



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JACQUELINE ENÉQUIO DE SOUZA

**METODOLOGIA PARA AUMENTAR A PROPORÇÃO DE
PLANTAS DE SOJA TOLERANTES AO *GLYPHOSATE* E AO
IMAZAPYR NA GERAÇÃO F₂**

JACQUELINE ENÉQUIO DE SOUZA

**METODOLOGIA PARA AUMENTAR A PROPORÇÃO DE
PLANTAS DE SOJA TOLERANTES AO *GLYPHOSATE* E AO
IMAZAPYR NA GERAÇÃO F₂**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Arrabal
Arias

Londrina
2010

Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S729m Souza, Jacqueline Enéquio de. Metodologia para aumentar a proporção de plantas de soja tolerantes ao glyphosate e ao imazapyr na geração F₂/ Jacqueline Enéquio de Souza. – Londrina, 2010.
71 f.: il.

Orientador: Carlos Alberto Arrabal Arias.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2010.

Inclui bibliografia.

1. Soja – Melhoramento genético – Teses. 2. Soja – Resistência a herbicidas – Teses. 3. Glycine max – Teses. 4. Plantas transgênicas – Teses. I. Arias, Carlos Alberto Arrabal. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

CDU 631.52:633.34

JACQUELINE ENÉQUIO DE SOUZA

**METODOLOGIA PARA AUMENTAR A PROPORÇÃO DE PLANTAS
DE SOJA TOLERANTES AO *GLYPHOSATE* E AO *IMAZAPYR* NA
GERAÇÃO F₂**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Alberto Arrabal Arias
EMBRAPA – Londrina – PR

Prof. Dr. Marcelo Fernandes de Oliveira
EMBRAPA – Londrina – PR

Prof. Dr. Josué Maldonado Ferreira
UEL – Londrina – PR

Londrina, 25 de fevereiro de 2010.

DEDICATÓRIA

Á Deus, pela minha existência e por iluminar minha vida

Aos meus pais, Roberto e Jussara, por tudo o que fizeram por mim Á

minha irmã, Caroline, pela amizade e companheirismo Ao meu

namorado, Marcus, pelo amor e paciência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e renovação de forças a cada momento.

A toda minha família, principalmente aos meus pais Roberto e Jussara, minha irmã Caroline, pela força, união que me proporcionaram para que acreditasse em meu sonho.

Ao Marcus, namorado-amigo, pelo amor e companheirismo nesta jornada.

Ao Prof. Dr. Carlos Arrabal, pelas orientações e ensinamentos ao longo dos dois anos.

Ao Prof. Josué e a Profa. Rosângela, que há sete anos estão ao meu lado depositando confiança e motivação a cada passo conquistado.

À Embrapa Soja, por permitir a realização das atividades experimentais, e ao apoio dos pesquisadores da instituição, principalmente das áreas de melhoramento e plantas daninhas.

Aos amigos da Embrapa: Zé Carlos, Rodrigo, Itamar, Chugão, Chagas, que sem saber, fizeram com que o trabalho desenvolvido se tornasse fácil e muito agradável. Incluindo as mentiras e conversas do Itamar, o carneiro do Chugão, as piadas do Camundongo e aos ensinamentos e conselhos do Zé, sentirei saudade.

Ao Betti e Anizia, pela valiosa amizade, me cativando dia a dia durante os dois anos com carinho e companheirismo, incentivando e proporcionando momentos memoráveis.

A todos os meus colegas e amigos da Embrapa que, de alguma forma, me ensinaram e me acompanharam. Sentirei saudades do Alex, Meison, Adriano, Bruno, Everaldo, Alvino, Mamangava, Aliny, Baiano, Cirso, Felipe, Douglas, Cibeli, que de uma forma ou outra, contribuíram com este trabalho.

À Raquel, que mais uma vez esteve ao meu lado, agradeço sua amizade e companheirismo.

À Sueli, pela simpatia e pelo trabalho prestado a todos os alunos do programa.

À Universidade Estadual de Londrina e todo o corpo docente do curso de Genética e Biologia Molecular, pela contribuição e a oportunidade dada para realizar este trabalho.

À CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

E agradeço a todos que passaram pela minha vida durante toda a jornada acadêmica e que, mesmo sem saber, me ensinaram mais do que posso dizer em palavras.

*“Toda a nossa ciência, comparada à realidade, é primitiva e infantil e,
no entanto, é a coisa mais preciosa que temos”*

Albert Einstein

SOUZA, Jaqueline Enéquio. **Metodologia para aumentar a proporção de plantas de soja tolerantes ao *glyphosate* e ao *imazapyr* na geração F₂**. 2010. 71 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, 2010.

RESUMO

Este trabalho teve o objetivo de: desenvolver uma metodologia para o cultivo de plantas transgênicas hemizigóticas para o gene CP4-EPSPS e *csr1-2* que conferem tolerância ao *glyphosate* e ao *imazapyr*, respectivamente, em casa-de-vegetação sob condição de inverno; promover seleção de gametas contendo o gene CP4-EPSPS, durante a geração F₁; e verificar a possibilidade de seleção de gametas com o gene *csr1-2* na geração F₁ *hemizigota*. Os cruzamentos entre genótipos convencionais e transgênicos foram submetidos aos seguintes tratamentos: a) plantas tolerantes ao *glyphosate*: Tratamento T1- testemunha sem aplicação do *glyphosate*; T2-0,96 Kg i.a. ha⁻¹ em V3; T3-1,92 Kg i.a. ha⁻¹ em V3; T4-0,96 Kg i.a. ha⁻¹ em V5 e T5-1,92 Kg i.a. ha⁻¹ em V5; b) plantas tolerantes ao *imazapyr*: T1-sem aplicação de *imazapyr*; aplicações no estágio V3: T2-6,25 g i.a. ha⁻¹; T3-12,5 g i.a. ha⁻¹; T4-25 g i.a. ha⁻¹; e aplicações no estágio V5: T5-6,25 g i.a. ha⁻¹; T6-12,5 g i.a. ha⁻¹; e T7-25 g i.a. ha⁻¹. As plantas da geração F₁ foram avaliadas para diversas características seguindo o delineamento experimental inteiramente casualizado, e em dois esquemas fatoriais, sendo eles: tratamentos x posições na planta (superior e inferior) e dose do herbicida x época de aplicação, com cinco repetições. Para plantas tolerantes ao *glyphosate*, dosagens maiores de herbicida aplicadas próximas à floração reduziram significativamente o número de vagens e o número de sementes nas duas posições das plantas. As amostras de plantas da geração F₂, derivadas das plantas F₁ dos diversos tratamentos, foram avaliadas quanto à tolerância ao *glyphosate* e foi verificado um aumento significativo da proporção de plantas vivas em todos os tratamentos envolvendo a aplicação do herbicida. Nos programas de melhoramento que envolvam o gene CP4-EPSPS, o tratamento T3 é o que melhor atende aos objetivos, pois permite tanto a seleção de gametas, como a produção regular de sementes nas plantas F₁. Para os genótipos tolerantes ao *imazapyr*, a aplicação de 6,25 g i.a. ha⁻¹ de *imazapyr* em V5 é a melhor opção para identificar e selecionar plantas *hemizigotas* em condições de inverno e em casa-de-vegetação para o gene *csr1-2*, sem que haja redução na quantidade de sementes da geração F₂.

Palavras –chave: *Glycine Max*. CP4-EPSPS. *csr1-2*. Seleção de gametas.

SOUZA, Jaqueline Enéquio. **Methodology to increase the ratio of soybean tolerant to glyphosate and imazapyr in the F₂ generation.** 2010. 71 f. Dissertation (Master's Degree in Genetics and Molecular Biology) - State University of Londrina, 2010.

ABSTRACT

This study aimed to: develop a methodology for growing hemizygous F₁ transgenic plants for the gene CP4-EPSPS and *csr1-2* that confer tolerance to *glyphosate* and *imazapyr*, respectively, in the greenhouse under winter conditions, promoting gamete selection in the F₁ generation containing the CP4-EPSPS gene, and to assess the possibility of gamete selection with the *csr1-2* gene on hemizygous F₁ generation. The crosses between conventional and transgenic genotypes were subjected to the following treatments: a) *glyphosate* tolerant plants: Treatments T1-control without *glyphosate* spraying, T2-0.96 kg a.i. ha⁻¹ in the V3 stage, T3-1.92 kg a.i. ha⁻¹ in the V3 stage, T4-0.96 kg a.i. ha⁻¹ in the V5 stage and T5-1.92 kg a.i. ha⁻¹ in the V5 stage; b) *imazapyr* tolerant plants: T1-control without *imazapyr*; spraying in stage V3: T2-6.25 g a.i. ha⁻¹, T3-12.5 g a.i. ha⁻¹, T4-25 g a.i. ha⁻¹, and spraying in stage V5: T5-6.25 g a.i. ha⁻¹, T6-12.5 g a.i. ha⁻¹, and T7-25 g a.i. ha⁻¹. The F₁ plants were evaluated for various characteristics according to a completely randomized design, with five replicates in two factorial arrangements: treatment x plant position (upper and lower) and herbicide dose x spraying stage. For *glyphosate* tolerant plants higher herbicide doses, applied nearby flowering, significantly reduced the number of pods and number of seeds in both plant positions. Samples of the F₂ plants derived from F₁ plants of different treatments, were evaluated for tolerance to *glyphosate* and there was a significant increase in the proportion of live plants in all treatments involving any herbicide spraying. For breeding purposes with the CP4-EPSPS gene, the T3 is the best option by allowing both an effective selection of gametes and regular seed production in F₁ plants. For *imazapyr* tolerant genotypes, the spraying of 6.25 g a.i. ha⁻¹ of *imazapyr* in stage V5 is the best option to identify and select hemizygous *csr1-2* plant in the greenhouse under winter conditions, without any reduction in the amount of seeds for the F₂ generation.

Keywords *Glycine max.* CP4-EPSPS. *csr1-2*. Gametes selection.

LISTA DE TABELAS

Artigo A

- Table 1** – Variance analysis with mean squares and significance level, estimates of means and coefficient of variation CV (%) in the F₁ generation after treated with *glyphosate* at different herbicide doses and spraying stage..... 35
- Table 2** – General means for the treatments (TREA) to the percentage of injury 14 days after application (INJ14), plant height during the flowering period (HPF, cm), days to flowering (DF), number of nodes on main stem of the plant (NNO), number of pods in the upper (NPU), number of pods on the lower (NPL), total number of pods in the plant (NP_T), number of seeds in the upper (NS_U), number of seeds in the lower (NS_L), total number of seeds in the plant (NS_T), for seed per pod (NSP); plant height at maturity (HPM, cm) and days to maturity (DM) assessed in the F₁ generation after treated with *glyphosate* at different herbicide doses and spraying stage..... 37
- Table 3** – Variance analysis in factorial arrangement (2x2) with the mean squares and significance levels, estimates of average and coefficient of variation CV (%) for treatment in the F₁ generation after treated with *glyphosate* at different herbicide doses and spraying stage.....38
- Table 4** – General means of herbicide doses and spraying stage for the characteristics of injuries 14 days after application (INJ14), plant height during the flowering period (HPF, cm), days to flowering (DF), number of nodes on main stem of the plant (NNO) , number of pods in the upper (NPU), number of pods on the lower (NPL), number of seeds in the upper (NS_U), number of seeds in the lower (NS_L), for seed per pod (NSP), height the plant at maturity (HPM cm) and days to maturity (DM) assessed in the F₁ generation after treated with *glyphosate* in different herbicide doses and spraying stage 39
- Table 5** – Mean squares and degrees of freedom (df) to: treatment, plant position, interaction treatment by plant position (MS_{TxP}) and error, with their significance levels, estimates of average and coefficient of variation CV

	(%) for the characters: number of pods and number of seeds assessed in the F ₁ generation after treated with <i>glyphosate</i>	40
Table 6	– General means of the treatments to the number of pods and number of seeds assessed in the F ₁ generation after treated with <i>glyphosate</i>	40
Table 7	– Valores of the χ^2 test the hypothesis of 3 Live Plants: 1 Dead Plant, assessed in the F ₂ generation, calculating the probability with 1 degree of freedom.....	41

Artigo B

Tabela 1	– Resumo da análise de variância com os quadrados médios e níveis de significância; estimativas de medias e coeficiente de variacao CV(%) para os caracteres avaliados na geracao F ₁ apos tratado com o <i>imazapyr</i> em diferentes doses e épocas	53
Tabela 2	– Médias gerais dos tratamentos para as características altura de planta no período de florescimento (APF, cm); dias para a floração (DF); número de nós na haste principal da planta (NNO); número de vagens na região superior (NVs); número de vagens na região inferior (NVi); número de vagens totais (NVt); número de sementes na região superior (NSs); número de sementes na região inferior (NSi); número de sementes totais (NSt); relação semente por vagem (SpV); altura da planta na maturação (APM, cm) e dias para a maturação (DM), avaliadas na geração F ₁ após tratado com o <i>imazapyr</i> em diferentes doses e épocas	54
Tabela 3	– Resumo da análise fatorial 3x2 com os respectivos quadrados médios e níveis de significância; estimativas de média e coeficiente de variação CV (%) para os caracteres avaliados na geração F ₁ após tratado com o <i>imazapyr</i> em diferentes doses e épocas	56
Tabela 4	– Médias gerais de doses, em g i.a. ha ⁻¹ , e épocas para as características altura de planta no período de florescimento (APF, cm); dias para a floração (DF); número de nós na haste principal da planta (NNO); número de vagens na região superior (NVs); número de vagens na região inferior (NVi); número de vagens total (NVt); número de sementes na região superior (NSs); número de sementes na região inferior (NSi); número de sementes total (NSt); relação semente por vagem (SpV); altura da planta na maturação (APM, cm) e dias para a maturação	

(DM), avaliadas na geração F ₁ após tratado com o <i>imazapyr</i> em diferentes doses e épocas	57
Tabela 5 – Quadrados médios e graus de liberdade (GL) para: tratamento (QMt), posição (QMp), interação tratamento por posição e erro, com os respectivos níveis de significâncias; estimativas de médias e coeficiente de variação CV(%) para os caracteres: número de vagens (NV) e número de sementes (NS), avaliadas na geração F ₁ depois de tratado com o <i>imazapyr</i>	58
Tabela 6 – Médias gerais dos tratamentos para as características número de vagens e número de sementes, avaliadas na geração F ₁ após tratado com o <i>imazapyr</i>	58
Tabela 7 – Valores de χ^2 testando a hipótese de 3 Plantas Vivas: 1 Planta Morta, avaliadas na geração F ₂ , calculado a probabilidade com 1 grau de liberdade	60
Tabela 8 – Valores de χ^2 testando a hipótese de 1 Planta Viva : 1 Planta Morta, avaliadas na geração de retrocruzamento, calculado a probabilidade com 1 grau de liberdade	61

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 REVISÃO DE LITERATURA	15
1.1.1 Danos e Controle das Espécies Daninhas.....	15
1.1.2 Soja Transgênica Tolerante aos Herbicidas	16
1.1.3 Ação dos Herbicidas.....	18
1.1.3.1 <i>Glyphosate</i> – inibidores de EPSPS	18
1.1.3.2 <i>Imazapyr</i> – inibidores de ALS	20
1.1.4 Plantas Tolerantes aos Herbicidas	21
1.1.5 Alterações Florais Devido ao Herbicida	22
1.1.6 Efeito do Uso de Herbicida em Programas de Melhoramento Genético em Soja.....	23
Referências	25
2 METHODOLOGY TO INCREASE THE RATIO OF SOYBEAN TOLERANT TO <i>GLYPHOSATE</i> IN THE F₂ GENERATION	29
Abstract.....	30
2.1 INTRODUCTION	30
2.2 MATERIALS AND METHODS	32
2.3 RESULTS AND DISCUSSION.....	35
Conclusions	42
References	43
3 METODOLOGIA PARA CULTIVAR PLANTAS DE SOJA <i>HEMIZIGOTAS</i> PARA O GENE <i>csr1-2</i> QUE CONFERE TOLERANCIA AO HERBICIDA	45
Resumo	46
Abstract.....	46
3.1 INTRODUÇÃO	47
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	48
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
Conclusões.....	62
Referências	63

CONCLUSÕES GERAIS 65

REFERÊNCIAS 66

1 INTRODUÇÃO

Cada vez mais os agricultores e os programas de melhoramento buscam por cultivares geneticamente modificada tolerante aos herbicidas devido ao grande dano que as plantas daninhas causam à cultura. Dois eventos independentes de soja geneticamente modificada, que contém os genes CP4-EPSPS e *csr1-2* mutado, conferindo respectivamente tolerância aos herbicidas a base de *glyphosate* e do grupo químico das *imidazolinonas*, representam alternativas tecnológicas importantes aos agricultores. Com esta tecnologia, o controle de plantas daninhas nas lavouras comerciais é facilitado por permitir a aplicação do produto em pós-emergência quando a cultura ainda está em desenvolvimento.

Uma série de fatores foi relevante para se estabelecer o cultivo de plantas de soja transgênicas no país, dentre eles: liberação dada pela CTNBio (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança) em 2005 para o plantio e comercialização da soja Roundup Ready[®] (RR); e o controle eficiente de plantas daninhas em área de infestação (NETO et al., 2009; DELANNAY et al. 1995).

Para o desenvolvimento destas cultivares transgênicas, os programas de melhoramento no início de suas atividades, após as hibridações, as sementes F₁ são cultivadas normalmente durante o inverno em condições de casa-de-vegetação. Cruzamentos entre esses organismos geneticamente modificados com cultivares convencionais, produzem plantas F_{1s} *hemizigotas* que devem produzir aproximadamente 50% de gametas contendo o gene de interesse. Assim, em programas de retrocruzamentos para introgressão desses genes, é esperado que apenas 50% das plantas da geração F₁RC₁ receberão o gene de interesse apresentando a tolerância desejada. Os outros 50% não tolerantes serão perdidos, o que significa que o trabalho empregado para obtenção desses cruzamentos, anotações, colheita, trilha, semeadura e avaliação dos F_{1s} serão perdidos.

Também na geração F₂, derivada dessas plantas F₁ *hemizigotas*, é esperada uma segregação na proporção de três tolerantes (AA e Aa) para uma não tolerante (aa), sob ausência de seleção e considerando-se a mesma viabilidade de gametas com e sem o gene inserido.

Nos programas de melhoramento genético com soja transgênica, existe a possibilidade de seleção de gametas na geração F₁, por meio de herbicida à base de *glyphosate* (WALKER et al., 2006), abrindo a possibilidade de incrementar a eficiência nessas atividades

de retrocruzamentos e de produção de sementes de plantas F_1 , normalmente executadas em condição de entresafra em casa-de-vegetação.

Os herbicidas utilizados em pós-emergência sobre os genótipos de soja podem comprometer o desenvolvimento da planta e até o rendimento de grãos, dependendo do produto utilizado, da dosagem e do estágio fenológico em que se encontra a cultura no momento da aplicação, desta forma, este estudo teve como objetivo:

1 - desenvolver metodologia para o cultivo das plantas hemizigóticas, que contenham o gene CP4-EPSPS, em condições de inverno e casa-de-vegetação, e promover a seleção de gametas de interesse, sem afetar significativamente a produção de sementes;

2 - desenvolver metodologia para a seleção de plantas que contenham o gene *csr1-2*, que confere tolerância aos herbicidas do grupo das *imidazolinonas*, em condições de inverno e em casa-de-vegetação, sem prejudicar a produção de sementes;

3 - investigar a possibilidade de seleção de gametas contendo o gene *csr1-2* produzidos a partir de plantas F_1 *hemizigotas*.

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1 Danos e Controle das Espécies Daninhas

Plantas daninhas são conceituadas como toda planta indesejada que se encontra presente em uma cultura de interesse e competem por luz, umidade e nutriente. As plantas daninhas instalam-se nas lavouras, crescem e se reproduzem juntamente com as plantas de interesse. Elas apresentam determinada resistência a fatores abióticos como: seca, umidade e baixa temperatura, além de possuir grande vigor vegetativo e reprodutivo (SAAD, 1981).

Dependendo da espécie da planta daninha, a produtividade pode ser reduzida em até 90% (BLANCO, 1973). Silva et al. (2008) avaliaram em soja o número de vagens por planta em três níveis de infestação de plantas daninhas (baixa, média e alta), observaram perdas de produtividade em 58%, 71% e 78%, respectivamente. Merotto Jr. et al. (2002) verificaram redução significativa de altura de planta e massa seca da soja, quando as plantas daninhas se encontravam presentes na área experimental.

Para Voll et al. (2002), a perda de produtividade causada pela competição de plantas daninhas pode variar de 2% a 39% na cultura da soja. As diversas espécies daninhas podem apresentar capacidade diferente de competição com a cultura. Estes autores analisando quatro espécies: capim-marmelada, corda-de-viola, amendoim-bravo e fedegoso, observaram uma redução de produtividade de: 14%; 22%; 35% e 39%, respectivamente, na presença de 10 plantas daninhas por m².

Estas perdas podem ser minimizadas através de alguns manejos, tais como: mecânicos, biológicos e químicos. Saad (1981) relata que a maior eficiência é encontrada com o manejo químico, onde se utiliza herbicidas para controlar as plantas daninhas. Segundo Warren (1967), quando a prática mecânica não é possível de ser utilizada em épocas chuvosas, o herbicida pode ser a única opção de controle, além de diminuir danos às raízes causados pelo arranque manual ou com enxada. Segundo EMBRAPA (2007), o manejo mais utilizado na cultura da soja é o químico. Nele há uma economia de mão de obra e maior rapidez no controle.

Dentro do controle químico, uma alternativa é a utilização das cultivares transgênicas tolerantes aos herbicidas não seletivos, e através desta tecnologia, é possível o controle com maior facilidade.

1.1.2 Soja Transgênica Tolerante aos Herbicidas

No melhoramento genético, a obtenção de plantas tolerantes aos herbicidas pode ser realizada de duas maneiras: por meio de cruzamentos tradicionais ou por técnicas de biotecnologia. Na primeira situação, normalmente, buscam-se populações selvagens ou não domesticadas para compor os cruzamentos. Já na segunda situação, podem-se utilizar técnicas de transformação de plantas, mutagenicidade de sementes, meio de cultura de células e tecidos ou fusão de protoplasto (ALMEIDA; ULBRICH, 1999).

A primeira soja transgênica liberada para plantio comercial tem como característica a tolerância ao herbicida *glyphosate*. Padgett et al. (1995) inseriram um gene oriundo de *Agrobacterium*, denominado CP4-EPSPS, e formaram a linhagem 40-3-2. Esta linha foi cruzada com 17 cultivares não transgênicos e foi observada na geração F₂ uma segregação constante de três plantas tolerantes para uma planta suscetível. Além disso, foi

possível identificar, por meio de análises moleculares, que esta linhagem carrega cópia única do gene.

Com esta mesma linhagem (40-3-2), Delannay et al. (1995) testaram a produtividade das plantas quando tratadas com *glyphosate*. No ano de 1992 a linhagem foi testada em 17 locais, no ano de 1993 em 23 locais e em 1994, um total de 18 locais, mas em nenhum momento observou-se redução da produtividade.

Em 1996, a Embrapa-Soja recebeu um genótipo do evento transgênico GTS 40-3-2 da Monsanto, posteriormente denominada STG BR-16. Com esta progênie, por meio de cruzamentos e retrocruzamentos, foi possível obter linhagens tolerantes ao *glyphosate* e adaptadas às condições brasileiras. Estes genótipos encontram-se hoje em fase bastante avançada, com diversas cultivares indicadas para as várias regiões sojícolas (ARIAS, 2001).

Estudos comparativos com diferentes ciclos de maturação entre soja convencional e transgênica também foram realizados no estado do Paraná, e verificaram comportamento semelhante de produtividade entre os dois grupos de genótipos avaliados (LIMA et al., 2008).

Um outro evento transgênico desenvolvido, e que confere tolerância ao herbicida do grupo químico das *imidazolinonas*, é a soja que contém o gene *csrl-2* mutante.

Para o desenvolvimento deste genótipo, foi realizada uma parceria entre a Basf, empresa detentora do gene, com a Embrapa, e ficou estabelecido que, a primeira forneceria o gene, enquanto que a segunda seria responsável por fixá-lo nas plantas de soja. No ano de 1999, em Brasília, iniciou-se o processo de transformação e, em 2001, já havia o primeiro evento-elite utilizando uma técnica nacional (ERNESTO, 2007).

Na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Aragão et al. (2000) bombardearam micropartículas do gene mutante na região do meristema apical da soja, e obtiveram plantas com uma única cópia do gene *csrl-2*, porém com níveis de resistência diferente e concluíram que, provavelmente, isso ocorra como resultado do ponto de inserção do gene dentro do genoma. Esta inserção pode ocorrer em regiões de alta ou baixa expressividade do DNA. Em outro experimento, estes mesmos autores realizaram em nível de campo, a aplicação de *imazapyr* sobre 28 linhagens transgênicas e observaram desde plantas sem nenhum sintoma de fitotoxicidade até plantas mortas. Plantas de soja contendo o transgene e pulverizada com *imazapyr* podem apresentar escurecimento de nervuras, porém após 10 dias, estas podem se recuperar e voltar a se desenvolver normalmente.

1.1.3 Ação dos Herbicidas

Segundo Roman et al. (2007), as moléculas de herbicidas para entrar na célula enfrentam três principais estruturas: a cutícula, parede celular e membrana plasmática. Dentro das células os herbicidas ligam-se aos chamados “sítios de ação”, que são locais específicos de ligação e inibem algumas funções vitais da planta. Porém, cada herbicida pode ter uma atuação diferente dentro da planta, que chamam de mecanismos de ação, entre eles: inibidores de aminoácidos de cadeia cíclica e ramificada.

1.1.3.1 *Glyphosate* – inibidores de EPSPS

O *glyphosate*, cujo nome químico N-(phosphonomethyl) glycine, é formulado como um sal, solúvel em água, porém não em solventes orgânicos, não é volátil, e no solo é muito adsorvido às partículas de argila. O *glyphosate* funde a 200 °C e apresenta uma densidade aparente de 0,5 g/cm³. Em temperaturas elevadas, como a 60 °C, por exemplo, possui grande estabilidade. O *glyphosate* é o herbicida mais utilizado no mundo. Isso se dá pelas propriedades de amplo espectro, ou seja, não-seletivo, sistêmico e pouco tóxico aos animais (AMARANTE JUNIOR; SANTOS, 2002). A molécula de *glyphosate* foi descoberta no ano de 1950 e desenvolvida por cientistas da Monsanto Company, com propriedade herbicida no início da década de 70. Após 30 anos, em mais de 119 países, já existiam 150 marcas desta molécula sendo comercializada. No Brasil, há aproximadamente 18 empresas nacionais e multinacionais que disponibilizam o produto (GALLI; MONTEZUMA, 2005).

Nas plantas, este herbicida inibe uma enzima denominada 5-enolpiruvato-shikimato-3-fosfato sintetase (EPSPS). Esta enzima pertence a uma rota metabólica onde sintetiza os aminoácidos cíclicos, ou aromáticos: fenilalanina, tirosina e triptofano. Como este herbicida altera o balanço de carbono nas plantas, ele é capaz de reduzir o seu próprio movimento no floema, reduzindo a formação de açúcares, consequentemente, reduz o fluxo no floema, ou seja, se os açúcares não estão sendo produzidos e transportados, o transporte no floema é diminuído, logo o herbicida não transloca na planta, ficando concentrado nas folhas (ROMAN et al., 2007).

Além dos aminoácidos, esta rota metabólica é precursora de compostos como vitaminas, hormônios, alcalóides, lignina, entre outros. Calcula-se que 20% do carbono fixado pela fotossíntese são oriundos desta rota metabólica e 35% de toda a massa seca do vegetal é representada por derivados da via shikimato (VIDAL; MEROTTO JUNIOR, 2001).

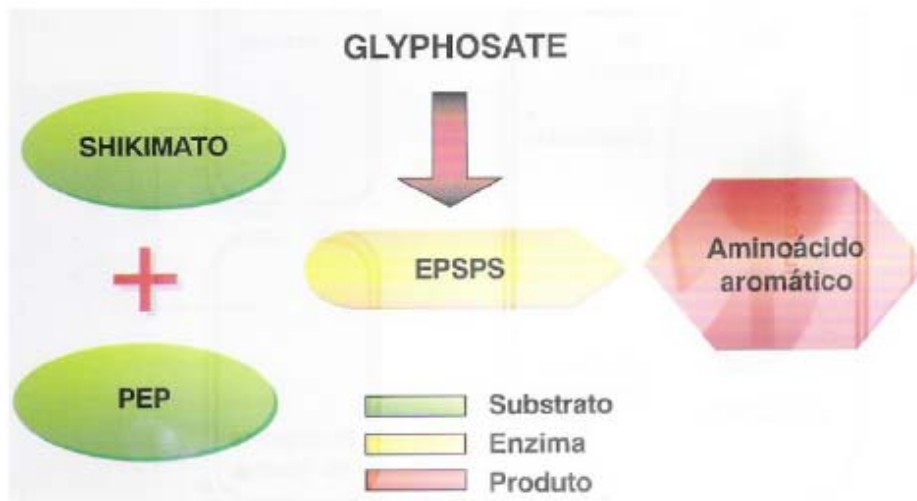


Figura 1 – O *glyphosate* inibe a EPSPS, uma enzima chave na biossíntese de aminoácidos aromáticos. **Fonte:** Roman et al. (2007)

Estudos realizados com *microarrays* mostraram que, em plantas convencionais quando tratadas com *glyphosate*, estas possuíam diferentes níveis de transcrição. Após 1, 4 e 24 horas da aplicação, 3, 170 e 311 genes, respectivamente, foram identificados sendo expressos. Já em plantas tolerantes ao *glyphosate*, neste mesmo período após a aplicação, os autores encontraram menor quantidade de genes, um total de dez, quatro e quatro genes, respectivamente, verificando assim o efeito secundário do *glyphosate* dentro da planta (ZHU et al., 2008).

1.1.3.2 Imazapyr – inibidores de ALS

O grupo de herbicidas das *imidazolinonas*, ao qual pertence o ingrediente ativo *imazapyr*, é conhecido por inibir a enzima acetolactato sintase (ALS), também

denominada acetohidroxiacetato sintase (AHAS). Esta enzima faz parte do mecanismo de síntese dos aminoácidos de cadeia ramificada, valina, leucina e isoleucina (VIDAL; MEROTTO JUNIOR, 2001).

Esta enzima participa da rota de síntese de duas reações: a condensação de duas moléculas de piruvato gerando uma molécula de acetolactato e/ou a condensação de uma molécula de piruvato com uma de acetobutirato para formar acetohidroxiacetato (Figura 2). Essa dupla ação resultou em dois nomes para a mesma enzima, a ALS (acetolactato sintase) e AHAS (acetohidroxi ácido sintase). Estes herbicidas ligam-se à enzima e, além de reduzirem a quantidade de aminoácidos de cadeia lateral, inibem a divisão celular e, assim como nos inibidores de EPSPS, diminuem a translocação de assimilados no floema (ROMAN et al., 2007).

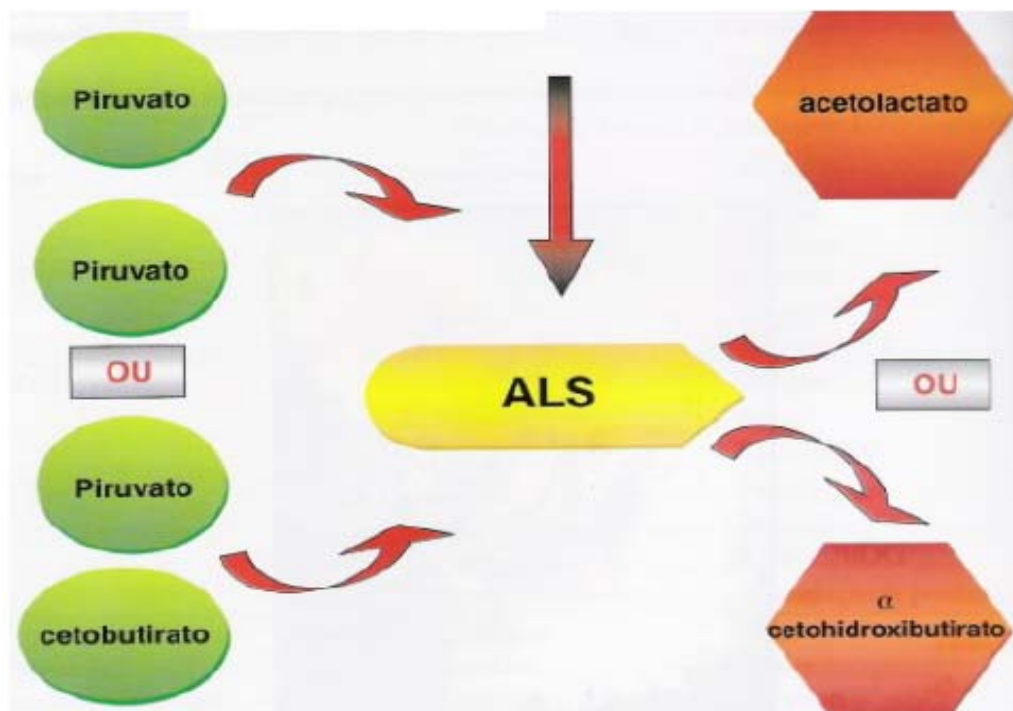


Figura 2 – Herbicidas inibidores da acetolactato sintase (ALS).

Fonte: Roman et al. (2007).

1.1.4 Plantas Tolerantes aos Herbicidas

Plantas daninhas tolerantes são aquelas que sobrevivem e geram descendentes mesmo após a aplicação de herbicida. Esta tolerância está correlacionada com a variabilidade genética da espécie, enquanto que a resistência é dada como a habilidade de uma planta sobreviver e reproduzir após tratada com uma dose de herbicida capaz de matar uma planta do tipo selvagem. Atualmente existem 336 biótipos resistentes a diferentes grupos de herbicidas (HEAP, 2009).

Para Kissmann (1995), a resistência aos herbicidas ocorre pela seleção de um biótipo já existente dentro da população natural de plantas. A maior ou menor quantidade de plantas resistentes dentro de uma população está relacionada com a frequência com que os genes de resistência se encontram. A utilização sequencial de herbicida com o mesmo mecanismo de ação pode causar pressão de seleção, fazendo com que os indivíduos tolerantes sejam rapidamente predominantes em uma população. Burnside (1992), Sammons et al. (2007) e Lazaroto et al. (2008) citam que o uso inadequado de herbicida é um dos principais responsáveis pela seleção de indivíduos resistentes dentro da espécie.

Há relatos na literatura de que, plantas tolerantes aos herbicidas inibidores da enzima ALS se expressam com maior facilidade quando comparado a outros grupos de herbicidas. Dados da Weed Science mostraram que, no Brasil, 21 espécies já apresentam resistência a diversos herbicidas. Deste total, nove espécies são resistentes aos inibidores de ALS e cinco aos inibidores de EPSPS. Nos Estados Unidos, o país que possui o maior número de espécies resistentes no mundo (126), são encontradas 40 diferentes plantas com resistência aos inibidores de ALS e nove aos inibidores de EPSPS (HEAP, 2009).

A causa para este elevado número de plantas resistentes aos inibidores de ALS é devida à sua ampla e repetida utilização para o controle de plantas daninhas. Além disso, o herbicida possui elevada atividade residual do solo e apresentar alta atividade sobre biótipos sensíveis às taxas utilizadas (TRANEL; WRIGHT, 2002).

Beckie e Reboud (2009) avaliaram durante quatro anos plantas daninhas tratadas com inibidores de ALS, misturas de formulações com diferentes mecanismos de ação e áreas com rotação de herbicidas. Estes autores observaram que, as aplicações repetidas de herbicidas com o mesmo mecanismo de ação podem levar rapidamente ao desenvolvimento de plantas resistentes, e que para tentar reduzir a evolução de plantas resistentes, as misturas de

herbicidas com mecanismo de ação diferente é mais eficiente do que a rotação anual desses herbicidas.

Outro estudo realizado com inibidores de ALS foi realizado por Volenberg et al. (2001) para verificar a herança da resistência de uma planta daninha. A geração F₁ foi obtida pelo cruzamento entre indivíduos tolerantes e suscetíveis e foi observado na geração F₂, após o tratamento com imazethapyr, uma segregação mendeliana de 1:2:1, sendo estes três fenótipos de plantas: tolerantes, intermediárias e suscetíveis, respectivamente, indicando que esta característica de resistência pode estar associada a um gene nuclear com dominância incompleta. Almeida e Ulbrich (1999) relatam que, para situações de dominância completa, o grupo das *imidazolinonas*, indivíduos com genótipos homocigotos apresentam uma maior tolerância quando comparado aos indivíduos em heterocigose.

1.1.5 Alterações Florais Devido ao Herbicida

A estrutura reprodutiva da flor de soja é composta por um androceu que contém 10 estames coletivos, sendo nove fundidos e mais elevados, e um estame permanece isolado. A parte feminina da flor é composta por um pistilo simples, unicarpelado, e o número de óvulos presentes podem variar de um a quatro.

O desenvolvimento de flores e a época em que ocorrerá a floração serão influenciados por diversos fatores ambientais, como por exemplo, o comprimento do dia, ou a temperatura do ar. O período de floração em uma planta de soja pode durar em média três a cinco semanas. Estas plantas desenvolvem muito mais flores do que a quantidade de vagens que será formada, e as flores que não se desenvolverão em vagens, serão abortadas, podendo variar entre 20% a 80% em uma única planta (BOERMA; SPECHT, 2004).

As aplicações de *glyphosate* sobre plantas transgênicas que estão em desenvolvimento reprodutivo podem provocar modificações em sua estrutura. Pline et al. (2001) verificaram que em algodão tolerante a herbicida, os capítulos e os botões florais podem acumular concentrações superiores de *glyphosate* quando comparado a outros tecidos, sendo observado nas raízes o acúmulo de *glyphosate* 5,7 vezes menor do que nos botões florais.

Ye et al. (2001) ao trabalharem com plantas de tabaco que apresentavam resistência ao *glyphosate*, analisando os tecidos dos órgãos vegetativos e dos órgãos

reprodutivos, observaram que o nível de tolerância aumenta conforme o aumento da quantidade de proteína CP4 presente na estrutura. Em uma mesma linhagem, a tolerância nos tecidos reprodutivos foi consistentemente menor do que em tecidos vegetativos, 50 vezes menor em ambos os ovários e anteras imaturas, e 10 vezes menor em pétalas de flores, quando comparado aos tecidos das folhas maduras.

Outro estudo comparando aplicações de *glyphosate* em genótipos de algodão que apresentavam tolerância e suscetibilidade ao herbicida, mostrou que as aplicações realizadas antes da floração inibiram o alongamento dos filamentos de estames, fazendo com que aumentasse em média 4,9 e 5,7 mm a distância entre as anteras e o estigma, quando comparado aos tratamentos que não receberam o herbicida. Outra alteração morfológica observada foi a presença de grandes vacúolos, numerosos grãos de amido e bolsos de retículo endoplasmático que continham poucos ribossomos no pólen. A aplicação do *glyphosate* resultou em desenvolvimento de gametas macho-estéreis depositados sobre o estigma (PLINE et al., 2002).

1.1.6 Efeitos do Uso de Herbicida em Programas de Melhoramento Genético em Soja

Nos programas de melhoramento do Brasil, as sementes híbridas F₁ são cultivadas normalmente em casa-de-vegetação, entre os meses de maio e agosto, sob baixas temperaturas e fotoperíodo curto, o que pode afetar o desenvolvimento fenológico da soja e reduzir a produção de sementes. Segundo Motta (2000) e Borém (1999), em condições de campo, a antecipação ou o retardamento das sementeiras, causam diminuições significativas na produtividade e na estatura das plantas em resposta ao fotoperíodo e à temperatura. Plantas F₁ derivadas de cruzamentos para a introdução do gene CP4-EPSPS ou o gene *csr1-2*, que confere tolerância ao *glyphosate* e ao *imazapyr*, respectivamente, tem sido cultivadas sob essas condições em casa-de-vegetação.

Neves et al. (1998) verificaram que, a aplicação de *imazapyr* a 25 e 50 g ha⁻¹ no início da formação da vagem de soja, reduz a germinação das progênies por ela formada, além de diminuir o comprimento do hipocótilo e da raiz das plântulas da geração F₂. Estes mesmos efeitos não foram verificados quando o herbicida foi aplicado no período de florescimento (estádio R1).

Estudos realizados por Walker et al. (2006) mostram que é possível selecionar gametas contendo o gene CP4-EPSPS a partir da aplicação do herbicida *glyphosate* sobre as plantas *hemizigotas*, antes da floração, aumentando a proporção de plantas tolerantes na geração F₂. Essa seleção é desejável tanto para a produção da geração F₂ como para a realização de retrocruzamentos, quando o objetivo for introgridir os transgenes. A aplicação de herbicidas em soja na condição de inverno pode agravar o estresse sobre as plantas F₁ e prejudicar ainda mais a produção de sementes, objetivo principal do melhoramento.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J. C. V de; ULBRICH, A. V. Melhoramento genético de plantas. In: DESTRO, D. E MONTALVÁN, R. (ed) **Resistência aos herbicidas**. Londrina: UEL, 1999. 820p.
- AMARANTE JUNIOR, O. P. DE; SANTOS, T. C. R. DOS. GLIFOSATO: Propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, v.25, n.4, p.589-593, 2002.
- ARAGÃO, F. J. L.; SAROKIN, L.; VIANNA, G. R.; RECH, E. L. Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] plants at a high frequency. **Theoretical and Applied Genetics**, v.101, p.1-6, 2000.
- ARIAS, C. A. A. Soja transgênica: experiências de pesquisa e produção. In: IV Latin-American Meeting on Plant Biotechnology, 2001, Goiânia. IV Latin-American Meeting on Plant Biotechnology - Programa e Resumos. Goiânia, p. 49-50, 2001.
- BECKIE, H. J.; REBOUD, X. Selecting for weed resistance: Herbicide rotation and mixture. **Weed Technology**, v.23, 2009.
- BLANCO, H. G.; OLIVEIRA, D. A.; ARAÚJO, J. B. M.; GRASSI, N. Observação sobre o período em que as plantas daninhas competem com a soja (*Glycine max* (L.) Merr). **O biológico**, São Paulo, v.39, n.2, 1973.
- BOERMA, H. R. e SPECHT, J. E. **Soybeans: Improvement, production and uses**. Madison, Wisconsin, USA, 2004.
- BORÉM, A. Escape gênico - Os riscos do escape gênico da soja no Brasil. **Biociência & Desenvolvimento** - Encarte Especial, 1999.
- BURNSIDE, O. C. Rationale for developing herbicide-resistant crops. **Weed technology**. v.6, n.3, p.621-625, 1992.
- DELANNAY, X. et al. Yield Evaluation of a *Glyphosate*-Tolerant **Soybean** Line after Treatment with *Glyphosate*. **Crop Science** v.35, p.1461-1467, 1995.
- EMBRAPA 2007. **Tecnologias de produção de soja**: Paraná – 2007. Londrina: Embrapa Soja, 2006. 217p.

ERNESTO, P. Soja transgênica brasileira representa avanço para o setor agrícola. Disponível em: <www.jornalcomunicacao.ufpr.br>. Acesso em: 15 de novembro de 2009.

GALLI, A. J. B.; MONTEZUMA, M. C. **Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura**. Editora ACADCOM Gráfica e Editora Ltda, 2005.

HEAP, I. M. 2009. International Survey of Herbicide Resistent Weeds online. Weed science society of America. Disponível em <<http://www.weedscience.org/in.asp>> Acesso em 25 de agosto de 2009.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2004. Disponível em:<www.ibge.gov.br> Acesso em: 14 de agosto 2009.

KISSMANN, K. G. **Resistência de plantas a herbicidas**. BASF, 1995.

LAZAROTO, C. A.; FLECK, N. G.; VIDAL, R. A. Biologia e ecofisiologia de buva (*Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.3, p.852-860, mai-jun, 2008.

LIMA, W. F.; PÍPOLO, A. E.; MOREIRA, J. U. V.; CARVALHO, C. G. P. de; PRETE, C. E. C.; ARIAS, C. A. A.; OLIVEIRA, M. F. de; SOUZA, G. E. de; TOLEDO, J. F. F. de. Interação genótipo-ambiente de soja convencional e transgênica resistente a glifosato, no Estado do Paraná. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.43, n.6, p.729-736, jun. 2008.

MEROTTO Jr., A.; VIDAL, R. A.; FLECK, N. G. e ALMEIDA, M. L. Interferência das plantas daninhas sobre o desenvolvimento inicial de plantas daninhas de soja e arroz através da qualidade da luz. **Planta daninha**, Viçosa-MG, v.20, n.1, p.9-16, 2002.

MOTTA, I. de S.; BRACCINI, A. de L. E.; SCAPIM, C. A.; GONÇALVES, A. C. A.; BRACCINI, M. do C. L. Características agrônômicas e componentes da produção de sementes de soja em diferentes épocas de semeadura. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 22, n. 2, p.153-162, 2000.

NETO, M. E.; PITELLI, R. A.; BRASILE E, A.G. e TIMOSSO, P. C. Seletividade de herbicidas pós-emergentes aplicados a soja geneticamente modificada. **Planta Daninha**, Viçosa – MG, v.27, n.2, p.345-352, 2009.

NEVES R.; FLECK, N. G.; SILVEIRA, C. A. DA; COSTA, E. L. N. Ação de herbicidas sistêmicos não-seletivos sobre a progênie de soja quando aplicados durante a fase reprodutiva das plantas-mãe. **Ciência Rural**. v.28, n.3, Santa Maria,1998.

PADGETTE, S. R.; KOLACZ, K. H.; DELANNAY, X.; RE, D. B.; LAVALLEE, B. J.; TINIUS, C. N.; RHODES, W. K.; OTERO, Y. I.; BARRY, G. F.; EICHHOLTZ, D. A.; PESCHKE, V. M.; NIDA, D. L.; TAYLOR, N. B. E.; KISHORE, G. M. Development, Identification, and Characterization of a *Glyphosate*-Tolerant Soybean Line. **Crop Science** v.35 p.1451-1461, 1995.

PLINE, W. A.; PRICE, A. J.; WILCUT, J. W.; EDMISTEN, K. L.; WELLS, R. Absorption and translocation of *glyphosate* in *glyphosate*-resistant cotton as influenced by application method and growth stage. **Weed Science**, v.49, p. 460–467, 2001.

PLINE, W. A.; VIATOR, R.; WILCUT, J. W.; EDMISTEN, K. L.; THOMAS, J.; WELLS, R. Reproductive abnormalities in *glyphosate*-resistant cotton caused by lower CP4-EPSPS levels in the male reproductive tissue **Weed Science**, v. 50, p.438–447, 2002.

ROMAN, E. S.; BECKIE, H.; VARGAS, L.; HALL, L.; RIZZARDI, M. A.; WOLF, T. M. **Como funcionam os herbicidas: da biologia à aplicação**. Passo Fundo (RS): Berthier, 2007. 160p.

SAAD, O. **A vez dos herbicidas**. 2 ed. São Paulo, Nobel, 1981.

SAMMONS, R. D.; HEERING, D. C.; DINICOLA, N.; GLICK, H.; ELMORE, G.A. Sustainability and stewardship of *glyphosate* and *glyphosate*-resistant crops. **Weed Technology**, v.21, 2007.

SILVA, A. F.; FERREIRA, E. A.; CONCENÇO, G., FERREIRA, F. A.; ASPIAZU, I.; GALON, L.; SEDIYAMA, T.; SILVA, A. A. Densidades de plantas daninhas e épocas de controle sobre os componentes de produção da soja. **Planta daninha**, v.26, n.1, Viçosa, jan./mar. 2008.

TRANEL, P. J.; WRIGHT, T. R. Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? **Weed Science**, v.50, 2002.

VIDAL, R. A.; MEROTTO JUNIOR, A. **Herbicidologia**. Porto Alegre: Edição dos Autores, 2001.

VOLENBERG, D. S.; STOLTENBERG, D. E.; BOERBOOM, C. M. Biochemical mechanism and inheritance of cross-resistance to acetolactate synthase inhibitors in giant foxtail. **Weed Science**, v.49, 2001.

VOLL, E. et al. Competição relativa de espécies de plantas daninhas com dois cultivares de soja. **Planta Daninha**, v.20, n.1, p. 17-24, 2002.

WALKER, D. R.; et al. Gametic selection by *glyphosate* in soybean plants hemizygous for the CP4 EPSPS transgene. **Crop Science**, v.46, p.30 - 35, 2006.

WARREN, G. F. **Curso intensivo de herbicidas**. Viçosa: Universidade Rural do Estado de Minas Gerais, 1967. 89p.

YE, G. N.; HAJDUKIEWICZ, P. T. J.; BROYLES, D.; RODRIGUEZ, D.; XU, C.W.; NEHRA, N.; STAUB, J. M. Plastid-expressed 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase genes provide high level *glyphosate* tolerance in tobacco. **Plant Journal**, v.25, n.3, p.261-270, 2001.

ZHU, J.; PATZOLDT, W. L.; SHEALY, R. T.; VODKIN, L. O.; CLOUGH, S. J.; TRANEL, P. J. Transcriptome Response to Glyphosate in Sensitive and Resistant Soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.6355–6363, 2008.

**2 METHODOLOGY TO INCREASE THE RATIO OF SOYBEAN TOLERANT TO
GLYPHOSATE IN F₂ GENERATION**

Trabalho a ser submetido à revista científica internacional:

Euphytica

Fator de Impacto: 1.403

Universidade de Wageningen

Springer Netherlands.

METHODOLOGY TO INCREASE THE RATIO OF SOYBEAN TOLERANT TO *GLYPHOSATE* IN F₂ GENERATION

Abstract

This study aimed to develop a method for selecting gametes with CP4-EPSPS gene, which confer tolerance to the herbicide *glyphosate*, from F₁ hemizygous plants growing under winter conditions in the greenhouse, without significantly affect the seed production. The hybrids obtained by crosses between *glyphosate* tolerant and conventional cultivars were submitted to the following treatments: T1-control without application of *glyphosate*, T2-0.96 kg a.i. ha⁻¹ at V3 stage of development, T3-1.92 kg a.i. ha⁻¹ at V3 stage, T4-0.96 kg a.i. ha⁻¹ at V5 stage and T5-1.92 kg a.i. ha⁻¹ at V5 stage. The F₁ plants were evaluated for a range of traits according to a completely randomized design with five replications in two factorial arrangements: treatment x plant position (upper and lower) and herbicide dose x spraying stage. Higher doses of herbicide applied next to the flowering reduced significantly the number of pods and seeds in both positions of plants. In all treatments (T2 to T5), the *glyphosate* applied before flowering on F₁ generation plants promoted the selection of CP4-EPSPS gametes. The treatment T3 is the best option for breeding purposes by allowing the efficient selection of CP4-EPSPS gametes and also the seed production in F₁ plants.

Keywords: Glycine max. CP4-EPSPS. Tolerance herbicide. Gametic selection.

2.1 INTRODUCTION

The Brazil is one of the 25 countries in the world where the cultivation of soybean comprises conventional and transgenic cultivars. Results from the International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA) showed that Brazil has the third largest global transgenic area, with 15.8 million hectares, trailing only the United States and Argentina. Among the transgenic crops in the world, the soybean occupies the largest area with 65.8 million hectares, representing 53% of the total, and the event 40-3-2 tolerant to *glyphosate* already got the approvals in most countries (James, 2008).

The GM soybean tolerant to *glyphosate* was obtained by inserting a gene from the bacterial called CP4-EPSPS. The line, 40-3-2, have a cassette inserted into the plant with a 35S promoter, obtained from the cauliflower mosaic virus, a peptide from hybrida *Petunia* chloroplast, the CP4-EPSPS gene, coming from a strain of *Agrobacterium* sp. and a fraction of nopaline synthase (NOS 3'), which comprises the region of the terminator, but is not translated (Padgett et al., 1995).

The *glyphosate* kills plants by inhibits the activity of 5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase (EPSPS). This enzyme is part of a route that produces the aromatic amino acids: phenylalanine, tyrosine and tryptophan. The EPSPS enzyme is inhibited because it competes before with a substrate, the phosphoenolpyruvate (PEP), where in the presence of *glyphosate* in connect with these, impedes the transformation of shikimate in chorismate. The phytotoxicity isn't given by the absence of three amino acids, but occurs because deregulate the carbon cycle in the plants, and the accumulation shikimate, a toxic compound, in intermediate metabolic pathway (Roman et al., 2007).

The transfer these tolerant genes for the other conventional cultivars is given through breeding conventional cross. At the beginning of breeding programs with genetically modified (GM) soybean in Brazil, just after the crosses, the F₁ seeds are usually cultivated in the greenhouse under winter conditions during the months May to August, at low temperature and short photoperiod, which can affect the soybean phenological development and reduce seed production. Crosses between these GM with conventional cultivars produce F_{1s} hemizygous plants which are expected to produce about 50% of gametes containing the gene of interest in the next generation. Thus, in backcross programs for introgression of these genes, it is expected that only 50% of the F₁RC₁ generation plants would have the gene of interest and showing desired tolerance. The other 50% no tolerant soybean plants would be lost, meaning that all the work evolving crossings, notations, harvest, planting and assessment of these F_{1s} would be discarded. Also in the F₂ generation derived from F₁ hemizygous plants, is expected a three tolerant to one non-tolerant segregation ratio, without the selection and considering the same gametic viability with and without the inserted gene.

The gamete selection already on the F₁ generation through the application of *glyphosate* before flowering, increases the ratio of tolerant plants in the F₂ generation (Walker et al., 2006), and opens the possibility of increase the efficiency of breeding programs in these activities of backcross and seed production in F₁ plants, usually realized in greenhouse and in off-season conditions.

This study aimed to develop a method for selecting gametes with CP4-EPSPS gene, which confer tolerance to the herbicide *glyphosate*, from F₁ hemizygous plants growing under winter conditions in the greenhouse, without significantly affect the seed production.

2.2 MATERIALS AND METHODS

Description of experimental material

The progenies that constituted this experiment were developed from crosses between the conventional cultivar BRS 133 (Embrapa Soybean) and three different transgenic varieties with tolerance to *glyphosate*: BRS Valiosa RR, BRS 245 RR and BRS 255 RR.

Were chosen three different varieties to make up this experiment in order to obtain an average single, thereby diluting the possible of a single genotype effects.

The obtaining of F₁ hemizygous plants were made on March 2008. In these crosses, the BRS 133 cultivar was always used as a mother plant and consequently the gene CP4-EPSPS can be used as marker in the F₁ generation. This cultivar is adapted and largely used by brazilian farmers and has recessive alleles for flower color white, which also can be used as a morphological marker when the other parental has purple flowers.

The F₁ generations were harvested on June 2008, and the seeds were immediately induced to germinate under temperature around 25°C and controlled relative humidity. Two days after, the seedlings were transplanted in pots, according a randomized completely design with five replications, and the randomization executed after application of the herbicide.

The plants were developed at a greenhouse with minimum and maximum temperatures between 15° and 28°C, respectively, the fertilization and plant management were done according with the technical recommendations for soybeans.

Hybrids received the following treatments: Treatment 1-no application of *glyphosate*; Treatment 2-0.96 kg a.i. ha⁻¹ at V3 stage; Treatment 3-1.92 kg a.i. ha⁻¹ at V3 stage; Treatment 4- 0.96 kg a.i. ha⁻¹ at V5 stage and Treatment 5- 1.92 kg a.i. ha⁻¹ at V5 stage.

The plants were treated with the Roundup Original herbicide, using a formulated of soluble concentration of 480 g / L (360g / L acid equivalent) of isopropylamine salt of *glyphosate*. The applications were done using a costal sprayer with a constant pressure (40 lbf pol⁻²) maintained by carbon dioxide, coupled a bar with two nozzles spaced 50 cm, each one of them containing flat fan nozzles. The volume of spray was equivalent to 200 Lha⁻¹.

With the objective of verifying the efficiency of application and dosage, conventional susceptible plants were placed within the hemizygous plant population. After

maturation, the F₁ plants were divided into two regions, upper and lower, taking as basis for the division the number of nodes present in the main stem, whose pods and seeds were harvested separately.

The F₁ plants that receiving the T1 treatment and not had morphological markers (e.g. flower color), were submitted to molecular markers analyses (PCR) to assure that they are true hybrids. In other treatments, the CP4-EPSPS gene itself served as a marker and enabled that non-transgenic F₁ plants died after the herbicide application.

Evaluated character

The characteristics assessed in the F₁ generation were: Percentage of injury assessed at 14 days after application of the herbicide, that range from 0% to 100%, in which 0% (zero) corresponds to no symptoms and 100% of dead plants (INJ14); plant height in centimeters (cm), obtained at the flowering, time measured from the ground level until insertion of the last leaf (HPF); number of days between sowing and flowering, obtained by the complete opening of the first flower (DF); number of nodes present in the main stem of the plant in the period of flowering (NNO); number pods in the upper position of the plant (NPU); number of pods in the lower position of the plants (NPL); total number of pods in the plant (NP_T), number of seeds in the upper position of the plants (NS_U); number of seeds in the lower position of the plants (NS_L); total number of seeds in the plant (NS_T); number of seeds per pod (NSP); plant height in centimeters (cm), obtained at the maturation stage, the linear measurement from ground level until the last pod insertion (HPM) and days to maturity, number of days between sowing and harvesting dates (DM).

Conducting the experiment: Second Generation

In July, the F₂ plant generation, derived from F₁ plants with the different treatments were sown in plastic pots containing 8 L of substrate, containing in average 15 to 20 seeds. It was applied 1.92 kg ai ha⁻¹ *glyphosate* at the V2 stage. After two weeks, the number of live and dead plants was assessed and the segregation pattern was analyzed by chi-square (χ^2) test. At this stage of the test, the pots containing the F₂ generation were not randomized, once is expected very little environmental influence on plant survival.

Statistic and genetic analyses

Analysis of variance was applied for each trait assessed in the F₁ generation and the means were compared by Tukey's test at 5% of probability to verify the hybrid performance according the received treatment.

The analysis of variance was realized with fixed treatment effect, using the following mathematical model:

$$Y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}, \text{ where:}$$

Y_{ij} : observation of *i*-th treatment in the *j*-th repetition;

μ : overall mean of treatments in the experiment;

t_i : effect of *i*-th treatment *i*;

e_{ij} : experimental error associated with observation Y_{ij} .

To study two factors simultaneously were performed variance analysis in factorial arrangement: treatment x plant position (5x2) and herbicide dose x spraying stage (2x2).

The variance analyses in factorial arrangements were realized using the following mathematical model:

$$Y_{ijk} = m + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + e_{ijk}, \text{ where:}$$

Y_{ijk} : observation of treatment or herbicide dose *i*, plant position or spraying stage *j* in the repetition *k*;

μ : overall mean of the variable in the experiment;

α_i : effect of *i*-th treatment (*i*= 1,2, ..., 5) or *i*-th herbicide dose (*i*= 1,2);

β_j : effect of *j*-th plant position (*i*= 1,2) or *i*-th spraying stage (*i*= 1,2);

$(\alpha\beta)_{ij}$: effect of interaction between the *i*-th level of α (treatment or herbicide dose) and *j*-th level of β (plant position or spraying stage);

e_{ijk} : experimental error associated with observation Y_{ijk} .

The chi-square test (χ^2) was applied to accept or reject the segregation patterns of live and dead plants in the F₂ generation according to the Mendelian patterns.

2.3 RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 shows the resume of the variance analysis for the several characteristics in the F₁ generation. Similar CVs (%) were found by Kiihl and Arias (2008) for the characters NPt, NSt and NSP evaluated at greenhouse.

Highly significant effect was observed for treatment for almost all characteristics, except for plant height at flowering and number of nodes per plant (Table 1). Apparently, there was little time for herbicide action causing reductions on the number of nodes or plant height at flowering. The significance for treatment on the character HPM, which is taken only at the end of the cycle, also shows that this effect must be due to the shortening of the internodes.

Table 1 – Variance analysis with mean squares and significance level, estimates of means and coefficient of variation CV (%) in the F₁ generation after treated with *glyphosate* at different herbicide doses and spraying stage.

Characteristics	Mean Squares		Means	CV(%)
	Treatment*	Error*		
Injury 14 days after application	1128.2 **	23.206	12.3	39.21
Plant height at flowering	194.55 ns	112.97	48.7	21.83
Days to flowering	8.8469 **	2.2867	49.2	3.08
Number of nodes in plant	1.9600 ns	1.1940	11.6	9.43
Number of pods in the upper	405.52 **	17.148	11.8	35.06
Number of pods in the lower	788.92 **	148.32	39.5	30.87
Number of pods total	1961.0 **	185.04	51.3	26.54
Number of seeds in the upper	2532.7 **	95.768	23.4	41.78
Number of seeds in the lower	8818.0 **	783.99	79.4	35.26
Number of seeds total	19855 **	1080.9	102.8	31.97
Number of seed per pod	2.3811 **	0.0454	1.9	11.02
Plant height at maturity	841.95 **	220.32	66.3	22.40
Days to maturity	1358.7 **	33.750	114.2	5.09

ns and **: nonsignificant and significant at 1% probability, respectively. ♣ For the characteristics INJ 14 degrees of freedom of treatment and error equal to 3 and 52, respectively, for the rest of the characteristics, degrees of freedom of treatment and error equal to 4 and 75, respectively.

For analysis of INJ14 was considered only four treatments. Treatment 1 was excluded from this analysis because there was no application of herbicides, so there is no development of injury.

Plants that received the herbicide in V3 and with dosage less, in mean, had lower percentages of injuries, (3.6%) compared to V5 and with dosage larger (24.6%), evaluated in the same period after the application of *glyphosate* (Table 2). The observed injuries were related with shorter plant height, also wrinkle and chlorosis on leaves. Similar results were found by Krausz and Young (2001), where five different doses of *glyphosate* were applied at two growth stages of soybean (V4 and R1), these authors found that most of chlorosis in the leaves when *glyphosate* was applied at R1, and this fact has intensified as they ratcheted up the dosages. Reddy and Zablatowing (2003) performed applications of *glyphosate* in soybean using various formulations of the product in the field. Observed that certain formulations may cause injury to plants, but the soybeans have a potential to recover from the damage.

No treatment differs from the control for days of flowering. Similar means among treatments possibly occurred due to the relative proximity between the application date and the flowering date. Elmore et al. (2001), after application of *glyphosate*, found that flowering was not affected by the herbicide, but he cites another study, conducted by the author in 1997, when the flowering of soybean was delayed when treated with *glyphosate*. For DM, it was observed that the treatments T1, T2 and T3 did not differ significantly among themselves, and that T4 and T5 differed from other treatments. There was a mean delay of 9 and 21 days in the development of plants treated in V5 with the lowest and highest herbicide dose, respectively, when compared to plants that received the herbicide at V3.

Table 2 – General means for the treatments (TREA) to the percentage of injury 14 days after application (INJ14), plant height during the flowering period (HPF, cm), days to flowering (DF), number of nodes on main stem of the plant (NNO), number of pods in the upper (NPU), number of pods on the lower (NPL), total number of pods in the plant (NP_T), number of seeds in the upper (NS_U), number of seeds in the lower (NS_L), total number of seeds in the plant (NS_T), for seed per pod (NSP); plant height at maturity (HPM, cm) and days to maturity (DM) assessed in the F₁ generation after treated with *glyphosate* at different herbicide doses and spraying stage.

TREA	INJ14	HPF	DF	NNO	NP _U	NP _L	NP _T	NS _U	NS _L	NS _T	NSP	HPM	DM
1	-	46.8 a	49.0 ab	11.2 a	15.2 a	38.1 ab	53.3 a	33.3 a	89.3 ab	123a	2.3 a	66.2 ab	109.2 c
2	3.6 a	54.3 a	48.1 b	12.1 a	14.2 a	48.4 a	62.6 a	30.5 a	106.9a	137a	2.2 ab	75.7 a	107.5 c
3	8.3 ab	50.9 a	49.3 ab	11.7 a	14.9 a	41.4 a	56.4 a	29.1 a	83.4 ab	113ab	2.0 b	70.9 a	110.1 c
4	12.6 b	47.8 a	49.1 ab	11.6 a	9.0 b	42.3 a	51.3 a	12.4 b	69.6 b	82b	1.6 c	63.4 ab	116.8 b
5	24.6 c	45.1 a	50.4 a	11.6 a	3.3 c	28.0 b	31.3 b	4.7 b	40.9 c	46c	1.4 c	55.2 b	130.9 a
Dms	4.8	10.8	1.5	1.1	4.2	12.3	13.8	9.9	28.3	33.0	0.2	15.0	5.9

Means followed by the same letter in a column do not differ by Tukey's test, at 5% of probability. Treatments: T1 = no application of *glyphosate*, T2 = 0.96 kg a.i. ha⁻¹ at the V3 stage, T3 = 1.92 kg a.i. ha⁻¹ at the V3 stage, T4 = 0.96 kg a.i. ha⁻¹ at the V5 stage and T5 = 1.92 kg a.i. ha⁻¹ at the V5 stage.

Significant difference was observed for the trait HPM, but none of the treatments differed from the control. Studies by Elmore et al. (2001) and Correia and Durigan (2007), observed reduction in the plant height after *glyphosate* spraying.

In this test all the cultivars used to obtain the F₁ generation had determinate growth habit. An apparent growth after flowering was observed for all treatments. For T1, control without herbicide, the increase between flowering and maturity was 19.4 cm, while for T5, this increase was smaller, on average 10.1 cm. Heatherly and Smith (2004) analyzed patterns of the stem growth in soybean and found that same after the R1 development stage, some cultivars of the maturity group V were able to increase 3.7 nodes and had an average growth of 23 cm.

Regarding the traits NPU and NS_U, T2 and T3 did not differ from the control, while there was a considerable reduction of pods and seeds mainly in treatments T4 and T5. For NPL, T2, T3 and T4 differed only from T5, and for NS_L, T5 differed and reduced in 54.2% when compared to the control. Considering the whole plant, the treatment T5 reduced number of pods and the treatments T4 and T5 reduced the number of seeds when compared with the control. For NSP, the treatments T3, T4 and T5 differed from the T1 control, and in the treatments where the application occurred in V5, there was bigger reduction in the number of seeds per pod.

The variance analysis in factorial arrangement (2 herbicide doses x 2 spraying stage) summarized in the Table 3 did not include the treatment 1 or the control without herbicide.

Table 3 – Variance analysis in factorial arrangement (2x2) with the mean squares and significance levels, estimates of average and coefficient of variation CV (%) for treatment in the F₁ generation after treated with *glyphosate* at different herbicide doses and spraying stage.

Characteristics	Mean Squares				Means	CV(%)
	Doses	Stages	DosexStg	Error		
GL	1	1	1	52		
Injury 14 days after application	961.14 **	2237.8 **	185.79 **	23.206	12.3	39.2
Plant height at flowering	129.02 ns	522.16 *	2.1607 ns	90.320	49.52	19.19
Days to flowering	19.446 **	15.018 **	0.0179 ns	1.5288	49.23	2.51
Number of nodes in plant	0.4464 ns	0.8750 ns	0.4464 ns	0.8887	11.77	8.01
Number of pods in the upper	87.500 *	994.57 **	144.64 **	18.580	10.36	41.62
Number of pods in the lower	1575.2 **	1330.9 **	189.45 ns	135.99	40.02	29.14
Number of pods total	2405.2 **	4626.4 **	665.16 ns	180.47	50.38	26.67
Number of seeds in the upper	283.50 ns	6343.1 **	138.29 ns	94.371	19.18	50.65
Number of seeds in the lower	9542.2 **	22280 **	95.161 ns	659.77	75.16	34.17
Number of seeds total	13115 **	52399 **	462.88 ns	1005.4	94.34	33.61
Number of seeds per pod	0.5441 **	4.4805 **	0.0006 ns	0.0404	1.78	11.31
Plant height at maturity	598.02 ns	2730.0 **	39.446 ns	201.81	66.30	21.43
Days to maturity	977.79 **	3150.0 **	457.143 **	39.640	116.32	5.41

ns, * and **: nonsignificant, significant at 5% and 1% probability, respectively.

Significant differences between the highest and lowest dose of *glyphosate* were observed for almost every character except HPF, NNO, NS_U and HPM (Table 3 and 4).

The highest injury and greater cycle delay, observed through the traits DF and DM, occurred with the highest dose of *glyphosate*. Treatments with the lower doses of herbicide produced the highest number of pods and seeds per pod (Table 4). Some studies show that high doses of herbicide, and possibly greater phytotoxicity in the plants, can cause reduced productivity. Barros et al. (2005) working with different soybean cultivars and different pre-emergence herbicides (imazaquin, and sulfentrazone diclosulan) found that depending of the genotype and of the active product ingredient, are larger or smaller the reductions of productivity, and that the largest decreases are observed when used twice the recommended dose.

Checking the effect of spraying stage, it was observed that only NNO was not significantly affected (Table 3). Among the traits affected by spraying stage, those applications made next the planting developed lower injuries, shorter cycle and higher HPF and HPM. Number of pods, seeds and seeds per pod in the lower or upper region of the plant, were higher with the earlier application of the product. The interaction between herbicide doses x spraying

stage was significant for INJ14, NPU and DM, indicating that there is a relationship between the effects of two factors (Table 3). For these traits had interaction, all were of the simple type and for both the first and second spraying stage, the dose 2 increased the injury and delayed the harvesting of the F₁ plants (data not shown).

Table 4 – General means of herbicide doses and spraying stage for the characteristics of injuries 14 days after application (INJ14), plant height during the flowering period (HPF, cm), days to flowering (DF), number of nodes on main stem of the plant (NNO) , number of pods in the upper (NPU), number of pods on the lower (NPL), number of seeds in the upper (NS_U), number of seeds in the lower (NS_L), for seed per pod (NSP), height the plant at maturity (HPM cm) and days to maturity (DM) assessed in the F₁ generation after treated with *glyphosate* in different herbicide doses and spraying stage.

Herbicide											
Doses	INJ14	HPF	DF	NNO	NP _U	NP _L	NS _U	NS _L	NSP	HPM	DM
0.96	8.1 a	51 a	48.6 a	11.9 a	11.61a	45.32a	21.43a	88.21a	1.88 a	69.6 a	112.1a
1.92	16.4 b	48 a	49.8 b	11.7 a	9.12 b	34.7 b	16.93a	62.1 b	1.68 b	63.0 a	120.5b
Spraying											
Stage	INJ14	HPF	DF	NNO	NP _U	NP _L	NS _U	NS _L	NSP	HPM	DM
V3	6.0 a	52.6a	48.7 a	11.9 a	14.57a	44.89a	29.82a	95.12a	2.06 a	73.3 a	108.8a
V5	18.6 b	46.5b	49.7 b	11.6 a	6.14 b	35.14b	8.54 b	55.21b	1.49 b	59.3 b	123.8b
Dms	2.6	5.1	0.7	0.5	2.31	6.25	5.21	13.78	0.11	7.6	3.4

Means followed by the same letter in a column don't differ by Tukey's test, at 5% of probability.

The variance analyses in a factorial arrangement (5x2), which considered the relationship between the factor plant position (P), of pods and seeds in the plant with the treatments effects (T) are summarized in Table 5. For both Number of pods and seeds, there was significant effect for T, P and T x P interaction (Table 5). These results indicate that at least two treatment means differed, as well as the two positions (upper and lower) in the plant. The interaction T x P indicate that there was significant change in the relative position of means for treatments in the two positions of the plant. As a consequence of these interactions, the effect of treatment on these characters was evaluated independently for each plant position.

Table 5 – Mean squares and degrees of freedom (df) to: treatment, plant position, interaction treatment by plant position ($MS_{T \times P}$) and error, with their significance levels, estimates of average and coefficient of variation CV (%) for the characters: number of pods and number of seeds assessed in the F_1 generation after treated with *glyphosate*.

Mean Squares	df	Number of pods	Number of seeds
Mean squares to treatment	4	980.48 **	9927.4 **
Mean squares to plant position	1	30553 **	125328 **
Mean squares to interaction ($MS_{T \times P}$)	4	213.97 *	1423.4 *
Mean squares to error	150	82.735	439.88
Means		25.63	51.41
CV(%)		35.49	40.79

* and **: significant at 5% and 1% probability, respectively.

In Table 6, independent of position (upper and lower), the treatments T2 and T3 were not different from the control T1, indicating that the treatments when performed earlier, in higher or less dose, not had the number of pods and seeds affected.

Analyzing the upper region, for number of pods and number of seeds, the treatments T4 and T5 differed from the control T1. Considering the lower region, for the NP, none of the treatments differed from T1, while for NS, only T5 showed significant reduction on seed yielding. Thus, it was found that the bigger effects on the number of pods and seeds occurred in the upper half of the plant.

The genotypes always produced the highest number of pods and seeds, on average, in the lower half of the plants. These results are also observed in T1, so part of this difference is a consequence of the plant structure. Similar results were found by Kiihl and Arias (2008) with assessments in three different plant positions, and found that the number of pods and seeds are naturally less in upper region of the plants, and the proportion varies with the genotype and with the type of plant architecture.

Table 6 – General means of the treatments to the number of pods and number of seeds assessed in the F_1 generation after treated with *glyphosate*.

Treatment	Number of pods			Number of seeds		
	Upper	Lower	Mean	Upper	Lower	Mean
1	15.2 a	38.1 ab	26.7 a	33.3 a	89.3 ab	61.3 a
2	14.2 a	48.4 a	31.3 a	30.5 a	106.9 a	68.7 a
3	14.9 a	41.4 a	28.2 a	29.1 a	83.4 ab	56.3 a
4	9.0 b	42.3 a	25.6 a	12.4 b	69.6 b	41.0 b
5	3.3 c	28.0 b	15.6 b	4.7 b	40.9 c	22.8 c
DMS	4.2	12.3	6.4	9.9	28.3	14.8
Means	11.8 B	39.5 A		23.4 B	79.4 A	

Means followed by the same miniscule letter in the column and uppercase on the line, do not differ by Tukey's test at 5% probability. DMS between positions equal to 2.8 and 6.6 for number of pods and number of seeds, respectively.

The observed segregation ratio of live and dead plants in the F₂ generation derived from T1 (control), fitted a Mendelian segregation pattern of a single dominant gene (Table 7). Significant deviations for all remaining treatments with herbicide (T2 to T5), confirm that the application of *glyphosate* on the F₁ plants promoted the selection of gametes with the gene CP4-EPSPS. Walker et al. (2006) conducted similar studies with *glyphosate*-tolerant soybeans and found that the segregation proportion of the F₂ generation was dependent on the application held in F₁. Plants treated with *glyphosate* at 15 and three days before flowering, were lethal to the majority of the male and / or female gametes, causing an almost total elimination of the herbicide susceptible plants in the F₂ generation.

Table 7 – Valores of the χ^2 test the hypothesis of 3 Live Plants: 1 Dead Plant, assessed in the F₂ generation, calculating the probability with 1 degree of freedom.

Treatment	Plants Observed		Plants Expected		Total	$\chi^2_{(3:1)}$	Probability
	Live	Dead	Live	Dead			
T1	2199	702	2175.8	725.3	2901	0.9938 ns	0.3188
T2	1645	219	1398.0	466.0	1864	174.56 **	0.0001
T3	1479	55	1150.5	383.5	1534	375.18 **	0.0001
T4	1123	6	846.8	282.3	1129	360.50 **	0.0001
T5	597	5	451.5	150.5	602	187.55 **	0.0001

The observed ratio of dead plants in the F₂ generation derived from F₁ plants untreated (T1) was 24%, which decreased to 11.7% for T2, 3.6% for T3 and less than 1% for T4 and T5.

Combining the agronomic results and the segregation analysis, it was observed that T2 and T3 are sufficient to promote the selection of desirable gametes without, however, reduce NP and NS, when compared to the T1 control treatment. Between T2 and T3, the treatment T3 is more appropriate to the objectives of the breeding program, since it promotes a more stringent gamete selection containing the CP4-EPSPS gene in F₁ plant. Treatments T4 and T5 promote a more severe selection of desirable gametes but causing significant reduction in number of pods and number of seeds in relation to T1.

CONCLUSION

The selection of gametes containing the gene CP4-EPSPS in F₁ plants grown in winter conditions at greenhouse is efficient through of the application of 1.92 kg a.i. ha⁻¹ *glyphosate* at the V3 development stage of soybean without compromising the seeds production for future generations.

REFERENCES

- BARROS, A. C.; MONTEIRO, P. M. F. DE O.; FURTADO, X. C.; JÚNIOR, J. N.; GUERZONI, R.A. Tolerância de cultivares de soja aos herbicidas imazaquin, diclosulam e sulfentrazone, aplicados em solo de textura arenosa. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.4, n.1, 2005.
- CORREIA, N. M.; DURIGAN, J. C. Seletividade de diferentes herbicidas à base de *glyphosate* a soja RR. **Planta daninha**, Viçosa-MG, v.25, n.2, p.375-379, 2007.
- ELMORE, R. W. et al. *Glyphosate*-resistant soybean cultivar response to *glyphosate*. **Agronomy journal**, v.93, p.404-407, 2001.
- HEATHERLY, L. G.; SMITH, J. R. Effect of soybean stem growth habit on height and node number after beginning bloom in the *Midsouthern* USA. **Crop science**, v.44, n.5, p.1855-1858, 2004.
- JAMES, C. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2008. **ISAAA Brief**, n.39, Ithaca, NY, 2008.
- KIIHL, T. A. M.; ARIAS, C. A. A. Soybean cultivar BR-16-AHAS tolerance to the herbicide *imazapyr*. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.43, n.8, p.1031-1035, ago. 2008.
- KRAUSZ, R. F.; YOUNG, B. G. Response of *glyphosate*-resistant soybean (*Glycine max*) to trimethylsulfonium and isopropylamine salts of *glyphosate*. **Weed Technology**, v.15, n.4, p.745-749, 2001.
- PADGETTE, S. R.; KOLACZ, K. H.; DELANNAY, X.; R. E, D. B.; LAVALLEE, B. J.; TINIUS, C. N.; RHODES, W. K.; OTERO, Y. I.; BARRY, G. F.; EICHHOLTZ, D. A.; PESCHKE, V. M.; NIDA, D. L.; TAYLOR, N. B. E; KISHORE, G. M. Development, Identification, and Characterization of a *Glyphosate*-Tolerant Soybean Line. **Crop Science** v.35, p.1451-1461, 1995.
- REDDY, N. K.; ZABLATOWING, R. M. *Glyphosate*-resistant soybean response to various salt of *glyphosate* and *glyphosate* accumulation in soybean nodules. **Weed Technology**, v.51, n.4, p.496-502, 2003.
- ROMAN, E. S.; BECKIE, H.; VARGAS, L.; HALL, L.; RIZZARDI, M. A.; WOLF, T. M. **Como funcionam os herbicidas**: da biologia à aplicação. Passo Fundo (RS): Berthier, 2007. 160p.

WALKER, D. R.; et al. Gametic selection by *glyphosate* in soybean plants hemizygous for the CP4 EPSPS transgene. **Crop Science**, v.46, p.30-35, 2006.

3 METODOLOGIA PARA CULTIVAR PLANTAS DE SOJA *HEMIZIGOTAS* PARA O GENE *csr1-2* QUE CONFERE TOLERÂNCIA AO HERBICIDA *IMAZAPYR*

Trabalho a ser submetido à revista científica: Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB).

METODOLOGIA PARA CULTIVAR PLANTAS DE SOJA *HEMIZIGOTAS* PARA O GENE *csr1-2* QUE CONFERE TOLERÂNCIA AO HERBICIDA *IMAZAPYR*

Resumo

O objetivo deste estudo foi desenvolver uma metodologia para o cultivo de plantas F_1 hemizigóticas, que contenham o gene *csr1-2*, que confere tolerância ao grupo químico das *imidazolinonas*, em casa-de-vegetação sob condições de inverno, sem afetar significativamente a produção de sementes; e investigar a possibilidade de seleção de gametas, a partir de plantas F_1 *hemizigotas*, contendo este gene. Os híbridos obtidos nos cruzamentos entre genótipos convencionais e transgênicos foram submetidos aos seguintes tratamentos: T1 = sem aplicação de *imazapyr*; aplicações realizadas no estágio V3: T2 = 6,25 g i.a. ha⁻¹; T3 = 12,5 g i.a. ha⁻¹; T4 = 25 g i.a. ha⁻¹; e aplicações realizadas no estágio V5: T5 = 6,25 g i.a. ha⁻¹; T6 = 12,5 g i.a. ha⁻¹; e T7 = 25 g i.a. ha⁻¹. As plantas da geração F_1 foram avaliadas para diversas características seguindo o delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco repetições, em dois esquemas fatoriais: tratamentos x posições (superior e inferior) e doses x épocas. A melhor opção para que não haja a redução da quantidade de sementes na geração F_2 , e identificar e selecionar plantas *hemizigotas* que contenham o gene *csr1-2*, em casa-de-vegetação, sob condições de inverno, é a aplicação do herbicida realizada em V5 com 6,25 g i.a. ha⁻¹. Não foi possível indicar uma metodologia eficiente para selecionar gametas a partir de plantas F_1 *hemizigotas*, sob condições de inverno, sem que ocorram perdas no potencial produtivo.

Palavras-chave: *Glycine max.* *Imidazolinonas.* Tolerância a herbicida. Seleção de gametas.

Abstract

The objective of this work was to develop a method for growing hemizygous F_1 plants containing the *csr1-2* gene, which confers tolerance to the imidazolinone chemical group, in the greenhouse under winter conditions without significantly affect the seed production, and investigate the possibility of gamete selection from hemizygous F_1 plants containing this gene. The hybrids obtained in crosses between genetically modified genotypes and conventional genotypes were developed to the following treatments: T1 = no application of *imazapyr*, applications at V3 stage: T2 = 6.25 g ai ha⁻¹, T3 = 12.5 g ai ha⁻¹, T4 = 25 g ai ha⁻¹, and applications at V5 stage: T5 = 6.25 g ai ha⁻¹, T6 = 12.5 g ai ha⁻¹, T7 = 25 g ai ha⁻¹. The F_1 plants were assessed for various characteristics according a completely randomized design with five replicates in two factorial arrangements: treatment x plant position (upper and lower) and herbicide dose x spraying stage. The best option to avoid any seed yielding reduction in the F_2 generation and identify and select plants that contain hemizygous *csr1-2* gene, in the greenhouse under winter conditions, is the application of herbicide at V5 stage with 6.25 g ai ha⁻¹. It was not possible to indicate an effective methodology to select gametes from hemizygous F_1 plants containing the *csr1-2* gene, under winter conditions without losses on yield potential.

Keywords: *Glycine max.* Herbicide tolerance. Imidazolinone. Gametic selection.

3.1 INTRODUÇÃO

Para facilitar o controle de plantas daninhas nas lavouras comerciais de soja, um evento independente de soja geneticamente modificada, que contém o gene *csr1-2*, foi desenvolvido para conferir tolerância aos herbicidas do grupo químico das *imidazolinonas*, apresentando mais uma alternativa tecnológica importante aos agricultores. Devido ao grande dano causado pelas plantas daninhas, cada vez mais os agricultores e os programas de melhoramento buscam por variedades que contenham estas tecnologias.

Este gene mutado, cuja patente pertence à empresa alemã BASF, foi encontrado na espécie *Arabidopsis thaliana*, que continha uma mutação de ponto, onde o nucleotídeo de guanina foi substituído por uma adenina. Esta mutação altera o aminoácido serina para asparagina, obtendo assim, plantas tolerantes às moléculas do grupo das *imidazolinonas* (SATHASIVAN et al., 1990).

A Basf, empresa detentora do gene firmou uma parceria com a Embrapa e estabeleceu que esta ficasse responsável por fixá-lo nas plantas de soja, enquanto que a primeira forneceria o gene. No ano de 1999, em Brasília, iniciou-se o processo de transformação e, em 2001, já havia o primeiro evento-elite utilizando uma técnica nacional (ERNESTO, 2007).

Aragão et al. (2000) obtiveram um cassete de expressão, que continham o gene *csr1-2* e bombardearam os plasmídeos em embriões de soja com a região apical voltada para cima e obtiveram plantas transgênicas com diversos níveis de expressão, criando um sistema de transformação único no mundo, que emprega a seleção de células meristemáticas. Em análise de progênie, 35 plantas da geração F₁ foram autofecundadas e verificaram que, com a exceção de quatro linhagens, todas as plantas transferiram o transgene para a geração F₂ numa proporção Mendeliana (3:1).

Com base nos estudos realizados por Walker et al. (2006), os autores mostram que é possível selecionar gametas contendo o gene CP4-EPSPS a partir da aplicação do herbicida *glyphosate* sobre as plantas *hemizigotas*, aumentando a proporção de plantas tolerantes na geração F₂. Essa seleção é desejável tanto para a produção da geração F₂ como para a realização de retrocruzamentos quando o objetivo for introgridir o gene CP4-EPSPS nas cultivares adaptadas. A aplicação de herbicidas em soja na condição de inverno pode agravar o estresse sobre as plantas F₁ e afetar ainda mais a produção de sementes, objetivo principal do melhoramento.

Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia para a seleção de plantas que contenham o gene *csr1-2*, que confere tolerância aos herbicidas do grupo das *imidazolinonas*, em casa-de-vegetação sob condições de inverno, sem prejudicar a produção de sementes; e investigar a possibilidade de seleção de gametas contendo o gene *csr1-2* produzidos a partir de plantas F₁ *hemizigotas*.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Origem do material genético

Na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia foram selecionadas nove plantas derivadas de um mesmo evento de transformação via biobalística. Essas plantas foram colhidas e trilhadas separadamente e uma amostra de 50 sementes de cada uma foi enviada ao programa de melhoramento da Embrapa Soja, em setembro de 2001. Esses genótipos foram semeados em casa-de-vegetação para teste de suas progênes. Todas as progênes apresentaram plantas atípicas, segregando para sintomas como nanismo, atraso no desenvolvimento e encarquilhamento das folhas, independente da aplicação do herbicida do grupo das *imidazolinonas*. Nos tratamentos onde o herbicida foi aplicado, as plantas não demonstraram o nível de expressão do gene de tolerância que se desejava. Pelas análises de *southern blot*, verificou-se a presença de múltiplas cópias do gene *csr1-2* nas plantas transformadas, o que poderia explicar o baixo nível de expressão do gene.

Assim, com o objetivo de obter plantas de soja contendo cópia única do gene *csr1-2* e livre dos sintomas indesejáveis já descritos, foram realizados, durante o mês de outubro de 2001, cruzamentos entre plantas dos nove eventos com variedades adaptadas de soja. As sementes F₁ desses cruzamentos foram colhidas em dezembro de 2001 e imediatamente semeadas em casa-de-vegetação. Todas as plantas F₁ foram normais e não apresentaram as mesmas irregularidades dos eventos originais, indicando que os defeitos são recessivos, conforme esperado. A geração F₂ desses cruzamentos foi cultivada em casa-de-vegetação, a partir de maio de 2002. Foi pulverizado o herbicida sobre a população de plantas para verificar a segregação para o gene *csr1-2*. Houve segregação independente do gene *csr1-2* em relação ao nanismo e demais sintomas detectados nos eventos originais. De setembro de 2002 até julho de 2005, foram avaliadas, em casa-de-vegetação, progênes de plantas individuais das gerações F₃, F₄, F₅ e F₆, dos cruzamentos entre o evento Conquista-AHAS com

variedades convencionais como Conquista, BRS 137 e a linhagem BR97-7066. Plantas derivadas de progênies uniformes para a tolerância ao herbicida foram submetidas ao teste de *southern blot*, confirmando a presença de cópia única do gene *csr1-2* nesses eventos. Essa seleção com cópia única do gene *csr1-2*, designada evento elite, participou do processo de regulamentação para liberação comercial junto à Comissão Técnica de Biossegurança -CTNBio.

Em dezembro de 2009, a CTNBio emitiu um parecer técnico liberando o evento BPS-CV127-9 no meio ambiente, para fins comerciais, consumo e atividades relacionadas a este (CTNBio, 2010).

Descrição e obtenção dos materiais

Quatro progênies participaram deste experimento, dentre elas, uma cultivar convencional BRS 133 (Embrapa Soja) e três diferentes parentais transgênicos que apresentavam tolerância ao herbicida *imazapyr*.

A BRS 133 é uma cultivar que foi obtida pelo cruzamento FT Abyara x (União x BR-1T). Ela apresenta resistência às doenças: cancro da haste, mancha “olho de rã”, mosaico comum da soja e ao vírus da necrose da haste. A coloração da flor é branca, com hilo e pubescência marrom. Possui hábito de crescimento determinado e ciclo semiprecose (Almeida et al., 1999).

As linhagens transgênicas tolerantes aos herbicidas do grupo químico das *imidazolinonas* são:

a) E08-3398 – Genótipos na geração F8, obtido pelo cruzamento de CL08-700/6 x [Conquista³ x (BRI98-641)], sendo que a linhagem CL08-700/6 corresponde à fonte do gene *csr1-2* que foi introduzido na cultivar convencional MG/BR 46 (Conquista). Apresenta maturação tardia, coloração de flor roxa e hilo preto.

b) E08-3331 -Obtido pelo cruzamento de BRS133² x (BRS230 x CL08-700/6). Encontra-se segregando na geração F₃ e possui maturação semi-precose, coloração de flor branca e hilo marrom;

c) E08-3307 – Progênie F₄, derivada do cruzamento (BRS 184³ x CL08-700/6), apresenta maturação semi-precose, coloração de flor roxa e hilo preto.

A cultivar BRS 133 foi escolhida para participar dos cruzamentos sempre como genitor feminino. Por ela apresentar uma coloração de flor branca, com alelos recessivos para a característica, viabilizou o uso da técnica de marcador morfológico nas linhagens parentais de coloração de flor roxa. Nos cruzamentos da linhagem E08-3331, em que não possibilitavam o uso da técnica com marcador morfológico para checar os cruzamentos, foram realizadas análises moleculares nas plantas do tratamento T1, uma vez que nos outros tratamentos, as possíveis plantas autofecundadas, ou seja, não transgênicas, morreram após a aplicação dos herbicidas. Para a extração de DNA, foram coletadas folhas jovens no estágio vegetativo V2 e armazenadas em nitrogênio líquido, sendo realizada com base no protocolo descrito por Keim et al. (1988).

Em fevereiro de 2008, os parentais foram semeados em vasos na casa-de-vegetação e no mês de março, realizaram-se os cruzamentos.

A geração F₁ foi colhida em junho de 2008 e, em seguida, realizou o plantio em vasos individuais na casa-de-vegetação, seguindo o delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo a casualização realizada após a aplicação dos herbicidas. Os controles fitossanitários foram realizados de acordo com as recomendações técnicas indicadas para o cultivo da soja.

Os tratamentos foram: T1-sem aplicação de *imazapyr*; aplicações realizadas no estágio V3: T2-6,25 g i.a. ha⁻¹; T3-12,5 g i.a. ha⁻¹; T4-25 g i.a. ha⁻¹; e aplicações realizadas no estágio V5: T5- 6,25 g i.a. ha⁻¹; T6- 12,5 g i.a. ha⁻¹; e T7- 25 g i.a. ha⁻¹.

A aplicação de *imazapyr* foi realizada com um produto comercial contendo 250 g/L de equivalente ácido do 2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl) nicotinic acid (IMAZAPIR). As aplicações foram realizadas com um pulverizador costal com pressão constante de 40 lbf/pol², mantida por gás carbônico, acoplado com uma barra de dois bicos espaçados a 50 cm, que continham pontas de pulverização do tipo leque. O volume da calda foi equivalente a 200 L ha⁻¹. No preparo da calda adicionou-se um espalhante adesivo, cujo nome técnico *Aterbane*, possui concentração de 0,3%, com propriedades umectantes, emulsificantes e penetrantes.

A eficiência da aplicação e da dosagem foi testada com a presença de alguns vasos com plantas suscetíveis ao herbicida espalhados entre as progênies *hemizigotas*.

Durante a colheita, cada progênie F₁ foi dividida ao meio separando-as em duas regiões: superior e inferior, representando as duas posições avaliadas nas plantas.

Os caracteres avaliados nos híbridos F₁:

Altura de planta em centímetros (cm), obtida no período do florescimento, pela medida linear do nível do solo até a inserção do último trifólio (APF); número de dias entre a semeadura e o início do florescimento considerando a abertura completa da primeira flor (DF); contagem do número de nós presentes na haste principal da planta no período do florescimento (NNO); número de vagens presente na região superior das plantas (NVs); número de vagens presente na região inferior das plantas (NVi); número total de vagens na planta (NVt); número de sementes presente na região superior das plantas (Nss); número de sementes presente na região inferior das plantas (NSi); número total de sementes na plantas (NSt); relação sementes por vagens (SpV); altura de planta em centímetros (cm), obtido no período da maturação, pela medida linear do nível do solo até a inserção da última vagem (APM); dias para a maturação da planta. Número de dias entre a data de semeadura e a de colheita (DM).

Condução do experimento: Segunda Geração

Todas as sementes F₂, obtidas na geração F₁, foram semeadas em vasos plásticos contendo 8 litros de substrato e com aproximadamente 15 sementes por vaso. No momento em que a planta atingiu o estágio fenológico V2, foi aplicado 100 g i.a. ha⁻¹ de *imazapyr*. Três semanas após a aplicação, avaliou-se o número de plantas vivas e mortas em cada tratamento para as análises de segregação com o teste de Qui-Quadrado (χ^2).

Suscetibilidade dos gametas masculinos

Para verificar a intensidade de seleção provocada pelo herbicida *imazapyr*, apenas sobre os gametas masculinos, realizou-se retrocruzamentos da geração F₁ tratada, as quais forneceram pólen para o parental convencional BRS 133. Estas plantas, no período da floração, foram separadas das demais, não participando das avaliações realizadas sobre as demais plantas F₁.

As sementes obtidas foram para ensaio, seguindo o mesmo princípio da geração F₂. Contabilizou-se o número de plantas vivas e plantas mortas para análise estatística.

Análises estatístico – Genéticas

Realizaram-se análises de variância e testes de comparações de médias nas progênies da geração F_1 . Na análise de variância individual considerou-se efeito de tratamento fixo, seguindo o modelo matemático abaixo:

$$Y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}, \text{ onde:}$$

Y_{ij} : observação do i -ésimo tratamento na repetição j ;

μ : média geral dos tratamentos no experimento;

t_i : efeito do i -ésimo tratamento;

e_{ij} : erro experimental associado a observação Y_{ij} .

Duas outras análises de variância foram realizadas, porém considerando esquema fatorial avaliando: 7 tratamentos x 2 posições e 3 doses x 2 épocas. Utilizou-se o seguinte modelo matemático:

$$Y_{ijk} = m + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + e_{ijk}, \text{ onde:}$$

Y_{ijk} : observação do i -ésimo tratamento ou dose, j -ésimo posição ou época, na k -ésima repetição;

μ : média geral da variável do experimento;

α_i : efeito do i -ésimo tratamento ou dose;

β_j : efeito do j -ésimo posição ou épocas;

$\alpha\beta_{ij}$: efeito da interação entre o i -ésimo nível de α e o j -ésimo nível de β ;

e_{ijk} : erro experimental associado a observação Y_{ijk} .

Na segunda geração, para aceitar ou rejeitar os padrões mendelianos de segregação das plantas vivas e mortas esperadas, realizou-se o teste de Qui-Quadrado (χ^2), onde as frequências observadas foram obtidas diretamente pela contagem dos dados da amostra.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão representadas as análises de variâncias para tratamentos. Os valores dos coeficientes de variação CV (%) foram semelhantes aos observados no experimento realizado por Kiihl e Arias (2008) em casa-de-vegetação, com soja tolerante ao herbicida *imazapyr*. Neste ensaio observou-se porcentagens iguais a 28,33%, 30,81% e 9,86% com estimativas iguais a 31,7%, 32,8% e 10,9% para as características número de vagens, sementes e relação semente por vagem, respectivamente.

Pelo resumo da análise de variância (Tabela 1), observou-se que houve efeito significativo de tratamento para quase todas as características avaliadas na geração F₁, exceto DF e NNO. Para os demais caracteres que apresentaram diferenças significativas, pelo menos duas médias de tratamentos diferiram entre si. O número de nós em soja pode ser influenciado pela estrutura genética que compõe o genótipo, e pelas condições ambientais no início de seu desenvolvimento, como por exemplo, disponibilidade hídrica e temperatura do ar. Mundstock e Thomas (2005), realizando experimentos de disponibilidades hídricas em plantas de soja, observaram reduções significativas tanto para NNO como o número de nós produtivos na planta, à medida que se reduziu a quantidade de água no experimento. Embora o NNO em soja sofra influência externa do ambiente, a aplicação do *imazapyr*, não interferiu nesta característica a ponto de reduzir NNO nas doses utilizadas.

Tabela 1 – Resumo da análise de variância com os quadrados médios e níveis de significância; estimativas de medias e coeficiente de variacao CV(%) para os caracteres avaliados na geracao F₁ apos tratado com o *imazapyr* em diferentes doses e epocas.

Características	Quadrados Médio		Médias	CV(%)
	Tratamento	Erro		
GL	6	130		
Altura de planta no florescimento	1212,8 *	456,76	81,2	26,33
Dias para o florescimento	5,0468 ns	7,5679	37,5	7,34
Número de nós da planta	1,1184 ns	0,6570	10,9	7,42
Número de vagens superior	764,48 **	33,531	16,2	35,69
Número de vagens inferior	1203,3 **	116,90	31,8	33,96
Número de vagens total	3181,9 **	24097	48,1	28,33
Número de sementes superior	4162,9 **	151,01	30,7	40,07
Número de sementes inferior	5992,8 **	443,31	57,4	36,68
Número de sementes total	17695 **	736,33	88,1	30,81
Relação semente por vagem	0,9576 **	0,0303	1,80	9,86
Altura da planta na maturação	2114,4 **	495,48	90,1	24,72
Dias para a maturação	985,46 **	34,636	105,4	5,59

ns, * e **: nao significativo, significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente.

Nas comparações de médias (Tabela 2), para as características APF e APM, apenas o tratamento T7 diferiu de T1. Entre estes dois tratamentos observou-se uma redução média de 23,5 e 31,2 cm para APF e APM, respectivamente. Plantas convencionais quando tratadas com herbicidas inibidores de AHAS tem sua mitose cessada. Roe et al. (1997) citam que em poucas horas após a aplicação de herbicidas inibidores das *imidazolinonas*, a mitose e síntese de DNA diminuem. Os herbicidas agem nos tecidos meristemáticos, e dentro da célula, a inibição pode ocorrer no período entre o intervalo mitótico (G2) e a metáfase da mitose. Este efeito pode ser revertido, por exemplo, com a aplicação de aminoácidos exógenos de valina, leucina e isoleucina.

Em DM a testemunha T1 não diferiu de T2, T3 e T5. O atraso da maturação das plantas hemizigóticas ocorreu com aplicações mais tardias e com maiores dosagens de herbicida. Entre os dois extremos (tratamentos T1 e T7), observou-se que houve em média, uma diferença de 21 dias entre as datas de colheita (Tabela 2).

Tabela 2 – Médias gerais dos tratamentos para as características altura de planta no período de florescimento (APF, cm); dias para a floração (DF); número de nós na haste principal da planta (NNO); número de vagens na região superior (NVs); número de vagens na região inferior (NVi); número de vagens totais (NVt); número de sementes na região superior (NSs); número de sementes na região inferior (NSi); número de sementes totais (NSt); relação semente por vagem (SpV); altura da planta na maturação (APM, cm) e dias para a maturação (DM), avaliadas na geração F₁ após tratado com o *imazapyr* em diferentes doses e épocas.

Trat	APF	DF	NNO	NVs	NVi	NVt	NSs	NSi	NSt	SpV	APM	DM
1	87,6 a	37,2 a	10,7 a	25,0 a	32,0ab	57,0 a	53,1 a	65,8 a	118,9 a	2,1 a	102,0a	98,3 d
2	86,5 a	36,4 a	11,1 a	18,9 bc	40,1 a	59,1 a	37,8 b	76,1 a	113,8ab	1,9 ab	98,9 a	99,5 d
3	85,2 a	37,7 a	11,3 a	16,4bcd	37,2 a	53,5 a	31,1 bc	69,4 a	100,5ab	1,9 bc	95,5 a	103,5cd
4	76,2 ab	37,8 a	11,1 a	13,6 cd	37,9 a	51,5 a	23,9 cd	65,3 a	89,2 b	1,7 cd	82,9ab	105,6bc
5	80,6 ab	37,7 a	10,7 a	19,8 ab	34,5 a	54,3 a	35,5 bc	59,6 a	95,1 ab	1,7 c	87,0ab	102,6cd
6	83,6 ab	37,9 a	10,9 a	11,5 d	23,9 bc	35,5 b	18,9 de	38,3 b	57,2 c	1,6 de	88,1ab	110,8 b
7	64,1 b	37,5 a	10,7 a	5,8 e	17,9 c	23,7 b	8,5 e	26,6 b	35,1 c	1,4 e	70,8 b	119,3 a
Dms	20,7	2,7	0,8	5,6	10,5	13,2	11,9	20,4	26,2	0,2	21,5	5,7

Medias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Tratamentos: T1 = sem aplicação de *imazapyr*; T2 = 6,25 g i.a. ha⁻¹ no estádio V3; T3 = 12,5 g i.a. ha⁻¹ no estádio V3; T4 = 25 g i.a. ha⁻¹ no estádio V3; T5 = 6,25 g i.a. ha⁻¹ no estádio V5; T6 = 12,5 g i.a. ha⁻¹ no estádio V5; e T7 = 25 g i.a. ha⁻¹ no estádio V5.

Para NVs, o tratamento T5 foi o único que não diferiu significativamente da testemunha T1. Em relação aos demais tratamentos, todos apresentaram redução no número de vagens. Já em NSs, todos os tratamentos diferiram de T1. Na parte inferior das plantas a

redução de vagens e sementes foi menos acentuada quando comparada à região superior (Tabela 2). Este fato já era esperado pelo mecanismo de ação que o *imazapyr* apresenta dentro da planta, e pelo modo como se inicia a morte celular. O herbicida é absorvido pelas folhas e translocado ao meristema apical das plantas. Nesta região observa-se um escurecimento e posteriormente a morte celular do tecido. Segundo Roman et al. (2007) os herbicidas inibidores de AHAS podem ser absorvidos pelas folhas ou pelas raízes da planta e são translocados tanto pelos vasos do xilema como pelos vasos do floema. A movimentação é facilitada na planta devido a sua lipofilicidade intermediária e ao comportamento de ácido fraco que o produto possui.

Na parte inferior das plantas a redução de número de vagens e sementes ocorreu com menor intensidade, observou-se que para NVi o único tratamento que diferiu estatisticamente da testemunha foi T7. Já em NSi, T6 e T7 foram os que diferiram de T1. Ao considerar a planta inteira, para a quantidade de vagens, T1 diferiu de T6 e T7 e para o número de sementes, a testemunha diferiu de T4, T6 e T7 (Tabela 2).

No resumo da análise de variância em esquema fatorial de dose por época de aplicação (Tabela 3), as plantas do tratamento T1 foram retiradas da análise pois não receberam aplicação de *imazapyr*. O efeito de dose foi altamente significativo para quase todos os caracteres exceto DF e NNO, já o efeito de época isoladamente foi significativo para todos os caracteres, exceto para APF e DF. Nas características que apresentaram significância, pelo menos duas doses ou duas épocas diferiram entre si. Já na interação doses x épocas, foram observados efeitos significativos para os caracteres: NVs, NVi, NVt, NSt e DM. Em função da dose de aplicação foram observadas interações do tipo simples para todas as características, não havendo mudança na classificação das médias. As aplicações realizadas em V5 e com a menor dose ($6,25\text{g i.a. ha}^{-1}$) produziram maiores quantidades de vagens na região superior, enquanto que, as aplicações realizadas mais precocemente (V3) e com as maiores dosagens ($12,5$ e 25 g i.a. ha^{-1}), foram observados maiores NVs (dados não mostrados).

Ao considerar efeito de dose individualmente, dentre as três dosagens escolhidas para serem utilizadas nos ensaios, a dose 1 e 2 não diferiram entre si quando se avaliou APF e APM, sendo a dose 3 (25g i.a. ha^{-1}) a que causou maior redução na altura durante todo o ciclo da planta (Tabela 3 e 4).

A presença de maiores dosagens de herbicida causou atrasos na colheita dos materiais, reduzindo em média 11,4 dias o DM entre a mínima e máxima dose.

Tabela 3 – Resumo da análise fatorial 3x2 com os respectivos quadrados médios e níveis de significância; estimativas de média e coeficiente de variação CV (%) para os caracteres avaliados na geração F₁ após tratado com o *imazapyr* em diferentes doses e épocas.

Características	Quadrados Médio				Médias	CV(%)
	Dose	Época	DosexÉpoca	Erro		
GL	2	1	2	108		
Altura de planta no florescimento	2291,3 **	1028,1 ns	260,99 ns	437,90	79,9	26,2
Dias para o florescimento	5,4564 ns	5,9993 ns	5,8222 ns	7,6473	37,5	7,37
Número de nós da planta	0,6524 ns	4,4409 **	0,0316 ns	0,6201	11,0	7,19
Número de vagens superior	851,70 **	417,08 **	169,36 **	32,066	14,5	39,17
Número de vagens inferior	835,54 **	4644,4 **	451,88 *	129,56	31,8	35,79
Número de vagens total	3352,5 **	7845,1 **	1167,4 **	200,53	46,3	30,61
Número de sementes superior	3714,8 **	2812,3 **	419,15 ns	136,44	26,1	44,68
Número de sementes inferior	4278,0 **	23185 **	1128,6 ns	476,97	55,7	39,20
Número de sementes total	15951 **	42148 **	2914,7 *	770,77	81,9	33,92
Relação semente por vagem	0,5972 **	1,8552 **	0,0411 ns	0,0326	1,70	10,59
Altura da planta na maturação	2800,6 **	2989,1 *	74,987 ns	445,59	87,6	24,09
Dias para a maturação	1152,2 **	1740,3 **	246,50 **	36,461	106,8	5,65

ns, * e **: não significativo, significativo a 5% e a 1% de probabilidade, respectivamente.

Em todos os componentes de rendimento (NVs, NVi, NVt, NSs, NSi, NSt e SpV), observou-se diferença significativa entre as três dosagens. À medida que aumentou a concentração de herbicida na solução, reduziu-se significativamente a quantidade de vagens e sementes na planta. Na posição inferior, não houve diferença entre as doses 2 e 3 para o número de vagens (NVi) e sementes (NSi) (Tabela 4).

Ao considerar o efeito de época de aplicação individualmente, observou-se que, para os caracteres APF e DF, não houve diferença quando aplicado o herbicida no estágio fenológico V3 ou V5. Para as demais características avaliadas, as duas diferentes épocas de aplicação interferiram nos resultados (Tabela 4).

Houve redução no NNO e na APM nas aplicações mais tardias do herbicida. Para APM, quando comparado com a testemunha, as aplicações realizadas em V3 e V5 causaram aparentemente uma redução média de 9,1 e 19,3 cm, respectivamente (Tabela 2 e 4). Resultados diferentes foram encontrados por Young et al. (2003) avaliando altura de planta em diferentes épocas de aplicação de herbicida. Os autores avaliaram a influencia de: *glyphosate*, *acifluorfen* e *imazethapyr* (este último pertencente ao mesmo grupo químico do *imazapyr*) aplicado em duas épocas diferentes (V2-V3 e V5-V6), e verificaram que as maiores reduções

de altura ocorreram nas plantas que receberam as aplicações mais cedo (V2-V3) e com o uso dos herbicidas imazethapyr e acifluorfen.

Tabela 4 – Médias gerais de doses, em g i.a. ha⁻¹, e épocas para as características altura de planta no período de florescimento (APF, cm); dias para a floração (DF); número de nós na haste principal da planta (NNO); número de vagens na região superior (NVs); número de vagens na região inferior (NVi); número de vagens total (NVt); número de sementes na região superior (NSs); número de sementes na região inferior (NSi); número de sementes total (NSt); relação semente por vagem (SpV); altura da planta na maturação (APM, cm) e dias para a maturação (DM), avaliadas na geração F₁ após tratado com o *imazapyr* em diferentes doses e épocas.

Doses	APF	DF	NNO	NVs	NVi	NVt	NSs	NSi	NSt	SpV	APM	DM
6,25	83,3 a	37,1 a	10,9 a	19,4 a	37,1 a	56,5 a	36,5 a	67,2 a	103,7a	1,8 a	92,5 a	101,2c
12,5	84,4 a	37,8 a	11,1 a	14,0 b	30,5 b	44,5 b	25,0 b	53,9 b	78,9 b	1,7 b	91,8 a	107,1b
25,0	70,0 b	37,6 a	10,9 a	9,6 c	27,6 b	37,2 b	16,0 c	45,3 b	61,3 c	1,6 c	76,7 b	112,6a
DMS	11,5	1,5	0,4	3,1	6,2	7,8	6,4	12,0	15,2	0,1	11,6	3,3

Épocas	APF	DF	NNO	NVs	NVi	NVt	NSs	NSi	NSt	SpV	APM	DM
V3	83,0 a	37,3 a	11,2 a	16,3 a	38,3 a	54,7 a	31,1 a	70,3 a	101,3a	1,8 a	92,9 a	102,8b
V5	77,0 a	37,7 a	10,8 b	12,7 b	25,7 b	38,4 b	21,5 b	42,2 b	63,7 b	1,6 b	82,7 b	110,5a
DMS	7,8	1,0	0,3	2,1	4,2	5,3	4,3	8,1	10,3	0,1	7,8	2,2

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Houve um aumento significativo da média do caráter DM nas aplicações realizadas em V5. Em média a diferença entre as datas de colheita foi de 7,7 dias quando comparadas as duas épocas de aplicação (Tabela 4).

As médias para número de vagens, sementes e a relação semente por vagem, independente da região da planta, foram menores quanto mais tardiamente foi aplicado o herbicida. As plantas de soja tolerantes ao *imazapyr* e que receberam o produto no início de seu desenvolvimento, tem maiores chances de metabolizar o herbicida e se recuperarem, causando desta forma, menores prejuízos na produção de vagens e sementes (Tabela 4).

Pelo resumo da análise fatorial (7 tratamentos x 2 posições) observou-se que, para as duas características, componentes do rendimento de grãos, houve efeito altamente significativo de tratamento, posição e interação entre tratamentos e posições, indicando que pelo menos dois tratamentos e as duas posições, diferem entre si. A interação significativa mostra que a resposta para tratamento depende da posição da planta avaliada (Tabela 5).

Tabela 5 – Quadrados médios e graus de liberdade (GL) para: tratamento (QMt), posição (QMp), interação tratamento por posição e erro, com os respectivos níveis de significâncias; estimativas de médias e coeficiente de variação CV(%) para os caracteres: número de vagens (NV) e número de sementes (NS), avaliadas na geração F₁ depois de tratado com o *imazapyr*.

Quadrados médio	GL	Número de vagens	Número de sementes
QMt	6	1590,9**	8847,4**
QMp	1	16698**	48996**
QMtxp	6	376,87**	1308,3**
QMe	260	75,214	297,16
Média		24,0	44,0
CV(%)		36,09	39,15

** : significativo a 1% de probabilidade.

Na Tabela 6, analisando individualmente cada posição, verificou-se que na região superior da planta houve redução no número de vagens em quase todos os tratamentos, exceto para T5. Já para número de sementes superior, todos os tratamentos reduziram a quantidade de sementes quando comparado à testemunha. Na região inferior esta diferença foi menos evidente, quase todos os tratamentos não diferiram de T1, exceto em T7 para número de vagens; e T6 e T7 para número de sementes.

Tabela 6 – Médias gerais dos tratamentos para as características número de vagens e número de sementes, avaliadas na geração F₁ após tratado com o *imazapyr*.

Tratamentos	Número de vagens			Número de sementes		
	Superior	Inferior	Médias	Superior	Inferior	Médias
1	25,0 a	32,0 ab	28,5 a	53,1 a	65,8 a	59,5 a
2	18,9 bc	40,1 a	29,5 a	37,8 b	76,1 a	56,9 ab
3	16,4 bcd	37,2 a	26,8 a	31,1 bc	69,4 a	50,3 abc
4	13,6 cd	37,9 a	25,8 a	23,9 cd	65,3 a	44,6 c
5	19,8 ab	34,5 a	27,1 a	35,5 bc	59,6 a	47,5 bc
6	11,5 d	23,9 bc	17,7 b	18,9 de	38,3 b	28,6 d
7	5,8 e	17,9 c	11,9 b	8,5 e	26,6 b	17,6 d
DMS	5,6	10,5	5,9	11,9	20,4	11,7
Médias	16,2 B	31,8 A		30,7 B	57,4 A	

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. DMS entre posições iguais a 2,1 e 4,1 para número de vagens e número de sementes, respectivamente.

Kiihl e Arias (2008) avaliaram o número de vagens e sementes em três posições da planta (superior, médio e inferior) em 12 genótipos distintos de soja tolerantes ao herbicida *imazapyr*. Verificaram que dependendo do genótipo, existem diferentes distribuições

de números de vagens e sementes nas três posições da planta. Observaram também que, quando semeados no período de inverno, estas diferenças entre as três posições se acentuam quando comparado à semeadura realizada no verão.

Em média, observou-se diferença significativa entre as posições superiores e inferiores para os caracteres números de vagens e número de sementes. Esta diferença ocorreu em todos os tratamentos, inclusive nas plantas que não receberam o herbicida. Em média a diferença entre as duas regiões foi de 15,6 e 26,7 para números de vagens e número de sementes, respectivamente (Tabela 6).

Para números de vagens, em média, os tratamentos T6 e T7 diferiram da testemunha reduzindo significativamente a produção de vagens. Para números de sementes, observou-se que os tratamentos T4, T5, T6 e T7 diferiram estatisticamente de T1.

Neste sentido os tratamentos T4, T6 e T7 não atenderam aos objetivos do programa de melhoramento, em que se deseja identificar em casa-de-vegetação, e no período de inverno, plantas hemizigóticas de interesse agrônomico e que possuam o gene *csr1-2*, sem que haja a redução do número de sementes na geração posterior (F_2). Na geração F_2 , é necessário ter uma grande quantidade de sementes, pois o avanço das gerações não ocorre mais em casa-de-vegetação e sim no campo. O sucesso na exploração da variabilidade genética gerada a partir de cada cruzamento depende da disponibilidade de uma população mínima de plantas na geração F_2 .

Foi avaliada pelo teste de χ^2 a segregação da geração F_2 (Tabela 7). O tratamento T2 foi o único que não segregou na proporção mendeliana de 3:1, porém ao contrário do previsto, com maiores plantas mortas do que o esperado.

Para o restante dos tratamentos, mesmo com uma probabilidade não significativa, parece que há uma tendência de maior número de plantas mortas (inclusive na testemunha T1) quando comparado com o número esperado, exceto para T5. A maior proporção de plantas mortas com efeito significativo para T2, pode ser um indicativo de que os gametas sem o gene *csr1-2* sob baixa pressão de seleção estão com maior valor adaptativo para esta condição de inverno, deixando maior proporção de descendentes. Estes resultados ainda devem ser investigados a fim de verificar se eles se repetem apenas no inverno ou também no verão.

T2, T3 e T4 são tratamentos com diferentes doses, mas todos aplicados no estágio fenológico V3, pode-se concluir que para as condições ambientais de casa-de-vegetação e nessas doses utilizadas o tempo entre a aplicação e o início da fase reprodutiva foi suficiente

para que o herbicida não exercesse nenhum efeito seletivo sobre os gametas formados nessas plantas F_1 *hemizigotas*. Também para T5, onde foi aplicada a dose mais baixa de *imazapyr* no estágio V5 da soja, não houve efeito significativo sobre a proporção média esperada de gametas masculinos e femininos produzidos a partir da planta F_1 *hemizigota*, embora o número de plantas mortas tenha sido menor que o esperado.

Tabela 7 – Valores de χ^2 testando a hipótese de 3 Plantas Vivas: 1 Planta Morta, avaliadas na geração F_2 , calculado a probabilidade com 1 grau de liberdade.

Tratamentos	Plantas Obs.		Plantas Esp.		Total	$\chi^2_{(3:1)}$	Probabilidade
	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas			
T1	379	141	390,0	130,0	520	1,2410 ns	0,2653
T2	258	111	276,8	92,3	369	5,0813 *	0,0242
T3	364	142	379,5	126,5	506	2,5323 ns	0,1115
T4	139	59	148,5	49,5	198	2,4310 ns	0,1190
T5	212	61	204,8	68,3	273	1,0269 ns	0,3109

ns e *: não significativo e significativo a 5% de probabilidade, respectivamente.

Na Tabela 8, foram apresentados os resultados obtidos com o teste de χ^2 em retrocruzamentos. Nos tratamentos T3, T4 e T6 não foi possível obter pólen viável para os cruzamentos. Acredita-se que as maiores injúrias, ocasionadas provavelmente pela baixa temperatura no inverno, associado as maiores dosagens de herbicida, possa ter afetado a viabilidade do pólen para cruzamento nestes tratamentos. Segundo Pinto (2009), as baixas temperaturas podem sim retardar o florescimento, deixando as plantas com aspecto de macho-estéreis ou até mesmo levá-las à esterilidade.

Dentre os demais cruzamentos que foram realizados (T2, T5 e T7), os tratamentos T2 e T5 apresentaram maior viabilidade de pólen no inverno, permitindo assim, obter maior quantidade de plantas para serem avaliadas na geração de retrocruzamentos. Observou-se que o tratamento T2 não diferenciou da segregação mendeliana 1:1, ocorrendo um pouco mais de plantas mortas do que o esperado, dados semelhantes a este, porém significativos, foram observados na geração F_2 com o T2 (Tabela 7).

Nos tratamentos T5 e T7 verificou-se desvio significativo do padrão de segregação e a ocorrência de seleção de gametas, encontrando menores valores de plantas mortas do que o esperado. Apesar da amostragem em T7 ter sido pequena devido às dificuldades de se obter polens viáveis para cruzamento, dentre as 11 plantas avaliadas, todas

possuam o gene *csr1-2* e sobreviveram. Estes resultados indicam uma possível seleção contra os gametas machos que não continham o gene *csr1-2*.

Trabalho semelhante, testando a viabilidade do gameta masculino, foi realizado por Walker et al. (2006) em soja *hemizigota* tolerante ao *glyphosate*. Verificaram que a aplicação de *glyphosate* antes do florescimento foi tóxico aos pólenes não transgênicos. Os autores sugerem que o transgene CP4-EPSPS presente no gameta masculino, já pode estar sendo expresso no desenvolvimento dos micróporos, em um nível suficiente para protegê-los.

Delannay et al. (1995) citam que na flor da soja os gametas femininos são mais bem protegidos do que os gametas masculinos devido a própria estrutura que os envolvem. Assim, os gametas femininos que não possuem o seguimento transgênico, ou seja, os gametas suscetíveis ao herbicida, possivelmente receberão menos ou nenhuma interferência do produto aplicado.

Tabela 8 – Valores de χ^2 testando a hipótese de 1 Planta Viva : 1 Planta Morta, avaliadas na geração de retrocruzamento, calculado a probabilidade com 1 grau de liberdade.

Tratamentos	Plantas Obs.		Plantas Esp.		Total	$\chi^2_{(1:1)}$	Probabilidade
	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas			
T2	43	51	47,0	47,0	94	0,6809 ns	0,4093
T5	56	37	46,5	46,5	93	3,8817 *	0,0488
T7	11	0	5,5	5,5	11	11,000 **	0,0009

ns, * e **: não significativo, significativo a 1% e a 5% de probabilidade, respectivamente.

Com os resultados obtidos até o momento, o tratamento T5 parece ser a melhor opção para selecionar plantas que contenham o gene *csr1-2*, sem reduzir significativamente a produção de sementes e, conseqüentemente, obter um maior número de plantas na geração F₂. Contudo, seria necessária a repetição do ensaio e, unindo a experiência já adquirida, aliada as dosagens determinadas neste trabalho, obter plantas com pólenes viáveis, utilizando doses de herbicidas que promovam a seleção de gametas, sem contudo, reduzir a quantidade de vagens e sementes.

CONCLUSÕES

Aplicação de *imazapyr* em V5 com 6,25 g i.a. ha⁻¹ é uma opção para identificar e selecionar plantas *hemizigotas* que contenham o gene *csr1-2*, em condições de inverno e em casa-de-vegetação, sem reduzir a quantidade de sementes na geração F₂.

Não foi possível desenvolver uma metodologia eficiente para selecionar gametas em F₂, a partir de plantas *hemizigotas*, cultivadas no inverno e em casa-de-vegetação, contendo o gene *csr1-2*, sem interferir na quantidade de sementes produzidas.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J. C. V de; ULBRICH, A. V. Melhoramento genético de plantas. In: DESTRO, D. E MONTALVÁN, R. (ed) **Resistência aos herbicidas**. Londrina: UEL, 1999. 820p.
- ARAGÃO, F. J. L.; SAROKIN, L.; VIANNA, G. R.; RECH, E. L. Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] plants at a high frequency. **Theoretical and Applied Genetics**, v.101, p.1-6, 2000.
- CTNBio. Disponível em: <www.ctnbio.gov.br>. Acesso em: 12 de janeiro de 2010.
- ERNESTO, P. Soja transgênica brasileira representa avanço para o setor agrícola. Disponível em: <www.jornalcomunicacao.ufpr.br>. Acesso em: 15 de novembro de 2009
- FERREIRA, D. F. **Estatística básica**. Lavras: Editora UFLA, 2005. 664p.
- KIIHL, T. A. M e ARIAS, C. A. A. Soybean cultivar BR-16-AHAS tolerance to the herbicide *imazapyr*. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.43, n.8, p.1031-1035, ago. 2008.
- KEIM, P.; OLSON, T. C.; SHOEMAKER, R. C. A rapid protocol for isolating soybean DNA. **Soybean Genetics Newsletter**, v.15, p.150-152, 1988.
- MUNDSTOCK, C. M.; THOMAS, A. L. **Soja: fatores que afetam o crescimento e o rendimento de grãos**. Porto Alegre: Departamento de Plantas de Lavoura - UFRGS, 2005. 31 p.
- PINTO, F. S. A. Híbridação em soja <<http://www.ufv.br/dbg>> Acesso em: 23 de novembro de 2009.
- ROE, R. M.; BURTON, J. D.; KUHR, R. J. **Herbicide activity: Toxicology, biochemistry and molecular biology**. ed. IOS press, 1997.
- ROMAN, E. S.; BECKIE, H.; VARGAS, L.; HALL, L.; RIZZARDI, M. A.; WOLF, T. M. **Como funcionam os herbicidas: da biologia à aplica o**. Passo Fundo (RS): Berthier, 2007. 160p.
- SATHASIVAN, K.; HAUGHN, G. W.; MURAI, N. Nucleotide sequence of a mutant acetolactate synthase gene from an imidazolinone-resistant *Arabidopsis thaliana* var. Columbia. **Nucleic Acids Research**, v.18, n.8, p.2188, 1990.

YOUNG, B. G., YOUNG, J. M. Soybean development and yield as affected by three postemergence herbicides. **Agronomy Journal**, v.95, p.1152-1156, 2003.

WALKER, D. R.; et al. Gametic selection by *glyphosate* in soybean plants hemizygous for the CP4 EPSPS transgene. **Crop Science**, v.46, p.30 - 35, 2006.

CONCLUSÕES GERAIS

1-A seleção de gametas contendo o gene CP4-EPSPS em plantas F₁, cultivadas em condições de inverno e em casa de vegetação, é eficiente através da aplicação de 1,92 kg ai ha⁻¹ de *glyphosate* no estágio de desenvolvimento V3 da soja, sem que comprometa a produção de sementes para as futuras gerações.

2-Aplicação de *imazapyr* em V5 com 6,25 g i.a. ha⁻¹ é uma opção para identificar e selecionar plantas *hemizigotas* que contenham o gene *csr1-2*, em condições de inverno e em casa-de-vegetação, sem reduzir a quantidade de sementes na geração F₂.

3-Não foi possível desenvolver uma metodologia eficiente para selecionar gametas em F₂, a partir de plantas *hemizigotas*, cultivadas no inverno e em casa-de-vegetação, contendo o gene *csr1-2*, sem interferir na quantidade de sementes produzidas.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J. C. V de; ULBRICH, A. V. Melhoramento genético de plantas. In: DESTRO, D. E MONTALVÁN, R. (ed) **Resistência aos herbicidas**. Londrina: UEL, 1999. 820p.
- AMARANTE JUNIOR, O. P. DE; SANTOS, T. C. R. DOS. GLIFOSATO: Propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, v.25, n.4, p.589-593, 2002.
- ARAGÃO, F. J. L.; SAROKIN, L.; VIANNA, G. R.; RECH, E. L. Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] plants at a high frequency. **Theoretical and Applied Genetics**, v.101, p.1-6, 2000.
- ARIAS, C. A. A. Soja transgênica: experiências de pesquisa e produção. In: IV Latin-American Meeting on Plant Biotechnology, 2001, Goiânia. IV Latin-American Meeting on Plant Biotechnology - Programa e Resumos. Goiânia, p. 49-50, 2001.
- BARROS, A. C.; MONTEIRO, P. M. F. O.; FURTADO, X. C.; JÚNIOR, J. N.; GUERZONI, R. A. Tolerância de cultivares de soja aos herbicidas imazaquin, diclosulam e sulfentrazone, aplicados em solo de textura arenosa. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.4, n.1, 2005.
- BECKIE, H. J.; REBOUD, X. Selecting for weed resistance: Herbicide rotation and mixture. **Weed Technology**, v.23, 2009.
- BLANCO, H. G.; OLIVEIRA, D. A.; ARAÚJO, J. B. M.; GRASSI, N. Observação sobre o período em que as plantas daninhas competem com a soja (*Glycine max* (L.) Merr). **O biológico**, São Paulo, v.39, n.2, 1973.
- BOERMA, H. R. e SPECHT, J. E. **Soybeans: Improvement, production and uses**. Madison, Wisconsin, USA, 2004.
- BORÉM, A. Escape gênico - Os riscos do escape gênico da soja no Brasil. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** - Encarte Especial, 1999.
- BURNSIDE, O. C. Rationale for developing herbicide-resistant crops. **Weed technology**. v.6, n.3, p.621-625, 1992.
- CORREIA, N. M.; DURIGAN, J. C. Seletividade de diferentes herbicidas à base de *glyphosate* a soja RR. **Planta daninha**, Viçosa-MG, v.25, n.2, p.375-379, 2007.

CTNBio. Disponível em:<www.ctnbio.gov.br>. Acesso em: 12 de janeiro de 2010.

DELANNAY, X. et al. Yield Evaluation of a *Glyphosate*-Tolerant Soybean Line after Treatment with *Glyphosate*. **Crop Science** v.35, p.1461-1467, 1995.

ELMORE, R. W. et al. *Glyphosate*-resistant soybean cultivar response to *glyphosate*. **Agronomy journal**, v.93, p.404-407, 2001.

EMBRAPA 2007. **Tecnologias de produção de soja: Paraná – 2007**. Londrina: Embrapa Soja, 2006. 217p.

ERNESTO, P. Soja transgênica brasileira representa avanço para o setor agrícola. Disponível em: <www.jornalcomunicacao.ufpr.br>. Acesso em: 15 de novembro de 2009.

FERREIRA, D. F. **Estatística básica**. Lavras: Editora UFLA, 2005. 664p.

GALLI, A. J. B.; MONTEZUMA, M. C. **Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura**. Editora ACADCOM Gráfica e Editora Ltda, 2005.

HEAP, I. M. 2009. International Survey of Herbicide Resistent Weeds online. Weed science society of America. Disponível em <<http://www.weedscience.org/in.asp>> Acesso em 25 de agosto de 2009.

HEATHERLY, L. G.; SMITH, J. R. Effect of soybean stem growth habit on height and node number after beginning bloom in the *Midsouthern* USA. **Crop science**, v.44, n.5, p.1855-1858, 2004.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2004. Disponível em:<www.ibge.gov.br> Acesso em: 14 de agosto 2009.

JAMES, C. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2008. **ISAAA Brief**, n.39, Ithaca, NY, 2008.

KEIM, P.; OLSON, T. C.; SHOEMAKER, R. C. A rapid protocol for isolating soybean DNA. **Soybean Genetics Newsletter**, v.15, p.150-152, 1988.

KIIHL, T. A. M; ARIAS, C. A. A. Soybean cultivar BR-16-AHAS tolerance to the herbicide *imazapyr*. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.43, n.8, p.1031-1035, ago. 2008.

KISSMANN, K. G. **Resistência de plantas a herbicidas**. BASF, 1995.

KRAUSZ, R. F.; YOUNG, B. G. Response of *glyphosate*-resistant soybean (*Glycine max*) to trimethylsulfonium and isopropylamine salts of *glyphosate*. **Weed Technology**, v.15, n.4, p.745-749, 2001.

LAZAROTO, C. A.; FLECK, N. G.; VIDAL, R. A. Biologia e ecofisiologia de buva (*Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.3, p.852-860, mai-jun, 2008.

LIMA, W. F.; PÍPOLO, A. E.; MOREIRA, J. U. V.; CARVALHO, C. G. P. de; PRETE, C. E. C.; ARIAS, C. A. A.; OLIVEIRA, M. F. de; SOUZA, G. E. de; TOLEDO, J. F. F. de. Interação genótipo-ambiente de soja convencional e transgênica resistente a glifosato, no Estado do Paraná. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.43, n.6, p.729-736, jun. 2008.

MEROTTO Jr., A.; VIDAL, R. A.; FLECK, N. G. e ALMEIDA, M. L. Interferência das plantas daninhas sobre o desenvolvimento inicial de plantas daninhas de soja e arroz através da qualidade da luz. **Planta daninha**, Viçosa-MG, v.20, n.1, p.9-16, 2002.

MOTTA, I. de S.; BRACCINI, A. de L. E.; SCAPIM, C. A.; GONÇALVES, A. C. A.; BRACCINI, M. do C. L. Características agronômicas e componentes da produção de sementes de soja em diferentes épocas de semeadura. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 22, n. 2, p.153-162, 2000.

MUNDSTOCK, C. M.; THOMAS, A. L. **Soja: fatores que afetam o crescimento e o rendimento de grãos**. Porto Alegre: Departamento de Plantas de Lavoura - UFRGS, 2005. 31p.

NETO, M. E.; PITELLI, R. A.; BRASILE E, A. G. e TIMOSSI, P. C. Seletividade de herbicidas pós-emergentes aplicados a soja geneticamente modificada. **Planta Daninha**, Viçosa – MG, v.27, n.2, p.345-352, 2009.

NEVES R.; FLECK, N. G.; SILVEIRA, C. A. DA; COSTA, E. L. N. Ação de herbicidas sistêmicos não-seletivos sobre a progênie de soja quando aplicados durante a fase reprodutiva das plantas-mãe. **Ciência Rural**, v.28, n.3, Santa Maria,1998.

PADGETTE, S. R.; KOLACZ, K. H.; DELANNAY, X.; RE, D. B.; LAVALLEE, B. J.; TINIUS, C. N.; RHODES, W. K.; OTERO, Y. I.; BARRY, G. F.; EICHHOLTZ, D. A.; PESCHKE, V. M.; NIDA, D. L.; TAYLOR, N. B. E; KISHORE, G. M. Development, Identification, and Characterization of a *Glyphosate*-Tolerant Soybean Line. **Crop Science**, v.35, p.1451-1461, 1995.

PINTO, F. S. A. Híbridação em soja <<http://www.ufv.br/dbg>> Acesso em: 23 de novembro de 2009.

PLINE, W. A.; PRICE, A. J.; WILCUT, J. W.; EDMISTEN, K. L.; WELLS, R. Absorption and translocation of *glyphosate* in *glyphosate*-resistant cotton as influenced by application method and growth stage. **Weed Science**, v.49, p. 460–467, 2001.

PLINE, W. A.; VIATOR, R.; WILCUT, J. W.; EDMISTEN, K. L.; THOMAS, J.; WELLS, R. Reproductive abnormalities in *glyphosate*-resistant cotton caused by lower CP4-EPSPS levels in the male reproductive tissue **Weed Science**, v. 50, p.438–447, 2002.

REDDY, N. K.; ZABLATOWING, R. M. *Glyphosate*-resistant soybean response to various salt of *glyphosate* and *glyphosate* accumulation in soybean nodules. **Weed Technology**, v.51, n.4, p.496-502, 2003.

ROE, R. M.; BURTON, J. D.; KUHR, R. J. **Herbicide activity: Toxicology, biochemistry and molecular biology**. ed. IOS press, 1997.

ROMAN, E. S.; BECKIE, H.; VARGAS, L.; HALL, L.; RIZZARDI, M. A.; WOLF, T. M. **Como funcionam os herbicidas: da biologia à aplicação**. Passo Fundo (RS): Berthier, 2007. 160p.

SAAD, O. **A vez dos herbicidas**. 2 ed. São Paulo, Nobel, 1981.

SAMMONS, R. D.; HEERING, D. C.; DINICOLA, N.; GLICK, H.; ELMORE, G. A. Sustainability and stewardship of *glyphosate* and *glyphosate*-resistant crops. **Weed Technology**, v.21, 2007.

SATHASIVAN, K.; HAUGHN, G. W.; MURAI, N. Nucleotide sequence of a mutant acetolactate synthase gene from an imidazolinone-resistant *Arabidopsis thaliana* var. Columbia. **Nucleic Acids Research**, v.18, n.8, p.2188, 1990.

SILVA, A. F. ; FERREIRA, E. A.; CONCENÇO, G., FERREIRA, F. A.; ASPIAZU, I.; GALON, L.; SEDIYAMA, T.; SILVA, A. A. Densidades de plantas daninhas e épocas de controle sobre os componentes de produção da soja. **Planta daninha**, v.26, n.1, Viçosa, jan./mar. 2008.

TRANDEL, P. J.; WRIGHT, T. R. Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? **Weed Science**, v.50, 2002.

- VIDAL, R. A.; MEROTTO JUNIOR, A. **Herbicidologia**. Porto Alegre: Edição dos Autores, 2001.
- VOLENBERG, D. S.; STOLTENBERG, D. E.; BOERBOOM, C. M. Biochemical mechanism and inheritance of cross-resistance to acetolactate synthase inhibitors in giant foxtail. **Weed Science**, v.49, 2001.
- VOLL, E. et al. Competição relativa de espécies de plantas daninhas com dois cultivares de soja. **Planta Daninha**, v.20, n.1, p. 17-24, 2002.
- WALKER, D. R.; et al. Gametic selection by *glyphosate* in soybean plants hemizygous for the CP4 EPSPS transgene. **Crop Science**, v.46, p.30-35, 2006.
- WARREN, G. F. **Curso intensivo de herbicidas**. Viçosa: Universidade Rural do Estado de Minas Gerais, 1967. 89p.
- YE, G. N.; HAJDUKIEWICZ, P. T. J.; BROYLES, D.; RODRIGUEZ, D.; XU, C. W.; NEHRA, N.; STAUB, J. M. Plastid-expressed 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase genes provide high level *glyphosate* tolerance in tobacco. **Plant Journal**, v.25, n.3, p.261-270, 2001.
- YOUNG, B. G., YOUNG, J. M. Soybean development and yield as affected by three postemergence herbicides. **Agronomy Journal**, v.95, p.1152-1156, 2003.
- ZHU, J.; PATZOLDT, W. L.; SHEALY, R. T.; VODKIN, L. O.; CLOUGH, S. J.; TRANEL, P. J. Transcriptome Response to *Glyphosate* in Sensitive and Resistant Soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.6355–6363, 2008.