

PAULO ZANCHETTA PASSAMANI

**ADAPTAÇÃO DA METODOLOGIA DE ENSAIO COMETA PARA AVALIAÇÃO DE
GENOTOXICIDADE DO GLIFOSATO EM MILHO (*Zea mays* L.).**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para a obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

Passamani, Paulo Zanchetta, 1987-
P285a Adaptação da metodologia de ensaio cometa para avaliação
2017 de genotoxicidade do glifosato em milho (*Zea mays* L.) / Paulo
Zanchetta Passamani. – Viçosa, MG, 2017.
vii, 79f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Carlos Roberto de Carvalho.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Milho - Efeito de herbicida - Análise. 2. Genética vegetal. 3. DNA. 4. Glifosato. 5. Toxicologia. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22 ed. 633.15

PAULO ZANCHETTA PASSAMANI

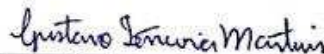
ADAPTAÇÃO DA METODOLOGIA DE ENSAIO COMETA PARA
AVALIAÇÃO DE GENOTOXICIDADE DO GLIFOSATO EM MILHO (*Zea
mays* L.).

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e
Estrutural, para a obtenção do
título de *Doctor Scientiae*.

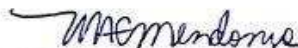
APROVADA: 28 de julho de 2017.



Denilce Meneses Lopes



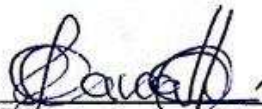
Gustavo Ferreira Martins



Maria Andréia Corrêa Mendonça



Milene Miranda Praça Fontes



Carlos Roberto de Carvalho
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, por toda a estrutura oferecida e pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa, fundamental para a condução desse trabalho.

Ao Prof. Carlos Roberto de Carvalho, pela orientação e por todos os ensinamentos transmitidos em todos esses anos de mestrado e doutorado.

Ao Prof. Cosme Damião Cruz, pelo auxílio nas análises estatísticas.

A todos os professores, tanto da graduação quanto da pós-graduação, que contribuíram para a minha formação acadêmica na UFV.

A todos os meus amigos do Laboratório de Citogenética e Citometria, por compartilharem essa fase comigo e tornarem esses anos muito mais agradáveis. Em especial à Fernanda e à Ana Paula, que estão desde o começo comigo, e à Natália, meu braço direito em todo este trabalho.

A todos os meus amigos de Viçosa, Belo Horizonte e Castelo. Em especial ao Rick e a Letícia pela parceria de sempre, e ao Pedro, pelo companheirismo importantíssimo nesta etapa final.

A todos os meus familiares, em especial aos meus pais Osmar e Tânia, pelo apoio em todos os momentos. Vocês são meus maiores exemplos.

À Deus, por todas as bênçãos conquistadas.

SUMÁRIO

Resumo	iv
Abstract.....	vi
Introdução Geral	1
Referências Bibliográficas	5
Capítulo 1	
Resumo	9
Abstrat	10
Introdução	11
Objetivos	14
Materiais e Métodos.....	15
Resultados	21
Discussão	28
Conclusão	31
Referências Bibliográficas	32
Capítulo 2	
Resumo	36
Abstrat	37
Introdução	38
Objetivos	42
Materiais e Métodos.....	43
Resultados	49
Discussão	63
Conclusão	66
Referências Bibliográficas	67
Conclusão Geral	71
Anexos.....	72

RESUMO

PASSAMANI, Paulo Zanchetta, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2017. **Adaptação da metodologia de ensaio cometa para avaliação de genotoxicidade do glifosato em milho (*Zea mays* L.)**. Orientador: Carlos Roberto de Carvalho.

O milho (*Zea mays* L.), além de ser um dos grãos de maior importância econômica no mundo, é um importante modelo em diversos estudos com plantas. Em virtude da sua grande importância econômica, a minimização da perda na produtividade tem sido priorizada em pesquisas e em programas de melhoramento dessa cultura. O advento do uso de defensivos agrícolas é uma das alternativas adotadas mundialmente para assegurar aumento de produtividade, principalmente em plantações de milho. Os pesticidas são muito eficazes no controle das pragas e na manutenção do nível de produção, mas podem gerar danos a nível genético na planta. Uma forma de avaliar a ocorrência de danos na molécula de DNA tem sido pelo uso da técnica de ensaio cometa, ou eletroforese de célula única. A aplicação dessa metodologia é relativamente rápida, sensível e simples para quantificar danos e reparo no DNA, conforme verificado com sucesso em testes com células humanas e de diversos outros organismos. Portanto, torna-se imperativo e de grande importância a padronização desta técnica para a avaliação da genotoxicidade em plantas, principalmente em culturas de grande importância econômica. O presente trabalho adaptou a metodologia de ensaio cometa em milho, utilizando tanto folha como raízes. Nas adaptações envolvendo raízes, foram avaliados dois métodos de isolamento nuclear, utilizando protoplasto e *chopping*, incluindo testes para verificar o efeito da sincronização nuclear com

hidroxiureia (HU) nas raízes. O uso de núcleos oriundos de protoplasto se mostrou mais eficiente nos ensaios, bem como o tratamento com HU gerou núcleos sincronizados sem danos detectáveis no DNA. Tal procedimento foi útil para padronização do tamanho dos núcleos analisados. Nas adaptações metodológicas envolvendo núcleos oriundos de folhas, o ensaio cometa foi utilizado para avaliar a genotoxicidade associada ao tratamento com Roundup®, herbicida a base de glifosato, em dois híbridos de milho, um resistente à aplicação do herbicida e ou suscetível ao mesmo. Ambos os híbridos apresentaram danos nas moléculas de DNA. A planta não-resistente apresentou sinais de genotoxicidade associado a todos os tratamentos com glifosato. Já o híbrido resistente só teve danos genotóxicos nos tratamentos com as doses mais altas, indicando que a dose recomendada para uso do herbicida não gera danos no DNA deste híbrido.

ABSTRACT

PASSAMANI, Paulo Zanchetta, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2017. **Comet assay methodology adaptation for the assessment of glyphosate genotoxicity in maize (*Zea mays* L.)**. Adviser: Carlos Roberto de Carvalho.

Maize (*Zea mays* L.), besides being one of the greater economic importance grains in the world, is an important model in several studies with plants. Due to its great economic importance, the minimization of productivity loss has been prioritized in research and in breeding programs of this crop. The advent of the use of pesticides is one of the alternatives adopted worldwide to ensure increased productivity, especially in maize plantations. The pesticides are very effective in controlling pests and maintaining the production level, but can cause genetic damage to the plant. One way to assess the occurrence of DNA molecule damage has been through the use of the comet assay technique, or single cell electrophoresis. The application of this methodology is relatively fast, sensitive and simple to quantify DNA damage and repair, as successfully verified in tests with human cells and several other organisms. Therefore, it is imperative and of great importance the standardization of this technique for genotoxicity evaluation in plants, especially in great economic importance crops. The present work adapted the comet assay methodology in maize, using both leaf and roots. In the adaptations involving roots, two methods of nuclear isolation were evaluated, using protoplast and chopping, including tests to verify the effect of nuclear synchronization with hydroxyurea (HU) on the roots. The use of protoplast nuclei proved to be more efficient in the assays, as well as the treatment with HU generated synchronized nuclei without detectable DNA damage. Such procedure was useful for standardizing

the size of the nuclei analyzed. In the methodological adaptations involving nuclei originating from leaves, the comet assay was used to evaluate the genotoxicity associated with Roundup® treatment, glyphosate-based herbicide, in two maize hybrids, one resistant to herbicide application and the other susceptible to it. Both hybrids showed DNA molecule damages. The non-resistant plant showed genotoxicity signs associated with all glyphosate treatments. However, the resistant hybrid only had genotoxic damages in the highest dose treatments, indicating that the recommended dose for use of the herbicide does not generate damage in the DNA of this hybrid.

INTRODUÇÃO GERAL

O milho (*Zea mays* L.) é um dos grãos de maior importância econômica mundial, sendo um dos mais produzidos e comercializados. O Brasil encontra-se na terceira posição como maior produtor de milho no mundo (USDA, 2017). A produção de milho no Brasil, até o mês de abril, já tinha ultrapassado os 93 milhões de toneladas, com cerca de 12 milhões de hectares plantados, sendo a cultura de maior importância sócio-econômica do país. O milho é cultivado em todo o Brasil, tendo as regiões centro-oeste e sul como as maiores produtoras (IBGE, 2017).

Além de ser uma importante planta de caráter econômico, o milho é um importante organismo modelo de monocotiledônea para pesquisas fundamentais em plantas (Cao et al, 2014). Vários atributos da planta de milho, incluindo uma vasta coleção de mutantes, grandes cromossomos heterocromáticos e colinearidade gênica dentro das gramíneas, posicionaram esta espécie como uma peça central para pesquisas nas áreas de genética, citogenética e genômica (Strable and Scanlon, 2009).

Devido a sua importância, qualquer queda na produtividade gera muitos prejuízos. A principal causa na queda da produtividade são as chamadas pestes (ou pragas), que podem ser animais (insetos, ácaros, nematoides, minhocas, lesmas, pássaros, roedores), patógenos (vírus, bactérias, fungos) e ervas daninhas (plantas competitivas) (Oerke, 2006). Uma forma de controlar essas pestes é por meio da utilização de pesticidas. Os pesticidas (que incluem herbicidas, inseticidas e fungicidas) têm sido utilizados extensivamente para melhorar a produtividade de culturas, sendo aplicadas mais de 2,5 toneladas na agricultura mundial todo ano (Dimitrov et al, 2006). Porém, o uso de pesticidas apresenta impactos diretos em

humanos, afetando a saúde humana, e no meio ambiente, gerando contaminação de água, solo e ar, além de afetar outros organismos que não são alvos (Aktar et al, 2009).

A utilização de plantas geneticamente modificadas (resistentes a herbicidas e protegidas de insetos) tem reduzido significativamente o uso dos pesticidas nas culturas (Phipps and Park, 2002). De acordo com *The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications* (ISAAA), em 2016, cerca de 2,5 bilhões de hectares são cultivados com espécies geneticamente modificadas, sendo 27% no Brasil, e prevenindo a utilização de 619 milhões de kg de pesticidas no período de 1996-2015 (ISAAA, 2016).

Os pesticidas têm sido considerados agentes potencialmente mutagênicos, podendo causar mutações, alterações cromossômicas e danos no DNA (Bolognesi, 2003). Uma forma de avaliar essa genotoxicidade é por meio do ensaio cometa, que permite a visualização direta de danos no material genético de células individuais (Alvarez-Moya et al, 2011).

O ensaio cometa, ou eletroforese em gel de célula única (SCGE), é um método sensível de detecção de quebras na fita de DNA, amplamente utilizado em testes de genotoxicidade, biomonitoramento humano, ecogenotoxicologia e em pesquisas básicas sobre o mecanismo de dano e reparo da molécula de DNA (Collins, 2004).

O ensaio cometa consiste em fazer passar uma corrente elétrica pelas células lisadas, embebidas em gel de agarose de baixo ponto de fusão, sobre lâminas para microscopia (Betti et al., 1994). Com isso, o DNA fragmentado sai da célula lisada, formando um rastro semelhante a cauda de um cometa (Afanasieva et al., 2010).

A técnica foi primeiramente descrita por Östling e Johanson (1984), que desenvolveram a metodologia de eletroforese do DNA em microgel. Eles utilizaram radiação para gerar danos no DNA de células de mamíferos e observaram que, a extensão da cauda de DNA liberada era proporcional a quantidade de radiação utilizada (Fairbairn et al., 1995). A técnica foi então aprimorada por Singh et al. (1988), que atribuíram maior sensibilidade à técnica com a utilização de solução alcalina.

De acordo com Singh et al. (1988), o ensaio cometa é um método rápido, sensível e relativamente simples para medir danos no DNA. Essa técnica pode ser utilizada em uma vasta gama de organismos (humanos, animais, plantas), tanto em culturas *in vitro* com *in vivo*, desde que as amostras possam ser preparadas como suspensão de células únicas (Neri et al., 2015).

Existem dois tipos principais de protocolos disponíveis para a realização dos ensaios, estabelecidos de acordo com o pH da solução utilizada na eletroforese. No primeiro ensaio, conforme método original de Östling e Johanson (1984), o protocolo utiliza um tampão de pH neutro (7,0 – 8,0) para a realização da eletroforese, detectando quebras duplas e *cross-links* nas moléculas de DNA. Na outra versão, a alcalina, desenvolvida por Singh et al. (1988) a partir do método original, a eletroforese é realizada em tampão alcalino (pH >13,0). Nesse caso, a desnaturação da molécula de DNA detecta quebras de fita simples e duplas, sítios álcali-lábeis, ligações cruzadas e sítios de reparação por excisões incompletas (Kappel, 2007).

Variações na metodologia do ensaio cometa vêm sendo desenvolvidas a fim de aprimorar a avaliação dos danos no material genético (Collins, 2015). Spivak (2009) estabeleceu a utilização de múltiplas sondas fluorescentes juntamente com o ensaio cometa, unindo as técnicas de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) e de ensaio cometa, descrito como Comet-FISH. Enciso et al (2009) também

desenvolveram uma outra variação da técnica, na qual conseguiram diferenciar as quebras simples das quebras duplas na fita de DNA, utilizando para isso as eletroforeses em tampão alcalino e neutro no mesmo experimento, levando ao aparecimento de duas caudas no cometa (2T-Comet Assay). Outra variação, desenvolvida por Cortés-Gutiérrez et al. (2011) adaptou a metodologia do ensaio cometa alcalino para visualizar danos no DNA a nível subnuclear, utilizando para isso uma suspensão contendo cromossomos, originando assim o ensaio cometa de cromossomo único (Chromosome-Comet Assay).

O ensaio cometa tem sido amplamente utilizado em todo mundo, para diversas áreas de pesquisa, com as publicações na área duplicando nos últimos 10 anos. A maioria dos trabalhos tem se concentrado nas áreas de danos e reparos no DNA, apoptose, câncer e estresse oxidativo, sendo aplicados em humanos, mamíferos e culturas celulares (Neri et al, 2015).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFANASIEVA, K.; ZAZHYTSKA, M.; SIVOLOB, A. (2010) Kinetics of comet formation in single-cell gel electrophoresis: loops and fragments. *Electrophoresis*, 31: 512-519.

AKTAR, M.W.; SENGUPTA, D.; CHOWDHURY, A. (2009) Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisc Toxicol*, 2(1): 1-12.

ALVAREZ-MOYA, C.; SILVA, M.R.; ARÁMBULA, A.R.V.; SANDOVAL, A.I.; VASQUEZ, H.C.; MONTES, R.M.G. (2011) Evaluation of genetic damage induced by glyphosate isopropylamine salt using *Tradescantia* bioassays. *Genetics and Molecular Biology*, 34(1): 127-130.

BETTI, C.; DAVINI, T.; GIANNESI, L.; LOPRIENO, N.; BARALE, R. (1994) Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutat. Res.*, 307: 323-333.

BOLOGNESI, C. (2003) Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutat Res*, 543(3): 251-272.

CAO, J.; YAO, D.; LIN, F.; JIANG, M. (2014) PEG-mediated transient gene expression and silencing system in maize mesophyll protoplasts: a valuable tool for signal transduction study in maize. *Acta Physiol Plant*, 36: 1271-1281.

COLLINS, A.R. (2004) The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations. *Molecular Biotechnology*, 26: 249-261.

COLLINS, A.R. (2015) The comet assay: a heavenly method! *Mutagenesis*, 30: 1-4.

CORTÉS-GUTIÉRREZ, E.I.; DÁVILA-RODRÍGUEZ, M.I.; FERNÁNDEZ, J.L.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C.; GOLSÁLBEZ, A.; GOLSÁVEZ, J. (2011) New Application of the Comet Assay: Chromosome-Comet Assay. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 59(7): 655-660.

DIMITROV, B.D.; GADEVA, P.G.; BENOVA, D.K.; BINEVA, M.V. (2006) Comparative genotoxicity of the herbicides Roundup, Stomp and Reglone in plant and mammalian test system. *Mutagenesis*, 21(6): 375-382.

ENCISO, M.; SARASA, J.; AGARWAL, A.; FERNÁNDEZ, J.L.; GOLSÁVEZ, J. (2009) A two-tailed Comet assay for assessing DNA damage in spermatozoa. *Reproductive BioMedicine OnLine*, 18(5): 609-616.

FAIRBAIRN, D.W.; OLIVE, P.L.; O'NEILL, K.L. (1995) The Comet Assay: a comprehensive review. *Mutation Research*, 339: 37-59.

IBGE (2017) Levantamento sistemático da produção agrícola. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Abril, 2017.

ISAAA (2016) Global status of commercialized biotech/GM crops: 2016. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, n. 52.

KAPPEL, B.P. (2007) Avaliação do efeito fotoprotetor de três extratos de plantas da Antártica por diferentes modelos biológicos. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 91 f.

NERI, M.; MILAZZO, D.; UGOLINI, D.; MILIC, M.; CAMPOLONGO, A.; PASQUALETTI, P.; BONASSI, S. (2015) Worldwide interest in the comet assay: a bibliometric study. *Mutagenesis*, 30: 155-163.

OERKE, E.C. (2006) Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science*, 144: 31-43.

ÖSTLING, O.; JOHANSON, K.L. (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 123: 291-298.

PHIPPS, R.H.; PARK, J.R. (2002) Environmental benefits of genetically modified crops: global and european perspectives on their ability to reduce pesticide use. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 11: 1-18.

SINGH, N.P.; McCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* 175: 184–191.

SPIVAK, G. (2010) The Comet-FISH assay for the analysis of DNA damage and repair. *Methods Mol. Biol.*, 659: 129–145.

STRABLE, J.; SCANLON, M.J. (2009) Maize (*Zea mays*): a model organism for basic and applied research in plant biology. Cold Spring Harb Protoc.

USDA (2017) Grains: World markets and trade. United States Department of Agriculture – Foreign Agricultural Service, Junho, 2017.

CAPÍTULO 1

Adaptação da metodologia de ensaio cometa em núcleos oriundos de raízes de milho (*Zea mays* L.).

Paulo Zanchetta Passamani

Viçosa
Minas Gerais – Brasil
2017

RESUMO

PASSAMANI, Paulo Zanchetta. D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2017. **Adaptação da metodologia de ensaio cometa em núcleos oriundos de raízes de milho (*Zea mays* L.)**. Orientador: Carlos Roberto de Carvalho.

O ensaio cometa vem sendo utilizado em plantas desde a década de 80, e é muito empregado em vários estudos de toxicológicos em várias espécies de plantas. Porém, como a técnica utiliza células em suspensão, o material vegetal apresenta uma dificuldade que é a presença da parede celular. Para solucionar esse problema, foram desenvolvidos métodos de isolamento nuclear para tecidos vegetais. Um método é extração mecânica por meio de *slicing* ou *chopping*, e outro é por meio de digestão enzimática, formando protoplastos. O presente trabalho teve como objetivo a padronização do ensaio cometa em raízes de milho. Para isso, foram analisadas duas formas diferentes de isolamento nuclear: *chopping* e protoplasto. Além disso, também foi realizada uma sincronização do ciclo celular com hidroxureia (HU), sendo avaliado se este tratamento gerou danos no DNA. A metodologia de protoplasto se mostrou mais eficiente que a de *chopping*, gerando uma boa quantidade de núcleos isolados por lâmina e apresentando poucos cometas, o que representa poucos danos ao DNA associados à técnica. A sincronização com HU foi eficiente para a padronização dos tamanhos dos núcleos analisados no ensaio, e também não apresentou danos adicionais à molécula de DNA, não aumentando a quantidade de cometas.

ABSTRAT

PASSAMANI, Paulo Zanchetta. D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2017.
Comet assay methodology adaptation to nuclei from maize roots (*Zea mays* L.).
Adviser: Carlos Roberto de Carvalho.

The comet assay has been used in plants since the 1980s, and is widely used in several toxicology studies on various plant species. However, as the technique uses cells in suspension, the plant material presents a difficulty that is the presence of the cell wall. To solve this problem, nuclear isolation methods for plant tissues have been developed. One method is mechanical extraction through slicing or chopping, and another is through enzymatic digestion, forming protoplasts. The present work had as objective the standardization of the comet assay in maize roots. For this, two different forms of nuclear isolation were analyzed: chopping and protoplast. In addition, a cell cycle synchronization with hydroxyurea (HU) was also performed, and it was evaluated whether this treatment generated DNA damage. The protoplast methodology was more efficient than chopping, generating a good amount of nuclei isolated per slide and presenting few comets, which represents little DNA damage associated to the technique. The synchronization with HU was efficient for the standardization of the nuclei sizes analyzed in the assay, and also did not present additional DNA molecule damages, not increasing the number of comets.

INTRODUÇÃO

O ensaio cometa, ou eletroforese em gel de célula única (SCGE), foi primeiramente descrito na década de 80 como uma técnica de microeletroforese para a visualização direta de danos no DNA em células individuais (Östling and Johanson, 1984). Os primeiros relatos de sua utilização em plantas datam da década de 90 (Cerdeira et al., 1993; Koppen and Verschaeve, 1996; Navarrete et al., 1997; Gichner and Plewa, 1998), e por mais de uma década essa técnica permaneceu restrita a alguns estudos toxicológicos em poucas espécies vegetais, incluindo *Allium cepa*, *Nicotiana tabacum*, *Vicia faba* and *Arabidopsis thaliana* (Gichner et al., 2009; Ventura et al., 2013). Nos últimos anos, a aplicação de ensaio cometa em plantas vem crescendo, principalmente em estudos de ecotoxicologia de diversas espécies vegetais (Santos et al., 2015).

Tradicionalmente, os ensaios cometas são realizados utilizando células em suspensão, que são embebidas em agarose e lisadas em tampão com detergente e alta concentração salina (Collins et al, 2008). A lise ajuda a remover membranas e solubilizar os componentes celulares, deixando o DNA superenovelado exposto (Azqueta et al, 2014). Entretanto, a presença de parede celular dificulta a realização do ensaio cometa em plantas (Santos et al, 2005). Para solucionar esse problema, foi desenvolvido um método simples e eficiente de extração mecânica para isolar os núcleos de espécies vegetais (Cerdeira et al, 1993) (Figura 1).

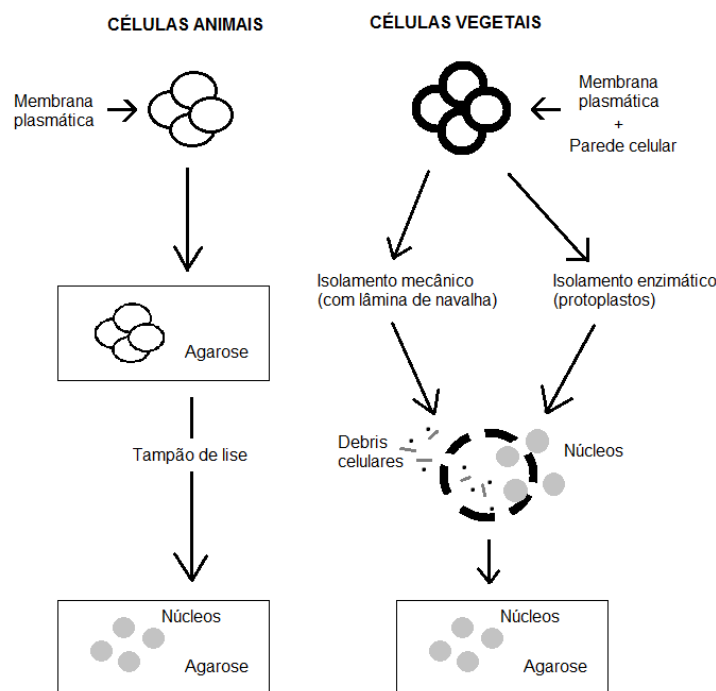


Figura 1: Representação esquemática dos diferentes procedimentos para a obtenção da lâmina para o ensaio cometa com células animais e vegetais (Modificado de Ventura et al, 2013)

A extração de núcleos a partir de material foliar é realizada por meio do corte da superfície da folha em forma de franjas, em um tampão de extração, com o auxílio de uma lâmina de navalha (Gichner and Plewa, 1998). Quando o procedimento utiliza raízes, a extração é feita por meio de cortes transversais sucessivos nas mesmas (*slicing*), também em um tampão de extração e com auxílio de navalha (Navarrete et al, 1997).

Outra forma de isolamento celular em plantas é por meio da formação de protoplastos, no qual o tecido vegetal é submetido a um tratamento enzimático para digerir a parede celular, liberando a célula e os núcleos para os procedimentos do ensaio cometa (Kuzminsky et al, 2016) (Figura 1).

Protoplastos são denominadas as células vegetais vivas que tiveram suas paredes celulares removidas de forma enzimática ou mecânica, e essas células são

utilizadas em diversos estudos de membranas biológicas, processos e atividades celulares, variação somaclonal e manipulação de DNA (Eeckhault et al, 2013). As metodologias para a obtenção de protoplastos permite obter uma grande quantidade de núcleos, o que é ideal para a realização de ensaios cometas, porém os protocolos para esse isolamento para poucas espécies, geralmente herbáceas (Kuzminsky et al, 2016). Em milho, existem poucos trabalhos sobre a obtenção de protoplastos, com os trabalhos envolvendo protoplastos oriundos de raízes sendo muito antigos (Lin, 1980; Lynch et al, 1987). Portanto, é importante estabelecer um protocolo eficiente de isolamento de protoplastos em raízes de milho, além de avaliar se este é o melhor método de isolamento nuclear para a utilização em ensaios cometa.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Adaptar a metodologia de ensaio cometa para testes de genotoxicidade em núcleos de células oriundas de raízes de milho (*Zea mays* L.).

Objetivos Específicos

- Estabelecer o método mais eficiente para o isolamento celular em raízes de milho;
- Sincronizar o ciclo celular do meristema radicular com a utilização de hidroxiuréia (HU), para padronizar o tamanho dos núcleos analisados;
- Avaliar o nível de danos no DNA associados aos diferentes tratamentos realizados, utilizando a técnica do ensaio cometa.

MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram realizados no Laboratório de Citogenética e Citometria do Departamento de Biologia Geral (DBG) da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Material biológico

Sementes comerciais de *Zea mays*, cultivar AL Bandeirantes, foram utilizadas para a germinação de raízes, das quais foram obtidos os isolamentos de protoplastos.

Germinação das sementes

Para a obtenção de raízes, as sementes de *Z. mays* primeiramente passaram por um processo de quebra de dormência, no qual elas ficaram imersas em H₂O por 24 horas, a temperatura ambiente.

Após as 24 horas, as sementes foram germinadas em placas de Petri, com papel filtro umedecido, e foram mantidas em estufa, a uma temperatura controlada de 28-30 °C. As sementes permaneceram nessas condições até as raízes atingirem cerca de 1 cm de comprimento.

Sincronização do ciclo celular

As raízes foram imersas em um recipiente contendo uma solução de sincronização por 18 horas a 30 °C. A solução de sincronização é composta por 1,75 µM de Hidroxiureia (HU; Sigma®) em meio MS (Murashige e Skoog 1962; Sigma®). Foram utilizadas 15 raízes para cada tratamento. Após esse tratamento, as raízes foram lavadas em água destilada a 30 °C por 3 vezes de 5 minutos.

As raízes, que não passaram pelo processo de sincronização, foram mantidas, nas mesmas condições citadas, em meio MS sem a adição de HU.

Isolamento nuclear

Para os procedimentos de ensaio cometa, a obtenção de um isolado de núcleos foi realizada de duas formas: por meio de um *chopping* das raízes ou por meio de isolamento de protoplastos.

Isolamento nuclear via *chopping*

As raízes (15 raízes de 1 cm) foram colocadas em placa de Petri (60 x 15 mm), sobre superfície gelada, onde foram adicionados 300 µl de solução de isolamento (400 mM de Tris-HCl [Sigma®], pH 7,5; 20% de polietileno-glicol [PEG; Merck®]). O isolamento foi realizado por meio de *chopping* de 30 segundos, com auxílio de uma lâmina de barbear. O material foi filtrado em filtro de nylon de 30 µm (Partec®) e

mantido a baixas temperaturas e no escuro até o momento de utilização no ensaio cometa.

Isolamento nuclear via protoplastos

As raízes (15 raízes de 1 cm) foram cortadas em 4 cortes longitudinais, com auxílio de uma lâmina de barbear, e os cortes foram em placa de Petri (30 x 15 mm) contendo 3 ml de solução enzimática. Foram testadas duas misturas enzimáticas diferentes, seguindo os protocolos de Lin (1980) e de Lynch et al (1987), respectivamente. A primeira solução enzimática foi composta por 2% de Cellulysin® (Calbiochem), 1% Hemicellulase (Sigma®) e 0,5% Pectoliase (Sigma®), diluídas em CPW 13 M (pH 5,6). A segunda mistura enzimática foi de 2% de Cellulysin® (Calbiochem) e 0,1% de Pectolyase Y-23 (MP Biomedicals), também diluída em meio CPW 13M (pH 5,6). A placa foi mantida por 4 horas a 30°C, no escuro, sob agitação constante de 80 rpm.

Após a digestão, o material foi filtrado em filtro de nylon com malha de 70 µm (BD Falcon™) e transferido para tubo Falcon de 15 ml. O filtrado foi diluído para 10 ml, com CPW 13M, e centrifugado a 85 G (700 rpm, centrífuga Excelsa II, Modelo 206 MP - Fanem®) por 5 minutos. Os detritos e a solução foram removidos utilizando uma pipeta de Pasteur, e o precipitado foi ressuspendido em 10 ml CPW 13M, para então ser centrifugado novamente. Este procedimento foi repetido por 4 vezes, para a purificação dos protoplastos, sendo que nas duas últimas vezes o CPW 13M foi substituído por tampão fosfato (PBS, pH 7,0). Após a última centrifugação, o material

é ressuspenso em 500 µl de PBS e armazenado a baixas temperaturas e no escuro até o momento de utilização no ensaio cometa e na citometria.

Citometria de fluxo

A suspensão celular, proveniente do isolamento dos protoplastos, foi incubada em 1 ml de CyStain® UV (Partec®), contendo o corante 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI), por 15 minutos, e posteriormente filtrada em filtro de nylon com malha de 30 µm (Partec®).

O material foi analisado no citômetro de fluxo Partec PAS® (Partec®), equipado com lâmpada de mercúrio (388 nm) para a excitação do DAPI. A fluorescência do DAPI (excitação: 435 nm) foi coletada através do filtro GG *band-pass*. O equipamento foi calibrado e alinhado utilizando *microbeads* e soluções padrões, de acordo com as recomendações do fabricante (Partec®). O software FlowMax (Partec®) foi utilizado para as análises. Cinco repetições independentes foram feitas, contando mais de 10.000 núcleos por vez. Picos com coeficiente de variação (CV) abaixo de 5% foram considerados o limite para análises adequadas na citometria de fluxo.

Ensaio Cometa

Todos os procedimentos descritos para os ensaios cometa foram realizados em ambiente com pouca intensidade de luz e a baixas temperaturas, a fim de evitar

danos adicionais à molécula de DNA, e seguiram o protocolo descrito por Gichner e Plewa (1998), com modificações.

Lâminas de microscópio, previamente limpas, foram mergulhadas em solução de agarose *normal melting point* (NMA; Invitrogen™) 1%, preparada em dH₂O, a 50 °C. A parte inferior das lâminas foi limpa, para retirar a camada de agarose, e elas foram deixadas na horizontal em estufa a 30 °C por 24 horas. Essas lâminas são mantidas em ambiente seco até a hora do uso.

Sobre cada uma das lâminas, previamente cobertas por agarose, foram aplicados 40 µl da suspensão nuclear e 60 µl de solução de agarose *low melting point* (LMA; Sigma®) 1% a 39 °C, prepara em PBS. A concentração final de agarose na mistura foi de 0,6%. Os núcleos e a LMA foram gentilmente misturados por meio de sucessivas pipetadas, utilizando uma ponteira descartável com a ponta cortada, e sobre a mistura foi colocada uma lamínula (24 x 50 mm). O conjunto foi incubado a 4 °C por 15 minutos, para depois as lamínulas serem retiradas.

Após a retirada das lamínulas, as lâminas foram colocadas em uma cuba horizontal de eletrofores, contendo o tampão de eletroforese recém preparado (tanto a cuba quanto o tampão devem estar gelados). O tampão de eletroforese utilizado foi um tampão alcalino modificado, composto por: 250 mM de Tris (Sigma®), 10 mM NaOH (Sigma®) e 1 mM de EDTA (Vetec), pH ~12. As lâminas foram incubadas nessa solução por 5 minutos, para o desenovelamento do DNA, seguindo após isso para a eletroforese a 0,8 V/cm (18V) por 15 minutos. Após a eletroforese, as lâminas foram lavadas em 3 trocas de 5 minutos cada em tampão de neutralização (400 mM de Tris [Sigma®], ph 7,5), e coradas com 100 µl de 50 µM de Acridine Orange (Sigma®) por 15 minutos. As lâminas foram mergulhadas em dH₂O gelada para retira o excesso de corante.

Análise e captura das imagens

As lâminas contendo os ensaios cometa foram observadas em fotomicroscópio Olympus™; modelo BX60, iluminação de campo claro e de fluorescência. As imagens foram capturadas diretamente por uma vídeo-câmera com CCD (Olympus™ DP71) acoplada ao microscópio e a um computador equipado com placa digitalizadora. Os cometas foram analisados com o software Comet Assay IV™ (Perceptive Instruments).

A análise foi feita com base no número de cometas presentes por lâminas (numa contagem de aproximadamente 200 núcleos por lâmina), assim como utilizando os parâmetros de intensidade da cauda e da cabeça dos cometas.

Análise estatística

Para todos os tratamentos, houveram 3 repetições independentes analisadas. O percentual de cometas em cada tratamento foi utilizado como dados para as análises de variância, e para a comparação de médias foi aplicado o teste de Tukey a 5% de probabilidade. Todas as análises estatísticas foram realizadas por meio do software GENES (Cruz, 2006).

RESULTADOS

Os procedimentos de isolamento de protoplastos se mostraram eficientes, sendo a mistura enzimática composta por Cellulysin® (Calbiochem) e Pectolyase Y-23 (MP Biomedicals) a que resultou em maior número de protoplastos isolados, ideais para a utilização no ensaio cometa (Figura 2).

O isolamento por meio do *chopping* também resultou em uma quantidade satisfatória de núcleos, porém apresentou estatisticamente uma quantidade de danos muito maior que o isolamento via protoplastos (Tabela 1; Figura 3).

Os cometas foram classificados em 5 tipos, de acordo com a intensidade da cabeça e da cauda (Tabela 2; Figura 4). Ambos os tratamentos apresentaram todos os tipos de cometas, porém o isolamento via *chopping* resultou em um número maior de cometas dos tipos 2 a 5 (Figura 5). Nesses procedimentos, foram encontrados dois padrões de cometas, de acordo com o tamanho da cabeça (Figura 6).

A sincronização celular, obtida por meio do tratamento com HU, foi satisfatória, concentrando mais núcleos na fase G1 se comparado com os núcleos das raízes não sincronizadas (Figura 7). Este tratamento com HU não apresentou diferença significativa na quantidade de cometas, se comparado com os núcleos não tratados (Tabela 4; Figura 3), apresentando quantidades similares dos diferentes tipos de cometas (Figura 8). Os cometas encontrados nas raízes sincronizadas apresentaram apenas os cometas com as cabeças menores, diferentemente das raízes não sincronizadas que apresentaram os dois padrões de tamanhos de cometas.

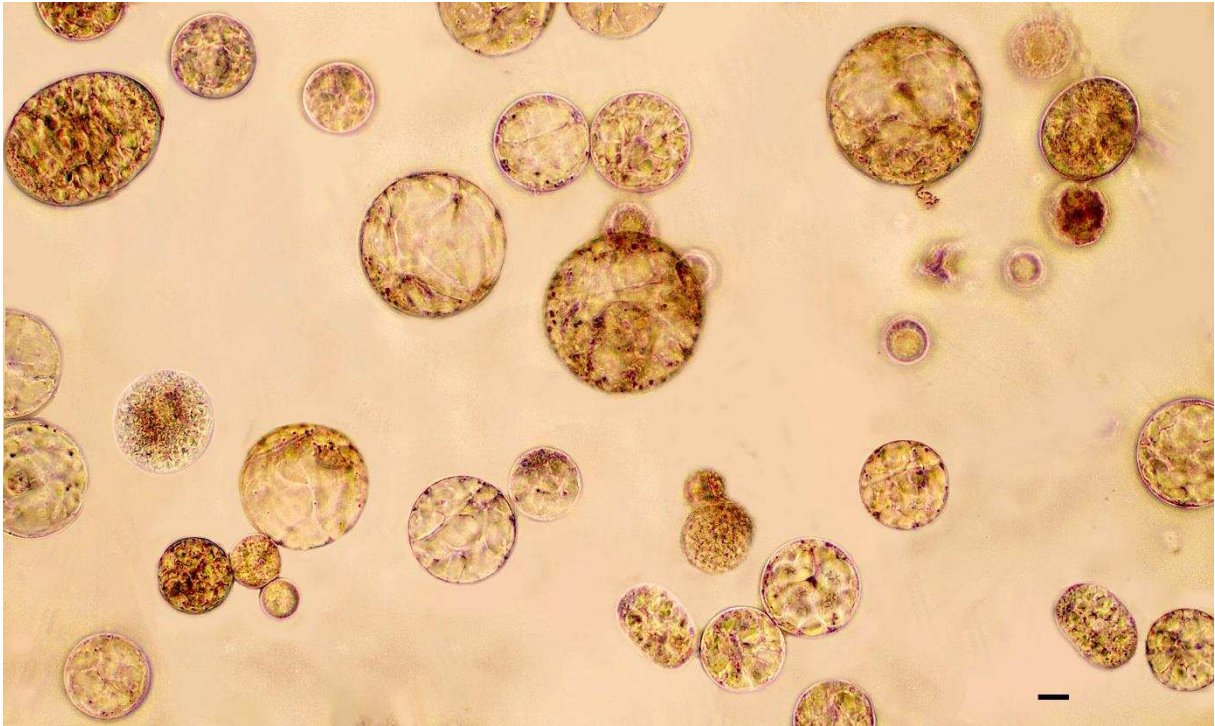


Figura 2: Micrografia dos protoplastos obtidos a partir das raízes de milho, mostrando a qualidade e o grande número de células obtidas. Barra = 5 μ m.

Tabela 1: Valores percentuais de cometas obtidos, em cada repetição, para cada tipo de isolamento nuclear realizado. Valores médios e desvios padrões utilizados nas comparações estatísticas.

Repetições	Tratamentos	
	Protoplasto	<i>Chopping</i>
1	10,73	53,93
2	14,22	40,12
3	12,18	46,93
Média	12,38	46,99
Desvio Padrão	1,75	6,91

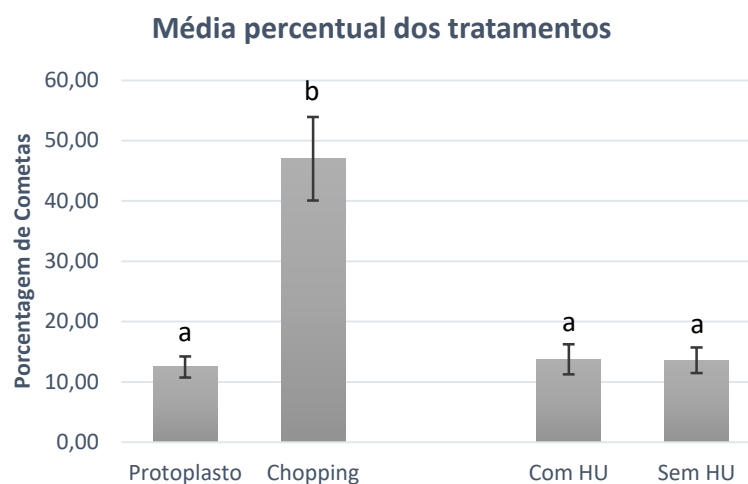


Figura 3: Gráfico de comparação entre as médias percentuais obtidas em cada um dos tratamentos realizados. Letras diferentes indicando diferença estatisticamente significativa.

Tabela 2: Critério de classificação dos 5 tipos de cometas encontrados.

Tipo de Cometa	Intensidade da Cabeça (Hi)	Intensidade da Cauda (Ti)
Tipo 1	100%	0%
Tipo 2	$75\% \leq Hi < 100\%$	$0\% < Ti \leq 25\%$
Tipo 3	$50\% \leq Hi < 75\%$	$25\% < Ti \leq 50\%$
Tipo 4	$25\% \leq Hi < 50\%$	$50\% < Ti \leq 75\%$
Tipo 5	$0\% \leq Hi < 25\%$	$75\% < Ti \leq 100\%$

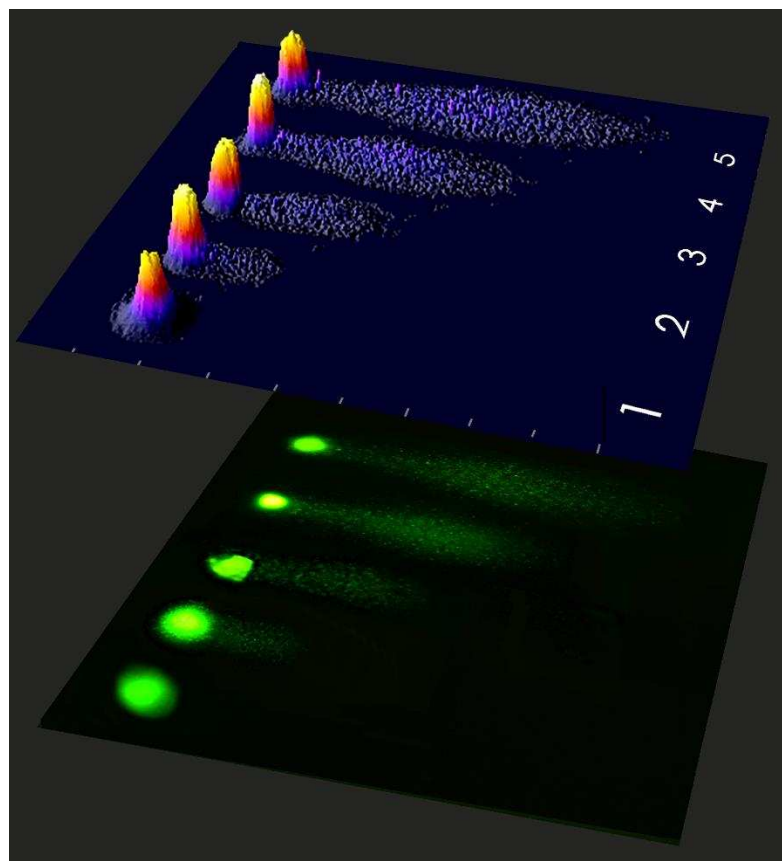


Figura 4: Micrografia mostrando os cinco tipos de cometas encontrados, evidenciando a intensidade na cabeça e na cauda de cada tipo por meio do esquema 3D.

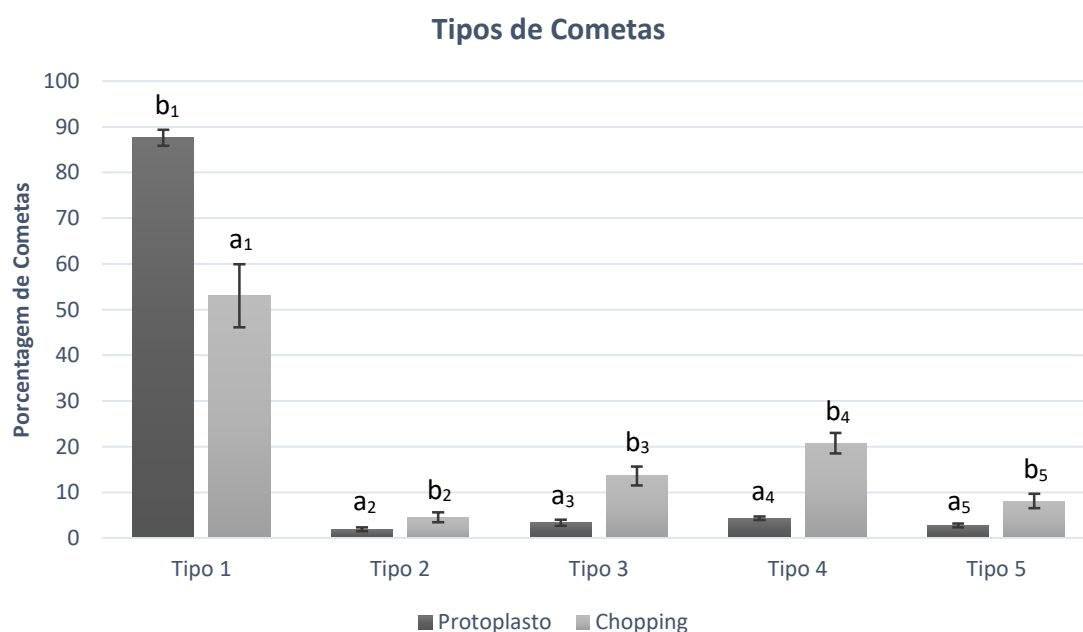


Figura 5: Gráfico da comparação das médias obtidas de cada tipo de cometa em cada um dos isolamentos diferentes. Comparações estatísticas analisada dentro de cada tipo; letras diferentes indicando diferença significativa entre os tratamentos.

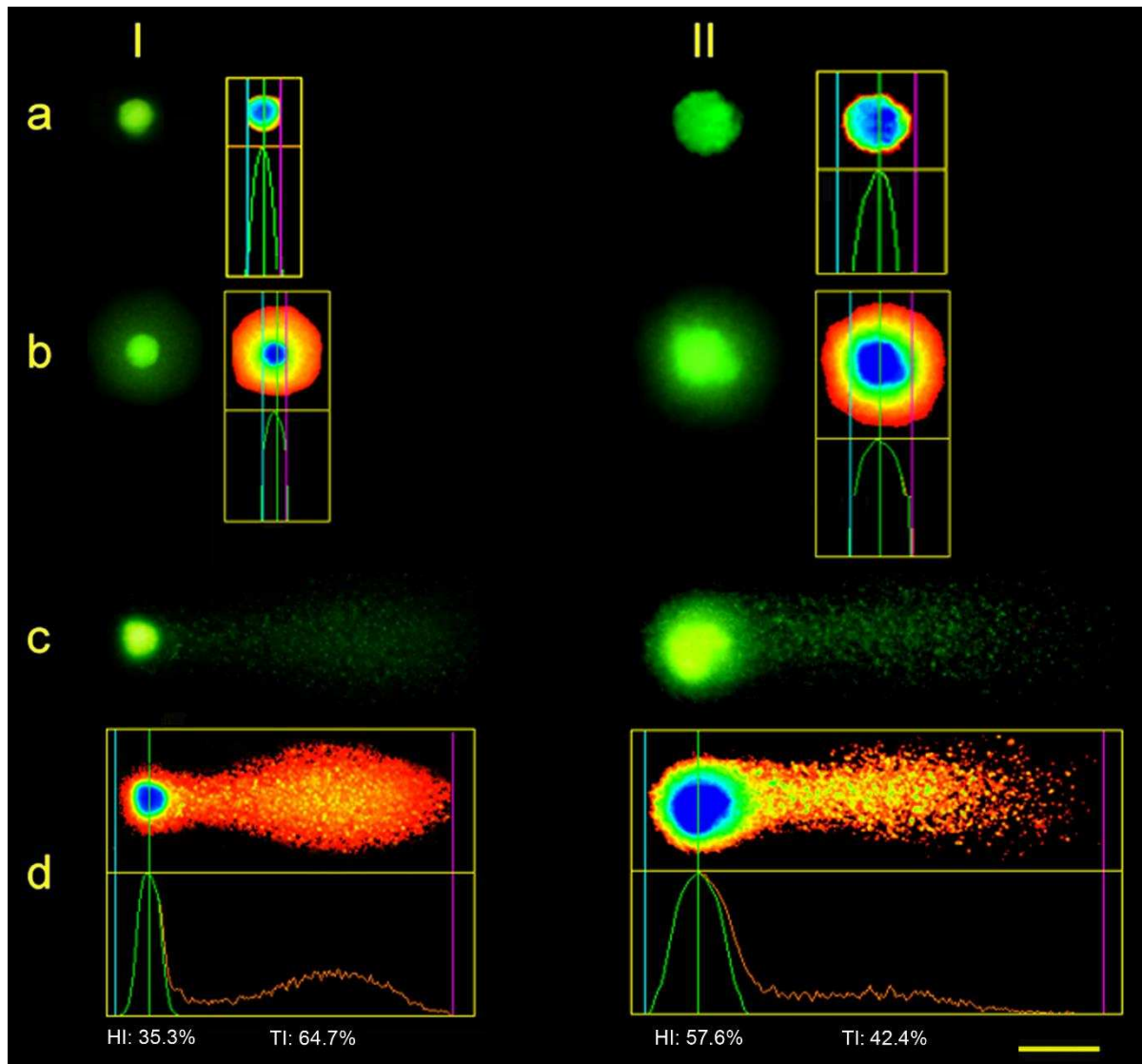


Figura 6: Micrografia mostrando a análise dos diferentes núcleos encontrados realizada pelo software Comet Assay IV™ (Perceptive Instruments), indicando a intensidade da cabeça (HI) e a intensidade da cauda (TI) utilizadas para a classificação dos tipos de cometas. Os cometas menores (I) correspondem aos núcleos na fase G1 e os cometas maiores (II) correspondem aos núcleos na fase G2. Barra = 50 μm .

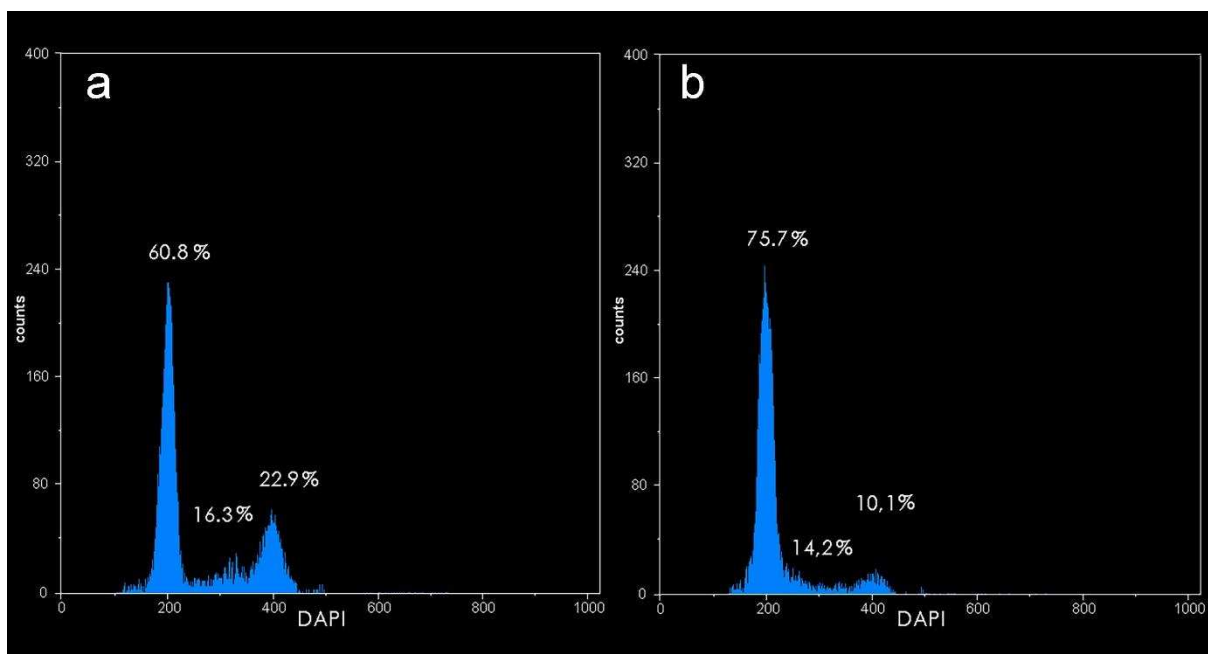


Figura 7: Histogramas obtidos por citometria de fluxo das suspensões celulares obtidas, coradas com DAPI, picos indicando os percentuais de células na população analisada que se encontram em cada ciclo celular. (a) corresponde a população não sincronizada com HU, enquanto (b) corresponde a população sincronizada.

Tabela 4: Valores percentuais de cometas obtidos, em cada repetição, para os núcleos sincronizados com HU e para os não sincronizados. Valores médios e desvios padrões utilizados nas comparações estatísticas.

Repetições	Tratamentos	
	Com HU	Sem HU
1	11,62	11,11
2	16,50	14,83
3	13,07	14,74
Média	13,73	13,56
Desvio Padrão	2,51	2,12

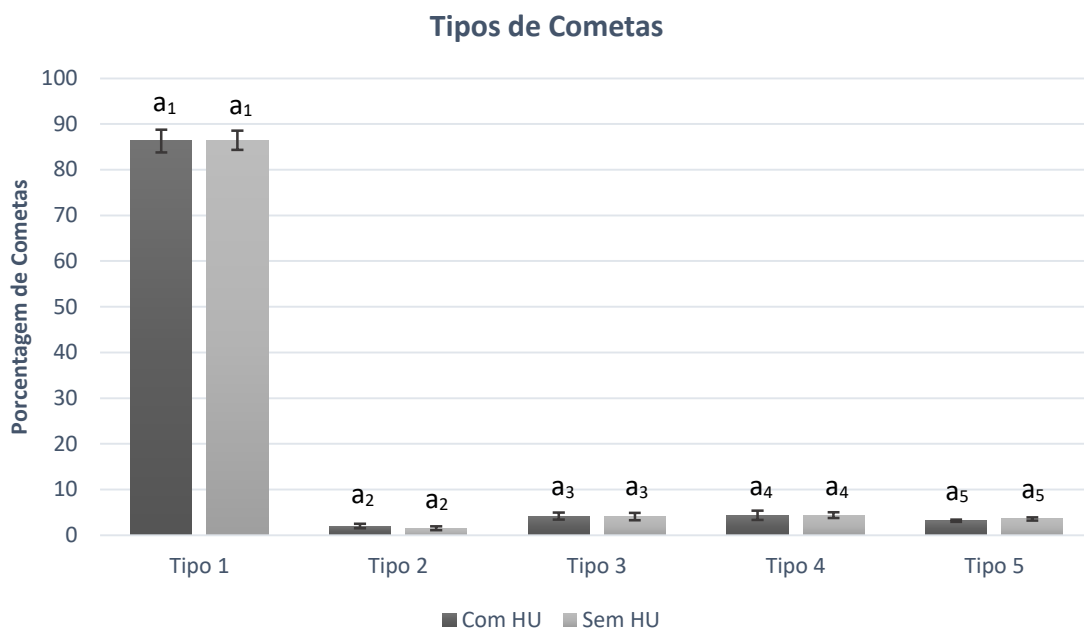


Figura 8: Gráfico da comparação das médias obtidas de cada tipo de cometa nas raízes sincronizadas com HU e nas não sincronizadas. Comparações estatísticas analisada dentro de cada tipo; letras diferentes indicando diferença significativa entre os tratamentos.

DISCUSSÃO

O procedimento de obtenção de protoplastos pode utilizar qualquer parte de plantas jovens como fonte de material, como radículas, cotilédones, hipocótilos, folhas, raízes e pelos radiculares (Davey et al, 2005). Porém, a maioria dos trabalhos tem utilizado folhas como fonte de protoplasto, por ser um sistema bem estabelecido (Chen et al, 2015). Os protocolos envolvendo a obtenção de protoplastos a partir de raízes de milho são bem antigos, mas se mostraram bem reprodutíveis, principalmente a metodologia descrita por Lynch et al (1987), gerando grande quantidade de células vegetais em suspensão, desprovidas da parede celular, ideais para a utilização nos protocolos de ensaio cometa.

Os ensaios cometas, em sua grande maioria, utilizam a versão alcalina, com o desenovelamento e eletroforese sendo realizados em tampão com pH maior que 13 (Azqueta et al, 2011). Essa metodologia é mais utilizada que a versão com tampão neutro (pH 7-8) por detectar tanto os danos de fita simples quanto os de fita dupla e por expor mais sítios susceptíveis a quebras em condições alcalinas (Santos et al, 2015). Entretanto, esse tampão com pH acima de 13 se mostrou muito forte nos procedimentos de ensaio cometa realizados, gerando uma quantidade de cometas muito altas em todos os tratamentos. A utilização de um tampão modificado, com pH 12, mostrou-se mais efetiva para a utilização no ensaio cometa em raízes de milho.

A maioria dos trabalhos utilizando raízes como fonte de núcleos para o ensaio cometa utilizam a técnica de *slicing* (pequenos cortes transversais consecutivos) para o isolamento nuclear (Gichner et al, 2008), porém essa técnica gera um baixo rendimento de núcleos por lâmina. Por isso, foram utilizadas as duas técnicas

alternativas para o isolamento nuclear: *chopping* das raízes e protoplasto. Ambas apresentaram alto rendimento, com mais de 200 núcleos por lâminas, porém o material oriundo do *chopping* apresentou mais danos no DNA, apresentando um percentual maior de cometas se comparado ao material oriundo de protoplastos, com aumento significativo dos cometas do tipo 2 a 5 (Figura 3, Tabela 3). Este fato já foi apontado por Pourrut et al (2015), em um trabalho com quatro diferentes espécies (*Arabidopsis thaliana*, *Allium cepa*, *Nicotiana tabacum* e *Vicia faba*), no qual foi observado um aumento de danos no DNA proporcional ao aumento no tempo de *chopping* aplicado na raiz.

Os dois padrões de tamanhos encontrados de cometas encontrados nas raízes não sincronizadas com HU correspondem aos núcleos nas fases G1 (cometas pequenos) e na fase G2/M (cometas grandes). Isto se dá pelo fato da região analisada ser uma região meristemática, com alta taxa de divisão celular, sendo encontradas duas populações bem distintas de núcleos (G0/G1 e G2/M) através da citometria de fluxo (Alarcón e Salguero, 2017). O tratamento com HU possibilita a sincronização das células meristemáticas na fase G1, uma vez que essa molécula inibe de forma reversível a ação da enzima ribonucleotídeo redutase de produzir todos os desoxiribonucleotídeos, impedindo a entrada das células na fase S (Dolezel et al, 1999). Essa sincronização possibilitou o acúmulo de núcleos pequenos (fase G1), tornando a população de núcleos observados na lâmina mais homogênea para as análises de ensaio cometa.

A sincronização com HU não apresentou uma toxicidade adicional aos núcleos, apresentando um percentual de cometas semelhante àquele encontrado nas raízes não sincronizadas, com todos os tipos de cometas em quantidades significativamente semelhantes (Figura 3, Tabela 4). Esses dados corroboram com a ideia de que as

plantas conseguem os efeitos tóxicos do tratamento de sincronização com HU (Temel e Gozukirmizi, 2015).

CONCLUSÃO

O isolamento de protoplastos a partir de raízes de milho se mostrou uma ótima alternativa como fonte de suspensão nuclear a ser utilizada nas técnicas de ensaio cometa. Isso se dá pela quantidade de núcleos obtidos por lâmina, além de apresentar uma menor quantidade de danos ao DNA associado ao procedimento. O *chopping* das raízes também apresentou uma quantidade satisfatória de núcleos, porém o procedimento gerou mais danos ao DNA, gerando uma quantidade maior de cometas associado à metodologia e não ao tratamento a ser analisado pelo ensaio.

Os dois padrões de tamanhos de cometas ocorreram pela presença de núcleos nas fases G1 (cometas pequenos) e G2 (cometas grandes), encontrados em grande quantidade nas raízes por se tratar de uma região meristemática. A utilização de HU para sincronizar o ciclo celular dessas raízes se mostrou eficiente para concentrar os núcleos na fase G1, deixando um padrão de cometas mais similares no tamanho para serem analisados. A sincronização não adicionou uma toxicidade extra ao procedimento, não gerando mais cometas que nas raízes não sincronizadas.

Portanto, o isolamento de protoplastos a partir de raízes sincronizadas com HU é o método mais eficiente para a obtenção de suspensões nucleares a serem utilizados em ensaios cometas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALARCÓN, M.V.; SALGUERO, J. (2017) Transition zone cells reach G2 phase before initiating elongation in maize root apex. *Biology Open*, 6: 909-913.

AZQUETA, A.; GUTZKOW, K.B.; BRUNBORG, G.; COLLINS, A.R. (2011) Towards a more reliable comet assay: optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions. *Mutat Res*, 724: 41-45.

AZQUETA, A.; SLYSKOVA, J.; LANGIE, S.A.S.; GAIVÃO, I.O.; COLLINS, A. (2014) Comet assay to measure DNA repair: approach and applications. *Frontiers in Genetics*, Vol. 5, Art. 288.

CERDA, H.V.; HOFSTEN, B.; JOHANSON, K. (1993) Identification of irradiated food by microelectrophoresis of DNA from single cells, *Proceedings of the workshop on Recent Advances on Detection of Irradiated Food*, (Brussels: Commission of the European Communities), 401–405.

CHEN, J.; YI, Q.; SONG, Q.; GU, Y.; ZHANG, J.; HU, Y.; LIU, H.; LIU, Y.; YU, G.; HUANG, Y. (2015) A highly efficient maize nucellus protoplast system for transient gene expression and studying programmed cell death-related processes. *Plant Cell Rep*, 34: 1239-1251.

COLLINS, A.R.; OSCOZ, A.A.; BRUNBORG, G.; GAIVÃO, I.; GIOVANNELLI, L.; KRUSZEWSKI, M.; SMITH, C.C.; STETINA, R. (2008) The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, 23(3): 143-151.

CRUZ, C.D. (2006) Programa Genes: Estatística experimental e matrizes. Editora UFV. Viçosa (MG). 285p.

DAVEY, M.R.; ANTHONY, P.; POWER, J.B.; LOWE, K.C. (2005) Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. *Biotech Advances*, 23: 131-171.

DOLEZEL, J.; CÍHALÍKOVÁ, J.; WEISEROVÁ, J.; LUCRETTI, S. (1999) Cell cycle synchronization in plant root meristems. *Methods in Cell Science*, 21: 95-107.

EECKHAUT, T.; LAKSHMANAN, P.S.; DERYCKERE, D.; BOCKSTAELE, E.V.; HUYLENBROECK, J.V. (2013) Progress in plant protoplast research. *Planta*, Agosto, 2013.

GICHNER, T.; PLEWA, M.J. (1998) Induction of somatic DNA damage as measured by single cell gel electrophoresis and point mutation in leaves of tobacco plants. *Mutat Res*, 401: 143-152.

GICHNER, T.; PATKOVÁ, Z.; SZÁKOVÁ, J.; ZNIDAR, I.; MUKHERJEE, A. (2008) DNA damage in potato plants induced by cadmium, ethyl methanesulphonate and γ -rays. *Environ Exp Bot*, 62: 113-119.

GICHNER, T.; ZNIDAR, I.; WAGNER, E.; PLEWA, M. (2009) The use of higher plants in the Comet Assay. *Issues in Toxicology* n° 5, *The Comet Assay in Toxicology*, (London: Royal Society of Chemistry), 98–119.

KOPPEN, G.; VERSCHAEVE, L. (1996) The alkaline comet test on plant cells: a new genotoxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba* root cells. *Mutat. Res.*, 360: 193–200.

KUZMINSKY, E.; MESCHINI, R.; TERZOLI, S.; PAVANI, L.; SILVESTRI, C.; CHOURY, Z.; SCARASCIA-MUGNOZZA, G. (2016) Isolation of mesophyll protoplasts from mediterranean woody plants for the study of DNA integrity under abiotic stress. *Frontiers in Genetics*, Vol. 7, Art. 1162.

LIN, W. (1980) Corn root protoplasts: isolation and general characterization of ion transport. *Plant Physiol*, 66: 550-554.

LYNCH, J.; CRAMER, G.R.; LÄUCHLI, A. (1987) Salinity reduces membrane-associated calcium in corn root protoplasts. *Plant Physiol*, 83: 390-394.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*, v. 15, p. 473-497.

NAVARRETE, M.H.; CARRERA, P.; MIGUEL, M.; TORRE, C. (1997) A fast Comet assay variant for solid tissue cells. The assessment of DNA damages in higher plants. *Mutat. Res.*, 389: 271–277.

ÖSTLING, O.; JOHANSON, K.L. (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 123: 291-298.

POURRUT, B.; PINELLI, E.; MENDIOLA, V.C.; SILVESTRE, J.; DOUAY, F. (2015) Recommendations for increasing alkaline comet assay reliability in plants. *Mutagenesis*, 30: 37-43.

SANTOS, C.L.V.; POURRUT, B.; OLIVEIRA, J.M.P.F. (2015) The use of comet assay in plant toxicology: recente advances. *Frontiers in Genetics*, Vol. 6, Art. 216.

TEMEL, A.; GOZUKIRMIZI, N. (2015) Cytotoxic effects of methafase-arresting methods in barley. *Cytology and Genetics*, 49(6): 382-387.

VENTURA, L.; GIOVANNINI, A.; SAVIO, M.; DONÀ, M.; MACOVEI, A.; BUTTAFAVA, A.; CARBONERA, D.; BALESTRAZZI, A. (2013) Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay with plants: research on DNA repair and ecogenotoxicity testing. *Chemosphere*, 92, 1–9.

CAPÍTULO 2

Avaliação da genotoxicidade do glifosato em milho (*Zea mays* L.), utilizando a técnica de ensaio cometa.

Paulo Zanchetta Passamani

Viçosa
Minas Gerais – Brasil
2017

RESUMO

PASSAMANI, Paulo Zanchetta. D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2017. **Avaliação da genotoxicidade do glifosato em milho (*Zea mays* L.), utilizando a técnica de ensaio cometa.** Orientador: Carlos Roberto de Carvalho.

O glifosato é um dos pesticidas mais utilizados em plantações no mundo, sendo a base do herbicida Roundup®, da Monsanto, e é um herbicida de amplo espectro utilizado em muitos cultivos. Ela atua inibindo uma enzima responsável pela síntese de aminoácidos aromáticos nos cloroplastos. Ainda hoje, existe muita divergência em relação ao caráter genotóxico do glifosato. Portanto, um trabalho com uma metodologia confiável para avaliar essa genotoxicidade é muito importante. Uma técnica rápida e precisa para detectar genotoxicidade *in vivo* e *in vitro*, em qualquer tipo de célula, é o ensaio cometa. O presente trabalho tem como objetivo utilizar a técnica de ensaio cometa para avaliar a genotoxicidade *in vivo* do glifosato em dois híbridos de milho (RB 9110 PRO, suscetível ao herbicida, e RB 9110 PRO2, resistente ao herbicida). Para isso, foram aplicados seis tratamentos, com diferentes diluições de Roundup®, nas plântulas de milho, e elas foram analisadas por meio do ensaio cometa 7 e 14 dias após a aplicação do herbicida. Foram observados danos fitotóxicos visíveis apenas nas plantas não-resistentes. Apesar disso, foram constatados danos genotóxicos em ambos os híbridos, porém em maior grau no não-resistente. As plantas resistentes apresentaram uma diferença significativa no percentual de cometas apenas nos tratamentos mais fortes (herbicida menos diluído), enquanto as plantas não-resistentes apresentaram mais cometas a partir da primeira diluição. Isso comprovou o caráter genotóxico do glifosato em milho, principalmente no híbrido não resistente.

ABSTRAT

PASSAMANI, Paulo Zanchetta. D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2017. **Genotoxicity evaluation of glyphosate in maize (*Zea mays* L.), using comet assay technique.** Adviser: Carlos Roberto de Carvalho.

Glyphosate is one of the most widely used pesticides in the world, being the basis of Monsanto's Roundup® herbicide, a broad spectrum herbicide used in many crops. It acts by inhibiting an enzyme responsible for the aromatic amino acids synthesis in chloroplasts. Even today, there is much divergence regarding the genotoxic character of glyphosate. Therefore, a work with a reliable methodology to evaluate this genotoxicity is very important. A rapid and accurate technique for detecting genotoxicity *in vivo* and *in vitro* in any cell type is the comet assay. The present work aims to use the comet assay technique to evaluate the *in vivo* genotoxicity of glyphosate in two maize hybrids (RB 9110 PRO, susceptible to the herbicide, and RB 9110 PRO2, resistant to the herbicide). For this, six treatments with different dilutions of Roundup® were applied to the maize seedlings, and they were analyzed by the comet assay 7 and 14 days after application of the herbicide. Phytotoxic damage was observed only in non-resistant plants. Despite this, genotoxic damage was observed in both hybrids, but to a greater degree in the non-resistant. Resistant plants showed a significant difference in the percentage of comets only in the strongest treatments (less diluted herbicide), while non-resistant plants showed more comets from the first dilution. This proved the genotoxic character of glyphosate in maize, especially in the non-resistant hybrid.

INTRODUÇÃO

Pesticidas têm sido utilizados amplamente na agricultura mundial, a fim de evitar perdas nas produções que geram prejuízos econômicos (Popp et al, 2013). Um dos pesticidas mais utilizados em todo o mundo é o herbicida glifosato, ficando atrás apenas do pesticida dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), utilizado como inseticida. Ambos foram primeiramente sintetizados muito antes de sua descoberta como agentes pesticidas (Székács and Darvas, 2012). O glifosato (N-fosfometil-glicina) é o ingrediente ativo principal do herbicida Roundup®, produzido pela companhia Monsanto, e é registrado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) como um herbicida de amplo espectro utilizado em muitos cultivos para fins alimentícios ou não (Mink et al, 2012).

O modo de atuação do glifosato é por meio da inibição da enzima 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), responsável pela síntese de aminoácidos aromáticos nos cloroplastos. A enzima EPSPS catalisa a transferência da porção enolpiruvil do fosfoenolpiruvato (PEP) para o shiquimato-3-fosfato (S3P) para produzir enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato (EPSP) (Pollegioni et al, 2011). O glifosato atua como uma molécula competidora pelo sítio de ligação ao PEP na enzima EPSPS, resultando em um complexo glifosato:EPSPS:S3P muito estável, com baixa taxa de reversão (Dill, 2005) (Figura 1).

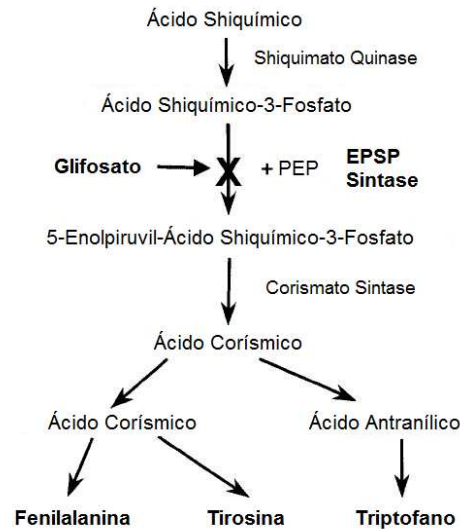


Figura 1: Modo de ação do glifosato (traduzido de Dill, 2005)

Existem três diferentes estratégias que foram utilizadas para introduzir resistência ao glifosato nas espécies cultivadas: a superexpressão da enzima EPSPS sensível ao glifosato, a detoxificação da molécula de glifosato e a expressão de uma enzima EPSPS que não seja sensível ao herbicida (Dill, 2005). A superexpressão da enzima ocorre como resultado da amplificação do gene que codifica EPSPS (Widholm et al, 2001). Já a detoxificação da molécula de glifosato é demonstrada por meio de duas rotas, que não ocorrem em plantas superiores em níveis significativos: uma rota resulta na formação de fosfato e sarcosina, enquanto a outra resulta na formação de ácido aminometil-fosfônico (AMPA) e glioxilato, que é relatada como glifosato oxidase (GOX) (CaJacob et al, 2004). Apesar desses dois métodos serem utilizados combinados na produção de canola resistente ao glifosato, estes métodos têm sido pouco empregados como mecanismos de resistências (Dill, 2005).

A estratégia de resistência mais utilizada nos cultivares comercializados é a empregada nos cultivares Roundup Ready® (RR), que expressam a enzima EPSPS insensível ao glifosato (Wagner et al, 2008). A linha de cultivares RR contém um gene derivado de *Agrobacterium* sp., a cepa CP4, codificando uma enzima tolerante ao

glifosato chamada CP4 EPSPS sintase (Funke et al, 2006). A expressão dessa enzima modificada permite que a rota do shiquimato funcione normalmente (Dill, 2005) (Figura 2).

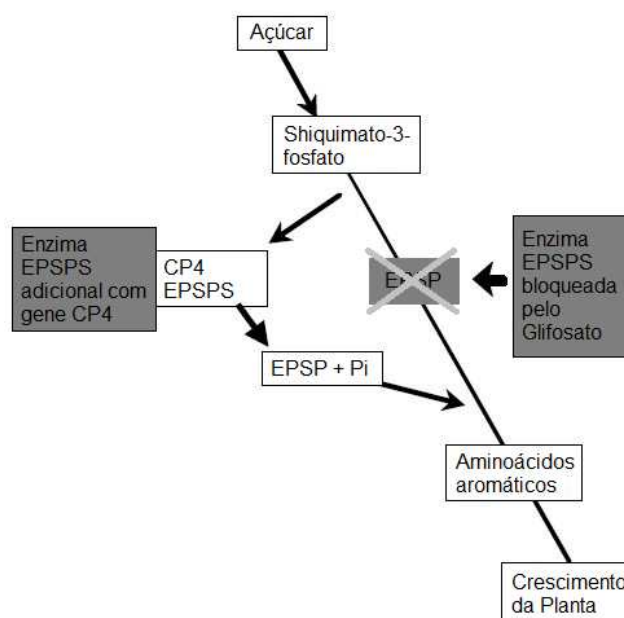


Figura 2: Esquema representativo de uma das estratégias de resistência ao glifosato (traduzido de Dill, 2005)

Apesar de ser um dos herbicidas mais utilizados no mundo, ainda existem muitas contradições sobre os efeitos genotóxicos do glifosato nos diferentes organismos (Alvarez-Moya et al, 2014). Muitos trabalhos apontam a ausência de efeitos adversos do glifosato em microorganismos do solo (Busse et al, 2001; Araújo et al, 2003), em plantas e ratos (Dimitrov et al, 2006), e a ausência de carcinogênese em ratos (Williams et al, 2000) e em humanos (Bolognesi et al, 2009). Em contrapartida, muitos estudos observaram uma alta genotoxicidade do glifosato em diversos organismos, como plantas (Alvarez-Moya et al, 2011), peixes (Cavalcante et al, 2008; Guilherme et al, 2012), répteis (Sparling et al, 2006) e humanos (Paz-y-Miño et al, 2007; Gasnier et al, 2009; Kwiatkowska et al, 2015). Portanto, para se chegar a

uma definição mais precisa sobre se há ou não genotoxicidade associada ao herbicida glifosato, faz-se necessário a realização de mais trabalhos, com teste confiáveis.

Uma importante e sensível técnica utilizada para avaliar danos no DNA em estudos de toxicologia e carcinogênese é o ensaio cometa (Singh et al, 1988). Esta técnica é baseada na eletroforese de células únicas, originando imagens semelhantes a cometas, com a intensidade da cauda dependendo da frequência de quebras que houve na molécula de DNA (Azqueta et al, 2014). O ensaio cometa é um método rápido para detectar genotoxicidade *in vivo* e *in vitro* em qualquer tipo de célula, sendo considerado um teste mais sensível que testes citogenéticos (Mañas et al, 2009).

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a genotoxicidade *in vivo* do herbicida glifosato em dois híbridos de milho (*Zea mays* L.), por meio da técnica de ensaio cometa.

Objetivos Específicos

- Estabelecer o procedimento de germinação *in vitro* das plântulas de milho, em condições adequadas para serem utilizadas como modelo nas demais etapas;
- Aplicar diferentes concentrações do herbicida a base de glifosa Roundup® nas plântulas;
- Analisar os danos fitotóxicos visíveis nas plântulas de milho;
- Padronizar a metodologia para a extração nuclear de folhas de *Z. mays* e as melhores condições de eficiência para a metodologia de ensaios cometa;
- Comparar os resultados obtidos pelo ensaio cometa com os efeitos fitotóxicos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram realizados no Laboratório de Citogenética e Citometria do Departamento de Biologia Geral (DBG) da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Material biológico

Sementes de dois híbridos de *Zea mays*, RB 9110 PRO e RB 9110 PRO2 (gentilmente fornecidas pelo Dr. Wagner Thompsom Estanislau – empresa Riber KWS Sementes S.A.), foram utilizadas para o estabelecimento *in vitro* de plântulas, as quais receberam os tratamentos com o herbicida.

O híbrido RB 9110 PRO2 tolera a aplicação pós-emergente de herbicida que contenha como ingrediente ativo o glifosato. Este híbrido foi produzido utilizando a tecnologia VT PRO 2™, desenvolvida pela Monsanto, que apresenta a resistência ao glifosato do Milho RR2. Já o híbrido RB 9110 PRO é susceptível ao tratamento com o mesmo herbicida. Portanto, para os fins deste trabalho, o híbrido RB 9110 PRO será chamado de híbrido Não-Resistente e, por sua vez, o híbrido RB 9110 PRO2 será intitulado híbrido Resistente.

Germinação das plântulas *in vitro*

Antes da germinação, as sementes de *Z. mays* passaram por um processo de desinfestação. Esse processo consistiu de esterilizações de 1 minuto em etanol 70 % e 20 minutos em hipoclorito de sódio 1,0-1,5 % (contendo 0,01 % Tween 20), seguidas de lavagens em dH₂O autoclavada (3 trocas de 5 minutos cada).

Após a desinfestação, as sementes foram colocadas para germinar em frascos de vidro contendo 100 ml de meio MS (Murashige e Skoog, 1962) meia força. Este meio de cultura é composto por 2,15 g/l de sal MS (Sigma®), suplementado com 10 ml/l de vitaminas MS, 30,0 g/l de sacarose (Sigma®), 0,1 g/l de mio-inositol (Sigma®) e 6,5 g/l de ágar (Sigma®). O pH foi ajustado para 5,8 e o meio esterilizado durante 20 minutos a 120 °C em 1,5 atm. As culturas foram mantidas em uma sala de crescimento vegetal climatizada, sob temperatura de 30 °C e o ciclo do fotoperíodo de 16/8 horas luz/escuro.

Aplicação do herbicida

O herbicida a base de glifosato utilizado foi o Roundup® original (Monsanto), que apresenta em sua fórmula 360 g/l de glifosato (N-[fosfonometil]-glicina). De acordo com informações do fabricante, a quantidade do herbicida a ser aplicada varia de acordo com a planta infestante alvo, sendo a diluição média de uso a de 1 parte de Roundup® para 100 de água. Sendo assim, foram feitas cinco diferentes diluições desse herbicida, em dH₂O, com duas diluições acima e duas abaixo da diluição

indicada a uso (1:1000; 1:500; 1:100; 1:50; e 1:10). Cada uma das diluições foi filtroesterelizada (filtro Millex®-GP de 0,22 µm [Millipore™]) antes da aplicação.

Os diferentes tratamentos foram aplicados pós-emergencialmente às plântulas. As diluições foram borrifadas sobre as plântulas após um período de 1 semana de germinação. Como controle negativo, foi borrifada dH₂O sobre as plântulas, seguindo os mesmos procedimentos. Os tratamentos foram realizados da mesma forma com plantas resistentes e as não-resistentes.

As plântulas foram analisadas em 7 e 14 dias após a aplicação (7 DAA e 14 DAA) de cada tratamento.

Isolamento nuclear

O isolamento nuclear foi realizado nas folhas provenientes de cada um dos tratamentos realizados. Um fragmento da folha, de aproximadamente 3 cm, foi selecionado e colocado em uma placa de Petri (60 x 15 mm), sobre uma superfície gelada, onde foi realizado o *slice* (cortes na folha em forma de franja), com o auxílio de uma lâmina de navalha. Esse *slice* foi realizado com a adição de 300 µl de tampão de isolamento: 400 mM Tris-HCl (Sigma®), pH 7,5, acrescido de 20 % polietileno-glicol (PEG; Merck®). Após o *slice*, as folhas cortadas ficaram imersas nesse tampão por aproximadamente 5 minutos.

Ensaio Cometa

Todos os procedimentos descritos para os ensaios cometa foram realizados em ambiente com pouca intensidade de luz e a baixas temperaturas, a fim de evitar danos adicionais à molécula de DNA, e seguiram o protocolo descrito por Gichner e Plewa (1998), com modificações.

Lâminas de microscópio, previamente limpas, foram mergulhadas em solução de agarose *normal melting point* (NMA; Invitrogen™) 1%, preparada em dH₂O, a 50 °C. A parte inferior das lâminas foi limpa, para retirar a camada de agarose, e elas foram deixadas na horizontal em estufa a 30 °C por 24 horas. Essas lâminas são mantidas em ambiente seco até a hora do uso.

Sobre cada uma das lâminas, previamente cobertas por agarose, foram aplicados 40 µl da suspensão nuclear e 60 µl de solução de agarose *low melting point* (LMA; Sigma®) 1% a 39 °C, prepara em PBS. A concentração final de agarose na mistura foi de 0,6%. Os núcleos e a LMA foram gentilmente misturados por meio de sucessivas pipetadas, utilizando uma ponteira descartável com a ponta cortada, e sobre a mistura foi colocada uma lamínula (24 x 50 mm). O conjunto foi incubado a 4 °C por 15 minutos, para depois as lamínulas serem retiradas.

Após a retirada das lamínulas, as lâminas foram colocadas em uma cuba horizontal de eletroforese, contendo o tampão de eletroforese recém preparado (tanto a cuba quanto o tampão devem estar gelados). O tampão de eletroforese utilizado foi um tampão alcalino modificado, composto por: 250 mM de Tris (Sigma®), 10 mM NaOH (Sigma®) e 1 mM de EDTA (Vetec), pH ~12. As lâminas foram incubadas nessa solução por 5 minutos, para o desenovelamento do DNA, seguindo após isso para a

eletroforese a 0,8 V/cm (18V) por 15 minutos. Após a eletroforese, as lâminas foram lavadas em 3 trocas de 5 minutos cada em tampão de neutralização (400 mM de Tris [Sigma®], pH 7,5), e coradas com 100 µl de 50 µM de Acridine Orange (Sigma®) por 15 minutos. As lâminas foram mergulhadas em dH₂O gelada para retirar o excesso de corante.

Análise e captura das imagens

As lâminas contendo os ensaios cometa foram observadas em fotomicroscópio Olympus™; modelo BX60, iluminação de campo claro e de fluorescência. As imagens foram capturadas diretamente por uma vídeo-câmera com CCD (Olympus™ DP71) acoplada ao microscópio e a um computador equipado com placa digitalizadora. Os cometas foram analisados com o software Comet Assay IV™ (Perceptive Instruments).

A análise foi feita com base no número de cometas presentes por lâminas (numa contagem de aproximadamente 200 núcleos por lâmina), assim como utilizando os parâmetros de intensidade da cauda e da cabeça dos cometas.

Análise estatística

Para todos os tratamentos, houveram 3 repetições independentes analisadas. O percentual de cometas em cada tratamento foi utilizado como dados para as análises de variância, e para a comparação de médias foi aplicado o teste de Tukey a 5% de

probabilidade. Todos as análises estatísticas foram realizadas por meio do software GENES (Cruz, 2006).

RESULTADOS

As diferentes diluições de Roundup® foram aplicadas nas plântulas e os danos fitotóxicos foram visualizados (Figuras 3 - 8). Foi possível notar que as plantas resistentes não apresentaram danos visíveis em nenhuma das aplicações, enquanto as plantas não-resistentes começaram a apresentar sinais de danos na aplicação das diluições mais baixas, como amarelamento das folhas e ausência de crescimento das plântulas.

O isolamento nuclear do material foliar foi eficaz, com quantidade de núcleos suficientes para as análises do ensaio cometa (mais de 200 núcleos para as contagens). A adição de PEG ao tampão de isolamento auxiliou na manutenção da integridade dos núcleos extraídos.

O nível de genotoxicidade foi medido por meio do ensaio cometa. Diferenças no percentual de cometas foi observado entre cada tratamento aplicado. Nas plantas resistentes, houve diferença significativa nos dois últimos tratamentos durante a análise dos 7 DAA, enquanto na análise dos 14 DAA houve diferença apenas no último tratamento (Tabela 1). Já nas plantas não-resistentes, os danos foram significativos a partir do quarto tratamento na análise dos 7 DAA, enquanto na análise dos 14 DAA a diferença já foi significativa a partir do segundo tratamento (Tabela 2).

Analisando as diferenças entre os 7 e os 14 DAA, as plantas resistentes apresentaram diferença significativa apenas no tratamento 5 (Figura 9), enquanto a diferença foi significativa apenas no tratamento 6 para as plantas não-resistentes (Figura 10). Quando se compara os tratamentos entre as plantas, nos 7 DAA houve diferença significativa entre as plantas resistentes e não-resistentes nos tratamentos

5 e 6 (Figura 11) e nos 14 DAA houve diferença em todos os tratamentos, com exceção do tratamento 1 (Figura 12).

Os cometas foram classificados em 5 tipos diferentes, de acordo com a intensidade da cabeça e da cauda (Tabela 3; Figura 13). As plantas resistentes apresentaram quantidades similares de todos os tipos de cometas para todos os tratamentos, com diminuição do tipo 1 e aumento dos tipos 4 e 5 nos tratamentos 5 e 6 das análises de 7 DAA e no tratamento 6 das análises de 14 DAA (Tabela 4). Nas plantas não-resistentes, houve queda na quantidade de cometas tipo 1 e aumento nas quantidades dos tipos 2 a 5 conforme os tratamentos foram aumentando (diminuindo as diluições do herbicida), tanto nas análises de 7 DAA quanto nas análises de 14 DAA (Tabela 5).



Figura 3: Crescimento das plântulas do híbrido resistente 7 dias após a aplicação das diferentes diluições do herbicida: (a) H₂O; (b) 1:1000; (c) 1:500; (d) 1:100; (e) 1:50; e (f) 1:10. Barra = 1 cm.



Figura 4: Crescimento das plântulas do híbrido resistente 14 dias após a aplicação das diferentes diluições do herbicida: (a) H₂O; (b) 1:1000; (c) 1:500; (d) 1:100; (e) 1:50; e (f) 1:10. Barra = 1 cm.



Figura 5: Crescimento das plântulas do híbrido não-resistente 7 dias após a aplicação das diferentes diluições do herbicida: (a) H₂O; (b) 1:1000; (c) 1:500; (d) 1:100; (e) 1:50; e (f) 1:10. Barra = 1 cm.



Figura 6: Crescimento das plântulas do híbrido não-resistente 14 dias após a aplicação das diferentes diluições do herbicida: (a) H₂O; (b) 1:1000; (c) 1:500; (d) 1:100; (e) 1:50; e (f) 1:10. Barra = 1 cm.



Figura 7: Folhas das plântulas do híbrido resistente 14 dias após a aplicação das diferentes diluições do herbicida: (a) H₂O; (b) 1:1000; (c) 1:500; (d) 1:100; (e) 1:50; e (f) 1:10. Barra = 1 cm.



Figura 8: Folhas das plântulas do híbrido não-resistente 14 dias após a aplicação das diferentes diluições do herbicida: (a) H₂O; (b) 1:1000; (c) 1:500; (d) 1:100; (e) 1:50; e (f) 1:10. Barra = 1 cm.

Tabela 1: Valores percentuais médios de cometas obtidos em cada um dos tratamentos aplicados nas plantas resistentes. Comparações estatísticas realizadas entre os tratamentos em cada dia analisado; letras diferentes indicando diferença significativa entre os tratamentos.

Plantas Resistentes						
Dias	Tratamentos					
	1- Água	2- 1:1000	3- 1:500	4- 1:100	5- 1:50	6- 1:10
7 DAA	8,17	7,29	11,24	12,23	19,27	22,47
	a ₁	a ₁	ab ₁	ab ₁	bc ₁	c ₁
14 DAA	4,51	5,63	6,56	6,19	5,58	16,38
	a ₂	a ₂	a ₂	a ₂	a ₂	b ₂

Tabela 2: Valores percentuais médios de cometas obtidos em cada um dos tratamentos aplicados nas plantas não-resistentes. Comparações estatísticas realizadas entre os tratamentos em cada dia analisado; letras diferentes indicando diferença significativa entre os tratamentos.

Plantas Não-Resistentes						
Dias	Tratamentos					
	1- Água	2- 1:1000	3- 1:500	4- 1:100	5- 1:50	6- 1:10
7 DAA	6,41	9,9	12,97	20,22	31,33	63,01
	a ₁	a ₁	ab ₁	b ₁	c ₁	d ₁
14 DAA	6,24	17,01	19,82	28,27	34,53	40,57
	a ₂	b ₂	bc ₂	cd ₂	de ₂	e ₂

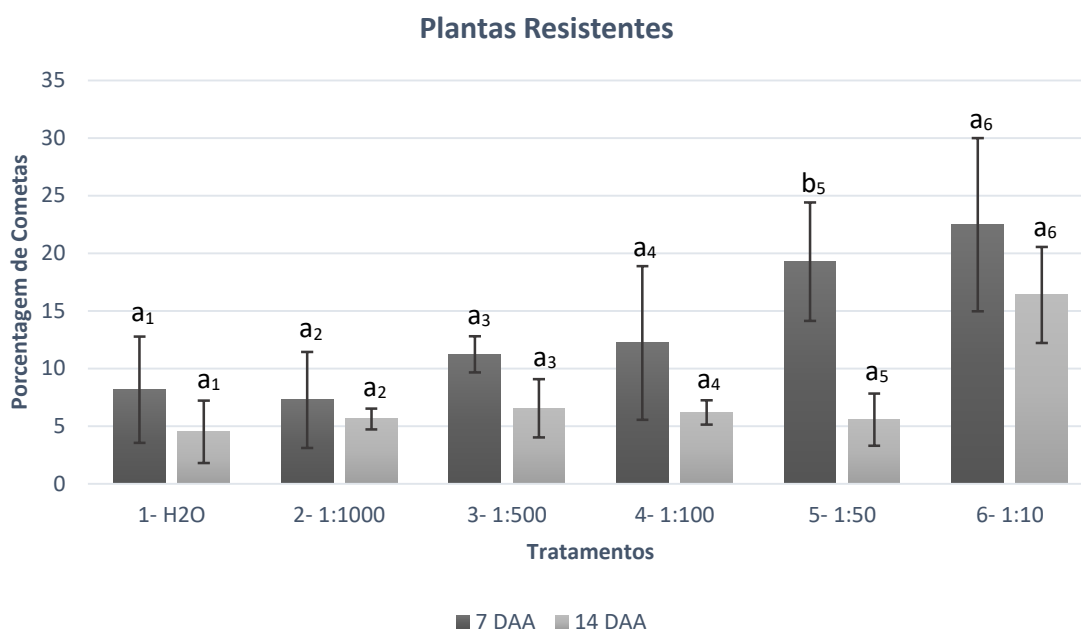


Figura 9: Gráfico de comparação entre as médias percentuais obtidas em cada um dos tratamentos realizados nas plantas resistentes. Comparação realizada entre os valores encontrados para cada dia analisado dentro de cada tratamento; letras diferentes indicando diferença significativa entre os tratamentos.

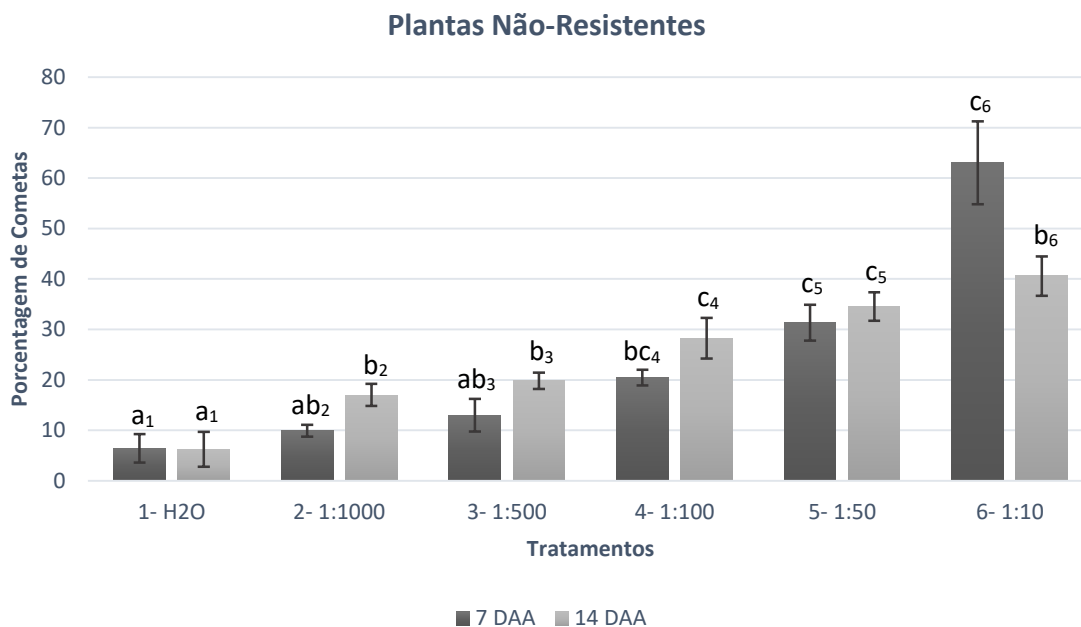


Figura 10: Gráfico de comparação entre as médias percentuais obtidas em cada um dos tratamentos realizados nas plantas não-resistentes. Comparação realizada entre os valores encontrados para cada dia analisado dentro de cada tratamento; letras diferentes indicando diferença significativa entre os tratamentos.

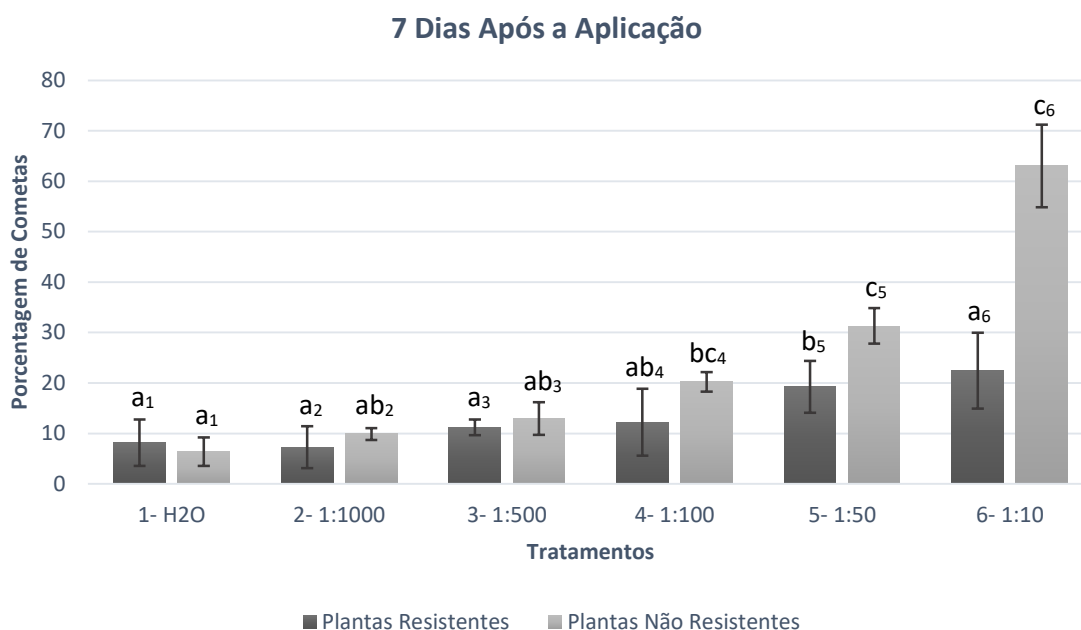


Figura 11: Gráfico de comparação entre as médias percentuais obtidas em cada um dos tratamentos analisado aos 7 DAA. Comparação realizada entre os valores encontrados para as plantas resistentes e não-resistentes dentro de cada tratamento; letras diferentes indicando diferença significativa entre os tratamentos.

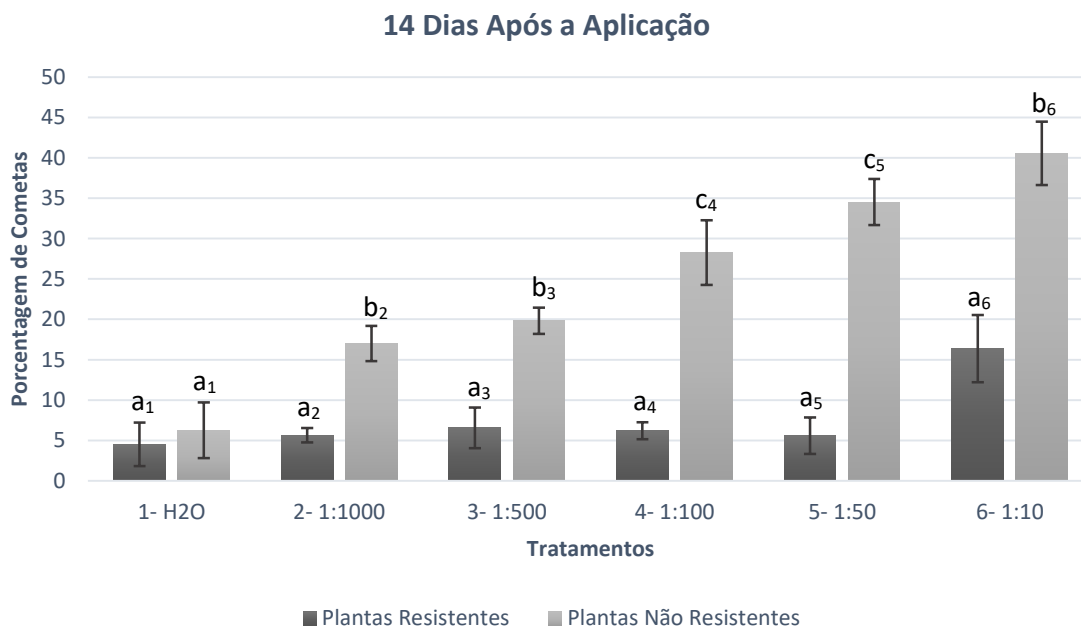


Figura 12: Gráfico de comparação entre as médias percentuais obtidas em cada um dos tratamentos analisado aos 14 DAA. Comparação realizada entre os valores encontrados para as plantas resistentes e não-resistentes dentro de cada tratamento; letras diferentes indicando diferença significativa entre os tratamentos.

Tabela 3: Critério de classificação dos 5 tipos de cometas encontrados.

Tipo de Cometa	Intensidade da Cabeça (Hi)	Intensidade da Cauda (Ti)
Tipo 1	100%	0%
Tipo 2	$75\% \leq Hi < 100\%$	$0\% < Ti \leq 25\%$
Tipo 3	$50\% \leq Hi < 75\%$	$25\% < Ti \leq 50\%$
Tipo 4	$25\% \leq Hi < 50\%$	$50\% < Ti \leq 75\%$
Tipo 5	$0\% \leq Hi < 25\%$	$75\% < Ti \leq 100\%$

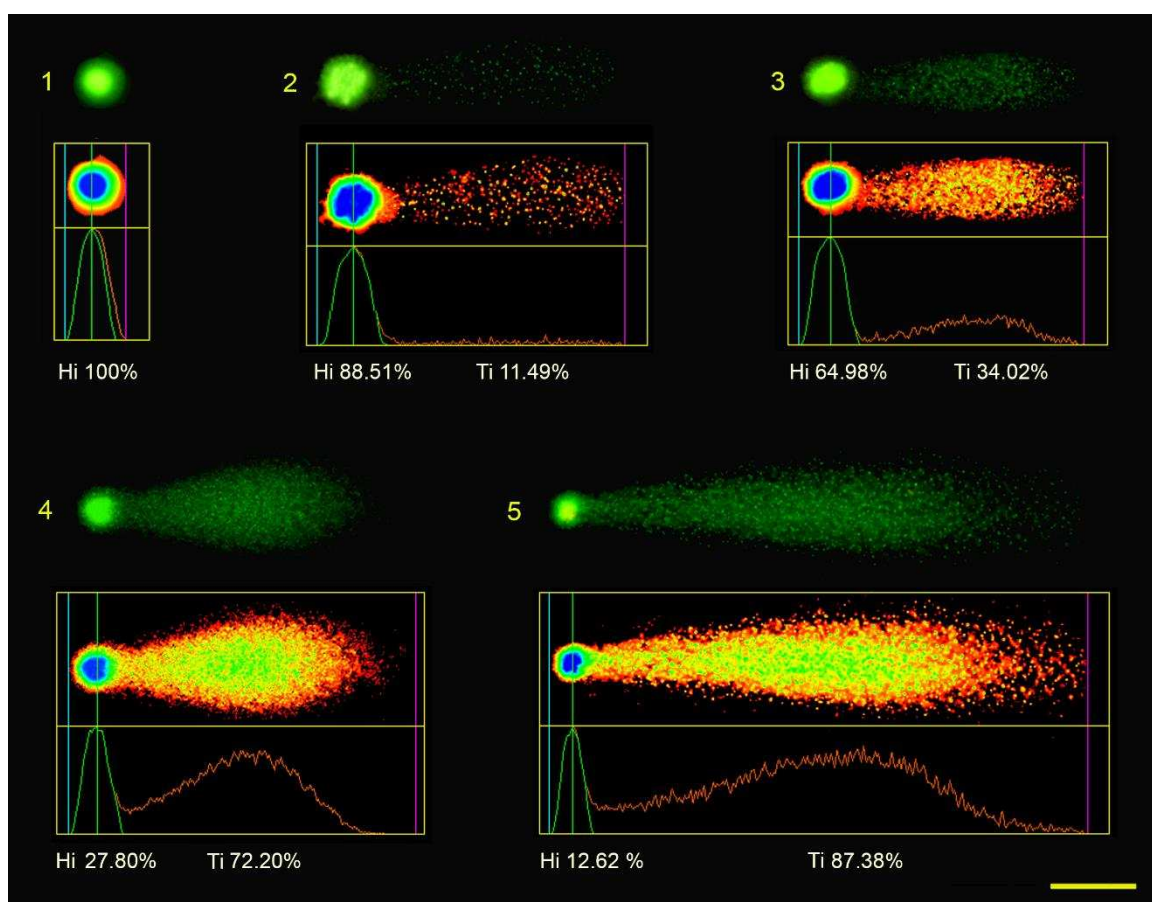


Figura 13: Micrografia indicando os diferentes tipos de cometas encontrados a análise dos diferentes núcleos encontrados. A intensidade da cabeça (HI) e a intensidade da cauda (TI), utilizadas para a classificação dos tipos de cometas, foi obtida por meio do software Comet Assay IV™ (Perceptive Instruments).

Tabela 4: Valores percentuais médios de cada tipo de cometa obtido para os diferentes tratamentos aplicados nas plantas resistentes. Comparações estatísticas realizadas entre os tratamentos para cada tipo de cometa; letras diferentes indicando diferença significativa entre os tratamentos.

Plantas Resistentes										
7 DAA										
Tratamentos	Tipos de Cometas									
	1		2		3		4		5	
1- Água	91,83	c ₁	3,61	a ₂	2,81	a ₃	0,97	a ₄	0,78	a ₅
2- 1:1000	92,71	c ₁	2,83	a ₂	3,25	a ₃	0,40	a ₄	0,81	a ₅
3- 1:500	88,76	bc ₁	3,85	a ₂	4,16	a ₃	0,45	a ₄	2,77	a ₅
4- 1:100	87,77	bc ₁	2,70	a ₂	3,81	a ₃	2,43	a ₄	3,29	ab ₅
5- 1:50	80,73	ab ₁	2,77	a ₂	4,88	a ₃	6,16	b ₄	5,46	b ₅
6- 1:10	77,53	a ₁	2,83	a ₂	4,72	a ₃	6,60	b ₄	8,32	c ₅
14 DAA										
Tratamentos	Tipos de Cometas									
	1		2		3		4		5	
1- Água	95,49	b ₁	1,88	a ₂	1,30	a ₃	0,19	a ₄	1,15	a ₅
2- 1:1000	94,37	b ₁	1,87	a ₂	2,08	a ₃	0,38	a ₄	1,31	a ₅
3- 1:500	93,44	b ₁	1,58	a ₂	1,94	a ₃	1,43	a ₄	1,61	a ₅
4- 1:100	93,81	b ₁	1,32	a ₂	1,73	a ₃	0,76	a ₄	2,37	ab ₅
5- 1:50	94,42	b ₁	1,13	a ₂	1,68	a ₃	1,10	a ₄	1,67	a ₅
6- 1:10	83,62	a ₁	2,66	a ₂	3,65	a ₃	5,30	b ₄	4,78	b ₅

Tabela 5: Valores percentuais médios de cada tipo de cometa obtido para os diferentes tratamentos aplicados nas plantas resistentes. Comparações estatísticas realizadas entre os tratamentos para cada tipo de cometa; letras diferentes indicando diferença significativa entre os tratamentos.

Plantas Não-Resistentes										
7 DAA										
Tratamentos	Tipos de Cometas									
	1		2		3		4		5	
1- Água	93,59	d ₁	3,40	a ₂	2,31	a ₃	0,53	a ₄	0,17	a ₅
2- 1:1000	90,10	d ₁	2,85	a ₂	4,03	ab ₃	1,85	ab ₄	1,17	ab ₅
3- 1:500	87,03	cd ₁	2,77	a ₂	3,80	ab ₃	3,64	b ₄	2,77	b ₅
4- 1:100	79,78	bc ₁	7,34	b ₂	6,52	bc ₃	4,57	b ₄	1,79	ab ₅
5- 1:50	68,67	ab ₁	6,48	b ₂	8,64	c ₃	10,09	c ₄	6,12	c ₅
6- 1:10	36,99	a ₁	8,63	b ₂	14,87	d ₃	21,70	d ₄	17,81	d ₅
14 DAA										
Tratamentos	Tipos de Cometas									
	1		2		3		4		5	
1- Água	93,76	e ₁	3,64	a ₂	2,28	a ₃	0,16	a ₄	0,16	a ₅
2- 1:1000	82,99	d ₁	5,07	ab ₂	5,76	b ₃	4,75	b ₄	1,42	a ₅
3- 1:500	80,18	cd ₁	6,58	b ₂	9,46	cd ₃	3,28	b ₄	0,51	a ₅
4- 1:100	71,73	bc ₁	5,29	ab ₂	8,17	bc ₃	9,17	c ₄	5,64	b ₅
5- 1:50	65,47	ab ₁	4,53	ab ₂	9,33	cd ₃	14,18	d ₄	6,48	b ₅
6- 1:10	59,43	a ₁	9,17	c ₂	11,80	d ₃	12,25	d ₄	7,35	b ₅

DISCUSSÃO

Os efeitos fitotóxicos do glifosato foram observados apenas nas plantas não-resistentes, uma vez que a planta resistente apresenta um mecanismo capaz de evitar a ação do herbicida (Dill, 2005). Assim, apenas o híbrido não-resistente apresentou uma interferência no crescimento da planta associado ao tratamento com glifosato.

O procedimento para a obtenção da suspensão nuclear a partir de material foliar é sempre realizado por meio do *slicing* da folha, utilizando para isso tampão Tris-HCl gelado (Gichner et al, 2006; Pourrut et al, 2015). A adição de PEG ao tampão de isolamento possibilitou uma maior preservação dos núcleos extraídos, uma vez que a adição desse polímero aumenta a solubilidade das substâncias sem causar toxicidade (Zalipsky, 1995).

Assim como para os procedimentos com raízes, os ensaios cometas dos materiais oriundos de folhas de milho também utilizaram o tampão de eletroforese e desenovelamento modificado, com pH 12. A grande maioria dos trabalhos de ensaio cometa em plantas utiliza o procedimento com tampão alcalino de pH acima de 13 (Santos et al, 2015), porém a utilização desse tampão gerou uma quantidade excessiva de cometas em todos os tratamentos, inclusive nos negativos.

O ensaio cometa é a técnica mais comumente utilizada para se medir a quantidade de danos no DNA de células eucarióticas (Azqueta e Collins, 2013). Essa metodologia tem sido utilizada para avaliar danos no DNA induzidos pelo herbicida glifosato em humanos, peixes e plantas (Gasnier et al, 2009; Guilherme et al, 2012; Alvarez-Moya et al, 2014). Apesar de alguns estudos que não utilizaram o ensaio cometa apontarem a ausência de genotoxicidade do herbicida em plantas, ratos e

humanos (Dimitrov et al, 2006; Bolognesi et al, 2009), o presente trabalho corrobora com o fato de que o glifosato apresenta efeito genotóxico em células de plantas, indicando que o ensaio cometa pode ser um método mais preciso para avaliar a toxicidade de determinadas substâncias.

Embora as plantas resistentes não apresentaram efeitos fitotóxicos visíveis, a genotoxicidade associada ao glifosato foi observada em ambos os híbridos de milho utilizados. Nas plantas resistentes, o efeito genotóxico foi visível apenas nos tratamentos mais fortes, não sendo observado no tratamento com a dose indicada a uso, enquanto nas plantas não-resistentes esse efeito foi visto em praticamente todas as diluições do herbicida aplicadas. Nas plantas resistentes, observou-se uma diminuição nos percentuais de cometas nas análises de 14 DAA em relação a de 7 DAA, indicando que as quebras na molécula de DNA foram reparadas pela célula, o que corrobora com o fato da técnica de ensaio cometa ser muito utilizada para acompanhar reparo de danos no DNA (Azqueta e Collins, 2013). Porém, essa diminuição não é observada nas plantas não-resistentes, sendo observado um aumento nos percentuais de cometas de uma semana para a outra. A ausência de reparo na molécula de DNA pode ser explicada pelo fato da célula já estar afetada pelos efeitos tóxicos diretos do glifosato, interrompendo a síntese de aminoácidos aromáticos e importantes metabólitos para a planta (Dill, 2005). Esses dados confirmam a resistência do híbrido RB 9110 PRO2, mesmo em doses do herbicida acima do indicado para o uso.

A análise dos tipos de cometas encontrados confirmou os dados das análises de percentuais de cometas. O aumento nos percentuais totais de cometas nos tratamentos foi acompanhado pelo aumento na incidência de cometas com maior intensidade na cauda (cometas tipos 4 e 5). Este fato indica que houve tanto aumento

na quantidade de células que sofreram danos quanto aumento na quantidade de danos por célula associado ao tratamento com o herbicida.

CONCLUSÃO

Os efeitos fitotóxicos observados confirmaram a resistência do híbrido RB 9110 PRO2 e a suscetibilidade do híbrido RB 9110 PRO, que teve seu crescimento afetado pelo tratamento com o herbicida inclusive em doses abaixo do indicado a uso.

A adição de PEG ao tampão de isolamento nuclear, associado à utilização de um tampão alcalino de pH 12 durante a eletroforese, otimizou a técnica de ensaio cometa em folhas de milho.

A técnica de ensaio cometa se mostrou muito eficiente na análise da genotoxicidade do glifosato em milho, mostrando que ocorreram danos ao DNA mesmo nas plantas resistentes, apesar da falta de evidências visíveis na planta.

Os efeitos genotóxicos foram mais fortes na planta não-resistente, sendo observado em praticamente todas as doses aplicadas do herbicida. Na planta resistente, esse efeito foi observado apenas nas doses mais altas de glifosato, não apresentando efeitos genotóxicos no tratamento com a dose recomendada de uso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ-MOYA, C.; SILVA, M.R.; ARÁMBULA, A.R.V.; SANDOVAL, A.I.; VASQUEZ, H.C.; MONTES, R.M.G. (2011) Evaluation of genetic damaged induced by glyphosate isopropylamine salt using *Tradescantia* bioassays. *Genetics and Molecular Biology*, 34(1): 127-130.

ALVAREZ-MOYA, C.; SILVA, M.R.; RAMÍREZ, C.V.; GALLARDO, D.G.; SÁNCHEZ, R.L.; AGUIRRE, A.C.; VELASCO, A.F. (2014) Comparison of the *in vivo* and *in vitro* genotoxicity of glyphosate isopropylamine salt in three different organisms. *Gen Mol Biol*, 37(1): 105-110.

ARAÚJO, A.S.F.; MONTEIRO, R.T.R.; ABARKELI, R.B. (2003) Effect of glyphosate on the microbial activity of two brasilian soil. *Chemosphere*, 52: 799-804.

AZQUETA, A.; COLLINS, A.R. (2013) The essencial comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Arch Toxicol*, 87: 949-968.

AZQUETA, A.; SLYSKOVA, J.; LANGIE, S.A.S.; GAIVÃO, I.O.; COLLINS, A. (2014) Comet assay to measure DNA repair: approach and applications. *Frontiers in Genetics*, Vol. 5, Art. 288.

BOLOGNESI, C.; CARRASQUILLA, G.; VOLPI, S.; SOLOMON, K.R. (2009) Biomonitoring of genotoxic risk in agricultural workers from five colombian regions: association to occupational exposure to glyphosate. *J Toxicol Environmental Health*, 72: 986-997.

BUSSE, M.D.; RATCLIFF, A.W.; SHESTAK, C.J.; POWERS, R.F. (2001) Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation controlo on soil microbial communities. *Soil Biol Biochem*, 33: 1777-1789.

CAJACOB, C.A.; FENG, P.C.C.; HECK, G.R.; ALIBHAI, M.F.; SAMMONS, R.D.; PADGETTE, S.R. (2004) Engineering resistance to herbicides. *Handbook of Plant Biotechnology*, 19.

CAVALCANTE, D.G.S.M.; MARTINEZ, C.B.R.; SOFIA, S.H. (2008) Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mut Res*, 655: 41-46.

CRUZ, C.D. (2006) Programa Genes: Estatística experimental e matrizes. Editora UFV. Viçosa (MG). 285p.

DILL, G.M. (2005) Glyphosate-resistant crops: history, status and future. *Pest Manag Sci*, 61: 219-224.

DIMITROV, B.D.; GADEVA, P.G.; BENOVA, D.K.; BINEVA, M.V. (2006) Comparative genotoxicity of the herbicides Roundup, Stomp and Reglone in plant and mammalian test system. *Mutagenesis*, 21(6): 375-382.

FUNKE, T.; HAN, H.; HEALY-FRIED, M.L.; FISCHER, M.; SCHÖNBRUNN, E. (2006) Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. *PNAS*, 103(35): 13010-13015.

GASNIER, C.; DUMONT, C.; BENACHOUR, N.; CLAIR, E.; CHAGNON, M.-C.; SÉRALINI, G.-E. (2009) Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology*, 262: 184-191.

GICHNER, T.; PLEWA, M.J. (1998) Induction of somatic DNA damage as measured by single cell gel electrophoresis and point mutation in leaves of tobacco plants. *Mutat Res*, 401: 143-152.

GICHNER, T.; MUKHERJEE, A.; VELEMÍNSKÝ, J. (2006) DNA staining with the fluorochromes EtBr, DAPI and YOYO-1 in the comet assay with tobacco plants after treatment with ethyl methanesulphonate, hyperthermia and DNase-I. *Mut Res*, 605: 17-21.

GUILHERME, S.; GAIVÃO, I.; SANTOS, M.A.; PACHECO, M. (2012) DNA damage in fish (*Anguilla anguilla*) exposed to a glyphosate-based herbicide – elucidation of organ-specificity and the role of oxidative stress. *Mut Res*, 743: 1-9.

KWIATKOWSKA, M.; JAROSIEWICZ, P.; BUKOWSKA, B. (2015) Cytotoxicity and genotoxicity of glyphosate and its two impurities in human peripheral blood mononuclear cells. *Intern Journ Bioeng Life Sci*, Vol 2(12).

MAÑAS, F.; PERALTA, L.; RAVIOLO, J.; OVANDO, H.G.; WEYERS, A.; UGNIA, L.; CID, M.G.; LARRIPA, I.; GORLA, N. (2009) Genotoxicity of glyphosate assessed by the comet assay and cytogenetic tests. *Env Toxic Pharm*, 28: 37-41.

MINK, P.J.; MANDEL, J.S.; SCEURMAN, B.K.; LUNDIN, J.I. (2012) Epidemiologic studies of glyphosate and cancer: a review. *Reg Toxic Pharm*, 63: 440-452.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*, v. 15, p. 473-497.

PAZ-Y-MIÑO, C.; SÁNCHEZ, M.E.; ARÉVALO, M.; MUÑOZ, M.J.; WITTE, T.; DE-LA-CARRERA, G.O.; LEONE, P.E. (2007) Evaluation of DNA damage in an Ecuadorian population exposed to glyphosate. *Gen Mol Biol*, 30(2): 456-460.

POLLEGIONI, L.; SCHONBRUNN, E.; SIEHL, D. (2011) Molecular basis of glyphosate resistance: different approaches through protein engineering. *FEBS J*, 278(16): 2753-2766.

POPP, J.; PETO, K.; NAGY, J. (2013) Pesticide productivity and food security: a review. *Agron Sustain Dev*, 33: 243-255.

SANTOS, C.L.V.; POURRUT, B.; OLIVEIRA, J.M.P.F. (2015) The use of comet assay in plant toxicology: recent advances. *Frontiers in Genetics*, Vol. 6, Art. 216.

SINGH, N.P.; McCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* 175: 184-191.

SPARLING, D.W.; MATSON, C.; BICKHAM, J.; DOELLING-BROWN, P. (2006) Toxicity of glyphosate as Glypro® and LI700 to red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) embryos and early hatchlings. *Env Toxicol Chem*, 25(10): 2768-2774.

SZÉKÁCS, A.; DARVAS, B. (2012) Forty years with glyphosate. *Herbicides – properties, synthesis and control of weeds*, 14: 247-284.

WAGNER, T.; ARANGO ISAZA, L.M.; GRUNDMANN, S.; DÖRFLER, U.; SCHROLL, R.; SCHLOTTER, M.; HARTMANN, A.; SANDERMANN, H.; ERNST, D. (2008) The probability of a horizontal gene transfer from Roundup Ready® Soybean to root symbiotic bacteria: a risk assessment study on the GSF lysimeter station. *Water Air Soil Pollut: Focus*, 8:155-162.

WIDHOLM, J.M.; CHINNALA, A.R.; RYU, J.-H.; SONG, H.-S.; EGGETT, T.; BROTHERTON, J.E. (2001) Glyphosate selection of gene amplification in suspension cultures of 3 plant species. *Physiol Plant*, 112: 540-545.

WILLIAMS, G.M.; KROES, R.; MUNRO, I.C. (2000) Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Reg Toxicol Pharm*, 31: 117-165.

ZALIPSKY, S. (1995) Chemistry of polyethylene glycol conjugates with biologically active molecules. *Adv Drug Deliv Ver*, 16: 157-182.

CONCLUSÃO GERAL

As modificações nas metodologias de isolamento nuclear e no tampão de eletroforese permitiram a otimização e aplicação da técnica de ensaio cometa em folhas e raízes de milho.

Com essas adaptações, foi possível avaliar de forma precisa o nível de genotoxicidade de diferentes doses do herbicida glifosato em dois híbridos de milho: RB 9110 PRO, suscetível à ação do herbicida, e RB 9110 PRO2, resistente. Esse teste provou a maior resistência deste segundo híbrido, apresentando sinais de genotoxicidade apenas nas doses mais altas. Portanto, não há evidências de genotoxicidade associada ao glifosato na planta resistente, sob as condições de uso indicadas pelo fabricante. Já no híbrido não-resistente, os tratamentos com o glifosato apresentaram efeitos genotóxicos, inclusive em doses abaixo do recomendado para uso.

Isso mostrou a importância da técnica de ensaio cometa em análises de genotoxicidade, podendo ser aplicada em análises de diversas substâncias tóxicas em qualquer organismo eucariótico de interesse.

ANEXOS

Anexo 1: Quantidades totais de núcleos e cometas contabilizados nas análises dos ensaios obtidos de protoplastos e de *chopping*, assim como as médias e os desvios padrões encontrados para cada tratamento.

Repetições		Tratamentos			
		Protoplasto		<i>Chopping</i>	
		Número	%	Número	%
1	Núcleos	183		82	
	Cometas	22	10,73	96	53,93
	Total	205		178	
2	Núcleos	187		103	
	Cometas	31	14,22	69	40,12
	Total	218		172	
3	Núcleos	173		95	
	Cometas	24	12,18	84	46,93
	Total	197		179	
Média (%)		12,38		46,99	
Desvio Padrão		1,75		6,91	

Anexo 2: Quantidades totais de núcleos e cometas contabilizados nas análises dos ensaios obtidos de núcleos sincronizados com HU e não sincronizados, assim como as médias e os desvios padrões encontrados para cada tratamento.

Repetições		Tratamentos			
		Com HU		Sem HU	
		Número	%	Número	%
1	Núcleos	175		168	
	Cometas	23	11,62	21	11,11
	Total	198		189	
2	Núcleos	167		178	
	Cometas	33	16,50	31	14,83
	Total	200		209	
3	Núcleos	173		162	
	Cometas	26	13,07	28	14,74
	Total	199		190	
Média (%)		13,73		13,56	
Desvio Padrão		2,51		2,12	

Anexo 3: Quantidades totais de núcleos e cometas contabilizados para cada tipo de cometa, nas análises dos ensaios obtidos de núcleos sincronizados com HU e não sincronizados, assim como as médias e os desvios padrões encontrados para cada tratamento.

		Tipos de Cometa																			
Tratamentos	Rep	1				2				3				4				5			
		Nº	%	Média (%)	Desvio Padrão	Nº	%	Média (%)	Desvio Padrão	Nº	%	Média (%)	Desvio Padrão	Nº	%	Média (%)	Desvio Padrão	Nº	%	Média (%)	Desvio Padrão
Com HU	1	175	88,38			3	1,52			7	3,54			7	3,54			6	3,03		
	2	167	83,50	86,27	4,16	5	2,50	2,01	1,00	10	5,00	4,19	1,53	11	5,50	4,35	2,08	7	3,50	3,18	0,58
	3	173	86,93			4	2,01			8	4,02			8	4,02			6	3,02		
Sem HU	1	168	88,89			2	1,06			6	3,17			7	3,70			6	3,17		
	2	178	85,17	86,44	8,08	4	1,91	1,52	1,00	9	4,31	4,07	1,73	10	4,78	4,41	1,53	8	3,83	3,56	1,00
	3	162	85,26			3	1,58			9	4,74			9	4,74			7	3,68		

Anexo 4: Quantidades totais de núcleos e cometas contabilizados para cada tipo de cometa, nas análises dos ensaios obtidos de protoplastos e de *chopping*, assim como as médias e os desvios padrões encontrados para cada tratamento.

		Tipos de Cometa																			
Tratamentos	Rep	1				2				3				4				5			
		Nº	%	Média (%)	Desvio Padrão	Nº	%	Média (%)	Desvio Padrão	Nº	%	Média (%)	Desvio Padrão	Nº	%	Média (%)	Desvio Padrão	Nº	%	Média (%)	Desvio Padrão
Protoplasto	1	183	89,27			3	1,46			6	2,93			8	3,90			5	2,44		
	2	187	85,78	87,62	7,21	5	2,29	1,93	1,00	9	4,13	3,37	1,73	10	4,59	4,35	1,00	7	3,21	2,73	1,15
	3	173	87,82			4	2,03			6	3,05			9	4,57			5	2,54		
Chopping	1	82	46,07			10	5,62			28	15,73			41	23,03			17	9,55		
	2	103	59,88	53,01	10,60	6	3,49	4,53	2,00	20	11,63	13,59	4,00	32	18,60	20,77	4,51	11	6,40	8,11	3,06
	3	95	53,07			8	4,47			24	13,41			37	20,67			15	8,38		

Anexo 5: Quantidades totais de núcleos e cometas contabilizados nas análises dos ensaios obtidos das plantas resistentes, aos 7 DAA e 14 DAA, assim como as médias e os desvios padrões encontrados para cada tratamento.

Plantas Resistentes													
7 Dias Após a Aplicação													
Repetições		Tratamentos											
		1 - H2O		2- 1:1000		3- 1:500		4- 1:100		5- 1:50		6- 1:10	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
1	Núcleos	151		156		163		145		205		186	
	Cometas	6	3,82	4	2,50	17	9,44	9	5,84	38	15,64	36	16,22
	Total	157		160		180		154		243		222	
2	Núcleos	154		153		190		186		128		146	
	Cometas	23	12,99	17	10,00	26	12,04	44	19,13	43	25,15	65	30,81
	Total	177		170		216		230		171		211	
3	Núcleos	144		145		201		196		151		164	
	Cometas	12	7,69	15	9,38	28	12,23	26	11,71	31	17,03	42	20,39
	Total	156		160		229		222		182		206	
Total	Núcleos	449		454		554		527		484		496	
	Cometas	41		36		71		79		112		143	
14 Dias Após a Aplicação													
Repetições		Tratamentos											
		1 - H2O		2- 1:1000		3- 1:500		4- 1:100		5- 1:50		6- 1:10	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
1	Núcleos	163		154		166		152		160		163	
	Cometas	13	7,39	10	6,10	17	9,29	12	7,32	14	8,05	31	15,98
	Total	176		164		183		164		174		194	
2	Núcleos	192		182		179		181		186		197	
	Cometas	4	2,04	12	6,19	8	4,28	10	5,24	7	3,63	28	12,44
	Total	196		194		187		191		193		225	
3	Núcleos	163		166		184		172		169		153	
	Cometas	7	4,12	8	4,60	12	6,12	11	6,01	9	5,06	40	20,73
	Total	170		174		196		183		178		193	
Total	Núcleos	518		502		529		505		515		513	
	Cometas	24		30		37		33		30		99	

Anexo 6: Quantidades totais de núcleos e cometas contabilizados nas análises dos ensaios obtidos das plantas não-resistentes, aos 7 DAA e 14 DAA, assim como as médias e os desvios padrões encontrados para cada tratamento.

Plantas Não-Resistentes													
7 Dias Após a Aplicação													
Repetições		Tratamentos											
		1 - H2O		2- 1:1000		3- 1:500		4- 1:100		5- 1:50		6- 1:10	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
1	Núcleos	184		180		160		166		121		93	
	Cometas	6	3,16	18	9,09	29	15,34	37	18,23	65	34,95	115	55,29
	Total	190		198		189		203		186		208	
2	Núcleos	179		174		176		164		132		78	
	Cometas	16	8,21	18	9,38	18	9,28	42	20,39	51	27,87	128	62,14
	Total	195		192		194		206		183		206	
3	Núcleos	164		182		168		159		128		65	
	Cometas	14	7,87	23	11,22	28	14,29	45	22,06	58	31,18	164	71,62
	Total	178		205		196		204		186		229	
Total	Núcleos	527		536		504		489		381		236	
	Cometas	36		59		75		124		174		407	
14 Dias Após a Aplicação													
Repetições		Tratamentos											
		1 - H2O		2- 1:1000		3- 1:500		4- 1:100		5- 1:50		6- 1:10	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
1	Núcleos	188		180		158		142		148		138	
	Cometas	21	10,05	31	14,69	41	20,60	44	23,66	70	32,11	80	36,70
	Total	209		211		199		186		218		218	
2	Núcleos	176		132		151		144		159		132	
	Cometas	6	3,30	31	19,02	33	17,93	65	31,10	96	37,65	106	44,54
	Total	182		163		184		209		255		238	
3	Núcleos	158		167		155		156		133		125	
	Cometas	9	5,39	35	17,33	41	20,92	67	30,04	68	33,83	85	40,48
	Total	167		202		196		223		201		210	
Total	Núcleos	522		479		464		442		440		395	
	Cometas	36		97		115		176		234		271	

Anexo 7: Quantidades totais de núcleos e cometas contabilizados para cada tipo de cometa, nas análises dos ensaios obtidos das plantas resistentes, aos 7 DAA, assim como as médias e os desvios padrões encontrados para cada tratamento.

Plantas Resistentes																					
7 Dias Após a Aplicação																					
Tratamentos	Rep	Tipos de Cometa																			
		1				2				3				4				5			
		Nº	%	Média (%)	Desvio Padrão	Nº	%	Média (%)	Desvio Padrão	Nº	%	Média (%)	Desvio Padrão	Nº	%	Média (%)	Desvio Padrão	Nº	%	Média (%)	Desvio Padrão
1 - Água	1	151	96,18			5	3,18			1	0,64			0	0,00			0	0,00		
	2	154	87,01	91,83	5,13	9	5,08	3,61	2,65	7	3,95	2,81	3,21	4	2,26	0,97	2,08	3	1,69	0,78	1,53
	3	144	92,31			4	2,56			6	3,85			1	0,64			1	0,64		
2- 1:1000	1	156	97,50			1	0,63			3	1,88			0	0,00			0	0,00		
	2	153	90,00	92,71	5,69	7	4,12	2,83	3,21	7	4,12	3,25	2,08	1	0,59	0,40	0,58	2	1,18	0,81	1,15
	3	145	90,63			6	3,75			6	3,75			1	0,63			2	1,25		
3- 1:500	1	163	90,56			7	3,89			8	4,44			0	0,00			2	1,11		
	2	190	87,96	88,76	19,55	9	4,17	3,85	1,00	7	3,24	4,16	2,08	2	0,93	0,45	1,00	8	3,70	2,77	3,46
	3	201	87,77			8	3,49			11	4,80			1	0,44			8	3,49		
4- 1:100	1	145	94,16			3	1,95			2	1,30			1	0,65			3	1,95		
	2	186	80,87	87,77	27,02	10	4,35	2,70	3,79	15	6,52	3,81	6,51	8	3,48	2,43	3,79	11	4,78	3,29	4,00
	3	196	88,29			4	1,80			8	3,60			7	3,15			7	3,15		
5- 1:50	1	205	84,36			5	2,06			8	3,29			13	5,35			12	4,94		
	2	128	74,85	80,73	39,53	6	3,51	2,77	0,58	10	5,85	4,88	1,15	14	8,19	6,16	2,65	13	7,60	5,46	3,21
	3	151	82,97			5	2,75			10	5,49			9	4,95			7	3,85		
6- 1:10	1	186	83,78			4	1,80			7	3,15			10	4,50			15	6,76		
	2	146	69,19	77,53	20,03	9	4,27	2,83	2,65	15	7,11	4,72	4,36	21	9,95	6,60	6,08	20	9,48	8,32	2,52
	3	164	79,61			5	2,43			8	3,88			11	5,34			18	8,74		

Anexo 8: Quantidades totais de núcleos e cometas contabilizados para cada tipo de cometa, nas análises dos ensaios obtidos das plantas resistentes, aos 14 DAA, assim como as médias e os desvios padrões encontrados para cada tratamento.

Plantas Resistentes																					
14 Dias Após a Aplicação																					
Tratamentos	Rep	Tipos de Cometa																			
		1				2				3				4				5			
		Nº	%	Média (%)	Desvio Padrão	Nº	%	Média (%)	Desvio Padrão	Nº	%	Média (%)	Desvio Padrão	Nº	%	Média (%)	Desvio Padrão	Nº	%	Média (%)	Desvio Padrão
1 - Água	1	163	92,61			5	2,84			3	1,70			1	0,57			4	2,27		
	2	192	97,96	95,49	16,74	2	1,02	1,88	1,53	2	1,02	1,30	0,58	0	0,00	0,19	0,58	0	0,00	1,15	2,00
	3	163	95,88			3	1,76			2	1,18			0	0,00			2	1,18		
2- 1:1000	1	154	93,90			3	1,83			4	2,44			1	0,61			2	1,22		
	2	182	93,81	94,37	14,05	4	2,06	1,87	0,58	4	2,06	2,08	0,58	1	0,52	0,38	0,58	3	1,55	1,31	0,58
	3	166	95,40			3	1,72			3	1,72			0	0,00			2	1,15		
3- 1:500	1	166	90,71			3	1,64			4	2,19			5	2,73			5	2,73		
	2	179	95,72	93,44	9,29	2	1,07	1,58	1,00	3	1,60	1,94	0,58	1	0,53	1,43	2,08	2	1,07	1,61	1,73
	3	184	93,88			4	2,04			4	2,04			2	1,02			2	1,02		
4- 1:100	1	152	92,68			3	1,83			5	3,05			2	1,22			2	1,22		
	2	181	94,76	93,81	14,84	2	1,05	1,32	0,58	2	1,05	1,73	1,73	1	0,52	0,76	0,58	5	2,62	2,37	2,08
	3	172	93,99			2	1,09			2	1,09			1	0,55			6	3,28		
5- 1:50	1	160	91,95			4	2,30			5	2,87			1	0,57			4	2,30		
	2	186	96,37	94,42	13,20	1	0,52	1,13	1,73	2	1,04	1,68	1,73	2	1,04	1,10	1,00	2	1,04	1,67	1,00
	3	169	94,94			1	0,56			2	1,12			3	1,69			3	1,69		
6- 1:10	1	163	84,02			6	3,09			6	3,09			10	5,15			9	4,64		
	2	197	87,56	83,62	23,07	4	1,78	2,66	1,15	6	2,67	3,65	2,31	9	4,00	5,30	2,08	9	4,00	4,78	1,15
	3	153	79,27			6	3,11			10	5,18			13	6,74			11	5,70		

Anexo 9: Quantidades totais de núcleos e cometas contabilizados para cada tipo de cometa, nas análises dos ensaios obtidos das plantas não-resistentes, aos 7 DAA, assim como as médias e os desvios padrões encontrados para cada tratamento.

Plantas Não-Resistentes																					
7 Dias Após a Aplicação																					
Tratamentos	Rep	Tipos de Cometa																			
		1				2				3				4				5			
		Nº	%	Média (%)	Desvio Padrão	Nº	%	Média (%)	Desvio Padrão	Nº	%	Média (%)	Desvio Padrão	Nº	%	Média (%)	Desvio Padrão	Nº	%	Média (%)	Desvio Padrão
1 - Água	1	184	96,84			4	2,11			2	1,05			0	0,00			0	0,00		
	2	179	91,79	93,59	10,41	7	3,59	3,40	2,08	6	3,08	2,31	2,08	2	1,03	0,53	1,00	1	0,51	0,17	0,58
	3	164	92,13			8	4,49			5	2,81			1	0,56			0	0,00		
2- 1:1000	1	180	90,91			6	3,03			8	4,04			3	1,52			1	0,51		
	2	174	90,63	90,10	4,16	5	2,60	2,85	0,58	7	3,65	4,03	1,00	4	2,08	1,85	0,58	2	1,04	1,17	1,53
	3	182	88,78			6	2,93			9	4,39			4	1,95			4	1,95		
3- 1:500	1	160	84,66			6	3,17			8	4,23			9	4,76			6	3,17		
	2	176	90,72	87,03	8,00	5	2,58	2,77	0,58	5	2,58	3,80	2,08	4	2,06	3,64	2,65	4	2,06	2,77	1,15
	3	168	85,71			5	2,55			9	4,59			8	4,08			6	3,06		
4- 1:100	1	166	81,77			14	6,90			12	5,91			8	3,94			3	1,48		
	2	164	79,61	79,78	3,61	15	7,28	7,34	1,00	14	6,80	6,52	1,15	9	4,37	4,57	1,53	4	1,94	1,79	0,58
	3	159	77,94			16	7,84			14	6,86			11	5,39			4	1,96		
5- 1:50	1	121	65,05			13	6,99			18	9,68			20	10,75			14	7,53		
	2	132	72,13	68,67	5,57	11	6,01	6,48	1,00	14	7,65	8,64	2,00	17	9,29	10,09	1,53	9	4,92	6,12	2,52
	3	128	68,82			12	6,45			16	8,60			19	10,22			11	5,91		
6- 1:10	1	93	44,71			16	7,69			28	13,46			40	19,23			31	14,90		
	2	78	37,86	36,99	14,01	15	7,28	8,63	5,51	30	14,56	14,87	5,29	45	21,84	21,70	7,64	38	18,45	17,81	7,51
	3	65	28,38			25	10,92			38	16,59			55	24,02			46	20,09		

Anexo 10: Quantidades totais de núcleos e cometas contabilizados para cada tipo de cometa, nas análises dos ensaios obtidos das plantas não-resistentes, aos 14 DAA, assim como as médias e os desvios padrões encontrados para cada tratamento.

Plantas Não-Resistentes																					
14 Dias Após a Aplicação																					
Tratamentos	Rep	Tipos de Cometa																			
		1				2				3				4				5			
		Nº	%	Média (%)	Desvio Padrão	Nº	%	Média (%)	Desvio Padrão	Nº	%	Média (%)	Desvio Padrão	Nº	%	Média (%)	Desvio Padrão	Nº	%	Média (%)	Desvio Padrão
1 - Água	1	188	89,95			12	5,74			7	3,35			1	0,48			1	0,48		
	2	176	96,70	93,76	15,10	4	2,20	3,64	4,36	2	1,10	2,28	2,52	0	0,00	0,16	0,58	0	0,00	0,16	0,58
	3	158	94,61			5	2,99			4	2,40			0	0,00			0	0,00		
2- 1:1000	1	180	85,31			10	4,74			11	5,21			8	3,79			2	0,95		
	2	132	80,98	82,99	24,83	9	5,52	5,07	0,58	10	6,13	5,76	1,00	9	5,52	4,75	1,00	3	1,84	1,42	0,58
	3	167	82,67			10	4,95			12	5,94			10	4,95			3	1,49		
3- 1:500	1	158	79,40			12	6,03			20	10,05			7	3,52			2	1,01		
	2	151	82,07	80,18	3,51	13	7,07	6,58	0,58	14	7,61	9,46	3,79	6	3,26	3,28	0,58	0	0,00	0,51	1,00
	3	155	79,08			13	6,63			21	10,71			6	3,06			1	0,51		
4- 1:100	1	142	76,34			8	4,30			12	6,45			15	8,06			9	4,84		
	2	144	68,90	71,73	7,57	12	5,74	5,29	2,65	19	9,09	8,17	4,36	20	9,57	9,17	3,61	14	6,70	5,64	2,52
	3	156	69,96			13	5,83			20	8,97			22	9,87			12	5,38		
5- 1:50	1	148	67,89			9	4,13			21	9,63			26	11,93			14	6,42		
	2	159	62,35	65,47	13,05	14	5,49	4,53	3,21	24	9,41	9,33	3,00	40	15,69	14,18	7,21	18	7,06	6,48	3,06
	3	133	66,17			8	3,98			18	8,96			30	14,93			12	5,97		
6- 1:10	1	138	63,30			18	8,26			24	11,01			23	10,55			15	6,88		
	2	132	55,46	59,43	6,51	22	9,24	9,17	2,08	32	13,45	11,80	4,93	34	14,29	12,25	5,86	18	7,56	7,35	1,53
	3	125	59,52			21	10,00			23	10,95			25	11,90			16	7,62		