

Avaliação do fluxo gênico entre a cultivar de soja BR-16 transgênica e BR-16 não-transgênica no ecossistema do Cerrado no Distrito Federal

S.ABUD¹, P.I.M.SOUZA¹, C.T.MOREIRA¹, G.R.VIANNA², S.R.M.ANDRADE¹, E.L.RECH², F.J. L.ARAGÃO²

¹Embrapa Cerrados, CP 08223, CEP 73301-970, Planaltina, DF;

²Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CP 0232, CEP 70770-900, Brasília, DF;

E-mail: abud@cpac.embrapa.br

INTRODUÇÃO

A soja é uma cultura de grande importância econômica no Brasil e no mundo e vem sendo utilizada na alimentação humana há vários séculos. Com o objetivo de aumentar sua produtividade e reduzir seu custo de produção, as equipes de melhoramento genético vêm desenvolvendo novas variedades e para isso, utilizando a engenharia genética que, apesar de mais de dez anos de experiência, ainda é uma tecnologia recente, requerendo, portanto, estudos que assegurem seu cultivo com menor impacto ambiental.

Em razão da demanda de resultados de estudos feitos com organismos transgênicos, iniciaram-se estudos com experimentos que permitissem verificar a que distância pode-se observar o fluxo gênico entre plantas transgênicas e não-transgênicas. A polinização cruzada, em soja, pode ocorrer numa taxa percentual de 0,5% a 1% (Wilcox, 1987). Com o objetivo de se verificar o fluxo dos transgenes entre cultivares de soja geneticamente modificada e não-modificada, foi instalado um experimento na Embrapa Cerrados, Planaltina, Distrito Federal, no qual sementes da cultivar BR-16 não-transgênica foram semeadas em linhas, ao lado e, em volta, de uma parcela com plantas da cultivar BR-16 geneticamente modificada com o gene *ahas* que confere resistência ao herbicida imazapyr. Cada linha foi previamente identificada e, as sementes, foram colhidas separadamente e semeadas para a verificação da transferência do gene *ahas* entre as plantas.

Aos 30 dias após a emergência, aplicou-se a dosagem de 100 g.ha⁻¹ do herbicida imazapyr (Arsenal®, BASF) e os sobreviventes, analisados por PCR e ensaio histoquímico de β-Glucuronidase.

Esse é o primeiro relato de estudo do fluxo gênico entre cultivares de soja transgênica e não-transgênica na Região do Cerrado (Abud et al., 2001).

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi verificar a que distância pode ocorrer o fluxo gênico entre as cultivares de soja BR-16 não-transgênica e a BR-16 geneticamente modificada com o gene *ahas*, que confere resistência ao herbicida imazapyr e GUS (*uidA*) que expressa para a proteína β-Glucuronidase.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido na Embrapa Cerrados em Planaltina, DF (Latitude 15°31'53", longitude 47°42'30", altitude 947 m e classe de solo LE). O clima predominante é de duas estações, sendo uma chuvosa (1400 a 1800 mm/ano), com temperatura de 25 °C a 30 °C, no período de setembro a abril e outra seca com umidade relativa em torno de 40% e temperatura amena (20 °C a 23 °C) no período de maio a agosto (Espinoza Garrido et al., 1978).

O experimento foi instalado em duas fases: a primeira, no dia 8 de dezembro de 2000 quando se semeou a cultivar BR-16 não-transgênica, com espaçamento de 0,5 m e população de 20 plantas por metro, ao lado e em volta da parcela da cv. BR-16, transformadas com o gene *ahas* (Aragão, 2000), que confere resistência ao herbicida imazapyr (Figura 1). As linhas foram identificadas e as sementes colhidas separadamente. A segunda fase, instalada no dia 18 de maio de 2001 quando se semeou, com espaçamento de 0,5 m e população de 20 plantas por metro.

Para a verificação da transferência do gene *ahas* das plantas transgênicas para as não-transgênicas, aplicou-se a dosagem de 100 g.ha⁻¹ do herbicida imazapyr. Esse herbicida atua na planta

reduzindo os níveis de três aminoácidos alifáticos de cadeia ramificada, valina, leucina e isoleucina, através da inibição do ácido hidroxiacético sintetase, uma enzima comum na via biossintética desses aminoácidos. Após 12 dias, coletou-se, dos sobreviventes, uma folha da região apical para ensaio histoquímico de GUS, segundo Jefferson (1987). Na transformação da cv. BR 16, juntamente com o gene *ahas*, foi inserido o gene *uidA* que expressa para a proteína β-Glucuronidase. Essa, na presença do substrato 5-bromo-4-cloro-3-indol glucorônico (X-GUS), produz uma dimerização oxidativa, formando um precipitado de intensa cor azul e insolúvel, permitindo uma seleção prévia dos possíveis híbridos. Em seguida, extraiu-se o DNA das plantas GUS (+) pelo método de Edwards (1996) que foi amplificado por PCR ("Polymerase Chain Reaction"), utilizando o primer 5' ACT AGA GAT TCC AGC CAG ATA CCT GG 3' que amplia uma sequência de 685 pb, para a confirmação do fluxo gênico entre as duas cultivares. Os resultados podem ser vistos na Tabela 1 e nas Figuras 1 e 2.

A realização deste trabalho foi aprovada pela CTNIBIO e publicada em diário oficial em 17 de novembro de 2000, Processo 01200.001780/2000-20.

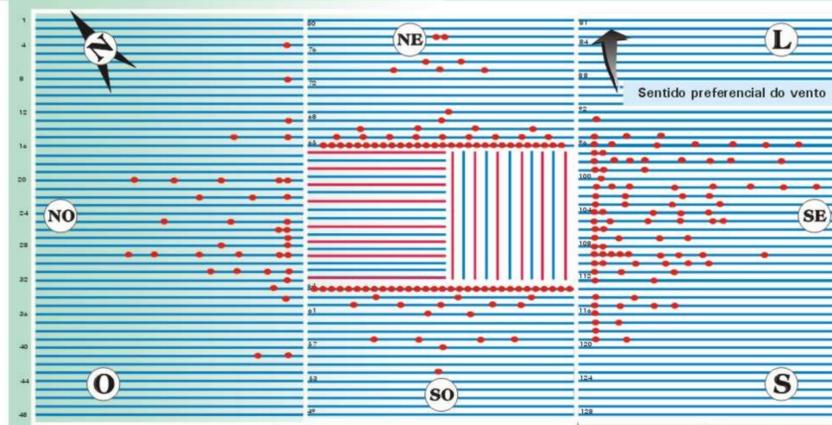


Figura 1. Área experimental com as linhas de ocorrência da transferência do gene *ahas* e *uidA* da cultivar BR-16 transgênica para a BR-16 não-transgênica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1. Frequência de disseminação de pólen das plantas transgênicas para as linhas de bordadura com plantas não-transgênicas, localizadas a sudoeste e a nordeste da parcela central.

Linha de bordadura	Polinização cruzada no sentido sudoeste	Polinização cruzada no sentido nordeste
1 (0,5)	31/6816(0,45)**	29/6586(0,44)**
2 (1,0)	3/6772(0,04)	9/6525(0,14)
3 (1,5)	5/6742(0,06)	4/6707(0,06)
4 (2,0)	2/6336(0,03)	1/6943(0,01)
5 (2,5)	0/6383(0,00)	1/6106(0,02)
6 (3,0)	0/7263(0,00)	0/8438(0,00)
7 (3,5)	4/7273(0,05)	0/7322(0,00)
8 (4,0)	1/6621(0,02)	0/6752(0,00)
9 (4,5)	0/7518(0,00)	0/6360(0,00)
10 (5,0)	0/7124(0,00)	3/7620(0,04)
11 (5,5)	1/7713(0,01)	2/7274(0,03)
12 (6,0)	1/6028(0,02)	1/6942(0,01)
13 (6,5)	0/6950(0,00)	0/7671(0,00)
14 (7,0)	0/6551(0,00)	0/7798(0,00)
15 (7,5)	0/6440(0,00)	0/6558(0,00)
16 (8,0)	0/10752(0,00)	0/12078(0,00)

* O número entre parênteses representa a distância, em metros, da linha de bordadura em relação à parcela central com plantas transgênicas.
** O valor entre parênteses representa o número de plantas transgênicas observadas/total de sementes semeadas na linha.

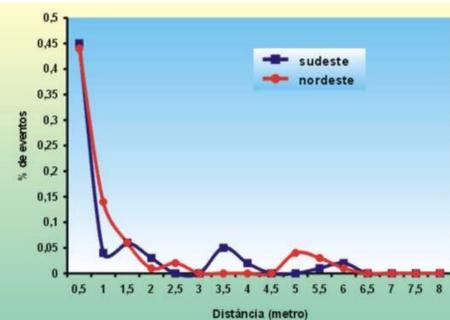


Figura 2. Porcentagem de eventos de polinização cruzada com transgenes, em função da distância, a partir da linha com plantas transgênicas, no sentido preferencial do vento (nordeste) e contrário (sudoeste).



Figura 3. Efeito da aplicação do herbicida Imazapyr na cv. BR-16 não-transgênica (esquerda) e transgênica (direita).



Figura 4. Plantas não-transgênicas sobreviventes da aplicação do herbicida Imazapyr.

Os pontos vermelhos plotados na Figura 1 indicam as linhas onde ocorreu o fluxo gênico. O número de eventos de fluxo gênico nas parcelas situadas a noroeste, sudoeste, nordeste e sudoeste foi de 27, 61, 49 e 47, respectivamente. Os eventos ocorridos nas linhas a nordeste e sudoeste poderiam ser explicados pela densidade e proximidade da parcela central. A linha a noroeste está próxima às linhas alternadas de transgênica e não-transgênica, o que pode contribuir para a redução de eventos. Em contraste, a linha a sudoeste está próxima a uma linha completa com transgênica, aumentando a possibilidade de fluxo gênico.

A porcentagem de polinização cruzada foi calculada como uma fração de plantas tolerantes ao herbicida em cada linha. A Tabela 1 resume a frequência de polinização cruzada em cada linha e permite verificar a que distância ocorreu o fluxo de genes. A frequência mais alta de disseminação do pólen transgênico pode ser observada na primeira linha, 0,5 m de distância da parcela central. Essa frequência diminuiu na segunda linha, alcançando 0% na linha 13 (6,5 m de distância da parcela central).

Na área experimental, o sentido preferencial do vento durante a condução da primeira fase do ensaio, foi de sudoeste para nordeste, no entanto não se observou nenhuma diferença na frequência de polinização cruzada, quando comparada com aquela ocorrida no sentido oposto.

Para o controle de insetos-praga, durante a condução deste experimento, utilizou-se o número mínimo de aplicações de inseticidas, conforme já é rotina em ensaios desenvolvidos pela Embrapa Cerrados. Isso pode ter facilitado a ação de agentes polinizadores, pois embora não se tenha feito o monitoramento das populações, observou-se a presença de Apidae (*Apis mellifera* e *Trigona spinipes*), durante a floração.

Embora a soja seja uma espécie essencialmente autógama, a polinização cruzada entre plantas transgênicas e não-transgênicas também é possível, como pode ser visto neste trabalho. Com base nos resultados obtidos, sugere-se que a largura da bordadura com soja não-transgênica, semeada em volta de ensaios com soja transgênica, seja superior a 6,5 m, distância a partir da qual, neste trabalho, não se observou eventos de fluxo gênico.

BIBLIOGRAFIA

- ABUD, S.; ARAGÃO, F. J. L.; RECH, E. L.; SOUZA, P. I. M.; MOREIRA, C. T.; KIIHL, R. A. S. FARIAS NETO, A. L. Gene flow between transgenic and non-transgenic soybean plants in the field. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 47, 2001, Águas de Lindóia, SP. A genética no século XXI: desafios. (S.J.): Sociedade Brasileira de Genética, [2001].
- ARAGÃO, F. J. L.; SAROKIN, L.; VIANNA, G. R.; RECH, E. L. Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean (*Glycine max* L. Merrill) plants at high frequency. *Theoretical and Applied Genetics*, New York, v. 101, n. 1/2, p. 1-6, 2000.
- ESPINOZA GARRIDO, W.; AZEVEDO, L. G. de; JARRETA JUNIOR, M. O clima da região dos Cerrados em relação a agricultura. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1978. 37 p. (Embrapa-CPAC. Comunicado Técnico, 4).
- JEFERSON, R. A. Assaying chimeric genes in plant: the GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 5, p. 387-405, 1987.
- EDWARDS, K.; JOHNSTONE, C.; THOMPSON, C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*, London, v. 19, p. 1349; 1998.
- WILCOX, J. R. Reproductive morphology. *Soybeans Improvement, Production and Uses*. 2nd ed., p 100, 1987.

INSTITUIÇÕES FINANCIADORAS

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa
Centro Tecnológico para Pesquisas Agropecuárias Ltda - CTPA
Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq
Fundação Cerrados