Allium root tip test. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 514, n. 1-2, p. 105-113, 2002.
- BABBAR, Neha et al. Influence of different solvents in extraction of phenolic compounds from vegetable residues and their evaluation as natural sources of antioxidants. **Journal of food science and technology**, v. 51, n. 10, p. 2568-2575, 2014.
- BERTAGNOLLI, C. M. **Deteção e quantificação de sementes de soja geneticamente modificada resistente ao glifosato em sistema hidropônico. 2005. 64f.** 2005. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Sementes)-Faculdade de Agronomia" Eliseu Maciel", Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- BERVALD, Clauber Mateus Priebe et al. Desempenho fisiológico de sementes de soja de cultivares convencionais e transgênicas submetidas ao glifosato. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 2, p. 009-018, 2010.
- BOLLE, Paola et al. Clastogenicity of atrazine assessed with the Allium cepa test. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 43, n. 2, p. 137-141, 2004.
- Bonny S. Genetically modified herbicide-tolerant crops, weeds, and herbicides: Overview and impact. **Environmental Management**, v. 57: 31-48, 2016.
- CARLISLE, S. M.; TREVORS, J. T. Glyphosate in the environment. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 39, n. 3-4, p. 409-420, 1988.
- CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos. V. 6, Safra 2018/19 – N. 10. Décimo Levantamento.** 2019.
- CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Compêndio de Estudos Conab – A Produtividade da soja: Análise e perspectivas. V. 10,** 2017.
- Cunha CSM, Tillmann MAA, Villela FA, Dode LB and Balerini F (2005) Comparação de métodos na detecção de sementes de soja geneticamente modificada resistente ao glifosato. **Revista Brasileira de Sementes 27:** 167-175.
- DE CARVALHO, Tereza Cristina et al. Comparação da qualidade fisiológica de sementes de soja convencionais e de sua derivada transgênica1. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 1, p. 164-170, 2012.
- DE MENEZES, Thatiane Padilha et al. Conteúdo de DNA e caracterização anatômica de cultivares de oliveiras (*Olea europaea* L.). **Agrarian**, v. 11, n. 41, p. 196-202, 2018.
- Duke SO. The history and current status of glyphosate. **Pest Management Science**, v. 74: 1027-1034, 2018.
- DUKE, Stephen O. et al. Isoflavone, glyphosate, and aminomethylphosphonic acid levels in seeds of glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 1, p. 340-344, 2003.
- DUTRA, Leonardo Ferreira; KERSTEN, Elio; FACHINELLO, José Carlos. Época de coleta, ácido indolbutírico e triptofano no enraizamento de estacas de pessegueiro. **Scientia agrícola**, v. 59, n. 2, p. 327-333, 2002.
- FERNANDES, Thaís CC; MAZZEO, Dânia Elisa C.; MARIN-MORALES, Maria A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of Allium cepa exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, n. 3, p. 252-259, 2007.

- FU, Yong-Bi; AHMED, Zaheer; DIEDERICHSEN, Axel. Towards a better monitoring of seed ageing under ex situ seed conservation. **Conservation physiology**, v. 3, n. 1, 2015.
- FUNGUETTO, Claudete Izabel et al. Detecção de sementes de soja geneticamente modificada tolerante ao herbicida glifosato. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n. 1, p. 130-138, 2004.
- FUNGUETTO, Claudete Izabel et al. Detecção de sementes de soja geneticamente modificada tolerante ao herbicida glifosato. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n. 1, p. 130-138, 2004.
- GÜVENÇ, Ayşegül; DUMAN, Hayri. Morphological and anatomical studies of annual taxa of *Sideritis* L.(Lamiaceae), with notes on chorology in Turkey. **Turkish Journal of Botany**, v. 34, n. 2, p. 83-104, 2010.
- HERNÁNDEZ-VALENCIA, Ismael; MAGER, Denise. Uso de *Panicum maximum* y *Brachiaria brizantha* para fitorremediar suelos contaminados con un crudo de petróleo liviano. **Bioagro**, v. 15, n. 3, p. 149-156, 2003.
- Islam I, Adam Z and Islam S. Soybean (*Glycine Max*): Alternative Sources of Human Nutrition and Bioenergy for the 21st Century. **American Journal of Food Science and Technology**, v. 7, n. 1, 1-6, 2019.
- James C. ISAAA. 2017. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2017: Biotech Crop Adoption Surges as Economic Benefits Accumulate in 22 Years. *ISAAA Brief No. 53*. ISAAA: Ithaca, NY.
- KUTLU, Nihal et al. Changes in anatomical structure and levels of endogenous phytohormones during leaf rolling in *Ctenanthe setosa* under drought stress. **Turkish Journal of Biology**, v. 33, n. 2, p. 115-122, 2009.
- LIMA, Claudia Chiarini Monteiro. **Uso de aditivos e cofatores na rizogênese de plântulas de *Eucalyptus grandis* Hill. in vitro**. 1998. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo.
- LIMAN, Recep; CİĞERCI, İbrahim Hakkı; ÖZTÜRK, Nur Serap. Determination of genotoxic effects of Imazethapyr herbicide in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, and comet assay. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 118, p. 38-42, 2015.
- LINCK, A. J. Effects on the cytology and fine structure of plant cells. **Herbicides: Physiology**, 1976.
- LOPES, Renata Miranda. Avaliação de metodologias moleculares e citogenéticas para detectar níveis de deterioração em sementes de soja (*Glycine max* (L.) merr.) e cevada (*Hordeum vulgare* L.). 2016.
- MAKBUL, Serdar et al. Changes in anatomical and physiological parameters of soybean under drought stress. **Turkish Journal of Botany**, v. 35, n. 4, p. 369-377, 2011.
- MCCALL, M. A. Developmental anatomy and homologies in wheat. **J. Agri. Res.**, v. 48, p. 283-321, 1934.
- Melo LF, Fagioli M, Sá ME. Alternative methods for detecting soybean seeds genetically modified for resistance to herbicide glyphosate. **Journal of Seed Science**, v. 35, n. 3, p.381-386, 2013.
- MENEGATTI, Ana Laura Angeli; BARROS, Alexandre Lahóz Mendonça de. Análise comparativa dos custos de produção entre soja transgênica e convencional: um estudo de caso para o Estado do Mato Grosso do Sul. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 45, n. 1, p. 163-183, 2007.
- MIRANDA, D.M.; TILLMANN, M.A.A.; BALERINI, F.; VILLELA, F.A. Bioensaios na detecção e quantificação de sementes de soja geneticamente modificada resistente ao glifosato. **Revista Brasileira de Sementes**, v.27, n.1, p.93- 103, 2005
- MIRANDA, DENISE et al. **Bioensaios na detecção e quantificação de sementes de soja geneticamente modificada resistente ao glifosato**. 2004.

- NAGATA, R.T.; DUSKY, J.A.; FERL, R.J.; TORRES, A.C.; CANTLIFFE, D.J. Evaluation of glyphosate resistance in transgenic lettuce. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.125, p.66-672, 2000.
- Pádua GP, Jesus AMS, Fronza V, Arantes NE, Zito RK. Detection of adventitious presence of genetically modified seeds in lots of non transgenic soybean. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 4 p.573-579, 2012.
- Pereira WA, Lisboa SP, Dias DCFS, Alvarenga EM, Borém A. Ajuste de metodologias para a identificação de cultivares de soja quanto à tolerância ao glifosato. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 4, p.133-144, 2009.
- PEREIRA, WELISON ANDRADE et al. AJUSTE DE METODOLOGIAS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA QUANTO À TOLERÂNCIA AO GLIFOSATO. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 4, 2009.
- PEREIRA, Welison Andrade et al. AJUSTE DE METODOLOGIAS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA QUANTO À TOLERÂNCIA AO GLIFOSATO. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 4, 2009.
- PEREIRA, Welison Andrade et al. Performance of transgenic and conventional soybean plants subjected to bioassay for detection of glyphosate tolerant seeds. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 39-46, 2018.
- PEZESHKI, S. R. et al. The effects of oil spill and clean-up on dominant US Gulf coast marsh macrophytes: a review. **Environmental pollution**, v. 108, n. 2, p. 129-139, 2000.
- RISTIC, Zoran; CASS, David D. Leaf anatomy of *Zea mays* L. in response to water shortage and high temperature: a comparison of drought-resistant and drought-sensitive lines. **Botanical Gazette**, v. 152, n. 2, p. 173-185, 1991.
- Rosas Chafim et al. Fitorremediação de solos contaminados por petróleo. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 6, n. 1, 2012.
- Silva¹ AFM, Albrecht AJP, Albrecht LP, Pellicci VA, Giovanelli BF, Ghirardello GA, Viana HRM, Victoria Filho R. Glyphosate in agronomic performance and seed quality of soybean with *cp4-EPSPs* and *cryIAc* genes. **Journal of Plant Protection Research**, v. 58, n. 4: 345-353, 2018.
- SILVA, João Eduardo Ribeiro et al. HERBICIDAS UTILIZADOS NA DESSECAÇÃO AFETANDO PARÂMETROS GERMINATIVOS DE SEMENTES DE SOJA CONVENCIONAL E TRANSGÊNICA. **e-RAC**, v. 8, n. 1, 2018.
- SILVEIRA, Maruhen Amir Datsch et al. Mutagenicity of two herbicides widely used on soybean crops by the *Allium cepa* test. **Cytotechnology**, v. 68, n. 4, p. 1215-1222, 2016.
- SRIVASTAVA, Khyati; MISHRA, Kum Kum. Cytogenetic effects of commercially formulated atrazine on the somatic cells of *Allium cepa* and *Vicia faba*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 93, n. 1, p. 8-12, 2009.
- STERN, WILLIAM LOUIS; JUDD, Walter S. Comparative anatomy and systematics of *Catasetinae* (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 136, n. 2, p. 153-178, 2001.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal 3 ed. **Porto Alegre: Artmed**, v. 719, 2004.
- TILLMANN, Maria Ângela André; WEST, Shirlye. Identification of genetically modified soybean seeds resistant to glyphosate. **Scientia agricola**, v. 61, n. 3, p. 336-341, 2004.
- VELDERRAIN-RODRÍGUEZ, G. R. et al. Phenolic compounds: their journey after intake. **Food & function**, v. 5, n. 2, p. 189-197, 2014.

XU, J. G.; JOHNSON, R. L. Root growth, microbial activity and phosphatase activity in oil-contaminated, remediated and uncontaminated soils planted to barley and field pea. **Plant and Soil**, v. 173, n. 1, p. 3-10, 1995.

ZONETTI PC, SUZUKI LS, BONINI EA, FERRARESE MLL, FERRARESE-FILHO O. Growth and root lignification of susceptible and glyphosate-resistant soybean. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 33, n. 2, p. 291-295, 2011.