

Avaliação agronômica do milho geneticamente modificado com o gene SbMATE, que confere tolerância ao alumínio: Processo de Biossegurança para o primeiro estudo de campo



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
173**

Avaliação agronômica do milho
geneticamente modificado com o gene
SbMATE, que confere tolerância ao
alumínio: Processo de Biossegurança
para o primeiro estudo de campo

*Maria José Vilaça de Vasconcelos
Andreia Almeida Carneiro
Jurandir Vieira de Magalhães
Claudia Teixeira Guimarães*

*Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2018*

Esta publicação está disponível no endereço:
<https://www.embrapa.br/milho-e-sorgo/publicacoes>

Embrapa Milho e Sorgo
Rod. MG 424 Km 45
Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3027-1100
Fax: (31) 3027-1188
www.embrapa.br/fale-conosco/sa

Comitê Local de Publicações
da Unidade Responsável

Presidente
Sidney Netto Parentoni

Secretário-Executivo
Elena Charlotte Landau

Membros
*Antonio Claudio da Silva Barros, Cynthia
Maria Borges Damasceno, Maria Lúcia
Ferreira Simeone, Roberto dos Santos
Trindade e Rosângela Lacerda de Castro*

Revisão de texto
Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica
Rosângela Lacerda de Castro (CRB 6/2749)

Tratamento das ilustrações
Tânia Mara Assunção Barbosa

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Tânia Mara Assunção Barbosa

Foto da capa
Maria José Vilaça de Vasconcelos

1ª edição
Formato digital (2018)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Nome da unidade catalogadora

Avaliação agrônômica do milho geneticamente modificado com o gene SbMATE,
que confere tolerância ao alumínio: Processo de Biossegurança para o primei-
ro estudo de campo / Maria José Vilaça de Vasconcelos ... [et al.]. -- Sete
Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2018.

22 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo,
ISSN 1679-0154; 173).

1. *Zea mays*. 2. Genética. 3. Gene. 4. Planta transgênica. 5. Biotecnologia. I.
Vasconcelos, Maria José Vilaça de. II. Carneiro, Andrea Almeida. III. Magalhães,
Jurandir Vieira de. IV. Guimarães, Cláudia Teixeira. V. Série.

CDD 633.15 (21. ed.)

Rosângela Lacerda de Castro (CRB 6/2749)

© Embrapa, 2018

Sumário

Resumo	4
Abstract	6
Introdução.....	7
Material e Métodos	8
Resultados e Discussão	17
Conclusões.....	20
Agradecimentos.....	20
Referências	20

Avaliação agronômica do milho geneticamente modificado com o gene *SbMATE*, que confere tolerância ao alumínio: Processo de Biossegurança para o primeiro estudo de campo

Maria José Vilaça de Vasconcelos¹

Andreia Almeida Carneiro²

Jurandir Vieira de Magalhães³

Claudia Teixeira Guimarães⁴

Resumo – O desenvolvimento de uma planta geneticamente modificada envolve a introdução de um ou vários genes exógenos nesse organismo, sem que haja fecundação ou cruzamento. As plantas que tiveram seu código genético alterado pela introdução de uma ou mais sequências de DNA provenientes de outra espécie devem passar por rigorosas análises que comprovam suas características agronômicas e de segurança, tanto para o meio ambiente, como para os seres vivos, cujo conjunto de práticas são chamadas de biossegurança. A biossegurança de uma planta transgênica, além de trabalhos em regime de contenção, passa por liberações planejadas no meio ambiente para se obter dados agronômicos, físico-químicos e ambientais, visando o preparo de um dossiê para a liberação comercial. O presente trabalho avaliou o desempenho agronômico de híbridos de milho geneticamente modificados com o gene *SbMATE*, derivado de sorgo, combinado com o gene nativo *ZmMATE1*. Ambos os genes foram previamente caracterizados como responsáveis pelo aumento da tolerância ao Al nas respectivas espécies. Nossos resultados demonstraram que os híbridos de milho com o alelo superior do *ZmMATE1* produziram mais grãos que os respectivos isogênicos em solo com saturação intermediária de Al, e que

¹ PhD, Farmacêutica/Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo.

² PhD, Bióloga, pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo.

³ PhD, Engenheiro-agrônomo, pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo.

⁴ PhD, Engenheira-agrônoma, pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo.

os híbridos transgênicos expressando o gene *SbMATE* não apresentaram superioridade agronômica, em relação às versões isogênicas convencionais. No entanto, esses resultados devem ser restritos ao evento transgênico avaliado e não ao gene *SbMATE*, cujo alelo superior já demonstrou aumentar a produção de grãos em sorgo cultivado em solo ácido.

Termos para Indexação: Biossegurança de OGM, RN 6, avaliação agronômica, gene *Sb MATE*

Agronomic evaluation of genetically modified corn conferring tolerance to aluminum: Biosafety process for the first field studies

Abstract – The development of a genetically modified plant involves the transfer or introduction of one or more exogenous genes into that organism without fertilization or crossing. Plants that had their genetic code altered by the introduction of one or more DNA sequences from another species must undergo rigorous analyzes to prove their agronomic and biosafety characteristics for both environment and living beings, whose set of practices are called biosafety. The biosafety of a transgenic plant in addition to works in a containment regime goes through planned releases in the environment, or in field experiments to obtain agronomic, physicochemical and environmental data for the preparation of a commercial release dossier. The present work evaluated the agronomic performance of genetically modified maize hybrids with the sorghum *SbMATE* gene, combined with the native gene *ZmMATE1*. Both genes were previously characterized as responsible to increase tolerance to Al in their respective species. Our results showed that the maize hybrids with the superior allele of *ZmMATE1* produced more grains than their respective isogenic hybrids in the soil with intermediate saturation of Al, and that the transgenic hybrids expressing the *SbMATE* showed no agronomic superiority over the conventional isogenic versions. However, these results should be restricted to the selected transgenic event evaluated herein and not to the *SbMATE* gene, whose superior allele has already been shown to increase grain yield in sorghum cultivated in acid soil.

Index terms: Biosafety of GMOs, RN 6, agronomic evaluation, *SbMATE* gene

Introdução

O desenvolvimento de uma planta geneticamente modificada envolve a transferência ou introdução de um ou vários genes exógenos nesse organismo sem que haja fecundação ou cruzamento. Essas plantas recebem o nome de plantas transgênicas, pois tiveram seu código genético alterado pela introdução de uma ou mais sequências de DNA provenientes de outra espécie.

Após o desenvolvimento de uma planta transgênica, ela deve passar por rigorosas análises que comprovam suas características agronômicas e de biossegurança tanto para o meio ambiente como para os seres vivos, cujo conjunto de práticas chamamos de biossegurança. A biossegurança de uma planta transgênica tem sido aplicada como sinônimo de aspectos relacionados ao cumprimento da legislação que devemos seguir quando estamos manipulando uma planta transgênica, seja ela em regime de contenção, em liberações planejadas no meio ambiente, ou em experimentos para obtenção de dados agronômicos, físico-químicos e moleculares para o preparo de um dossiê de liberação comercial. O conjunto de práticas e de ações técnicas relacionadas à segurança de um Organismo Geneticamente Modificado - OGM visa conhecer e controlar os riscos que esses organismos podem oferecer ao ambiente e à vida. Essa segurança só é alcançada por meio da aplicação adequada da análise de risco/segurança e da gestão do risco. A avaliação de risco de OGMs deve ser baseada em dados científicos sólidos e deve ser aplicada caso a caso.

Nesse processo, foi realizado o estudo em campo de uma planta de milho transgênico expressando o gene *SbMATE*, isolado de sorgo, que confere tolerância ao alumínio. Normalmente, a tolerância a estresses abióticos é uma característica que confere uma vantagem adaptativa às plantas transgênicas sob condições de estresse e pode aumentar a sua habilidade competitiva quando comparado com a sua linhagem isogênica. Especificamente neste caso, a estratégia utilizada para o desenvolvimento da planta transgênica com altos níveis de tolerância ao alumínio utilizando gene *SbMATE*, que codifica um transportador de citrato da família MATE (*Multidrug and Toxic Compound Extrusion*) ativado pelo alumínio no ápice radicular de genótipos tolerantes de sorgo (Magalhães et al., 2007), não confere à planta nenhuma

característica de invasão voluntária em ambientes naturais ou sua persistência em campos agrícolas (Ellstrand; Hoffman, 1990; Ellstrand, 2001; Lu, 2008). Assim, podemos dizer que a presença do gene *SbMATE* não irá modificar as características do milho como uma planta domesticada.

Será descrita a metodologia utilizada nesse experimento, baseada na Resolução Normativa 6 (RN-6) da CTNBio para avaliar a produtividade do milho geneticamente modificado com o gene *SbMATE*, sob diferentes teores de saturação de alumínio no solo (Brasil, 2008).

Material e Métodos

Metodologia para a primeira avaliação em campo de um milho geneticamente modificado tolerante ao alumínio – Milho *SbMATE*

Para uma avaliação, em campo, de uma planta geneticamente modificada precisamos seguir a legislação brasileira de biossegurança. A Lei Nacional de Biossegurança - Lei nº 11.105 estabelece como o pré-requisito básico para se trabalhar com OGMs e seus derivados, tanto em contenção como em liberações em campo, o Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB) (Brasil, 2005), que é emitido pela CTNBio após a análise da solicitação, segundo a Resolução Normativa 01 (RN-1) (Brasil, 2006). No presente trabalho, foi necessário submeter apenas o pedido de CQB para a área onde foi realizada o estudo em campo do milho expressando o gene *SbMATE*, pois os laboratórios do Núcleo de Biologia Aplicada da Embrapa Milho e Sorgo já possuíam CQB.

Ainda, respeitando a Lei de biossegurança vigente no País, após receber o certificado em Biossegurança da área a ser realizada o experimento de campo do OGMs, outro pedido de autorização deve ser submetido à CTNBio, que é o pedido de Liberação Planejada no Meio Ambiente (LPMA), seguindo a Instrução Normativa de número 6 (RN-6) que estabelece normas de biossegurança para condução de experimentos em campo para avaliar características agrônômicas e de biossegurança de uma planta transgênica expressando o gene *SbMATE* levada pela primeira vez ao meio ambiente.

A – Informações requeridas para o pedido da primeira liberação no meio ambiente do milho-*SbMATE*.

A-1: Informações sobre a instituição

- Nome da Instituição Responsável;
- Endereço para contato com a CIBio;
- Nome, cargo e endereço do Responsável Legal e do Técnico Principal;
- Parecer da CIBio, incluindo comentários sobre a capacidade do Técnico Principal para gerenciamento dos trabalhos, a adequação do planejamento experimental contido na proposta, escolha do local e plano emergencial de segurança;
- Declaração: “A informação aqui fornecida é, no limite de meu conhecimento, completa, acurada e verdadeira” (nome e assinatura do Responsável Legal e data); Endosso da CIBio: “A CIBio avaliou e endossa esta proposta” (nome, data e assinatura do presidente da CIBio);
- Nome e assinatura do Responsável Legal e data.

A-2: Informações sobre o OGM de origem vegetal

- Informar a espécie do vegetal a ser liberada (incluir, quando apropriado, nome científico, subespécie, cultivar, etc.);
- Informar as alterações genéticas introduzidas e suas consequências;
- Informar o vetor utilizado e a metodologia de transformação;
- Apresentar a sequência do ADN/ARN exógeno, indicando os elementos regulatórios presentes;
- Indicar um ou mais marcadores (fenotípico, citogenético ou molecular) que possibilite identificar o OGM de origem vegetal;
- Informar os números dos processos aprovados na CTNBio dos quais a atual proposta é um prosseguimento;
- Descrever as características genéticas do OGM de origem vegetal que possam afetar sua sobrevivência no meio ambiente;

- Informar a existência de espécies sexualmente compatíveis no local de liberação e as medidas adotadas para contenção do fluxo gênico;
- Descrever como será monitorada a sobrevivência do OGM de origem vegetal no local de liberação planejada.

A-3: Informações sobre a liberação planejada de OGM de origem vegetal

- Título da proposta;
- Informar o objetivo da proposta;
- Fornecer o endereço do local proposto para a condução da liberação planejada;
- Informar os procedimentos para o transporte do OGM de origem vegetal ao local da liberação planejada, indicando a sua procedência;
- Descrever o protocolo experimental para a liberação planejada e o monitoramento durante a condução do experimento;
- Incluir procedimentos de biossegurança, condições de isolamento, práticas agrônomicas e procedimentos de descarte e de armazenamento;
- Informar a dimensão da área total da liberação planejada e da área ocupada pelo OGM;
- Informar a quantidade de OGM de origem vegetal a ser liberado;
- Informar a data prevista para o início da liberação planejada;
- Informar a data prevista para a conclusão da liberação planejada;
- Descrever os procedimentos para a supervisão da área da liberação planejada e os procedimentos de segurança que deverão ser conduzidos pelos responsáveis.
- A CIBio deverá listar o pessoal responsável pelo desenvolvimento do experimento e descrever o treinamento recebido pelos membros da sua equipe, juntamente com a carta de informe de plantio do experimento.

- Informar se haverá transferência ou envio de material para análise ou armazenamento em outra unidade e qual será o destino;
- Informar se existe a possibilidade de a liberação planejada afetar as características ou abundância de outras espécies, e como isto será monitorado;
- Caso o OGM de origem vegetal permaneça no ambiente após o experimento de liberação planejada, deve-se informar duração e possíveis consequências, bem como as medidas utilizadas para reduzir populações ou restos do OGM de origem vegetal, e o monitoramento a ser efetuado;
- Informar as medidas a serem tomadas para remoção do OGM de origem vegetal, caso ocorra algum perigo evidente no decorrer do experimento de liberação planejada.

A-4: Mapas e croquis para a liberação planejada no meio ambiente de OGM de origem vegetal

- Nome do Município e do Estado;
- Nome da propriedade e do proprietário;
- Endereço completo da propriedade e número de telefone, fax e endereço eletrônico;
- Croquis, indicando nome da rodovia principal de acesso à propriedade, referência à cidade mais próxima, identificação da entrada da propriedade, quilômetro de referência para a entrada da propriedade e rodovia secundária/vicinal;
- Apresentar o mapa da área credenciada no CQB, incluindo a dimensão dos mapas e a escala utilizada neles, que devem ser coerentes com o OGM, tendo em vista os comunicados de isolamento publicados pela CTNBio; informar a escala cartográfica (nominal e gráfica), a orientação pela rosa dos ventos e as coordenadas geográficas da área experimental; indicar as benfeitorias; identificar os limites da área credenciada no CQB; identificar as áreas de proteção permanente e reserva legal; indicar curvas de nível com espaçamento equivalente a 2 metros de altitude em terrenos com declividade entre 2% a 5%, ou, a critério técnico, em casos de declividade superiores a 5%, indicando

os pontos de irrupção de vertentes; indicar rede hidrográfica (rios, córregos, lagos naturais ou artificiais e açudes); indicar profundidade máxima e mínima do lençol freático; informar a localização do experimento com as coordenadas geográficas dentro da área credenciada no CQB. Caso haja necessidade de alterar o local, desde que dentro da mesma área credenciada no CQB e atendendo às normas da CTNBio, o requerente deverá informar o local exato em até 15 (quinze) dias após a instalação do experimento;

- Caracterização da área circunvizinha à propriedade: descrição dos cultivos vizinhos, e quando possível, apresentação de croqui de localização; indicar as vias de circulação da área; informar tipo do bioma, conforme mapa oficial do IBGE; informar tipo de vegetação, conforme mapa oficial do IBGE;
- Fornecer um mapa de apresentação ou, na impossibilidade, a distância das Unidades de Conservação, em um raio de 5 km no entorno da estação experimental;
- Os mapas de apresentação deverão vir acompanhados com texto de descrição complementar da zona de avaliação, contendo as seguintes informações: dados climatológicos (frequência de ventos anormalmente fortes e tempestades, pluviometria média por mês, temperaturas médias por mês); dados pedológicos (descrição do tipo de solo, com ênfase ao horizonte A);

Metodologia experimental

O experimento foi conduzido na área com CQB (Figura 1), que foi dividida em 64 parcelas contendo diferentes saturações de Al (Figura 2). As parcelas foram estratificadas em três níveis de saturação de Al, sendo eles: solo corrigido (saturação de Al entre 0 e 2%), saturação intermediária (entre 8 e 10%) e solo com alta saturação de Al (entre 20 e 40%). Em cada parcela foram plantadas 4 linhas de 5 m espaçadas de 0,7 m representando uma área de 5 m x 2,8 m. Uma semente foi plantada a cada 20 cm ao longo da linha. Toda a área do experimento foi cercada e sinalizada com placas identificando o plantio de OGMs, com entrada restrita para pessoas autorizadas e treinadas. O local foi constantemente vigiado.

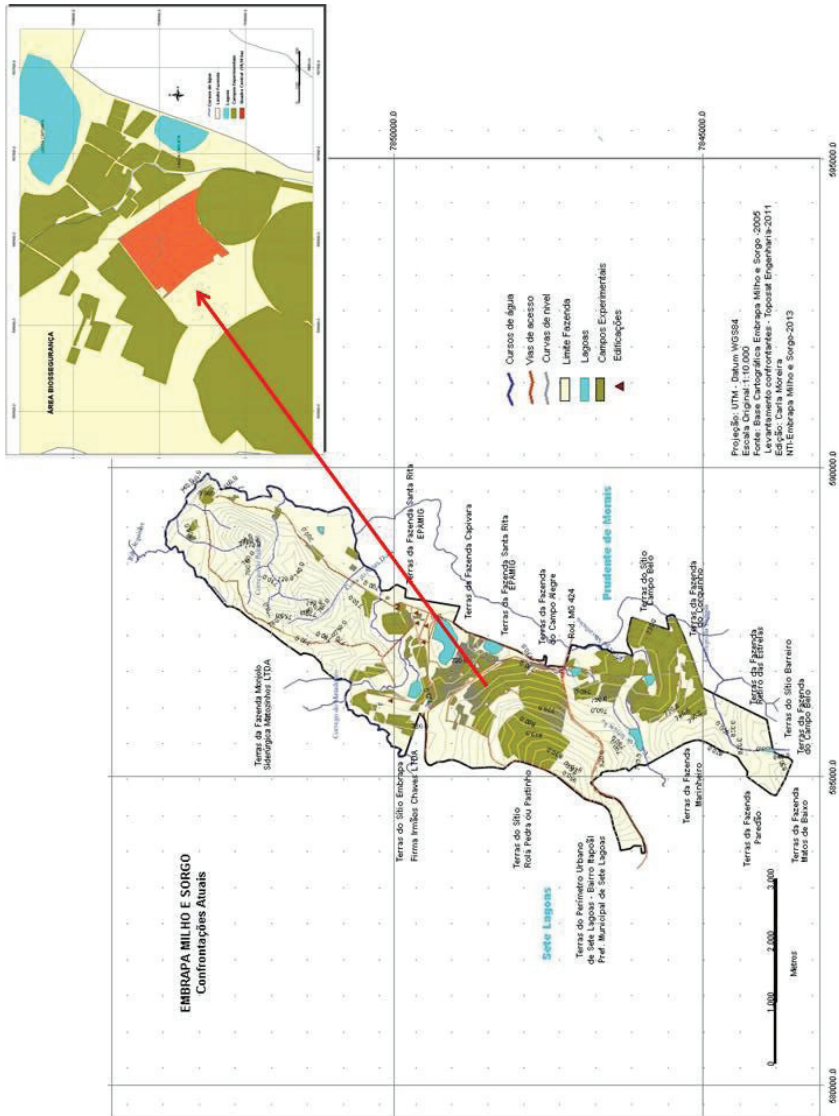


Figura 1. Mapa da Fazenda da Embrapa Milho e Sorgo mostrando a área credenciada com CQB para condução do experimento.

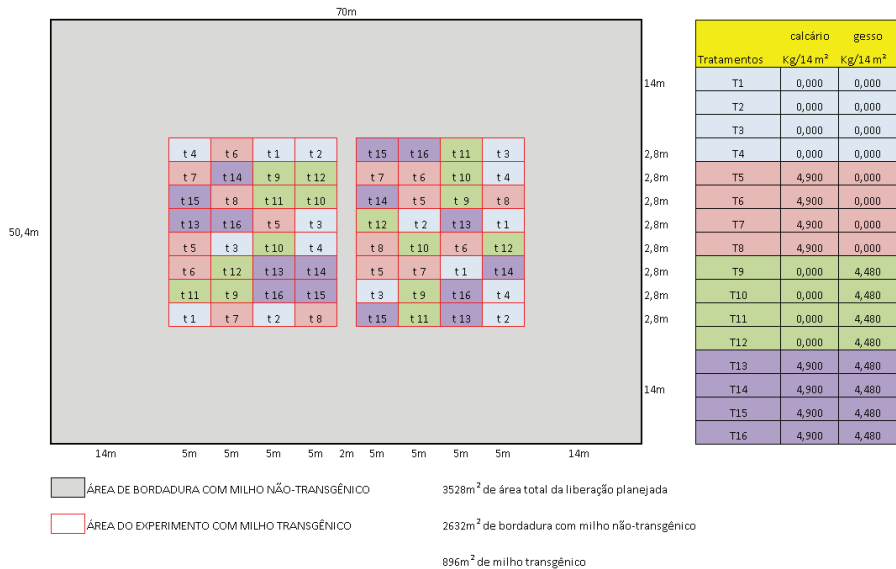


Figura 2. Delineamento Experimental da Liberação Planejada da Área 1.

Os materiais genéticos foram pares de híbridos isogênicos de milho derivados dos cruzamentos entre as linhagens L3 convencional e L3 contendo o transgene *SbMATE* (L3TT) com a linhagem L53, altamente sensível ao AI, e suas linhagens isogênicas introgrididas com o gene *ZmMATE*, denominadas de NILs. As NILs foram obtidas por retrocruzamento assistido, que apresentaram o dobro da tolerância ao AI em solução nutritiva quando comparada com a L53 (Guimarães et al., 2014). Assim, os híbridos testados foram L3xL53, L3TTxL53, L3xNILs e L3TTxNILs. O híbrido BRS1010 foi utilizado como testemunha intercalar.

Plantio - As sementes foram contadas e manipuladas nos laboratórios do Núcleo de Biologia Aplicada, que possuem CQB, sendo acondicionadas em sacos de papel individuais, rotulados, identificados e organizados em bandejas que foram embaladas em sacos plásticos. As sementes foram transportadas em carro próprio da empresa até a área de plantio, que foi realizado manualmente, por pessoas devidamente treinadas nas normas de Biossegurança. Após o plantio, todos os restos culturais foram recolhidos e enterrados à profundidade maior que 50 cm, em local apropriado para descarte de OGM.

Isolamento temporal e espacial - Foram adotados isolamentos reprodutivos temporal e espacial, sendo mantida distância de 10 metros de outros plantios de milho e respeitando-se o intervalo de florescimento de 40 dias entre as datas de florescimento do evento de milho transgênico em relação aos outros plantios de milho.

Bordadura - Foram plantadas 22 linhas de bordadura espaçadas de 0,70 m nas partes superior e inferior do experimento, sendo que a legislação solicita 20 linhas. No sentido longitudinal do experimento, foram instalados 20 metros de bordadura com plantas espaçadas a 0,20 m, totalizando pelo menos 100 plantas por linha nas duas extremidades do experimento. Esse procedimento foi realizado em função da adequação às práticas agronômicas e de conservação de solo e água. Nas bordaduras foram utilizados genótipos convencionais isogênicos aos utilizados nos experimentos. Mais detalhes podem ser visualizados na Figura 3, onde a área experimental está ressaltada por linhas pontilhadas.

Colheita - As espigas empalhadas foram colhidas manualmente em 09/02/2015, sendo devidamente identificadas e acondicionadas em sacos plásticos. O material foi transportado para o Galpão de OGMs, que também possui CQB, para debulha, pesagem e quantificação da umidade dos grãos.

Práticas agronômicas - O experimento foi irrigado, sendo realizadas adubações, controle de pragas e de plantas daninhas conforme as demandas. As adubações foram manuais, e as pulverizações foram realizadas com pulverizador costal. As visitas à área eram diárias, com imagens monitoradas por drone nas datas de 16/10, 21/10, 29/10, 07/11, 17/11, 25/11 e 02/12 de 2014.

Descarte - Espigas, palhas e grãos que haviam sido removidos da área experimental para mensuração foram acondicionados em sacos plásticos reforçados e transportados de volta à área cercada. Todos os restos culturais foram descartados em uma trincheira de aproximadamente 1 m de profundidade e enterrados.

Os dados coletados nos experimentos de liberação planejadas no meio ambiente irão fazer parte do dossiê de liberação comercial. A condução dos experimentos seguindo a legislação específica de Biossegurança brasileira constitui parte fundamental para a regulamentação dessa planta de milho

com tolerância aumentada para ambientes com alto teor de alumínio, como o cerrado brasileiro.

Todo experimento de LPMA recebe a fiscalização do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa). Os fiscais do Mapa recebem uma cópia da LPMA aprovada pela CTNBio para fiscalização.

Medidas de Biossegurança

A seguir serão descritas as medidas adotadas na condução do experimento em campo do milho *SbMATE*.

Toda a área do experimento foi cercada e sinalizada com placas identificando o plantio de OGMs.

Entrada restrita a pessoas autorizadas e treinadas.

O local foi constantemente vigiado por funcionários da empresa e da vigilância.

Isolamento temporal: foi mantida distância de 10 metros de outros plantios de milho, respeitando-se o intervalo de florescimento de 40 dias entre as datas de florescimento do evento de milho transgênico em relação aos outros plantios de milho.

Bordadura: foram instaladas bordaduras de isolamento de 20 linhas de milho convencional. A bordadura de isolamento instalada ao redor do experimento seguiu os mesmos procedimentos de plantio, manejo e descarte das áreas experimentais, sendo descartadas após o término da polinização.

Todo o material residual de laboratório e/ou de campo, derivado do experimento, foi eliminado em área de descarte apropriada para OGMs, e o material transgênico foi enterrado em profundidade suficiente para evitar a emergência.

Para transporte, todo material coletado que precisar ser removido para análise posterior, como solo, sementes e fragmentos foliares, deverá ser embalado em embalagens de papel apropriado para evitar o escape. O transporte será feito de acordo com a legislação de biossegurança.

As práticas agronômicas recomendadas à cultura do milho serão adotadas para o controle de pragas e doenças, e o manejo dos experimentos será realizado de forma compatível com o experimento.

Após o término do experimento de LPMA, a área experimental deverá ser monitorada, por um período de 4 meses com irrigação ou de 6 meses sem irrigação. Todas as plantas de milho emergentes durante esse monitoramento foram arrancadas e descartadas conforme descrito anteriormente.

Comunicações à CTNBio e ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (Mapa)

Foram comunicadas por escrito à CTNBio e ao Mapa as coordenadas geográficas exatas do experimento e a data exata do plantio do experimento, dentro da área detentora do CQB, 15 dias após o plantio.

Foi comunicado por escrito à CTNBio e ao Mapa, até 15 dias após a colheita, o término do experimento, data a partir da qual se iniciou o monitoramento.

Foi enviado a CTNBio, após seis meses de conclusão da LPMA, o relatório dessa liberação planejada no meio ambiente.

Monitoramento da área experimental

Após finalização do experimento, ou seja, a colheita final e o descarte dos restos culturais em vala própria dentro da área de CQB, iniciou-se o processo de monitoramento da área. Esse monitoramento pode ser feito com irrigação durante quatro meses ou sem irrigação durante seis meses. Para o monitoramento, foram efetuados sitas semanais e anotações no livro de campo de todas as plantas germinadas.

Resultados e Discussão

Os ambientes foram constituídos por três níveis de saturação de Al: solo corrigido (0 e 2% de saturação de Al), saturação intermediária (8 a 10%) e solo com alta saturação de Al (20 a 40%), e os híbridos testados apresentaram diferentes combinações de genes de tolerância ao Al: o gene nativo de milho *ZmMATE1*, presente nas NILs e ausente na L53 e o transgene de sorgo *SbMATE* transformado na L3: L3xL53, L3TTxL53, L3xNILs e L3TTxNILs.

No geral, houve uma tendência de redução na produção de grãos de todos os híbridos, em função do aumento da saturação de Al no solo (Figura 3), o que seria esperado conforme apresentado por Carvalho Jr. et al. (2015). Em solo corrigido, não houve diferença estatística na produção de grãos entre os híbridos transgênicos e convencionais. Na faixa intermediária de saturação de Al, foi observada uma perda de produtividade do híbrido transgênico em relação ao convencional, derivado do cruzamento com a L53. Por outro lado, os híbridos derivados dos cruzamentos com as NILs aumentaram significativamente a produtividade em relação aos cruzamentos com a L53. Esse aumento na produtividade foi conferido pelo gene *ZmMATE1*, que aumentou a tolerância ao Al nas NILs em solução nutritiva (Guimarães et al., 2014). Esses híbridos atingiram uma estabilidade de produção comparável ao desempenho agrônomo deles em solo corrigido e à testemunha BRS1010, reforçando que a tolerância ao Al foi responsável pela estabilidade de produção. Em solo com alta saturação de Al também não foram observadas diferenças significativas entre os híbridos avaliados (Figura 3).

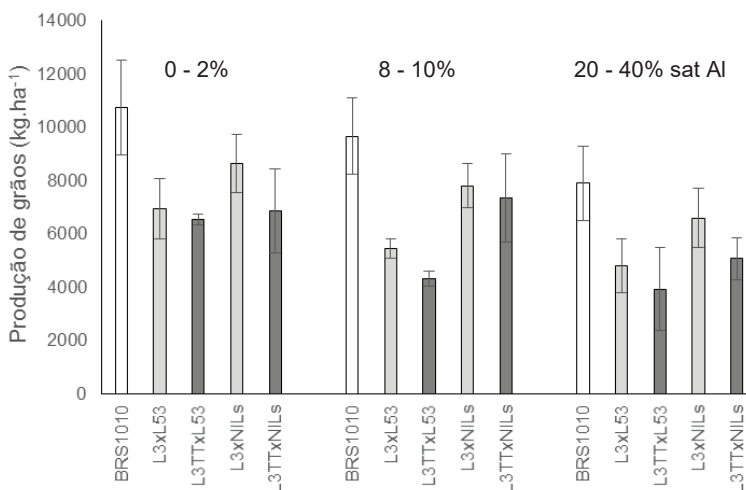


Figura 3. Produção de grãos de híbridos de milho derivados dos cruzamentos entre L3 convencional e sua isogênica expressando o gene *SbMATE* (L3TT) com a linhagens L53 e suas isogênicas para o QTL de tolerância ao Al (NILs) em diferentes níveis de saturação de alumínio (Al) no solo.

Resultados anteriores confirmaram que os híbridos com a linhagem L3 transgênica (L3TT) apresentaram tolerância ao Al em solução nutritiva significativamente superior aos híbridos derivados da L3 convencional, sendo que L3xL53 foi o híbrido mais sensível ao Al em solução nutritiva com {39} μM de Al (Mitre, 2014). De forma geral, o aumento da tolerância ao Al em solução nutritiva conferido pela superexpressão do gene *SbMATE* não resultou em ganhos na produção de grãos em condições de campo com diferentes níveis de saturação de Al. Ao contrário, houve uma redução significativa na produção de grãos de L3TTxL53 em comparação com L3xL53 em solo com saturação intermediária ao Al. Nesse nível de saturação de Al no solo, os cruzamentos com as NILs, que possuem o alelo superior do gene *ZmMATE1*, tiveram uma performance superior em relação aos respectivos híbridos isogênicos sem o referido alelo. Apesar de o aumento na tolerância ao Al em solução nutritiva conferido pelo alelo superior do gene *ZmMATE1* ser menor que a superexpressão do *SbMATE* (Mitre, 2014), o alelo nativo do milho resultou em ganhos expressivos na produção de grãos no campo, em detrimento à presença do transgene, pelo menos em solo com saturação intermediária de Al.

Uma hipótese que pode explicar tais resultados é que a superexpressão constitutiva do *SbMATE* pode ter culminado em uma perda de carbono pela alta exsudação de citrato, causando um maior gasto energético pela planta e uma conseqüente perda na sua performance agrônômica em condições de campo. A redução na produtividade de grãos pode ter sido mais expressiva sob condições de estresse, considerando que a presença do Al pode ter induzido um aumento na exsudação de citrato, como ocorre com o gene *SbMATE* nativo (Magalhães et al., 2007), aumentando ainda mais o desbalanço energético para a planta. Essa hipótese ainda precisa de mais estudos para ser comprovada.

Em contrapartida, o alelo superior do *ZmMATE1* possui uma expressão induzida pela presença do Al e restrita ao ápice radicular (Maron et al., 2010; Guimarães et al., 2014), em que a proteção à toxidez pelo Al se faz necessária. É importante ressaltar que esses dados da ineficiência do transgene *SbMATE* em milho são válidos apenas para o evento que foi avaliado em condições de campo, não devendo ser extrapolado ao gene. Carvalho Jr. et al. (2015) demonstraram que a substituição alélica do *SbMATE* conferiu um ganho de 0,5 t/ha em híbridos de sorgo cultivados em solos ácidos, indicando

que a tolerância ao AI pode ser convertida em ganhos de produtividade em condições de campo.

Ajustes no controle da expressão do *SbMATE* seriam necessários para otimizar a obtenção de um número maior de eventos de milho transgênicos, para a seleção daqueles mais competitivos em condições de campo. No entanto, a existência de um alelo superior, que aumenta a tolerância ao AI em milho, sinaliza fortemente para as vantagens em utilizar cruzamentos naturais para aumentar a tolerância ao AI em cultivares de milho, que pode trazer ganhos no desempenho agronômico da cultura.

Conclusão

Os resultados não demonstraram uma superioridade agronômica de híbridos de milho expressando o gene *SbMATE*, em relação às versões isogênicas convencionais. Estudos com maior número de eventos transgênicos, em que seriam selecionados aqueles mais competitivos, em condições de campo, poderiam mostrar a superioridade desse gene *SbMATE*, cujo alelo superior já demonstrou aumentar a produção de grãos em sorgo cultivado em solo ácido. Assim, podemos concluir que esses resultados podem ser restritos ao evento selecionado e não ao gene.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Embrapa e à Fapemig pelo suporte financeiro.

Referências

BRASIL. **Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005.** Regulamenta os incisos II, IV e V do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados – OGM e seus derivados, cria o Conselho Nacional de Biossegurança – CNBS, reestrutura a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio, dispõe sobre a Política Nacional de Biossegurança – PNB, revoga a Lei nº 8.974, de 5 de janeiro de 1995, e a Medida Provisória nº 2.191-9, de 23 de agosto de 2001, e os arts.

5º, 6º, 7º, 8º, 9º, 10 e 16 da Lei nº 10.814, de 15 de dezembro de 2003, e dá outras providências. Brasília, DF, 24 mar. 2005. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2005/Lei/L11105.htm>. Acesso em: 10 maio 2018.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. **Resolução Normativa nº 1, de 20 de junho de 2006**. Dispõe sobre a instalação e funcionamento das Comissões Interna de Biossegurança (CIBios) e sobre os critérios e procedimentos para requerimento, emissão, revisão, extensão, suspensão e cancelamento do Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB). Brasília, DF, 20 jun. 2006.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. **Resolução Normativa nº 6, de 6 de novembro de 2008. Brasília, DF, 6 nov. 2008.**

CARVALHO JR., G.; SCHAFFERT, R. E.; MALOSETTI, M.; VIANA, J. H. M.; MENEZES, C. B.; SILVA, L. A.; GUIMARÃES, C. T.; COELHO, A. M.; KOCHIAN, L. V.; EEUWIJK, F. A. van; MAGALHÃES, J. V. Back to acid soil fields: the citrate transporter SbMATE is a major asset for sustainable grain yield for sorghum cultivated on acid soils. **G3 Genes, Genomes, Genetics**, Bethesda, v. 6, p. 475-484, 2015.

ELLSTRAND, N. C. When transgenes wander, should we worry? **Plant Physiology**, Bethesda, v. 125, p. 1543-1545, 2001.

ELLSTRAND, N. C.; HOFFMAN, C. A. Hybridization as an avenue for escape of engineered genes. **Bioscience**, Washington, v. 40, p. 438-442, 1990.

LU, B. R. Transgene escape from GM crops and potential biosafety consequences: an environmental perspective. **Collection of Biosafety Reviews**, v. 4, p. 41-66, 2008.

GUIMARÃES, C. T.; SIMÕES, C. C.; PASTINA, M. M.; MARON, L. G.; MAGALHÃES, J. V.; VASCONCELLOS, R. C. C.; GUIMARÃES, L. J. M.; LANA, U. G. de P.; TINOCO, C. F. S.; NODA, R. W.; BELICUAS, S. N. J.; KOCHIAN, L. V.; ALVES, V. M. C.; PARENTONI, S. N. Genetic dissection of Al tolerance QTLs in the maize genome by high density SNP scan. **BMC Genomics**, v. 15, n. 153, p. 1-14, 2014.

MAGALHÃES, J. V. de; LIU, J.; GUIMARÃES, C. T.; LANA, U. G. de P.; ALVES, V. M. C.; WANG, Y-H.; SCHAFFERT, R. E.; HOEKENGA, O. A.; PINEROS, M. A.; SHAFF, J. E.; KLEIN, P. E.; CARNEIRO, N. P.; COELHO, C. M.; TRICK, H. N.; KOCHIAN, L. V. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. **Nature Genetics**, New York, v. 39, n. 9, p. 1156-1161, 2007.

MARON, L. G.; PIÑEROS, M. A.; GUIMARÃES, C. T.; MAGALHÃES, J. V. de; PLEIMAN, J. K.; MAO, C.; SHAFF, J.; BELICUAS, S. N. J.; KOCHIAN, L. V. Two functionally distinct members of the MATE (multi-drug and toxic compound extrusion) family of transporters potentially underlie two major aluminum tolerance QTLs in maize. **The Plant Journal**, Oxford, v. 61, n. 5, p. 728-740, 2010.

MITRE, L. K. **Caracterização genética e morfofisiológica de linhagens e híbridos transgênicos de milho expressando o gene SbMATE de sorgo**. 2014. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

Embrapa

Milho e Sorgo

BOLETIM DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO 173



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



CGPE 15002

