

## NOTAS CIENTÍFICAS

### Dispersão de pólen em soja transgênica na região do Cerrado<sup>(1)</sup>

Sérgio Abud<sup>(2)</sup>, Plínio Itamar Mello de Souza<sup>(2)</sup>, Claudete Teixeira Moreira<sup>(2)</sup>, Solange Rocha Monteiro Andrade<sup>(2)</sup>, Adolfo Vítório Ulbrich<sup>(3)</sup>, Giovanni Rodrigues Vianna<sup>(4)</sup>, Elíbio Leopoldo Rech<sup>(4)</sup> e Francisco José Lima Aragão<sup>(4)</sup>

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar a dispersão de pólen transgênico em soja. Plantas transgênicas de soja contendo os genes *ahas*, para tolerância ao herbicida imazapyr, e *uidA* (GUS), foram cultivadas com plantas não-transgênicas. A dispersão do pólen transgênico foi avaliada pela presença de ambos os genes dominantes na progênie de plantas não-transgênicas. A maior frequência de disseminação de pólen transgênico foi observada na primeira linha, distante 0,5 m da parcela central (0,44% a 0,45%). Esta frequência foi reduzida drasticamente na linha 2 (0,04% a 0,14%), atingindo 0 na linha 13, a 6,5 m da parcela central.

Termos para indexação: *Glycine max*, planta transgênica, polinização, fluxo gênico.

#### Gene flow in transgenic soybean in the Cerrado region, Brazil

Abstract – The objective of this work was to evaluate pollen dispersal from transgenic to non-transgenic soybean plants. Non-transgenic soybean plants were cultivated surrounding transgenic soybean plants carrying the *ahas* (for herbicide tolerance against imazapyr) and *gus* genes. Pollen dispersal was evaluated by the presence of both dominant genes in the progenies of non-transgenic plants. The highest amount of transgenic pollen dissemination was observed in the first row, 0.5m distant from the central plot (0.44% to 0.45%). The frequency of pollen dispersion has drastically decreased in the row 2 (0.04% to 0.14%), reaching zero by the row 13, which was 6.5 m distant from the central plot.

Index terms: *Glycine max*, transgenic plants, pollination, gene flow.

<sup>(1)</sup> Aceito para publicação em 14 de agosto de 2003.

Financiado pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), CNPq, Fundação Cerrados e BASF.

<sup>(2)</sup> Embrapa-Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados, Rod. Brasília-Fortaleza, BR 020, km 18, CEP 73301-970 Planaltina, DF. E-mail: abud@cpac.embrapa.br, plinio@cpac.embrapa.br, claudete@cpac.embrapa.br, solange@cpac.embrapa.br

<sup>(3)</sup> Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrícolas, Dep. de Agronomia, Caixa Postal 601, CEP 86051-990 Londrina, PR.

<sup>(4)</sup> Embrapa-Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB - W3 Norte, CEP 70770-900 Brasília, DF. E-mail: giovanni@cenargen.embrapa.br, rech@cenargen.embrapa.br, aragao@cenargen.embrapa.br

A produção de plantas transgênicas é uma realidade e tem sido liderada pelos Estados Unidos da América (68% da área plantada no mundo), seguidos por Argentina (22%), Canadá (6%) e China (3%), onde diferentes produtos têm sido aprovados e comercializados (James, 2001), inclusive a soja.

O Brasil é o segundo produtor mundial de soja, com 41,9 milhões de toneladas, em uma área cultivada de 13,32 milhões de hectares na safra de 2001/2002, com uma previsão de produção de 52,2 milhões de toneladas em uma área cultivada de 18,53 milhões de hectares na safra de 2002/2003 (Companhia Nacional de Abastecimento, 2003).

Questões referentes à biossegurança têm sido discutidas, incluindo o fluxo gênico via pólen (Rogers & Parkes, 1995; Llewellyn & Fitt, 1996; Ray et al., 2003). Produtores brasileiros têm questionado a possibilidade dos plantios de soja não-transgênica serem polinizados por cultivares de soja transgênica. Além disso, não se conhece o impacto da polinização cruzada entre cultivares transgênicas e não-transgênicas nos ensaios de melhoramento.

A soja é uma planta de autofecundação (Ahrent & Caviness, 1994). A polinização ocorre quando o estigma está receptivo e as anteras deiscem liberando o pólen, antes da abertura das flores. A polinização cruzada em soja está em torno de 1% (Sediyama et al., 1970; Verneti et al., 1972; Poehlman, 1987; Borém, 1999). Ahrent & Caviness (1994) demonstraram que a frequência de polinização cruzada pode chegar a 2,5% em algumas cultivares. Insetos, especialmente da ordem Hymenoptera, podem atuar como polinizadores (Beard & Knowees, 1971; Erickson et al., 1978).

Durante o processo de análise dos pedidos relativos à liberação de plantas transgênicas em condições de campo, as agências de regulamentação geralmente especificam distâncias de isolamento entre plantas da mesma espécie. Conseqüentemente, visando à manutenção da pureza das sementes, é importante determinar a distância máxima em que o fluxo gênico pode ocorrer de forma significativa. Estudos têm sido realizados com a finalidade de determinar as frequências de polinização cruzada entre plantas transgênicas e não-transgênicas em batata (Conner & Dale, 1996), canola (Scheffler et al., 1993) e algodão (Umbeck et al., 1991; Llewellyn & Fitt, 1996; Shen et al., 2001).

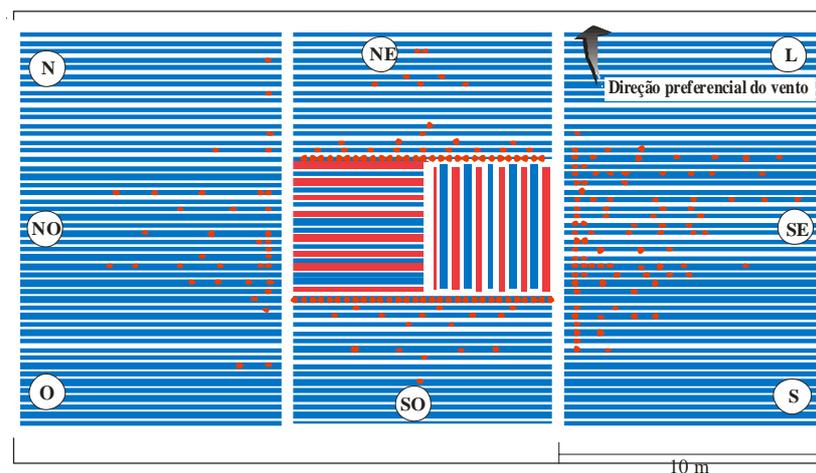
O objetivo deste trabalho foi avaliar a dispersão de pólen transgênico em soja.

O experimento foi realizado no campo experimental da Embrapa-Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados (CPAC), Planaltina, DF (15°31'53" S, 47°42'30" W; 970 m de altitude).

As plantas de soja transgênicas utilizadas no experimento foram derivadas de uma única planta transgênica de soja, linhagem 8/19, desenvolvida no Laboratório de Expressão de Genes da Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia (Aragão et al., 2000). Esta linhagem contém uma cópia do plasmídeo pAG1 que contém o gene *ahas*, isolado de *Arabidopsis thaliana*, sob controle do promotor do gene *ahas*, e o gene *uidA* sob controle do promotor da actina de *A. thaliana* (Aragão et al., 2000). As plantas transgênicas utilizadas estavam em homocigose para ambos os genes *ahas* e *uidA*. Plantas de soja não-transgênicas, cultivar BR-16, foram utilizadas como controle.

O experimento era composto por nove parcelas que ocupavam uma área total de 640 m<sup>2</sup>. A parcela central consistia de linhas de 5 e 8 m, com espaços de 0,5 m, intercaladas com plantas transgênicas e não-transgênicas (Figura 1). Sementes transgênicas e não-transgênicas foram semeadas em dezembro de 2000 (20 plantas/m). Todas as sementes produzidas pelas plantas não-transgênicas foram coletadas manualmente e semeadas no mês de maio de 2001 na Embrapa-CPAC. Quando as plantas atingiram o estágio da primeira folha trifoliolada, um disco foliar foi coletado para as análises da expressão do gene *uidA*. Na determinação da tolerância das plantas em relação ao gene dominante de seleção *ahas*, todas as plantas foram pulverizadas ao atingirem o estágio de quarta folha trifoliolada com o herbicida imazapyr na concentração de 100 g ha<sup>-1</sup>. Todas as plantas tolerantes foram analisadas por meio de PCR quanto à presença do gene *ahas*. O experimento foi realizado de acordo com a lei brasileira de biossegurança e com aprovação da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBIO), autorização número 01200.001780/2000-20.

Todas as plantas tolerantes ao herbicida e 1.000 plantas sensíveis foram analisadas objetivando detectar a expressão do gene *uidA* em ensaio histoquímico. Tecidos foram analisados visando a localização *in situ* da atividade de GUS de acordo com Jefferson et al. (1987). Na análise de PCR, foi isolado o DNA total de discos foliares pelo método de Edwards et al. (1991). Cada reação de PCR foi realizada em 25 µL contendo 10 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 160 µM de cada dNTP, 200 nM de cada oligonucleotídeo, 2U de Taq polimerase e 20 ng de DNA genômico. A mistura foi coberta com óleo mineral, desnaturada durante 5 min a 95°C em um termociclador e amplificada durante 35 ciclos (95°C/1 min, 55°C/1 min, 72°C/1 min) com um ciclo final a 72°C durante sete minutos. A amostra foi aplicada em um gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e visualizado



**Figura 1.** Área experimental com as linhas de ocorrência da transferência dos genes *ahas* e *uidA* da linhagem transgênica para a não-transgênica. Os pontos em vermelho plotados sobre as linhas representam a ocorrência de polinização cruzada.

com luz UV. Os oligonucleotídeos 5' act aga gat tcc agc gtc ac 3' e 5' gtg gct ata cag ata cct gg 3' foram utilizados para amplificar uma seqüência de 685 pb, de forma a avaliar as plantas de soja quanto à presença do cassete *ahas*.

As plantas tolerantes ao herbicida apresentaram uma forte expressão de GUS, enquanto 1.000 plantas sensíveis não revelaram a expressão de GUS, demonstrando a eficiência do tratamento com herbicida na identificação de eventos de polinização cruzada. As plantas tolerantes apresentaram a seqüência de 685 pares de bases presentes no vetor de expressão após análise de PCR, demonstrando que não ocorreram “escapes” no tratamento com o herbicida.

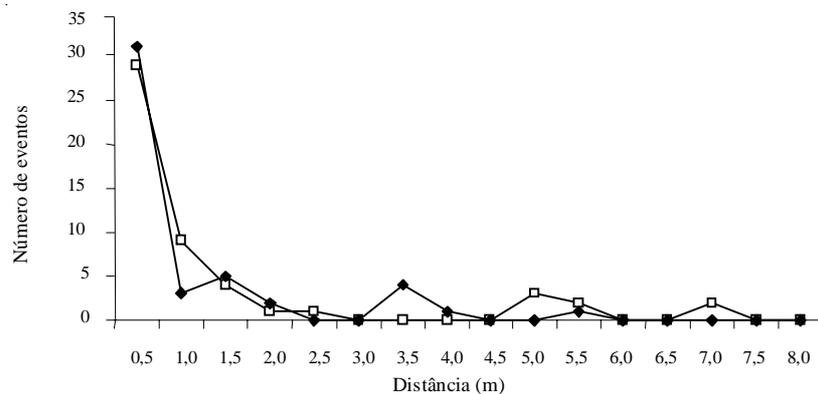
A porcentagem de polinização cruzada foi calculada determinando-se o número de eventos tolerantes ao herbicida em relação ao número total de plantas em cada linha. Os eventos de polinização em cada linha foram analisados pela tolerância ao herbicida e presença do gene *ahas* (Figura 2). O número de eventos de polinização cruzada nas bordas noroeste, sudeste, nordeste e sudoeste em linhas não-transgênicas foram 27, 61, 49 e 47, respectivamente. A diferença no número de eventos nas bordas noroeste e sudeste pode ser explicada pela densidade e proximidade das linhas da parcela central com transgênicos. A borda noroeste é próxima das linhas contendo plantas transgênicas e não-transgênicas na parcela central, orientadas na direção



**Figura 2.** A) Vista geral do campo experimental nº 1; B) Detalhe de linhas com plantas transgênicas (direita) e não-transgênicas (esquerda) após a aplicação do herbicida; C) Vista geral do campo nº 2; D) Detalhe de uma planta transgênica ( $F_1$ ) resistente a herbicida, resultante do cruzamento de uma planta transgênica com uma não-transgênica.

noroeste-sudeste. A borda sudeste é próxima de uma linha transgênica na parcela central (Figura 1). A maior quantidade de disseminação de pólen transgênico foi observada na primeira linha, distante 0,5 m da parcela central (Figura 3). Esta freqüência reduziu-se drasticamente na linha 2, atingindo 0 (sem disseminação) na linha 13 (distante 6,5 m do bloco central) em ambas as direções. Resultados similares foram encontrados nas bordas noroeste e sudeste. Uma diferença reduzida no padrão de disseminação de pólen foi observada entre as bordas sudoeste e nordeste. Resultados de alguns estudos realizados durante três anos com soja não-transgênica indicaram que a ocorrência de polinização cruzada entre distâncias superiores a 4,6 m, é rara (Caviness, 1966; Ahrent & Caviness, 1994). Boerma & Moradshahi (1975) constataram que a polinização cruzada atingiu 0% a uma distância de sete metros.

Na área experimental, a direção do vento foi preferencialmente nordeste e havia a presença de polinizadores durante o período de florescimento da soja. Embora as populações de insetos não tenham sido monitoradas, foram observados insetos como *Apis mellifera* e *Trigona spinipes* (Apidae). Assumindo que não houve diferença significativa na polinização cruzada nas direções nordeste e sudoeste, pode ser sugerido que não houve efeito significativo do vento na freqüência de polinização. Na parcela central, a freqüência de polinização foi de 2,1%. A polinização cruzada em soja situa-se em torno de 1% (Sediyama et al., 1970; Vernetti et al., 1972; Poehlman, 1987) e em alguns casos pode atingir entre 1,6% e 2,5% (Ahrent & Caviness, 1994). Com base nas informações obtidas e no fato de a freqüência de polinização cruzada no interior da parcela central deste experimento ter sido muito elevada pode-se afirmar que os resultados foram obtidos em condições de alta estrigência. A quantidade de inseticida aplicada durante o período de florescimento foi menor do que a normalmente aplicada nas condições brasileiras. Este fato pode ter contribuído no aumento das populações de polinizadores e conseqüentemente na freqüência de polinização cruzada.



**Figura 3.** Distribuição de eventos de fecundação entre plantas transgênicas da parcela central e plantas não-transgênicas direcionadas a Nordeste (□) e Sudoeste (●).

Os resultados obtidos poderão contribuir na formação da base dos estudos de fluxo gênico e na acumulação de evidências sobre os impactos potenciais de plantas transgênicas em condições ambientais.

### Agradecimentos

A Raimundo Queiroz Moreira e Warley Silva Almeida, pela assistência técnica.

### Referências

- AHRENT, D. K.; CAVINESS, C. E. Natural cross-pollination of twelve soybean cultivars in Arkansas. **Crop Science**, Madison, v. 34, n. 2, p. 376-378, 1994.
- 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, p. 1-6, 2000.
- BEARD, B. H.; KNOWEES, P. F. Frequency of cross-pollination of soybeans after irradiation. **Crop Science**, Madison, v. 11, n. 4, p. 489-492, 1971.
- BOERMA, H. R.; MORADSHAHI, A. Pollen movement within and between rows to male-sterile soybean. **Crop Science**, Madison, v. 15, n. 6, p. 858-861, 1975.
- BORÉM, A. Escape gênico: os riscos do escape gênico da soja no Brasil. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 5, n. 10, p. 101-107, 1999.
- CAVINESS, C. E. Estimates of natural cross-pollination in Jackson soybeans in Arkansas. **Crop Science**, Madison, v. 6, n. 2, p. 211-212, 1966.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (Brasília, DF). **Previsão e acompanhamento da safra agrícola 2002/2003**: quinto levantamento. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/download/safra/safra20022003Lev05.pdf>>. Acesso em: jun. 2003.
- CONNER, A. J.; DALE, P. J. Reconsideration of pollen dispersal data from field trials of transgenic potatoes. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 92, n. 5, p. 505-508, 1996.
- EDWARDS, K.; JOHNSTONE C.; THOMPSON, C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 19, n. 6, p. 1349, 1991.
- ERICKSON, E. H.; BERGER, G. A.; SHANNON, J. G.; ROBBINS, J. M. Honey bee pollination increases soybean yields in the Mississippi Delta region of Arkansas and Missouri. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 71, n. 4, p. 601-603, 1978.
- JAMES, C. A. **Global review of commercialized transgenic crops**: 2001. Ithaca: International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, 2001. (ISAAA Briefs, 24 - 2001 preview). Disponível em: <[http://www.isaaa.org/publications/briefs/Brief\\_24.htm](http://www.isaaa.org/publications/briefs/Brief_24.htm)>. Acesso em: 22 set. 2003

- JEFFERSON, R. A.; KAVANAGH, T. A.; BEVAN, M. W. GUS fusion: ( $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **EMBO Journal**, Heidelberg, v. 6, n. 13, p. 3901-3907, 1987.
- LLEWELLYN, D.; FITT, G. Pollen dispersal from two field trials of transgenic cotton in the Namoi Valley, Australia. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 2, n. 2, p. 157-166, 1996.
- POEHLMAN, J. M. **Breeding field crops**. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1987. 724 p.
- RAY, J. D.; KILEN, T. C.; ABEL, C. A.; PARIS, R. L. Soybean natural cross-pollination rates under field conditions. **Environmental Biosafety Research**, Versailles, v. 2, n. 2, p. 133-138, 2003.
- ROGERS, H. J.; PARKES, H. C. Transgenic plants and the environment. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 46, n. 286, p. 467-488, 1995.
- SCHEFFLER, J. A.; PARKINSON, R.; DALE, P. J. Frequency and distance of pollen dispersal from transgenic oilseed rape (*Brassica napus*). **Transgenic Research**, Dordrecht, v. 2, n. 2, p. 356-364, 1993.
- SEDIYAMA, T.; CARDOSO, A. A.; VIEIRA, C.; ANDRADE, D. Taxa de hibridação natural em soja, em Viçosa e em Capinópolis, Minas Gerais. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 2, n. 17, p. 329-331, 1970.
- SHEN, F. F.; YU, Y. J.; ZHANG, X. K.; BI, J. J.; YIN, C. Y. Bt gene flow of transgenic cotton. **Acta Genetica Sinica**, Beijing, v. 28, n. 6, p. 562-567, 2001.
- UMBECK, P. F.; BARTON, K. A.; NORDHEIM, E. V.; McCARTY, J. C.; PARROT, W. L.; JENKINS, J. N. Degree of pollen dispersal by insects from a field test of genetically engineered cotton. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 84, n. 6, p. 1943-1950, 1991.
- VERNETTI, F. J.; BONATTO, E. R.; TERAZAWA, F.; GASTAL, M. F. Observações sobre a taxa de cruzamentos naturais em soja, em Pelotas e Sertão, RS e Ponta Grossa, PR. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 1, n. 24, p. 36-41, 1972.