

Anatomia foliar de plantas transgênicas e não transgênicas de *Glycine max* (L.) Merrill (Fabaceae)

Leaf anatomy of *Glycine max* (L.) Merrill (Fabaceae) wild type and genetically modified

LEAL-COSTA, Marcos Vinicius 1, 3, 4

ARAGÃO, Francisco José Lima 2

REINERT, Fernanda 1, 3

TAVARES, Eliana Schwartz 1, 3

1 Laboratório de Anatomia Vegetal, Departamento de Botânica, UFRJ

2 EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília - DF

3 Programa de Pós - graduação em Biotecnologia Vegetal

4 Autor para correspondência: mlealcosta@gmail.com

Recebido em 7 de Maio de 2008; aceito em 24 de setembro de 2008

RESUMO

Glycine max, soja, é uma espécie originada na Ásia e de grande importância econômica no mundo. Mais recentemente, a soja vem sendo objeto de transformações genéticas através da tecnologia do ADN recombinante com o objetivo de aprimorar a produtividade. Apesar da importância da espécie, trabalhos sobre sua anatomia são escassos. O presente estudo descreve a anatomia foliar das cultivares de soja BR16 convencional e transgênica (modificada com gene *bip*, visando aumentar sua tolerância ao estresse hídrico). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as duas cultivares quanto às características anatômico-foliares. Ambas cultivares de *G. max* apresentam pecíolo alado com vascularização constituída de círculo de feixes colaterais. A folha apresenta-se anfistomática, com estômatos paracíticos em maior frequência na face abaxial, além de exibir tricomas tectores e glandulares pluricelulares. O mesófilo é dorsiventral, com duas camadas de parênquima paliçádico e duas camadas de parênquima lacunoso. Entre os dois é observado parênquima paranerval com uma camada de células. Essa é a primeira descrição anatômica das folhas da cultivar transgênica da soja BR16 e os dados fornecem uma nova referência para atestar a conformidade anatômica de folhas de novas cultivares geneticamente modificadas.

PALAVRAS-CHAVE: Anatomia foliar, Fabaceae, *Glycine max*, plantas geneticamente modificadas, soja.

ABSTRACT

Glycine max, soybean, is an Asian species of major economic and nutritional importance throughout the world. Recently, varieties of this species have been genetically modified (GM) to improve its production. Despite the importance of soybeans, studies on the anatomy of this species are scarce. In this project, the leaf anatomy of BR16 is described: the wild-type and the GM. (BR16 was modified by the addition of the *bip* gene to increase resistance to water stress). Both soybean cultivars had winged petiole with vascular bundles surrounding the pith. The leaves were amphistomatic with paracytic stomata and glandular and non glandular pluricellular hairs. The lower epidermis showed a higher frequency of stomata than the upper epidermis. The mesophyll was dorsiventral with two layers of palisade parenchyma and two layers of spongy parenchyma. One layer of paraveinal mesophyll was found between palisade and spongy parenchyma. The two cultivars studied did not present significant differences in anatomy. This is the first anatomic description of leaves from GM soybean variety BR16 and provides a new reference against which to compare anatomic conformity of leaves from other and newly genetically modified soybeans.

KEY WORDS: Fabaceae, genetically modified plants, *Glycine max*, leaf anatomy, Soybean.

I. INTRODUÇÃO

Glycine max (L.) Merrill (Fabaceae), soja, é a oleaginosa com maior importância econômica no mundo e está presente na composição da maioria dos alimentos industrializados. Do total de óleos vegetais consumidos no mundo, o óleo de soja corresponde a 31%. Os grãos são usados, ainda, na produção de farelo, correspondendo a 70% do consumo, devido ao seu alto teor protéico (PEREIRA, 2004). A produção mundial de soja, entre 2000 e 2006, cresceu cerca de 1,4%. No Brasil, em 2006, foram produzidas cerca de 52.335.976 toneladas de soja, cerca de 24% da produção mundial, em uma área total cultivada de 22.006.677

ha, aproximadamente 24% da área mundial de cultivo de soja naquele ano (FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations)

Apesar de sua grande importância econômica, trabalhos evidenciando os aspectos anatômicos da espécie são pouco encontrados. Metcalfe e Chalk (1950) trataram de várias características anatômicas da família e do gênero, referindo-se à *G. max* ao descrever a disposição dos feixes vasculares do pecíolo e Fisher (1967) descreveu o parênquima parênquima no mesófilo. Estudos anatômicos foram realizados relacionando variações na espessura foliar e frequência estomática com fatores como taxa de troca gasosa (DORNHOFF e SHIBLES, 1976), estresse hídrico (VIDAL e POGNONEC, 1984), diferentes concentrações de nitrogênio e níveis de irradiância (SIMS et al., 1998) e baixa concentração de fósforo (CHIERA et al., 2002). O conteúdo de flavonóides também foi relacionado à frequência estomática (BUTTERY et al., 1993).

A caracterização anatômica dos órgãos vegetais define peculiaridades estruturais de cada espécie, com aplicação em diversas áreas, como a taxonomia (METCALFE e CHALK, 1979), o controle de qualidade de matéria prima para indústria farmacológica (ROCHA et al., 2000; TAVARES et al., 2000) e a fitotecnia (SILVA et al., 2005). A descrição anatômica de espécies cultivadas, como a soja, é especialmente interessante pelo crescente surgimento de novas cultivares geradas com a tecnologia do ADN recombinante. Estudos anatômicos de tais espécies oferecem material de referência para verificação de conformidade de indivíduos transformados, sendo uma importante ferramenta para controle da qualidade do processo de transformação, já que é desejável que a cultivar transgênica em nada difira da convencional a não ser pela característica introduzida (WILSON; LATHAM; STEIBRECHER, 2004). O desenvolvimento dessas cultivares inclui estudos em diversas fases, não necessariamente chegando à fase de teste da modificação genética proposta. Não obstante, é importante que a comparação entre a cultivar convencional e a modificada seja realizada a cada nova etapa do estudo.

A redução da demanda hídrica das espécies está entre os fatores mais cobijados, dados os crescentes indícios de diminuição dos estoques de água doce do Planeta. A soja, por sua importância econômica, é uma forte candidata a receber transgenes que lhe confirmam maior tolerância ao estresse hídrico.

O Brasil vem desenvolvendo uma cultivar geneticamente modificada (GM) tolerante a estresse hídrico a partir da cultivar BR16. O desenvolvimento de plantas GM demanda o cumprimento de uma série de estudos que garantam a integridade do material vegetal e a eliminação de espécimes que apresentem modificações indesejáveis de qualquer natureza, tais como fisiológicas e anatômicas (KUIPER et al., 2003). O presente trabalho tem como objetivo descrever comparativamente a estrutura anatômico-foliar da cultivar BR16 de soja e de uma transgênica com inserção de gene de resistência à seca.

II. MÉTODOS

O material foliar das cultivares de soja BR16 convencional e transgênica foi obtido na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA, mais precisamente, na EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen, Brasília). Para o desenvolvimento da cultivar transgênica foi empregada a técnica de biobalística para inserção do gene *ahas* e de uma chaperona de soja (BiP-Binding Protein) para conferir tolerância a estresse hídrico (ARAGÃO et al., 2000). As plantas de ambas as cultivares estavam sob cultivo em estufa, em vasos individuais e com rega regular. Foram selecionadas, ao todo, seis folhas, uma por indivíduo, plenamente desenvolvidas. As amostras foram conservadas em álcool 70% e os cortes anatômicos realizados no folíolo central e pecíolo (não foram efetuados cortes no pecíolulo).

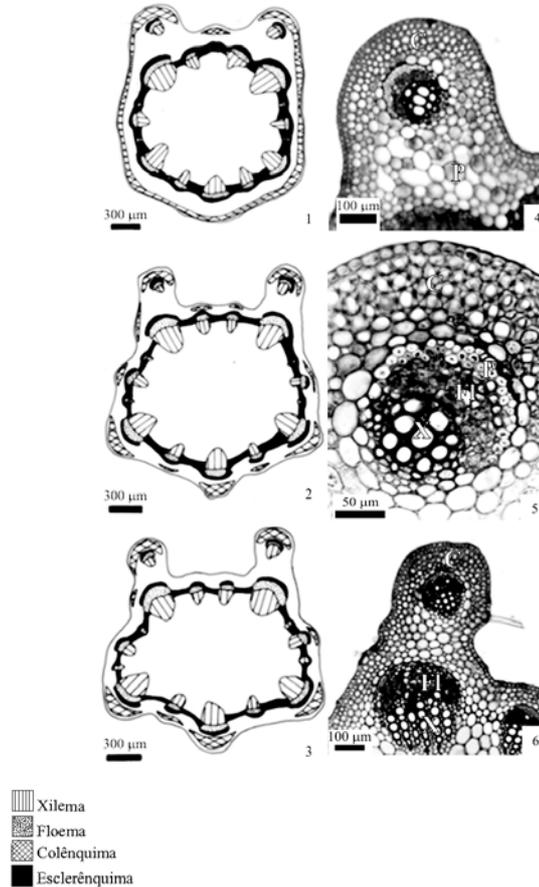
Porções de epiderme, da região intercostal do terço médio, foram obtidas por dissociação em solução de ácido crômico 10% e ácido nítrico 10% (JOHANSEN, 1940) e coradas com safranina hidroalcoólica (JOHANSEN, 1940) para confecção de lâminas semipermanentes. Cortes transversais foram efetuados, com auxílio de micrótomo de Ranvier, nas regiões proximal, mediana e distal do pecíolo e nos terços basal, mediano e apical da lâmina foliar. O material foi corado com solução de azul de astra mais safranina (BUKATSCH, 1972) e utilizado na confecção de lâminas semipermanentes. Todas as lâminas foram montadas em solução de glicerina a 50% (PURVIS et al., 1964).

Observações quantitativas foram efetuadas nas seis folhas, com cinco repetições para cada folha. Contagens do número de estômatos foram efetuadas em vista frontal, a partir de projeção em câmara clara, de campo observado em quadrado com 1 mm de lado. As medições da espessura do folíolo, epiderme, nas duas faces, e mesófilo foram efetuadas a partir da projeção do campo estudado, com auxílio de câmara clara, em um papel onde havia sido previamente desenhada régua micrométrica projetada nas mesmas condições. Para verificar a variabilidade dos caracteres anatômicos foliares entre os indivíduos, utilizou-se análise de variância (ANOVA), com o auxílio do programa GraphPad Prism 4.0.

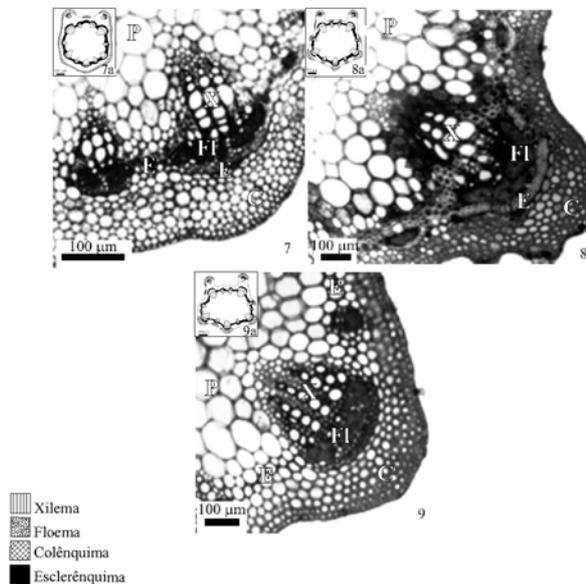
As fotomicrografias foram feitas com auxílio de microscópio óptico Bausch & Lomb modelo DynaZoom Photo Binocular e os desenhos, com microscópio óptico Zeiss modelo Standard equipado com câmara clara. A natureza dos cristais foi verificada segundo Chamberlain (1932).

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os testes de variância não indicaram diferenças significativas entre as cultivares convencional e transgênica. Portanto, a descrição anatômica e as medidas foliares (média ± desvio padrão) estão apresentadas conjuntamente.



Figuras 1-6 - Pecíolo de *Glycine max* (L.) Merrill cv. BR16 convencional e transgênica. 1, 2 e 3 - esquemas das seções transversais na região proximal (1), mediana (2) e distal (3). 4, 5 e 6 - detalhes de seções transversais nas regiões proximal (4), mediana (5) e distal (6). 1, 2, 3 e 4 - planta convencional; 5 e 6 - planta transgênica. C - colênquima, F - fibras, Fl - Floema, P - parênquima, X - xilema.

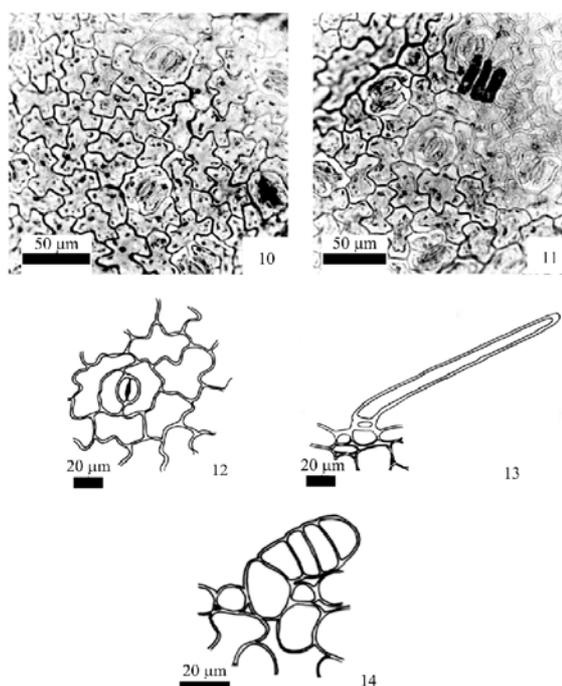


Figuras 7-9 - Pecíolo de *Glycine max* (L.) Merrill cv. BR16. Detalhes de secções transversais do pecíolo nas regiões proximal (7), mediana (8) e distal (9). 7a, 8a e 9a representam diagramaticamente secções transversais inteiras do pecíolo nas regiões proximal, mediana e distal respectivamente. 7 - planta convencional; 8 e 9 - planta transgênica. C - colênquima, F - fibras, Fl - Floema, P - parênquima, X - xilema.

O pecíolo das plantas analisadas é alado, com vascularização composta de feixes colaterais dispostos em círculo (Fig. 1-3). Na região proximal, junto às alas, o tecido parenquimático apresenta lacunas, característica não observada nas demais partes do pecíolo (Fig. 2). As alas do pecíolo apresentam um feixe colateral cada, com fibras junto ao floema, e colênquima do tipo angular em posição subepidérmica (Fig. 4-6). Secções transversais das regiões mediana e distal do pecíolo evidenciam sulcos longitudinais, delimitados pelas porções onde se originam os feixes vasculares de maior calibre (Fig. 7-9). Tecido esclerenquimático ocorre externo ao floema e entre os feixes vasculares (Fig. 7-9). Esse tecido é composto de fibras junto ao floema e fibras ou parênquima esclerificado entre os feixes vasculares (Fig. 7-9). É observado tecido colenquimático na periferia do córtex (Fig. 7-9). Na região proximal, o colênquima é contínuo em toda a periferia do córtex com cerca de três camadas de células, podendo chegar a cinco camadas nas alas, onde é interrompido, aparecendo somente em grupos de cerca de três camadas de células em áreas proeminentes entre as alas (Fig. 7). Nas regiões mediana e distal, onde o pecíolo aparece sulcado, o colênquima aparece nas regiões proeminentes acima dos feixes de maior porte com cerca de cinco camadas de células (Fig. 8 e 9). A medula é constituída de células parenquimáticas de paredes delgadas (Fig. 7-9).

Segundo Metcalfe e Chalk (1950), a estrutura do pecíolo varia muito entre os membros da família, podendo estar relacionada ao hábito da planta, e o padrão de vascularização e os feixes acessórios das alas observados em *G. max* são comuns ao gênero *Glycine*. A existência de fibras pericíclicas circundando os feixes vasculares em várias espécies de família é comum, mas não em espécies do gênero *Glycine*. Como não houve reconhecimento de endoderme no pecíolo de *G. max*, as fibras que nele ocorrem não foram denominadas pericíclicas.

A lâmina foliar de *G. max* cv. BR16 convencional e transgênica apresentou baixa variabilidade quanto à espessura média ($181,8 \pm 15,26 \mu\text{m}$) (Tab. 1). Estudos demonstram que diferentes fatores ambientais podem influenciar a espessura da folha. Foi demonstrado que a aplicação de cloroflurenol, um regulador de crescimento da classe das morfactinas, resultou em aumento na espessura foliar em plantas de soja tratadas com o regulador (DYBING e YARROW, 1984). A espessura de folhas de soja pode ser alterada pelo déficit hídrico, tornando-se maior em plantas sob estresse (VIDAL e POGNONEC, 1984). A folha de soja tem sua espessura alterada por diferentes concentrações de nitrogênio e por diferentes níveis de irradiância (SIMS et al., 1998). O déficit de fósforo pode, ainda, reduzir a espessura de folhas (CHIERA et al., 2002). Uma vez que as condições de crescimento das plantas das cultivares convencional e transgênica na estufa eram idênticas, podemos concluir que tal característica não foi afetada pela transformação genética. Embora seja possível que, uma vez sob estresse hídrico, a cultivar BR16 transgênica venha a apresentar alterações na espessura da folha, tal possibilidade só poderá ser averiguada numa fase posterior do experimento, quando as plantas forem submetidas ao déficit hídrico.



Figuras 10-14 - Epiderme foliar de *Glycine max*(L.) Merrill cv. BR16. 10 - face adaxial em vista frontal; 11 - face abaxial em vista frontal; 12 - estômato paracítico; 13 - tricoma tector; 14 - tricoma glandular. Planta convencional

A espessura média da epiderme na face adaxial foi igual a $13,21 \pm 2,10 \mu\text{m}$ e, na face abaxial, $9,01 \pm 1,36 \mu\text{m}$ (Tab. 1). Em vista frontal, a epiderme possui células de paredes anticlinais sinuosas (Fig. 10-12). Lackey (1978) observou que membros da subtribo Glycininae tendem a ter células epidérmicas adaxiais de paredes anticlinais sinuosas, tais como as observadas em *G. max*. Estômatos do tipo paracítico estão presentes nas duas faces foliares (Fig. 10-12). Segundo Metcalfe e Chalk (1950), não existe um tipo de estômato característico da família Fabaceae. Estômatos nas duas faces foliares são comuns a vários gêneros, tais como *Arachis*, *Canavalia*, *Crotalaria*, *Dalbergia* e *Indigofera*. Estômatos do tipo paracítico também são comuns a muitos gêneros da família Fabaceae. Lackey (1978) cita tal tipo de estômatos como característico da tribo Phaseoleae. Folhas anfiestomáticas também foram observadas em espécies do gênero *Pueraria* (PEREIRA-NETO et al., 1997 e 1999) e são comuns em plantas cultivadas, normalmente sujeitas a altas taxas luminosas, e tal caráter possibilitaria maior condutância de CO_2 e, conseqüentemente, maior taxa fotossintética (MOTT et al., 1982).

A densidade média de estômatos foi igual a $70,6 \pm 10,6 \text{ mm}^{-2}$ (média \pm desvio padrão) na face adaxial e $237,0 \pm 29,6 \text{ mm}^{-2}$ na face abaxial (Tab. 1). Em soja, o número de estômatos por área é um caráter que sofre influência ambiental e é variável entre as diferentes cultivares (BUTTERY et al., 1993). Cultivares que sintetizam camferol triglicosilado (K9) têm densidade estomática reduzida, especialmente na face adaxial. Plantas sem K9 exibiram densidade estomática na face adaxial igual a 110 mm^{-2} , enquanto plantas com K9, 2 mm^{-2} (BUTTERY et al., 1993). Foi demonstrado, ainda, que elevados níveis de UV-B podem reduzir a densidade estomática, especialmente na face adaxial, nas cultivares Essex, OX921 e OX922 (GITZ et al., 2005). Baixos níveis de luz azul, aliados a altas irradiâncias, reduzem a densidade de estômatos na face adaxial, mas a aumenta na face abaxial em cultivares de soja, indicando diferentes vias regulatórias envolvidas na formação dos estômatos nas duas faces foliares (LIU-GITZ et al., 2000). No presente trabalho, indivíduos das variedades transgênicas e não transgênicas, estando nas mesmas condições ambientais, não diferiram em relação a tal caráter. Logo, pode-se concluir que o processo de transformação não o afetou.

Dois tipos de tricomas foram observados, os tectores unisseriados, constituídos por uma célula basal, uma intermediária e uma célula apical alongada, cujas dimensões podem ser variadas (Fig. 13), e os glandulares unisseriados claviformes, compostos de cerca de cinco células, sendo uma basal, que se eleva acima do nível das demais células epidérmicas, três intermediárias achatadas dorsiventralmente, em formato discóide, e uma apical em formato semi-esférico (Fig. 14). As células epidérmicas que rodeiam a célula basal do tricoma tector exibem um arranjo radial. Vários tipos de tricomas podem ser encontrados entre as fabáceas (METCALFE e CHALK, 1950; LACKEY, 1978). O tipos de tricomas tector e glandular claviforme encontrados em *G. max* são comuns à família (METCALFE e CHALK, 1950; LACKEY, 1978).

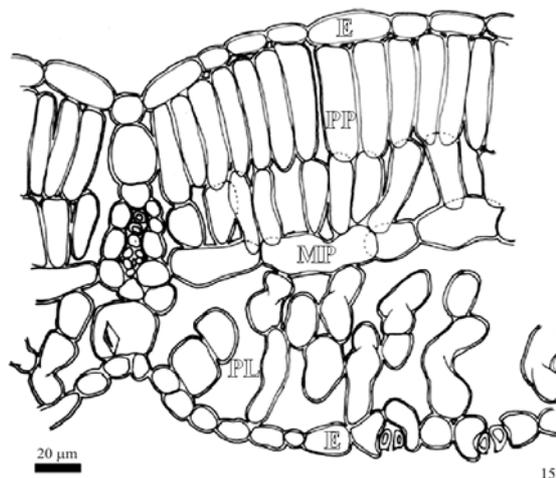


Figura 15 - Desenho de secção transversal do folíolo central da folha de *Glycine max* (L.) Merrill cv. BR16 entre a nervura principal e o bordo. E - epiderme; PP - parênquima paliçádico; MP - mesófilo paranervial; PL - parênquima lacunoso. Planta transgênica.

A epiderme, em secção transversal, é unisseriada com células de contorno elíptico a circular nas duas faces foliares, exibindo fina cutícula (Fig. 15). Depressões na epiderme coincidem com nervuras de menor porte (Fig. 15).

A espessura média do mesofilo foi igual a $160,48 \pm 16,11 \mu\text{m}$. Estudos mostram que a espessura do mesofilo em soja é diretamente relacionada à capacidade de troca de CO_2 (DORNHOFF e SHIBLES, 1976) e é influenciada por condições nutricionais (SIMS et al., 1998; CHIERA et al., 2002). Gotículas lipídicas foram evidenciadas no mesofilo. Amido foi evidenciado em células do parênquima clorofiliano e em células parenquimáticas da nervura central.

O mesofilo é do tipo dorsiventral, possuindo duas camadas de células paliçádicas (Fig. 15), característico da tribo Phaseolae (LACKEY, 1978). O parênquima lacunoso é constituído de células de tamanhos e formatos variados e com espaços intercelulares bastante pronunciados (Fig. 15). Cristais de oxalato de cálcio solitários aparecem associados aos feixes vasculares, na bainha parenquimática. Mesofilo dorsiventral em *Glycine max* é uma característica também encontrada por Fisher (1967), Dornhoff e Shibles (1976), Dybing e Yarrow (1984), Vidal e Pognonec (1984), Sims et al. (1998) e Chiera et al. (2002) em diferentes cultivares. O mesmo tipo de mesofilo pode ser observado em diversos gêneros da família, tais como *Pueraria* (PEREIRA-NETO et al., 1997 e 1999), *Myrocarpus*, *Myroxylon* e *Myrospermum* (SARTORI et al., 2002). As nervuras de pequeno calibre são circundadas por bainha parenquimática de células de secção isodiamétrica, podendo apresentar extensões em direção as duas faces foliares (Fig. 15).

Abaixo da camada mais interna do parênquima paliçádico, observam-se células com orientação horizontal, se comparadas às demais células do mesofilo (Fig. 15). Fisher (1967) tratou do reconhecimento desse conjunto de células que, segundo ele, em secção paradérmica, formam uma rede regular em contato com a camada mais interna do parênquima paliçádico e se posiciona junto à bainha do feixe na altura do floema. Por causa de sua relação com os tecidos vasculares, essa rede de células foi denominada mesofilo paranerval, cuja função seria facilitar a translocação horizontal de produtos da fotossíntese (FISHER, 1967).

Esse tecido é de fácil observação por apresentar menor quantidade de cloroplastos e sua distribuição é ampla entre as fabáceas, freqüentemente possuindo função secretora (LACKEY, 1978). Metcalfe e Chalk (1950) reconheceram esse tecido em vários gêneros da família Fabaceae, entre eles *Arachis*, *Erythrina* e *Indigofera*, indicando preenchimento com substâncias taniníferas. Testes histoquímicos realizados no presente trabalho não evidenciaram tais substâncias em células do mesofilo paranerval, o que sugere que sua função esteja restrita ao transporte lateral, conforme proposto por Fisher (1967). O mesmo tecido pode ser observado nos trabalhos de Dornhoff e Shibles (1976), Dybing e Yarrow (1984), Sims et al. (1998) e Chiera et al. (2002) ao trabalharem com diferentes cultivares de soja.

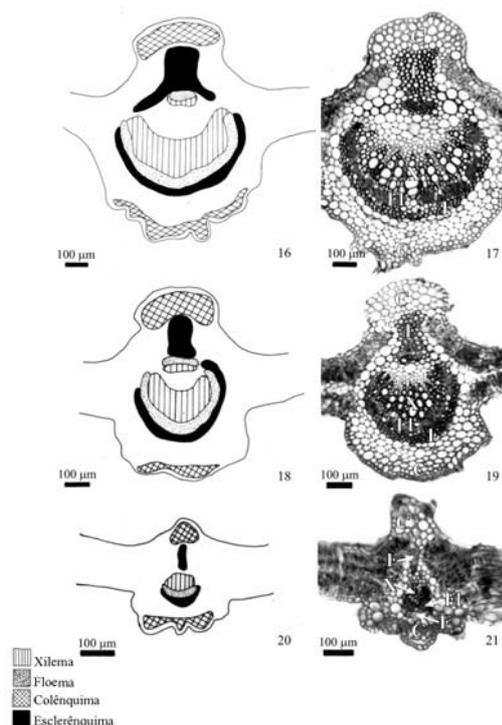


Figura 16-21 - Nervura principal do folíolo central da folha de *Glycine max* (L.) Merrill cv. BR16. 16, 18 e 20 - esquemas de seções transversais nos terços basal (16), mediano (18) e apical (20). 17, 19 e 21 - Seções transversais nos terços basal (17), mediano (19) e apical (21). Planta convencional. C - colênquima, F - fibras, FI - Floema, P - parênquima, X - xilema.

A nervura principal apresenta, em seção transversal, contorno biconvexo. O sistema vascular está constituído de um feixe sob a forma de um arco abaxial e um feixe menor voltado para a face adaxial, com floema externo ao xilema nos três terços (Fig. 16-21), padrão para a família Fabaceae (Metcalf e Chalk 1950).

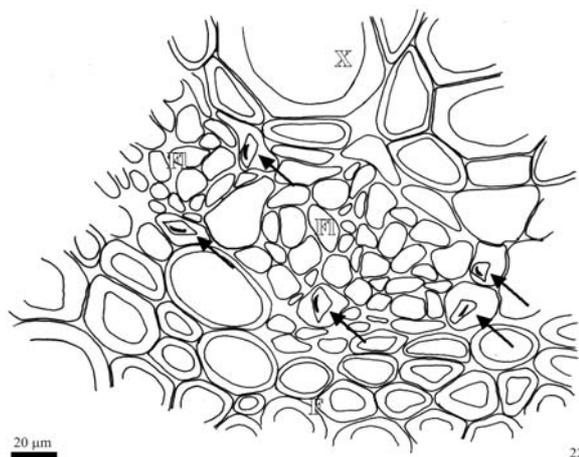


Figura 22 - Detalhe de feixe vascular do folíolo central da folha de *Glycine max* (L.) Merrill cv. BR16; as setas indicam cristais em células do floema. Planta convencional. F - fibras, FI - floema, X - xilema.

Observam-se fibras externas ao floema e colênquima angular com cerca de quatro camadas de células no arco adaxial e três camadas de células no arco abaxial em posição subepidérmica (Fig. 16-21). O parênquima paliádico se encontra interrompido pelo tecido colenquimático. Circundando os feixes vasculares e as fibras a eles associadas, observamos parênquima fundamental. Dybing e Yarrow (1984) observaram a mesma organização em plantas de soja da variedade Swift. Cristais prismáticos de oxalato de cálcio são observados em células do floema (Fig. 22) e parenquimáticas adjacentes às fibras, algo comum à família (METCALFE e CHALK, 1950).

Os resultados permitem concluir que, em soja, são aspectos anatômicos relevantes à sua caracterização: (1) a organização vascular do pecíolo, com seus feixes acessórios nas alas, típico do gênero *Glycine*, distinguindo-o dos demais gêneros da família; (2) a sinuosidade das paredes anticlinais das células epidérmicas adaxiais, ligada à subtribo Glycininae entre as fabáceas; e (3) o provável papel exclusivo de condução lateral desempenhado pelo mesofilo paranerval, tecido associado à secreção de substâncias nas demais espécies em que ocorre.

Como foi dito anteriormente, é desejável que uma planta transgênica seja idêntica, exceto pela característica introduzida, à convencional que lhe deu origem. A proteína BiP, superexpressada na cultivar transgênica estudada, é uma chaperona que facilita a naturalização de outras proteínas no retículo endoplasmático, prevenindo interações entre formas protéicas intermediárias. Sua produção é estimulada em situações de estresse como parte de uma via chamada *unfolded protein response* e que regularia a transcrição de um conjunto de proteínas residentes do retículo endoplasmático (ALVIN et al. 2001). A expressão de BiP está relacionada a uma série de fatores de estresse, que vão desde déficit hídrico até resposta a patogêneses. BiP atua facilitando a correta síntese de proteínas induzidas por estresse que estariam envolvidas no mecanismo de resposta osmótica (ALVIN et al. 2001). Pelo exposto, era de se esperar que, anatomicamente, as folhas da planta de soja transgênica fossem iguais à convencional, pois o mecanismo de resistência ao estresse hídrico mediado por BiP é fisiológico.

Estudos anatômicos evidenciam-se como importante ferramenta de controle de qualidade na produção de plantas transgênicas nos seus diversos estágios. Embora não se tenham verificado diferenças anatômicas entre as folhas da cultivar de soja BR16 convencional e transgênica nessa fase da produção da cultivar modificada, futuros trabalhos serão necessários quando testes de campo com plantas submetidas à seca forem liberados. O enfoque às demais partes da planta, como frutos e sementes, ao longo dos experimentos de campo da cultivar resistente ao estresse hídrico, também devem ser realizados.

Tabela 1 – Medidas dos caracteres anatômicos do folíolo central de *Glycine max* (L.) Merrill cv. BR16 convencional e transgênica (n=30).

Caráter estudado	Média ± desvio padrão
Espessura foliar	181,8 ± 15,26 µm
Densidade de estômatos na face adaxial	70,6 ± 10,6 mm ²
Densidade de estômatos na face abaxial	237,0 ± 29,6 mm ²
Espessura da epiderme na face adaxial	13,21±2,10 µm
Espessura da epiderme na face abaxial	9,01±1,36 µm
Espessura do mesofilo	160,48±16,11 µm

V. REFERÊNCIAS

- ALVIN, F. C. et al. Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. *Plant Physiology*, Rockville, v. 126, p.1042-1054, 2001.
- ARAGÃO, F. J. L. et al. 2000. Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merril] plants at a high frequency. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlim, v. 101, p. 1-6, 2000.
- BUKATSCH, F. Bemerkungen Zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. *Mikrokosmos*, Stuttgart v. 61, p. 255, 1972.
- BUTTERY, B. R. et al. Stomatal numbers of soybean and response to water stress. *Plant and Soil*, The Hague, v. 149, p. 283-288, 1993.
- CHAMBERLAIN, M. E. *Methods in plant histology*. Chicago: The University of Chicago Press, 1932.
- CHIERA, J.; THOMAS, J.; RUFT, T. Leaf initiation and soybean phosphorus stress. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v. 53, p. 473-481, 2002.
- DORNHOFF, G. M.; SHIBLES, R. Leaf morphology and anatomy in relation to CO₂-exchange rate of soybean leaves. *Crop Science*, Madison, v. 16, p. 377-381, 1976.
- DYBING, C. D.; YARROW, G. L. Mophactin effects on soybean leaf anatomy and chlorophyll content. *Journal of Plant Growth Regulation*, New York, v. 3, p. 9-21, 1984.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx>>. Acesso em: out. de 2007.
- FISHER, D. B. An unusual layer of cells in the mesophyll of soybean leaf. *Botanical Gazette*, Chicago v. 128, p. 215-218, 1967.
- GITZ, D. C. III et al. Ultraviolet-B effects on stomatal density, water-use efficiency, and stable carbon isotope discrimination in four glasshouse-grown soybean (*Glycine max*) cultivars. *Environmental and Experimental Botany*, Elmsford, v. 53, p. 343-355, 2005.
- JOHANSEN, D. A. *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill Book Co. Inc., 1940.

- KUIPER, H. A.; KOK, E. J.; ENGEL, K. H. Exploitation of molecular profiling techniques for GM food safety assessment. *Current Opinion in Biotechnology*, London, v. 14, p. 238-243, 2003.
- LACKEY, J. A. Leaflet anatomy of Phaseolae (Leguminosae: Papilionoideae) and its relation to taxonomy. *Botanical Gazette*, Chicago, v. 139, p. 436-446, 1978.
- LIU-GITZ, L.; BRITZ, S. J.; WERGIN, W. P. Blue light inhibits stomatal development in soybean isolines containing kaempferol-3-O-2G-glycosyl-gentiobioside (K9), a unique flavonoid glycoside. *Plant, Cell and Environment*, Oxford, v. 23, p. 883-891, 2000.
- METCALFE, C. R.; CHALK, L. *Anatomy of dicotyledons*. Oxford: Clarendon Press, 1950.
- _____. *Anatomy of dicotyledons*. Oxford: Oxford University Press, 1979.
- MOTT, K. A.; GIBSON, A. C.; O'LEARY, J. W. The adaptative significance of amphistomatic leaves. *Plant, Cell and Environment*, Oxford, v. 5, p. 455-460, 1982.
- PEREIRA, S. R. A evolução do complexo soja e a questão da transgenia. *Revista de Política Agrícola*, Brasília, v. 13, p. 26-32, 2004.
- PEREIRA-NETO, A. B.; GABRIELE, A. C.; PINTO, H. S. Aspects of leaf anatomy of tropical kudzu related to water and energy balance. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 32, p. 689-693, 1997.
- _____. Aspects of leaf anatomy of tropical kudzu (*Pueraria lobata*, Leguminosae-Faboideae) related to water and energy balance. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 34, p. 1361-1365, 1999.
- PURVIS, M. J.; COLLIER, D. C.; WALLS, D. *Laboratory techniques in botany*. Londres: Butterworths, 1964.
- ROCHA, J. A.; TAVARES, E. S.; CARVALHO, V. Análise farmacognóstica de *Bacopa monnieri* (L.) Pennell (Scrophulariaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, São Paulo, v. 81, p. 76-80, 2000.
- SARTORI, A. L. B.; TOZZI, A. M. G. A. Comparative leaflet anatomy in *Myrocarpus* Allemão, *Myroxylon* L. f and *Myrospermum* Jacq. (Leguminosae – Papilionoideae – Sophoreae) species. *Botanical Journal of the Linnean Society*, London, v. 140, p. 249-259, 2002.
- SILVA, L. M.; ALAQUINI, Y.; CAVALLET, V. J. Inter-relações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. *Acta Botanica Brasílica*, Porto Alegre, v. 19, p. 183-194, 2005.
- SIMS, D. A.; SEEMANN, J. R.; LUO, Y. Elevated CO₂ concentration has independent effects on expansion rates and thickness of leaves across light and nitrogen gradients. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v. 49, p. 583-591, 1998.
- TAVARES, E.S., GIL, V.R.; VIANA, V.R. C. Anatomia do eixo vegetativo de *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae). *Revista Brasileira de Farmácia*, Rio de Janeiro, v. 81, p. 25-28, 2000.
- VIDAL, A.; POGNONEC, J. C. Effet de l'alimentation en eau sur quelques caractères morphologiques et anatomiques des feuilles de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). *Agronomie*, Paris, v. 4, p. 967-975, 1984.
- WILSON, A.; LATHAM, J.; STEIBRECHER, R. Genome scrambling – myth or reality? Disponível em: <<http://www.econexus.info/pdf/ENx-Genome-Scrambling-Report.pdf>>. Acesso em: out. de 2007>.