

AVALIAÇÃO DO FLUXO GÊNICO ENTRE GENÓTIPOS DE ARROZ TRANSGÊNICO, CULTIVADO E ARROZ VERMELHO

Ariano M. de Magalhães Jr.⁽¹⁾; Andre Andres⁽¹⁾; Daniel F. Franco⁽¹⁾; Márcio P. da Silva⁽²⁾; André Abreu⁽³⁾; Renato Luzzardi⁽³⁾; Jefferson Coimbra⁽³⁾ 1. Embrapa Clima Temperado. Cx. Postal 403, Cep.: 96001-970, Pelotas-RS, E-mail: ariano@cpact.embrapa.br 2. Estudante de Mestrado. UFPel-FAEM. Cx. Postal 354, Cep.: 96001-970, Pelotas-RS. 3. Aventis Seeds, Av. Maria Coelho Aguiar, 215 – Bloco B, CEP 05804-902, São Paulo-SP.

A biotecnologia com suas técnicas de biologia molecular e de transformação vegetal têm possibilitado a produção de plantas geneticamente modificadas mantendo as características das espécies, constituindo-se, assim, em uma ferramenta concreta e importante para o melhoramento genético vegetal. Dessa maneira, é possível a obtenção de plantas transgênicas que representem variedades melhoradas para uma nova característica que não se poderia obter na diversidade da espécie. A possibilidade de se introduzir em plantas, genes codificantes que possam conferir-lhe resistência a determinados herbicidas, abriu novos horizontes para o controle do arroz vermelho nas lavouras orizícolas. Esta espécie é bastante agressiva em condições de lavoura e as perdas na produção do arroz irrigado, devido a competição, podem ser evidenciadas em função da sua densidade populacional. A principal razão, que explica a dificuldade do seu controle, deve-se ao fato de que o arroz-vermelho pertence ao mesmo gênero (*Oryza*) do arroz cultivado, não existindo, desta forma, um produto químico capaz de controlar esta invasora quando presente na cultura do arroz. Economicamente esta invasora vem causando perdas elevadas, atingindo valores anuais acima de 100 milhões de dólares, somente considerando o sul do Brasil.

O desenvolvimento de variedades de arroz irrigado que apresentem resistência a herbicidas totais poderá viabilizar o uso de áreas, atualmente comprometidas pela alta infestação, com maior economicidade e eficiência do que os métodos correntes de manejo de plantas daninhas tem conseguido. A tecnologia LibertyLink envolve a inserção no genoma da planta de um gene exógeno (*bar*), que pela sua expressão confere às plantas tolerância específica a um nova molécula herbicida, o Glufosinato de Amônio (GA). Este é um inibidor da glutamina sintetase, bloqueando a incorporação de amônia gerada pela própria planta em aminoácidos (D'Halluin et al. 1992), sendo que esta inibição resulta em acumulação tóxica de amônia nas células das plantas. O gene *bar*, isolado de *Streptomyces hygroscopicus*, codifica para a síntese de fosfinotricina acetil transferase (PAT) que cataliza a transferência do radical acetil da acetil coenzima-A para o grupo amino do glufosinato, tornando-o inativado (De Block et al. 1987). Desta forma, o arroz resistente ao herbicida glufosinato de amônio é capaz de sobreviver após a aplicação do produto, o qual, por ser de ação total, controla todas as plantas invasoras, inclusive o arroz-vermelho.

Por outro lado, a tecnologia de inserção de genes exógenos abre um leque de possibilidades de desenvolver variedades com características inéditas. Linhagens e cultivares de arroz, tais como Gulfmont, Koshihikari, IR 72, Bengal e Cypress (Oard, et al. 1996) foram transformadas para esta característica e apresentaram excelente performance agrônômica, em ensaios de campo. Haverá casos em que nova característica pode relacionar-se com a adaptabilidade e competitividade da espécie cultivada, devendo-se então atentar para a avaliação de impacto ambiental que possa ser resultante. Especificamente, no caso de inserção de uma resistência adicional para um dado herbicida em que o fator de competitividade depende da presença de um elemento sob controle, deverá ser avaliado o impacto nas práticas agrônômicas, caso uma planta daninha capture o novo gene da espécie cultivada e passe a expressar a nova característica também. A principal questão ao se trabalhar com plantas resistentes a herbicidas reside no fato que os genes responsáveis pela característica podem ser transferidos, particularmente através do pólen, e serem incorporados nas espécies de plantas invasoras (Fontes & Melo, 1999). A polinização cruzada entre o arroz cultivado e o arroz-vermelho, apesar da espécie ser autógama, já foi descrita. Para tanto, determinar a magnitude da dispersão do grão de pólen transgênico e a

fecundação do arroz daninho, será a informação básica na avaliação de riscos que possam ser postulados e proposição das medidas mitigadoras, se necessárias.

Relatos da literatura sugerem que a frequência de polinização cruzada natural entre plantas do gênero *Oryza* é variável e pode chegar, em condições normais, até 5%, e que o índice é diretamente dependente da coincidência no estágio de florescimento e da proximidade entre a fonte doadora e receptora de pólen. Nedel et al. (1998) descrevem que na maioria das cultivares de arroz a liberação do grão de pólen verifica-se antes da antese e, por essa razão, a taxa de alopolinização é muito baixa (menos de 1%).

Este estudo teve como objetivo determinar a distância de dispersão de pólen e taxa de fecundação cruzada entre genótipos modificados geneticamente para resistência ao glufosinato de amônio e seus parentais não transgênicos.

O trabalho foi constituído por um conjunto de experimentos, conduzidos sob normas de biossegurança no ano 2000, a campo, no município de Rio Grande, na área experimental da Aventis Seeds do Brasil. Nestes ensaios foram utilizados os seguintes genótipos: linhagem ABR-15 (derivada da cultivar BR-IRGA-410); linhagem LLRice62 (derivada da cultivar Bengal); cultivar BR IRGA 410; cultivar Bengal. A condução dos experimentos deu-se sob o controle da CIBio da Aventis Seeds do Brasil. Fez parte do procedimento experimental a comprovação da presença do gene marcador (*bar*) nas parcelas de plantas doadoras, bem como a confirmação de que as plantas receptoras não portavam previamente o gene. Para esta determinação, foi realizado um teste aos 30 dias após a emergência das plantas. Plantas ao acaso foram pinceladas com solução herbicida contendo Glufosinato de Amônio, em dose equivalente a 400 gramas/ha. Foram tratadas 13 plantas ao acaso da cultivar BR IRGA 410, 2 de arroz vermelho, e 15 plantas da linhagem ABR 15. A avaliação foi realizada após uma semana do tratamento. Verificou-se que no lote da linhagem transgênica ABR 15, nenhuma planta pincelada com o GA apresentou lesão, demonstrando que tratava-se de material resistente ao glufosinato de amônio. As plantas de arroz vermelho pinceladas com o herbicida apresentaram suscetibilidade, bem como todas as plantas de arroz não transgênico.

Foram realizados estudos objetivando avaliar possível influência de ventos que pudessem predominar na região. Neste sentido, foram coletadas amostras de plantas receptoras de pólen de plantas geneticamente modificadas de quatro quadrantes. As subparcelas das plantas receptoras de pólen foram locadas ao longo do eixo bissetriz de cada quadrante, nas distâncias (raio) de 0, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 metros a partir do centro (parcela com plantas doadoras de pólen).

Na ocasião da maturação fisiológica das parcelas realizou-se coleta de sementes, as quais foram avaliadas sob teste de germinação no laboratório de Cultura de Tecidos da ETB da Embrapa Clima Temperado.

Por tratar-se de plantas doadoras de pólen portando o gene marcador, dominante e em homocigose, a susceptibilidade (plantas autofecundadas: S1) ou resistência (plantas híbridas: F1) ao herbicida permite determinar com simplicidade e segurança a taxa de cruzamento, sua frequência e sua curva de ocorrência, submetendo-se as amostras ao tratamento com o produto.

A reação ao tratamento herbicida, controlado pela presença ou ausência do gene *bar*, ocorre tanto em plântulas pulverizadas com solução de glufosinato de amônio, como em sementes postas a germinar em meio contendo o herbicida. Para total confiabilidade do método, ambas estratégias foram aplicadas. Primeiramente as sementes foram submetidas ao teste de germinação em substrato contendo glufosinato de amônio, segundo protocolo estabelecido e validado por Magalhães Jr. et al. (2000). Uma vez que alguma semente em análise apresentasse germinação e início de emergência normal no teste de substrato, indicando resistência (F1), a mesma foi então submetida a um outro teste comprobatório. Neste teste complementar, as plântulas oriundas de sementes sobreviventes ao primeiro teste, ou seja, tidas como resistentes (F1), foram transplantadas em bandejas contendo substrato apropriado e em casa de vegetação da Estação Experimental Terras Baixas, da Embrapa Clima Temperado operando sob biossegurança (sob o devido CQB conferido pela CTNBio). Tão logo tais plântulas apresentavam-se adaptadas e sob desenvolvimento

regular, foram as mesmas pulverizadas com o herbicida Glufosinato de Amônio na dose de 800g/ha no estágio de 3-4 folhas. As plantas que comprovaram-se resistentes (F1) tiveram seu desenvolvimento ainda avaliado por período de 2 a 3 semanas, e foram posteriormente destruídas pela aplicação de glifosate (1800g/ha).

Nas condições em que os experimentos foram realizados, durante o ano 2000 e, considerando-se o comportamento das normas de biossegurança, pode-se observar que a taxa de cruzamento entre os genótipos de arroz foi muito baixa. Mais de 250.000 sementes foram analisadas e há uma frequência que constantemente se repete, da ordem de 0,1 a 0,04%. Este valor é muito menor que os índices sugeridos por alguns autores (Nedel et al., 1998). Alguma taxa de cruzamento entre genótipos de arroz somente pode ser detectada quando ocorrer absoluta coincidência de período de emissão de panículas. A probabilidade de ocorrência de cruzamento, em havendo perfeita sincronia floral se dá a uma distância curta. Os dados obtidos indicam que, a partir de 5 metros, a possibilidade de ocorrência de cruzamento entre as plantas é mínima. Corroboram com este trabalho o isolamento de 3 metros adotado pelas normas de produção de sementes (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 1981). Não foi detectado, nas condições em que foi realizado o experimento, diferenças na frequência de polinização cruzada nos distintos quadrantes analisados. No caso do arroz daninho, a possibilidade de ser fecundado pelo arroz foi ainda menor. A análise maciça de sementes apontou que mesmo sob boa coincidência floral, elevada presença de plantas e distância de 0 metros não pode ser obtido nenhuma semente híbrida F1, qual seja, nenhum cruzamento pode ser detectado. No entanto, este resultado não permite concluir que não ocorra fluxo gênico entre o arroz transgênico e o arroz vermelho. O fato de existir a possibilidade de fecundação cruzada entre os genótipos, ainda que mínima, justifica medidas de precaução. Ressalta-se que estes dados refletem observações de apenas uma safra agrícola.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- D'HALLUIN K.; De BLOCK, M.; JANSSENS, J.; LEEMANS, J.; REYNAERTS, A.; BOTTERMAN, J. The *bar* gene as a selectable marker in plant engineering. **Methods Enzimol.** v. 216, p.415-441. 1992.
- De BLOCK, M.; BOTTERMAN, J.; VANDERWIELE, M.; DOEKX, J.; THOEN, C.; GOSSELE, V.; RAO, M.; THOMPSON, C.; VAN MONTAGU, M.; LEEMANS, J. Engineering herbicide resistance in plants by expression of detoxifying enzyme. **EMBO J**, v.6, p. 2513-2518, 1987.
- FONTES, E.; MELO, P.E. de. Avaliação de riscos na introdução no ambiente de plantas transgênicas. In:TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A., ed. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** v.2. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPQ, 1999. p.815-843.
- MAGALHÃES JR. A.M. de; FRANCO, D.F.; ANDRES, A.; ANTUNES, P.; LUZZARDI, R.; DODE, L.B.; TILLMANN, M.A.A.; SILVA, M.P. Método para identificação de sementes de arroz transgênico resistente ao herbicida glufosinato de amônio. **Agropecuária Clima Temperado**, Pelotas, v.3, n.1, p. 31-38, 2000.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA - Legislação da inspeção e fiscalização da produção e do comércio de sementes e mudas. 3 ed. M.A. Brasília. 1981. 194p.
- NEDEL, J.L.; ASSIS, F.N. de; CARMONA, P.S. A planta de arroz: morfologia e fisiologia. In: PESKE, S.T.; NEDEL, J.L.; BARROS, A.C.S.A. ed. **Produção de arroz irrigado.** Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 1998. p. 11-66.
- OARD, J.H.; LINScombe, S.D.; BRAVERMAN, M.P.; JODARI, F.; BLOUIN, D.C.; LEECH, M.; KOHLI, A.; VAIN, P.; COOLEY, J.C.; CHRISTOU, P. Development, field evaluation, and agronomic performance of transgenic herbicide resistant rice. **Molecular Breeding**, Bélgica (Kluwer Academic Publishers), v.2, p.359-368, 1996.