

**WELISON ANDRADE PEREIRA**

**FLUXO GÊNICO RECÍPROCO ENTRE CULTIVARES DE SOJA SOB A TEORIA  
DE GENÉTICA DE POPULAÇÕES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2010**

**WELISON ANDRADE PEREIRA**

**FLUXO GÊNICO RECÍPROCO ENTRE CULTIVARES DE SOJA SOB A TEORIA  
DE GENÉTICA DE POPULAÇÕES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Aprovada em 25 de fevereiro de 2010.

---

Profa. Denise Cunha F. dos Santos Dias  
(Co-orientadora)

---

Prof. Cosme Damião Cruz  
(Co-orientador)

---

Prof. Tuneo Sedyama

---

Dra. Eveline Teixeira Caixeta

---

Aluizio Borém de Oliveira  
(Orientador)

Dedico,

todo o meu trabalho e dedicação a vocês,  
que estiveram presentes durante toda essa  
caminhada, incondicionalmente, desde os  
primeiros passos até o momento em que  
mais essa conquista se concretizasse.

Mãe, irmã e princesa, obrigado pelo afeto!  
Essa vitória não é só minha! É nossa!

À vocês,  
Sílvia Pereira, Sara Pereira e Kelly Cunha

Ao Pai, toda honra e toda a Glória, agora e para sempre!

Amém!

## A G R A D E C I M E N T O S

Ao Pai toda a honra e toda a Glória, agora e para sempre;

À Universidade Federal de Viçosa e, especificamente, ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento pela oportunidade e confiança;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à CAPES pelo apoio concedido por meio de bolsas de estudos, sem as quais, dificilmente seria possível a realização deste sonho;

À FAPEMIG pelo apoio e incentivo à participação em diversos eventos científicos, os quais se tornaram imprescindíveis para o amadurecimento profissional e intelectual;

Ao orientador, Aluizio Borém, pelo exemplo de profissional, pelos ensinamentos, por todo o apoio, credibilidade e incentivo;

Aos professores Cláudio Horst Bruckner e José Marcelo Soriano Viana por toda orientação enquanto coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento;

À professora Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias pelos valiosos momentos de força, orientação e ensinamento;

Ao professor Cosme Damião Cruz pelo convívio e pelas inúmeras oportunidades de aprendizado, seja em sala de aula ou fora dela;

Aos professores Aluizio Borém, Cosme Damião Cruz, Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias, Múcio Silva Reis e Ney Sussumu Sakiyama por comporem a banca de qualificação e propiciarem oportunidade ímpar de aprendizado;

Aos professores Aluizio Borém, Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias, Cosme Damião Cruz, Múcio Silva Reis, Ney Sussumu Sakiyama, Tuneo Sedyama, Márcio Henrique Pereira Barbosa, Glauco Vieira Miranda, Eveline Mantovani Alvarenga, Marisa Vieira de Queiroz, Eduardo Fontes Araújo, Elizabeth Pacheco Batista Fontes e Paulo Roberto Cecon pelos momentos de ensinamento em sala de aula;

A COODETEC, em nome de Ivan Schuster, pela concessão de material genético para realização desta e de outras pesquisas;

Aos funcionários da secretaria do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento pela prontidão em sanar dúvidas e contribuir para o êxito dos discentes;

Aos pilares de minha vida Sílvia Pereira, Sara Pereira e Kelly Cunha, por toda compreensão, carinho e amor;

A todos os entes queridos, tios e primos *Pereira* e tios e primos *Andrade de Oliveira*, TODOS essenciais à minha formação;

Aos estagiários Filipe Luis Sávio, Zamira Guerra Soares e Camila de Oliveira Firmino pela oportunidade de trabalho em equipe e pela prontidão em colaborar;

Aos funcionários do laboratório de genética de soja, dos campos experimentais de Coimbra e do Aeroporto, em especial, Paulo Paiva, Paulo Mendes, José Bernardino, Adílio e José Custódio, técnicos presentes e sempre dispostos a contribuir com suas experiências de campo na realização desta e de inúmeras outras pesquisas;

Ao amigo Bruno Laviola pelo sempre presente incentivo e orientação;

Aos tantos amigos que compartilharam momentos deste bom período de UFV, aqui, representados por Antônio Almeida de Barros Júnior, Marcelo Curitiba Espíndula, Camilo Busato, Edmar Vasconcellos, Leonardo Bhering, Maria Andrea, Milene Miranda e Tatiana Rosado;

Ao amigo Demerson Sanglard pelas valiosas contribuições para a realização de parte deste trabalho;

Aos companheiros de república Carlos Eduardo Magalhães dos Santos, Paulo Cesar Dias, Sara Maria Andrade Pereira, Giancarlo Magalhães dos Santos, Leonardo Pimentel, Leandro Pin Dalvi e Vinícius Magalhães dos Santos pelo convívio e amizade; Vida longa à República Acima da Perfeição!!!

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento pelos momentos de alegria e amizade;

A todas as pessoas que por algum momento contribuíram com críticas, sugestões e orientações, de modo que esta conquista se concretizasse.

A todos vocês, de coração, obrigado.

## BIOGRAFIA

Welison Andrade Pereira, filho de Irineu Pereira e Silvia Andrade de Oliveira Pereira, nasceu aos 28 dias do mês de novembro do ano de 1979, no município de Nova Iguaçu, Estado do Rio de Janeiro. Coursou parte do ensino fundamental no município de Divino e o restante em São Francisco do Glória, Minas Gerais.

Concluiu no ano de 1997 o segundo grau profissionalizante ‘Técnico em Contabilidade’ na cidade de Miradouro, em Minas Gerais. Em 1999 iniciou sua graduação em Ciências Biológicas – Licenciatura plena, na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, FAFILE de Carangola, vindo a colar grau no ano de 2002.

No período de 2003 a 2005 realizou o curso de *Lato Sensu* em Biologia pela Universidade Federal de Lavras, UFLA, Minas Gerais, com monografia de conclusão de curso de título *Controle Genético de Caracteres Qualitativos em Soja*, sob orientação do professor Antônio Magno Patto Ramalho.

No primeiro semestre de 2004, ingressou no *Stricto Sensu* em Genética e Melhoramento pela Universidade Federal de Viçosa, sob orientação do professor Aluizio Borém, vindo a apresentar sua dissertação em 2006, com o título *Análise do fluxo gênico em soja e metodologia para sua detecção*. Neste mesmo ano, iniciou o doutorado em Genética e Melhoramento pela Universidade Federal de Viçosa, sob orientação do professor Aluizio Borém, vindo a apresentar a presente tese no primeiro semestre de 2010.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
Revisão de Literatura.....	1
Referências.....	11
<b>Capítulo 1: AJUSTE DE METODOLOGIAS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA QUANTO À TOLERÂNCIA AO GLIFOSATO</b>	
Resumo.....	15
Abstract.....	16
Introdução.....	17
Material e métodos.....	19
Bioensaio 1 - Germinação em papel umedecido com solução do glifosato.....	19
Bioensaio 2 - Pré-embebição das sementes em papel umedecido com herbicida.....	19
Morfologia das plântulas.....	20
Análise estatística.....	20
Quantificação de misturas.....	20
Resultados e discussão.....	22
Bioensaio 1 – Germinação em papel umedecido com solução do glifosato.....	22
Bioensaio 2 – Pré-embebição das sementes em papel umedecido com herbicida.....	25
Morfologia das plântulas.....	27
Quantificação de misturas.....	30
Conclusões.....	31
Referências.....	32
<b>Capítulo 2: IMPLICAÇÕES DO FLUXO GÊNICO EM SOJA SOB A PERSPECTIVA DA GENÉTICA DE POPULAÇÕES</b>	
Resumo.....	34
Abstract.....	35
Introdução.....	36
Soja RR.....	38
Avaliação de riscos.....	38

O equilíbrio de Hardy – Weinberg.....	40
Coeficiente de endogamia.....	41
Estimativa das frequências genotípicas de uma população autógama com determinada taxa de alogamia.....	42
Efeito diluição.....	45
Processos sistemáticos que afetam as frequências alélicas: Migração.....	47
Processos sistemáticos que afetam as frequências alélicas: Seleção.....	49
Processos sistemáticos que afetam as frequências alélicas: Mutação.....	52
Considerações finais.....	53
Referências.....	54
<b>Capítulo 3: FLUXO GÊNICO RECÍPROCO ENTRE CULTIVARES DE SOJA CONVENCIONAL E GENETICAMENTE MODIFICADA</b>	
Resumo.....	56
Abstract.....	57
Introdução.....	58
Material e Métodos.....	60
Material genético.....	60
Instalação do experimento.....	61
Verificação de fluxo gênico.....	64
Fluxo gênico da cultivar CD217 para CD219.....	65
1º) Semeadura em campo para verificação da cor da flor.....	65
2º) Semeadura em leito de areia para verificação da cor do hipocótilo.....	66
Fluxo gênico da cultivar CD219 para CD217.....	67
3º) Aplicação de herbicida glifosato em condições de casa de vegetação.....	67
4º) Germinação de sementes em substrato umedecido com solução do herbicida.....	67
Análise estatística.....	68
Resultados e discussão.....	69
1º) Semeadura em campo para verificação da cor da flor.....	69
2º) Semeadura em leito de areia para verificação da cor do hipocótilo.....	71
3º) Aplicação de herbicida glifosato em condições de casa de vegetação.....	74
4º) Germinação de sementes em substrato umedecido com solução do herbicida.....	75
Efeito diluição.....	76
Conclusões.....	78
Agradecimentos.....	78
Referências.....	79

## RESUMO

PEREIRA, Welison Andrade, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2010. **Fluxo gênico recíproco entre cultivares de soja sob a teoria de genética de populações.** Orientador: Aluizio Borém de Oliveira. Co-orientadores: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias e Cosme Damião Cruz.

Conforme a literatura, não é comum que a taxa de hibridação natural em *Glycine max* ultrapasse o valor de 1%. Com a chegada das cultivares transgênicas, novas pesquisas foram realizadas no intuito de investigar a alogamia dessas cultivares. Para os produtores de sementes para comercialização é importante conhecer este aspecto das cultivares, pois pureza genética é a garantia de qualidade do seu produto. Pesquisas demonstram que o fato da cultivar ser modificada geneticamente não altera a expectativa existente de fecundação cruzada. Na consciência de que pureza genética é requerida para qualquer variedade, o objetivo deste trabalho foi avaliar a taxa de fecundação cruzada recíproca envolvendo duas cultivares de soja, uma convencional e outra GM. Anteriormente, buscou-se ajustar metodologias de bioensaios para a detecção de sementes de soja de cultivar GM, e refletir o fluxo gênico em soja sob a perspectiva de genética de populações. A partir do ajuste das metodologias dos bioensaios: i) germinação de sementes em substrato umedecido com o glifosato, e, ii) pré-embebição de sementes em solução do herbicida, seguida de teste de germinação, obteve-se protocolos eficientes para a detecção e quantificação de sementes de soja GM entre sementes de soja convencional. O método do umedecimento do substrato de germinação com solução do herbicida, a 0,03% do seu equivalente ácido, na proporção de 3 vezes o peso do papel seco foi escolhida para os testes de detecção de hibridação natural. Diante às perspectivas de genética de populações, concluiu-se que a chance de fixação de um alelo no *pool* gênico de uma população após o fluxo gênico é, entre outros fatores, função de sua relevância para a aptidão de seus portadores. Além disso, que a seleção contra um alelo dominante precisa de apenas uma geração para eliminá-lo do *pool* gênico da população e que o efeito diluição deve ser utilizado para a divulgação das taxas de hibridação natural encontradas em estudos desta natureza. No estudo de fecundação cruzada recíproca, os

diferentes métodos para a verificação da hibridação natural, na verificação da cor da flor em campo, na verificação da cor do hipocótilo em casa de vegetação, na pulverização de plântulas com solução do herbicida em casas de vegetação, e, na germinação de sementes em contato com o herbicida em laboratório de análise de sementes, demonstraram que as taxas de fecundação cruzada populacionais foram 0,05, 0,10, 0,39 e 0,22 %, respectivamente. Com base nestes resultados, verificou-se que a taxa de hibridação natural recíproca não é a mesma em ambos os sentidos e que a aplicação do efeito diluição é indispensável para apresentar os resultados de estudos sobre o fluxo gênico, já que os valores populacionais são inferiores àqueles encontrados para as fileiras estudadas.

## ABSTRACT

PEREIRA, Welison Andrade, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2010. **Reciprocal gene flow among soybean cultivars on that populations genetics theoretical.** Adviser: Aluizio Borém de Oliveira. Co-advisers: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias and Cosme Damião Cruz.

According to the literature, it isn't common that the natural hybridization rate in *Glycine max* exceeds the value 1%. With the arrival of transgenic cultivars, new researches has been done in order to investigate the allogamy of these cultivars. For seed producers for marketing is important to know this aspect of the cultivars, because genetic purity is the assurance of your product. Researches show that the fact of growing genetically modified to not change the existing expectation of cross-fertilization. In the knowledge that genetic purity is required for any variety, the objetctive was to assess the rate of reciprocal cross-fertilization involving two soybean cultivars, one conventional and one GM. Previously, we attempted to adjust methods of bioassay for the detection of soybean seeds of GM crops, and reflect the gene flow of soybean from the perspective of population genetics. From the adjustment of the methods of bioassays: i) seed germination in a substrate containing glyphosate, and ii) pre-soaking of seeds with the herbicide, followed by germination test, we obtained efficient protocols for detecting and quantification of GM soybean seeds of the soybean seeds. The method of wetting the substrate with germination herbicide solution, 0.03% of its acid equivalent at a ratio of 3 times the weight of dry paper was selected for the testing of natural hybridization. Faced with the prospect of population genetics, it was concluded that the chance of fixation of an allele in the gene pool of a population after gene flow is, among other factors, because of its relevance to the fitness of their bearers. In addition, the selection against a dominant allele needs only one generation to eliminate it from the gene pool of the population and that the dilution effect should be used for the dissemination of natural hybridization rates found in studies of this type. In the study of reciprocal cross-fertilization, different methods for the verification of natural hybridization, examining the color of the flower field, examining the color of the hypocotyls in a greenhouse, the spraying of seedlings

with the herbicide in greenhouses, and the germination of seeds in contact with the herbicide in the laboratory seed analysis showed that the rates of outcrossing population were 0.05, 0.10, 0.39 and 0.22% respectively. Based on these results, it was found that the rate of natural hybridization reverse is not the same in both directions and that the application of the dilution effect is indispensable to present the results of studies on gene flow, since the population values are lower than those found in the rows studied.

## REVISÃO DE LITERATURA

A soja é uma espécie dotada de elevado potencial nutricional e industrial. Os grãos de cultivares comerciais podem apresentar em sua composição até 23 % de óleo e 40 % de proteína, além de um excelente balanço de aminoácidos essenciais, sais minerais, fibras e glicídios (Vieira et al., 1999). Tais propriedades elevam o valor nutritivo da soja tanto para a alimentação humana e animal, quanto para a fabricação industrial de vários produtos, o que determina uma tendência ao crescimento na demanda mundial pelos grãos desta leguminosa.

O Brasil se destaca no cenário mundial em virtude de seu potencial produtivo, sendo a soja sua principal “commodity” agrícola (Schuster et al., 2007). Segundo dados da Conab, a área plantada com soja na safra 2008/09 (~22 milhões ha) aumentou em relação ao ano anterior (~21 milhões ha), demonstrando confiança do produtor nesta cultura no País. Entretanto, em termos de produção, estima-se uma queda de 5 % em relação à safra anterior, caindo de 60 para 57 milhões de toneladas de grãos. A relação entre a queda de produção e o aumento da área demonstra que a produtividade caiu em relação às duas safras imediatamente anteriores (Conab, 2009). Na história do cultivo da soja no País, quedas em produtividade ocorreram em algumas safras, porém, vindo a produtividade se estabilizar nos anos seguintes. Considerando que a demanda pelos grãos de soja não caia e, ao contrário, apresente indícios de crescimento, é provável que a produção aumente nos próximos anos.

A expectativa de crescimento da produção se baseia, principalmente, no aumento da produtividade das lavouras de soja. Alguns fatores responsáveis pela estabilidade produtiva são: redução das perdas no campo e no transporte, melhoria das práticas culturais, eficiência do balanço nutricional no solo, e, especialmente, o melhoramento genético, acompanhado de estudos de adaptabilidade e estabilidade de cultivares, os quais têm sido responsáveis pelo desenvolvimento e indicação de variedades para as diversas condições edafoclimáticas do território nacional.

Para suprir a demanda pelos grãos de soja, o aumento da produção é buscado a cada safra. Inicialmente, esta busca se dá em função de dois pilares: aumento da área plantada ou

aumento da produtividade. Atualmente, em que se torna imprescindível cuidar do meio ambiente, falar em avanço de fronteiras agrícolas é bastante delicado. Aumentar a produtividade se torna a principal alternativa para o aumento da produção de grãos de soja.

O aumento da produtividade é função de vários componentes, dos quais três merecem ser citados: i) Melhoria dos insumos agrícolas; ii) Redução do desperdício em toda a cadeia produtiva; e, iii) Melhoramento genético. O primeiro componente citado consiste em uma boa estratégia, contudo, seu valor é limitado, considerando que sozinho pode apenas possibilitar a manifestação do potencial genético de uma cultivar, mas nunca amplificá-lo; reduzir as perdas também pode ser uma ação muito significativa, visto que parte considerável da produção bruta é perdida na pré-colheita, colheita e pós-colheita da lavoura. Do mesmo modo que para o fator insumo agrícola, reduzir as perdas é fundamental para o aumento da produtividade. Juntos, melhoria dos insumos agrícolas, redução das perdas e, principalmente, o melhoramento genético constituem estratégias de constante exploração, rumo ao aumento da produtividade e à estabilidade da produção.

No cenário internacional, os Estados Unidos constituem o principal competidor para o Brasil no que se refere à soja, no entanto, existem indícios de que tenham atingido o seu teto produtivo. De acordo com as perspectivas de produção de grãos de soja, os Estados Unidos não apresentam grandes possibilidades de expansão de suas fronteiras agrícolas, e sendo assim, a alternativa para aumento de sua produção seria função da substituição de outras culturas pela soja, o que não parece ser uma estratégia interessante para o setor agrícola de um país. Nestas mesmas considerações, se enquadram Argentina e Bolívia. Mega populosos como a China e a Índia são considerados importadores. Visto que as expectativas dos últimos anos apontam um aumento da demanda mundial por soja de 5,3 % ao ano, o Brasil seria o único país capaz de atendê-la (Roessing, 2004).

Historicamente, a interferência de fatores bióticos e abióticos sobre o rendimento das lavouras vem propiciando quebras produtivas significativas. Entre eles, a infestação da lavoura com plantas daninhas tem destaque por influenciar de forma direta e indireta na quantidade e qualidade do produto, na eficiência técnica da colheita, beneficiamento dos grãos, e até mesmo como hospedeiras de pragas, doenças e nematóides (Gazziero e Prete, 2004). Manejar plantas daninhas é crucial para a estabilidade da cultura.

A disponibilidade do herbicida glifosato no mercado a partir da década de 70 do século passado potencializou o controle químico de plantas invasoras no sistema de plantio direto. Este herbicida, classificado como sistêmico, pós-emergente, não-seletivo, controlando plantas mono e dicotiledôneas anuais e perenes (Shah et al., 1986; Kruse et al., 2000;

Amarante Jr. et al., 2002a; Amarante Jr. et al., 2002b) e caracterizado pelo seu amplo espectro de ação (Kruse et al., 2000), inibe a atividade da enzima 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfatossintase (EPSPS), que por sua vez, previne a síntese dos aminoácidos aromáticos derivados do corismato (tirosina, fenilalanina e triptofano), bem como de seus metabólitos secundários (Shah et al., 1986).

O 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato (EPSP) é um precursor de várias vias metabólicas vitais para as plantas. A reação que lhe dá origem, união do fosfoenolpiruvato (PEP) com o shiquimato-3-fosfato (S3P) é catalisada pela enzima EPSPS, a qual é inibida pelo glifosato. Além dos aminoácidos aromáticos, a biossíntese de outros constituintes vegetais dependentes do EPSP acaba sendo prejudicada. Compostos secundários, como alcalóides, cumarinas, flavonóides, lignina e ácidos benzóicos, vitaminas (K e E) e alguns hormônios (auxina e etileno) são também dependentes do EPSP (Trezzi et al., 2001; Amarante Jr. et al., 2002b), o que justifica a severidade do herbicida.

O glifosato possui alta eficiência na eliminação de plantas daninhas (Amarante Jr., et al., 2002b), mas, a sensibilidade de plantas cultivadas a este herbicida limita a sua utilização na pós-emergência das culturas. Deste cenário surgiu o desafio de se obter variedades tolerantes à ação deste herbicida, o que facilitaria o controle de daninhas (Kruse et al., 2000).

O desenvolvimento de uma linhagem tolerante ao glifosato consistiu numa das primeiras aplicações práticas da engenharia genética em soja (Padgett et al., 1995). O advento da engenharia genética gerou a expectativa da utilização de ferramentas anteriormente indisponíveis no melhoramento convencional. Por intermédio da biotecnologia, barreiras de cruzamentos inter-específicos tornaram-se superáveis, e os genes puderam ser identificados em qualquer organismo vivo, modificados para expressão em algum tecido específico e inseridos no genoma das espécies cultivadas (Gasser e Fraley, 1989). Plantas, animais ou microrganismos que tiveram no seu genoma a introdução de DNA proveniente de outro indivíduo por meio de técnicas da engenharia genética são considerados organismos geneticamente modificados (Monquero, 2005).

A soja tolerante ao glifosato, conhecida como *Roundup Ready*, foi obtida a partir da introdução na planta do gene *cp4 epsps*, proveniente da bactéria do solo do gênero *Agrobacterium*, selecionada entre microrganismos decompositores do glifosato. O princípio da tolerância ao glifosato reside no fato da enzima CP4 EPSPS apresentar maior afinidade ao fosfoenolpiruvato do que ao glifosato (Kruse et al., 2000). Em contrapartida, a versão vegetal desta enzima possui mais afinidade com o glifosato do que com o PEP, sendo este o princípio da sensibilidade (Kleba, 1998).

Na construção gênica, o gene *cp4 epsps* foi fundido a uma seqüência de genes derivada da EPSPS de petúnia (promotor) e introduzido na soja por meio da biobalística. A linhagem obtida (GTS 40-3-2) foi cruzada com linhagens sensíveis de alto desempenho agrônômico. Desta forma, a soja geneticamente modificada passou a apresentar expressão dupla da enzima EPSPS, uma original e outra do gene bacteriano (Kleba, 1998). Além da seqüência derivada da petúnia que codifica para o peptídeo de trânsito do cloroplasto (CTP), a soja ainda possui seqüências do vírus do mosaico da couve-flor (P-E35S) e da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* (NOS 3'), as quais são necessárias como reguladoras da integração e funcionamento do gene *cp4 epsps* no genoma da planta (Padgett et al., 1995).

O desempenho da linhagem GTS 40-3-2 foi avaliado sob tratamento com o herbicida durante o período de três anos em dezenas de localidades, onde foram analisados os efeitos do glifosato sobre as características agrônômicas das plantas e de sua progênie. Os resultados deste estudo apontaram alto nível de tolerância à aplicação do herbicida em proporções de até duas vezes mais altas do que o necessário para o manejo de plantas daninhas, sem impactos negativos sobre a produtividade da lavoura. Esta tolerância é estável ao longo das gerações, não é afetada por fatores ambientais, por tempo de aplicação ou *background* genético. A segregação 3:1 (tolerante: sensível) na geração F<sub>2</sub>, caracterizou o controle genético qualitativo monogênico de herança dominante completa para a tolerância ao herbicida (Padgett et al., 1995). Em virtude de sua natureza genética, o gene passa a ser facilmente utilizado em programas de melhoramento genético para a obtenção de novos cultivares.

Desde a chegada da soja Roundup Ready (RR) foi gerada grande expectativa quanto à redução no uso de herbicidas, utilização do plantio direto, flexibilidade do uso do herbicida somente quando e onde necessário, menor impacto ambiental (Kleba, 1998), favorecimento do manejo das lavouras, redução dos custos (Nepomuceno, 2004), diminuição das perdas de produção (Siqueira et al., 2004) e, com isso, potencial para a estabilidade da produtividade. A disponibilidade de variedades de soja RR é uma alternativa no manejo de plantas daninhas (Dellanay et al., 1995), que possibilita controle químico eficiente com menor impacto ao ambiente.

Benefícios associados à obtenção de cultivares tolerantes ao herbicida e o avanço nos estudos acerca de novas possibilidades biotecnológicas fizeram com que o uso de cultivares geneticamente modificadas não parasse de aumentar desde sua primeira adoção. Atualmente, são 25 países cultivando oficialmente alguma variedade geneticamente modificada, ou até mesmo, várias delas. Em 2008, a soja foi a principal cultura biotecnológica no cenário

mundial, com 65,8 milhões de hectares, e a tolerância ao herbicida a principal característica associada às culturas geneticamente modificadas (James, 2008).

Apesar dos benefícios esperados com os organismos geneticamente modificados, existem receios por parte da sociedade. Entre as preocupações em torno dos organismos geneticamente modificados, ecologistas temem o fluxo gênico da cultivar transgênica para uma população silvestre, pois este fato modificaria a estrutura genética destas populações, interferindo no equilíbrio da biodiversidade (Borém e Ramalho, 2002). No caso do Brasil este risco seria nulo por não existir parentes silvestres dessa espécie no País (Borém e Miranda, 2009). Mesmo no centro de origem e de diversidade da soja, a possibilidade de escape gênico ainda seria reduzida devido ao sistema de reprodução e biologia floral da espécie, autógama e cleistógama (autopolinização antes da antese). Segundo Schuster et al. (2007), outra preocupação, esta por parte dos produtores de sementes para comercialização, é que seus campos de produção possam ser contaminados via fluxo gênico por lavouras vizinhas de soja.

Fluxo gênico é o processo de migração de alelos entre populações da mesma espécie, e os seus efeitos sobre o *pool* gênico local dependem do número de indivíduos migrantes e da diferença entre as populações quanto às frequências alélicas (Falconer and Mackay, 1998). No caso da soja, de reprodução predominantemente por autofecundação, a taxa de fecundação cruzada é baixa, e a partir da distância de 4 metros entre cultivares, a fecundação cruzada se torna rara (Abud et al., 2003; Ray et al., 2003; Pereira et al., 2007). Para o milho, uma alógama, a situação é bem diferente, pois os seus grãos de pólen são dispersos pelo vento e mesmo a grandes distâncias ocorre fecundação cruzada.

Dentro da mesma espécie existe variação nas taxas de fecundação cruzada em função de características peculiares do genótipo e do ambiente. A cor da flor, por exemplo, pode ser um fator relevante considerando seu poder de atrair insetos polinizadores. A produção de pólen e sua dispersão também contribuem para a variação na taxa de fecundação cruzada apresentada por determinada cultivar, variedade ou híbrido (Borém e Ramalho, 2002). Fatores ambientais, como, existência e abundância de insetos polinizadores, intensidade do vento, temperatura e umidade do ar, são fatores que também podem contribuir para a variação da taxa de fecundação cruzada (Borém e Ramalho, 2002). No caso do milho, a longevidade do grão de pólen e a distância entre duas populações são fatores fundamentais na determinação do fluxo gênico (Luna et al., 2001).

Quanto à possibilidade de surgimento de novas plantas invasoras, Crawley et al. (2001) apresentaram os resultados de 10 anos de observação e monitoramento de quatro culturas GM (canola, milho, beterraba e batata) em relação ao seu comportamento invasivo

quando comparado à sua contrapartida convencional. Nenhuma cultura, GM ou convencional, cresceu de forma abundante em nenhum local e, pelo contrário, todas declinaram após o primeiro ano devido a alguma forma de competição. Os resultados deste estudo não isentaram definitivamente as culturas GM da possibilidade de se tornarem daninhas ou invasoras, mas indicaram que as plantas cultivadas, fora de seu ambiente de cultivo, têm menores chances de sobreviverem, ainda mais em ambientes de competição. Seja como for, o impacto ecológico de cada evento desenvolvido deve ser estudado especificamente. Borém (2001) chegou a considerações semelhantes após os primeiros resultados obtidos em pesquisas, relatando que, em se tratando de transgênicos, generalizações não devem ser realizadas.

Muitos estudos acerca da hibridação em soja foram realizados até o momento, envolvendo desde o desenvolvimento de meios que aumentariam a ocorrência de fecundação cruzada, passando pelo entendimento de como o processo se dá, quando é favorecido ou não, até as formas de anular as chances de que esse evento ocorra. Todo esse interesse acerca do tema se dá por receio ou desejo de que genótipos se cruzem.

Culter (1934) relatou sobre um método para obtenção de híbridos naturais de soja. Nesse estudo, utilizou 6 genótipos diferentes organizando-os aos pares em blocos cercados por um tecido de algodão de cerca de 90 cm, no período de florescimento. Além disso, manteve cerca de 15 colméias de abelhas nas proximidades dos blocos. Assim, foram obtidos resultados indicativos de taxa de fecundação cruzada variando de 0,38 a 2,43%.

Em Campinas, Miyasaka (1958) encontrou taxa de hibridação de 0,5% entre as variedades Abura de flores brancas e Abura de flores roxas.

Nos estados de Iowa e Maryland (EUA), um estudo foi realizado com o objetivo de se verificar o efeito da radiação sobre a polinização cruzada em soja sob condições de campo. Em Iowa, os resultados indicaram quatro vezes mais (4,4%) a ocorrência de híbridos em progênies irradiadas do que no controle (1,0%). Em Maryland, enquanto o controle apresentou média de 0,8% de híbridos, progênies irradiadas com raios-X e nêutrons térmicos apontaram para hibridações de 4,7 e 4,8%, respectivamente, o que representa um aumento na escala de 6 vezes. Este acréscimo estaria relacionado à macho esterilidade.

Outra consideração interessante foi obtida a partir da observação da existência de relação entre densidade populacional de insetos e cruzamentos naturais em soja, ou seja, mais insetos, mais hibridações naturais. Assim, aumentar a densidade de insetos seria possível reduzindo o número de flores a partir do tratamento com irradiação. De fato, chegou-se ao aumento de cruzamentos naturais (400 a 600 %) a partir deste método (Weber & Hanson, 1961).

Starnes & Hadley (1962) avaliaram o efeito do  $\alpha$ - $\beta$ -dicloroisobutirato sobre a soja, como gameticida, sob a perspectiva de obtenção de uma metodologia prática para a obtenção da macho esterilidade, favorecendo a obtenção de híbridos nesta espécie. Contudo, a alta toxicidade deste produto sobre a soja inviabilizou a expectativa inicial.

O efeito combinado de irradiação de sementes e de abelhas na promoção de fecundação cruzada em variedades de soja, pertencentes a diferentes grupos de maturação em diferentes localizações na Califórnia foi também avaliado por Beard & Knowles (1971). Tanto a irradiação com raios-gama quanto o tratamento das sementes com Etil Metano Sulfonato (EMS), produto químico mutagênico, mostraram ser igualmente efetivos na promoção de fecundação cruzada, sendo que acréscimos na escala de 11 a 14% foram observados em alguns casos. Quanto aos locais, os resultados mostraram-se erráticos, 10%, 1-5% e 0-1%, nas localidades estudadas, ou seja, não se chegou a nenhum consenso ou relação. A combinação avaliada neste estudo não aumentou a taxa de fecundação cruzada quando comparada a cada situação separadamente.

Caviness (1966) estudando fluxo gênico entre duas variedades de soja pelo período de 3 anos (1961, 1962 e 1963), encontrou resultados variáveis de taxa de hibridação, sendo que no primeiro ano, a 90 cm de distância entre as fileiras, menor distância avaliada, encontrou 0,44% de fecundação cruzada. Nos anos seguintes, encontrou 0,03%. Nesse mesmo estudo, verificou que não foi possível eliminar completamente a fecundação cruzada com distâncias relativamente maiores, como 9 e 15m de distância.

Sediyama et al. (1970) estudaram a taxa de fecundação cruzada em soja em duas localidades distintas, sob a suspeita de que esta poderia variar de local para local em virtude das diferenças ambientais. Instalaram ensaios nas cidades de Capinópolis, localizada no Triângulo Mineiro, e Viçosa, situada na Zona da Mata Mineira. Em Viçosa, os resultados obtidos indicaram taxa de fecundação cruzada entre fileiras adjacentes e alternadas de 0,09%. Já entre plantas alternadas, foram obtidas 1,30% de hibridações naturais. Em Capinópolis, também no sistema de fileiras alternadas, foram obtidas 0,90% de plantas híbridas.

Verneti et al. (1972) procuraram determinar a taxa de fecundação cruzada natural em três localidades, Pelotas/RS, Sertão/RS e Ponta Grossa/PR. Chegaram a resultados variando entre 0,03 e 1,22%, em Ponta Grossa e Pelotas, respectivamente.

Nos anos agrícolas de 1973 e 1974, Boerma & Moradshahi (1975) estudaram distâncias percorridas por polinizadores entre e dentro de fileiras de soja nas condições de campo. Os resultados obtidos levaram a sugerir que além dos 7 m de distância de uma fonte de contaminação, reduzida taxa de polinização cruzada ocorreria.

Aproximadamente duas décadas mais tarde, Ahrent & Caviness (1994) avaliaram a taxa de fecundação cruzada em 12 cultivares de soja cultivadas em fileiras adjacentes, espaçadas por 102 cm, sob condições de campo. Neste estudo, fez-se presente populações de abelhas e outros insetos. Os resultados apontaram ocorrência de fecundação cruzada variando de 0 a 2,55%, fortalecendo ainda mais a tese de que a presença de polinizadores naturais favorece a ocorrência de fecundação cruzada.

Ray et al. (2003) realizaram em Mississipi (EUA) um estudo procurando observar o potencial de fluxo gênico em soja. No primeiro experimento, 12 fileiras de soja de variedade de flor branca, foram ladeadas por 4 fileiras de soja de variedade de flor roxa. No segundo experimento, numa mesma fileira, estas duas variedades foram semeadas alternadamente, espaçadas 15,2 cm. Encontraram, para o primeiro ensaio, 0,41 e 0,03% de polinização cruzada a 0,9 e 5,4 m da fonte, respectivamente. No segundo ensaio, o resultado médio indicou 1,8%, resultado considerado alto pelos autores, em alusão ao relatado na literatura.

Abud et al. (2003) procuraram investigar a dispersão de pólen de soja geneticamente modificada para resistência ao herbicida imazapyr, cultivando esta variedade junto com uma convencional sensível a este herbicida. De acordo com o desenho experimental, a maior incidência de pólen transgênico ocorreu na primeira linha de soja convencional imediatamente 0,5m distante da soja transgênica, 0,44 a 0,45%. Já na segunda fileira, estes percentuais foram reduzidos a 0,04 e 0,14% chegando a zero na 13ª linha, ou seja, a 6,5m de distância da parcela central, onde se encontravam as plantas transgênicas.

Schuster et al. (2007) e Pereira et al. (2007) estudaram independentemente a fecundação cruzada envolvendo uma cultivar convencional (CD211) e outra geneticamente modificada (CD219) tolerante ao herbicida glifosato. O primeiro estudo, realizado em Cascavel, PR, identificou uma taxa de 0,61% de fecundação cruzada a uma distância de 1m de distância entre populações. No segundo trabalho, realizado em duas localidades do Estado de Minas Gerais, verificou-se taxas de hibridação natural, à distância de 1m, de 0,80 e 0,08%, em Viçosa e Florestal, respectivamente.

Existem autores que recomendam a duplicação do resultado obtido no cálculo da taxa de fecundação cruzada, sendo equivalente à ocorrência de cruzamento natural recíproco (Culter, 1934; Caviness, 1966; Boerma & Moradshahi, 1975), o que tem sido criticado por outros autores (Weber & Hanson, 1961; Verneti et al., 1972). Com base em revisão de literatura realizada, entendeu-se que não se deve duplicar a taxa de hibridação cruzada unidirecional entre duas cultivares, pois como se evidenciou, este valor varia com as

variedades e locais. A taxa de alogamia é uma particularidade da variedade em interação com o seu meio, portanto, impraticável um pré-julgamento ou estimativa.

Corroborando com a tese supracitada, vários trabalhos mostraram que a taxa de fecundação cruzada é um evento influenciado por muitos fatores, como o próprio cultivar (Culter, 1934; Rubis, 1970; Beard & Knowles, 1971; Ahrent & Caviness, 1994), o local (Sediyama et al., 1970; Beard & Knowles, 1971; Pereira et al., 2007), o ano (Caviness, 1966), a distância entre as plantas (Caviness, 1966; Ahrent & Caviness, 1994), e até mesmo o manejo de pragas com inseticidas (Abud et al., 2003). Erickson (1975b) indiretamente fez referência à influência de fatores ambientais para a ocorrência de cruzamentos naturais entre variedades de soja. Este trabalho inferiu que a temperatura esteve relacionada com produção de néctar pela planta, logo, com a atração de insetos polinizadores, no caso, abelhas. Em geral, as plantas competem pela atenção dos insetos por meio das concentrações de açúcar em seu néctar. Sob temperaturas abaixo dos 21°C, as flores das cultivares estudadas não se abriram e a secreção de néctar cessou. Tais resultados levam a sugerir uma relação entre as condições ambientais e a hibridação natural, mesmo que indireta.

Para fortalecer a inferência de que o ambiente é relevante para a taxa de fecundação cruzada, fotoperíodo e a temperatura afetam o tempo de duração do período vegetativo de cultivares de soja, que por sua vez, têm tipos de sensibilidades distintas em relação a cada um desses fatores (Rodrigues et al, 2001). Oliveira et al. (1999) verificaram retardamento na data de florescimento de variedades sob baixas temperaturas nas fases iniciais do desenvolvimento e interação entre temperatura, fotoperíodo e genótipos no que tange época de florescimento. De acordo com Câmara et al. (1997), acréscimos no fotoperíodo e temperatura antecipam o florescimento da soja e aumentam a altura de suas plantas.

Fatores genéticos estão inseridos nessas considerações a respeito de floração e polinização em soja e o grau de cleistogamia parece estar relacionado com a secreção de néctar. Quanto mais efetiva a cleistogamia, menor se torna a secreção de néctar. Erickson (1975a) observou que cultivares semi-cleistógamas usualmente continuavam a secretar pequenas quantias a baixas temperaturas, e cultivares cleistógamas produziram pouco néctar.

Em relação aos principais agentes polinizadores em soja, diversos trabalhos citam os insetos de maneira geral (Weber & Hanson, 1961; Caviness, 1966; Ahrent & Caviness, 1994; Abud et al., 2003). Contudo, alguns autores especificaram as abelhas *Apis mellifera* L. como agentes principais (Culter, 1934; Weber & Hanson, 1961; Boerma & Moradshahi, 1975; Abud et al., 2003) e os tripses *Thrips tabaci* Lind (Weber & Hanson, 1961; Sediyama et al.,

1970). Abud et al. (2003) ainda citam a espécie *Trigona spinipes* (Apidae) como visitante das flores de soja.

Apesar da existência de significativas considerações e estudos que minimizam a ocorrência de fecundação cruzada, existe o receio de que o cultivo da soja geneticamente modificada tolerante ao glifosato permita o escape gênico no ambiente. Existe o questionamento se naturalmente uma variedade tolerante ao glifosato poderia fornecer pólen para a fecundação de plantas de uma variedade convencional e vice-versa.

Esta pesquisa teve como objetivos: i) ajustar metodologias de bioensaios para detecção e quantificação de sementes de soja geneticamente modificada e de soja convencional, tolerante e sensível ao herbicida glifosato, respectivamente; ii) discutir os efeitos do fluxo gênico da soja sob a perspectiva da genética de populações; e, iii) estimar a taxa de fecundação cruzada recíproca em soja sob condições naturais de campo, envolvendo uma cultivar geneticamente modificada tolerante ao herbicida e uma convencional.

## REFERÊNCIAS

ABUD, S.; SOUZA, I.M.; MOREIRA, C.T.; ANDRADE, S.R.M.; ULBRICH, A.V.; VIANNA, G.R.; RECH, E.L.; ARAGÃO, F.J.L. Dispersão de pólen em soja transgênica na região Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.10, p.1229-1235, 2003.

AHRENT, D.K.; CAVINESS, C.E. Natural cross-pollination of twelve soybean cultivars in Arkansas. **Crop Science**, v.34, p.376-378, 1994.

AMARANTE JÚNIOR, O.P.; SANTOS, T.C.R.; BRITO, N.M.; RIBEIRO, M.L. Métodos de extração e determinação do herbicida glifosato: Breve Revisão. **Química Nova**, v.25, n.3, p.420-428, 2002a.

AMARANTE JÚNIOR, O.P.; SANTOS, T.C.R.; BRITO, N.M.; RIBEIRO, M.L. Glifosato: Propriedades, Toxicidade, Usos e Legislação. **Química Nova**, v.25, n.4, p.589-593, 2002b.

BEARD, B.H.; KNOWLES, F. Frequency of cross-pollination of soybeans after seed irradiation. **Crop Science**, v.11, p.489-492, 1971.

BOERMA, H.R.; MORADSHAHI, A. Pollen movement within and between rows to male-sterile soybeans. **Crop Science**, v.15, p.858-861, 1975.

BORÉM, A. **Escape gênico & transgênicos**, Viçosa: UFV, 2001, 206 p.: il.

BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. **Melhoramento de Plantas**, (5ª ed), Viçosa: UFV, 2009, 529 p.: il.

BORÉM, A.; RAMALHO, M.A.P. Escape gênico e impacto ambiental: O caso do milho Brasil. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**. 28: 44 – 47. 2002.

CÂMARA, G.M.S.; SEDIYAMA, T.; DOURADO-NETO, D.; BERNARDES, M.S. Influence of photoperiod and air temperature on the growth, flowering and maturation of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). **Scientia Agricola**, v.54 (nº especial), p.149-154, 1997.

CAVINESS, C.E. Estimates of natural cross-pollination in Jackson soybeans in Arkansas. **Crop Science**, v.6, p.211-212, 1966.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Quarto levantamento da safra agrícola 2009/10**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 10 jan. 2010.

CRAWLEY, M.J.; BROWN, S.L.; HAILS, R.S.; KOHN, D.D.; REES, M. Transgenic crop in natural habitats, **Nature**, v.409, p.682-683, 2001.

CULTER, G.H. A simple method for making soybean hybrids. **Journal of the American Society of Agronomy**, v.26, p.252-254, 1934.

ERICKSON, E.H. Effect of honey bees on yield of three soybean cultivars. **Crop Science**, v.15, p.84-86, 1975a.

ERICKSON, E.H. Variability of floral characteristics influences honey bee visitation to soybean blossoms. **Crop Science**, v.15, p.767-771, 1975b.

FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introduction to quantitative genetics**. 4 ed. Edinburgh: Longman Group. 464 p. 1998.

GASSER, C.S.; FRALEY, R.T. Genetically engineering plants for crop improvement. **Science**, v.244, p.1293-1299, 1989.

GAZZIERO, D.L.P.; PRETE, C.E.C. Dinâmica da população e manejo de plantas daninhas na cultura da soja RR: vantagens e riscos. In.: MOSCARDI, F.; HOFFMANN-CAMPO, C.B.; SARAIVA, O.F.; GALERANI, P.R.; KRZYZANOWSKI, F.C.; CARRÃO-PAZZINI, M.C. **Proceedings... Congresso Brasileira de Soja (III)**. Foz do Iguaçu, PR, 2004. p. 1221-1230, 2004.

JAMES, C. **Situação global das culturas biotecnológicas/GM comercializadas: 2008**. ISAAA Briefs n. 39. ISAAA: Ithaca, NY, 2008.

KLEBA, J.B. Riscos e benefícios de plantas transgênicas resistentes a herbicidas: o caso da soja RR da Monsanto. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v.15, n.3, p.9-42, 1998.

KRUSE, N.D.; TREZZI, M.M.; VIDAL, R.A. Herbicidas inibidores da EPSPS: Revisão de Literatura. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.1, n.2, 2000.

LUNA, V.; FIGUEROA, M.; BALTAZAR, M.; GOMEZ, L.; TOWNSEND, R.; SCHOPER, J.B. Maize pollen longevity and distance isolation requirements for effective pollen control. **Crop Science**, 41: 1551 – 1557. 2001.

MIYASAKA, S. **Contribuição para o melhoramento da soja no Estado de São Paulo**. 1958, 49p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1958.

MONQUERO, P.A. Plantas transgênicas resistentes aos herbicidas: Situação e perspectivas. **Bragantia**, v. 64, n. 4, p. 517-531, 2005.

NEPOMUCENO, A.L. A agricultura e as plantas geneticamente modificados. In: MOSCARDI, F.; HOFFMANN-CAMPO, C.B.; SARAIVA, O.F.; GALERANI, P.R.; KRZYZANOWSKI, F.C.; CARRÃO-PANIZZI, M.C. (Ed.) **Proceedings...Congresso Brasileiro de Soja (III)** Foz do Iguaçu, PR, 2004. p.1217-1220, 2004.

OLIVEIRA, A.C.B.; SEDIYAMA, C.S.; CRUZ, C.D. Selection for later flowering in soybean (*Glycine max* L.Merrill) F2 populations cultivated under short day conditions. **Genetics and Molecular Biology**, v.22, n.2, p.243-247, 1999.

PADGETTE, R.; KOLACZ, K.H.; DELANNAY, X.; RE, D.B.; LAVALLEE, B.J.; TINIUS, C.N.; RHODES, W.K.; OTERO, I.; BARRY, G.F.; KISHORE, G.M. Development, identification and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. **Crop Science**, Madison, v.35, p.1451-1461, 1995.

PEREIRA, W.A.; DEL GIÚDICE, M.P.; CARNEIRO, J.E.S.; DIAS, D.C.F.S.; BORÉM, A. Fluxo gênico em soja geneticamente modificada e método para sua detecção, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 42: 999 – 1006. 2007.

RAY, J.D.; KILEN, T.C.; ABEL, C.A.; PARIS, R.L. Soybean natural cross-pollination rates under field conditions. **Environmental Biosafety Research**, v.2, n.2, p.133-138, 2003.

RODRIGUES, O.; DIDONET, A.D.; LHAMBY, J.C.B.; BERTAGNOLLI, P.F.; LUZ, J.S. Resposta quantitativa do florescimento da soja à temperatura e ao fotoperíodo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n.3, p.431-437, 2001.

ROESSING, A.C. Competitividade da cultura da soja no Brasil e no mundo. In.: **Proceedings: Congresso Brasileira de soja (III)**. Foz do Iguaçu, PR, 2004, p. 1203-1209, 2004.

RUBIS, D.D. Breeding insect-pollinated crops. P. 19-24. In: **The indispensable Pollinators**. A report of the 9<sup>th</sup> Polination Conf. Miss. Publ. 127. Ark. Agric. Exp. Stn. Fayetteville, AR. 1970.

SCHUSTER, I.; VIEIRA, E.S.N.; SANTANA, H.; SINHORAT, D.; SILVA, R.B.; OLIVEIRA, M.A.R. Fluxo gênico em soja na Região Oeste do Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 4, p. 515-520, 2007.

SEDIYAMA, T.; CARDOSO, A.A.; VIEIRA, C.; ANDRADE, D. Taxa de hibridação natural na soja, em Viçosa e em Capinópolis, Minas Gerais. **Revista Ceres**, v.17, n.94, p.329-331, 1970.

SHAH, D.M.; HORSCH, R.B.; KLEE, H.J.; KISHORE, G.M.; WINTER, J.A.; TUMER, N.E.; HIRONAKA, C.M.; SANDERS, P.R.; GASSER, C.S.; AYKENT, S.; SIEGEL, N.R.; ROGERS, S.G.; FRALEY, R.T. Engineering herbicide tolerance in transgenic plants, **Science**, v.233, p.478-481, 1986.

SIQUEIRA, J.O.; TRANNIN, I.C.B.; RAMALHO, M.A.P.; FONTES, E.M.G. Interferências no agrossistema e riscos ambientais de culturas transgênicas tolerantes a herbicidas e protegidas contra insetos. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v.21, n.1, p.11-81, 2004.

STARNES, W.J.; HADLEY, H.H. Some effects of the gametocide, alpha, beta-dichloroisobutyrate, on soybeans. **Crop Science**, v.2, p.305-310, 1962.

TREZZI, M.M.; KRUSE, N.D.; VIDAL, R.A. Inibidores de EPSPS. In: VIDAL, R.A.; MEROTTO JR, A. (Eds.). **Herbicidologia**, Porto Alegre, p.37-45, 2001.

VERNETTI, F.J.; BONATO, E.R.; TERESAWA, F.; GASTAL, M.F.C. Observações sobre a taxa de cruzamentos naturais em soja, em Pelotas e Sertão, RS e Ponta Grossa, PR. **Ciência e Cultura**, v.1, n.24, p.36-41, 1972.

VIEIRA, R.C.; CABRAL, L.C.; DE PAULA, A.C.O. Composição centesimal e conteúdo de aminoácidos graxos e minerais de seis cultivares de soja destinadas à alimentação humana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.7, p.1277-1283, 1999.

WEBER, C.R.; HANSON, W.D. Natural hybridization with and without ionizing radiation in soybeans. **Crop Science**, 1: 389-392, 1971.

## Capítulo 1

# AJUSTE DE METODOLOGIAS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA QUANTO À TOLERÂNCIA AO GLIFOSATO<sup>1</sup>

WELISON ANDRADE PEREIRA<sup>2</sup>, SUZANA PATRÍCIA LISBOA<sup>3</sup>, DENISE CUNHA FERNANDES DOS SANTOS DIAS<sup>4</sup>, EVELINE MANTOVANI ALVARENGA<sup>4</sup>, ALUÍZIO BORÉM<sup>4</sup>

RESUMO - Os bioensaios constituem uma alternativa prática e eficiente para detecção de sementes de soja geneticamente modificada (GM) tolerante ao glifosato entre sementes de soja convencional sensível ao herbicida. Deve ser verificada também sua utilização na identificação das sementes quando o lote é de soja GM, ou seja, quando sementes convencionais são a minoria. Objetivou-se, com este trabalho, ajustar a metodologia de dois bioensaios de detecção de sementes de soja GM e testar os melhores protocolos, um de cada bioensaio, na detecção e quantificação de misturas simuladas, contendo genótipos contrastantes quanto à tolerância ao herbicida. Nos bioensaios, foram testados três níveis de umidade no substrato (2,0; 2,5 e 3,0 vezes o seu peso seco), cinco soluções do herbicida (0; 0,01; 0,03; 0,06 e 0,12 %) no método papel umedecido com glifosato e quatro soluções do herbicida (0; 0,3; 0,6 e 1,2 %) no método pré-embebição de sementes. O nível de umidade 3,0 e a solução 0,03 % constituíram o protocolo mais eficiente para detecção no método do papel umedecido. O nível de umidade 2,0 e a solução 0,3 % se destacaram no método da pré-embebição das sementes. Foi mais prático e rápido detectar plântulas tolerantes do que plântulas sensíveis em ambos os testes. Em amostras com maior taxa de contaminação, foi mais fácil detectar e mais difícil quantificar misturas com exatidão. Foram encontrados, somando os resultados dos dois bioensaios, 20 erros em 6.400 análises, o que corresponde a uma taxa de 99.69 % de acurácia.

Palavras-chave: *Glycine max*, organismo geneticamente modificado, pureza genética.

---

<sup>1</sup> Submetido em 09/09/2008. Aceito para publicação em 13/05/2009. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 31, n. 4.

<sup>2</sup> Doutorando em Genética e Melhoramento, Depto. de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000 – Viçosa – MG. E-mail: welison.pereira@ufv.br;

<sup>3</sup> Doutoranda em Fitotecnia, Depto. Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000 – Viçosa – MG. E-mail: suzanaplisboa@yahoo.com.br

<sup>4</sup> Professor Adjunto, Depto. de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000 – Viçosa – MG. E-mail: dcdias@ufv.br; eveline@ufv.br; borem@ufv.br

## ADJUSTMENT OF METODOLOGIES TO VERIFICATION OF SOYBEAN CULTIVARS AS TOLERANCE TO THE GLYPHOSATE

ABSTRACT – Bioassays are a practical and efficient alternative for the detection of soybean seeds genetically modified (GM) glyphosate-tolerant soybeans between conventional sensitive to the herbicide. It should be also checked its use in identification of seeds in lots of GM soybean, ie, when conventional seeds are the minority. The objective of this work was to adjust two bioassays for the GM soybean seeds detection and to test the best protocols, one for each bioassay in the detection and quantification of the simulated mixtures containing contrasting genotypes for tolerance to the herbicide. In the bioassays were tested three levels of moisture in the substrate (2,0, 2,5 and 3,0 times its dry weight), five herbicide solutions (0, 0,01, 0,03, 0,06 and 0,12%) in the method moistened paper with herbicide solutions and four solutions (0, 0,3, 0,6 and 1,2%) in the method pre-soak of seeds. The moisture level 3,0 and herbicide solution 0,03% were the most efficient protocol in the moistened paper detection method. The moisture level 2,0 and herbicide solution 0.3% solution were the most efficient protocol in the seeds pre-soak method. It was more practical and rapid to detect tolerant seedlings than sensitive seedlings in both tests. In samples with the highest rate of contamination was easier to detect and more difficult to quantify mixtures accurately. Were found, adding the results of two bioassays, 20 mistakes in 6400 analysis, which corresponds to a rate 99.69% accuracy.

Key words: *Glycine max*, modified genetically organism, genetic purity.

## INTRODUÇÃO

O melhoramento genético tem propiciado cultivares altamente produtivas e com diversos perfis. A soja geneticamente modificada (GM) tolerante ao glifosato é uma opção favorável ao plantio direto, que possibilita redução no uso de herbicidas, flexibilidade no controle de plantas daninhas, menor impacto ambiental (Kleba, 1998), entre outros benefícios que convergem para o potencial incremento em produtividade e rentabilidade da lavoura de soja. Por outro lado, a preocupação com pureza genética ganha relevância no mercado sementeiro, tendo em vista a evolução do sistema produtivo e o conseqüente aumento no rigor dos padrões para produção e comercialização de sementes. É presumível que a verificação de cultivares quanto à transgenia venha fazer parte desses padrões, considerando a liberação do plantio de soja GM e a exigência de pureza genética das sementes.

Na rotina do laboratório de análise de sementes, durante a execução da análise física de um lote, alguns procedimentos são utilizados para a verificação de ocorrência de sementes de diferentes cultivares (Brasil, 1992). No que se refere à soja GM tolerante ao glifosato, bioensaios com diferentes princípios vêm sendo publicados no intuito de fornecer uma metodologia confiável para detecção de sementes de soja GM em lotes de sementes de soja não-GM. Entre os bioensaios, todos com bons resultados, podem ser citados: germinação seguida de aplicação do herbicida sobre as plantas (Goggi and Stahr, 1997); pulverização foliar com glifosato pós-germinação (Bevilaqua et al., 2000; Torres et al., 2003); umedecimento do substrato de germinação com solução do herbicida (Bevilaqua et al., 2000; Funguetto et al., 2004; Miranda et al., 2005); identificação com base na atividade das enzimas GOT, esterase, peroxidase e fosfatase ácida (Menezes et al., 2004); imersão de sementes em solução do herbicida (Funguetto et al., 2004; Tillmann and West, 2004); pré-embebição de sementes em substrato umedecido com glifosato (Goggi and Stahr, 1997; Funguetto et al., 2004; Tillmann and West, 2004); emergência da plântula em areia, seguida de aplicação do herbicida (Miranda et al., 2006); e, detecção em sistema hidropônico (Bertagnolli et al., 2006).

Nos estudos citados, objetivou-se detectar sementes de soja GM em lotes de soja convencional, mas, não foi verificada a utilização desses métodos na detecção de sementes de soja convencional em lotes de soja GM, o que leva ao questionamento se a eficiência dos bioensaios continua a mesma nesta situação. Esta poderia ser uma indagação do produtor que opta por cultivar a soja tolerante ao herbicida, mas, deseja antes investigar a pureza genética do lote de sementes adquirido. Caso o lote contenha sementes de soja convencional sensível ao herbicida, parte de sua lavoura seria perdida sob a aplicação do glifosato na pós-emergência (Kleba, 1998).

Cunha et al. (2005) compararam o desempenho de diferentes bioensaios para detecção de sementes de soja GM, e concluíram sobre a alta eficiência desses métodos perante às técnicas moleculares levando em conta a relação custo/benefício. Miranda et al. (2005) e Miranda et al. (2006) demonstraram a capacidade de diferentes métodos em detectar e quantificar misturas simuladas, onde os bioensaios confirmaram seu elevado potencial. Pereira et al. (2007) utilizaram os bioensaios para identificação de fluxo gênico entre uma cultivar de soja GM e uma cultivar de soja convencional sensível ao glifosato, e observaram que estes bioensaios foram eficientes em possibilitar a identificação das plântulas tolerantes a este herbicida nas amostras analisadas. Considerando que 71 % da área cultivada com soja na última safra no Brasil foram de soja GM (James, 2009) é possível que os bioensaios sejam exigidos dentro dos padrões para produção e comercialização de sementes de soja. Assim, ajustes nos bioensaios devem ser investigados com a finalidade de otimizar a capacidade destes testes em identificar sementes GM.

É fato que diferenças acentuadas de potenciais hídricos entre sementes e substrato caracterizam a transferência rápida de água para as sementes, o que pode resultar em danos por embebição (Marcos Filho, 2005). Ao contrário, caso o potencial hídrico da semente seja sutilmente inferior ao do seu ambiente, a embebição se dá de modo menos brusco, o que é favorável à germinação de sementes muito secas ou com menor capacidade de reorganização de suas membranas. Assim, a umidade do papel nos bioensaios de detecção de soja GM deve ser analisada.

Objetivou-se com este trabalho: i) ajustar metodologias de bioensaios para detecção de sementes de soja *Roundup Ready* (RR) quanto à umidade do substrato e a concentração do herbicida na solução; e, ii) avaliar a eficiência de cada bioensaio na detecção e quantificação de misturas simuladas contendo sementes de soja GM e não-GM.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos foram conduzidos no Laboratório de Sementes e Melhoramento de Soja, do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, MG, nos meses de junho e julho de 2007. Foram realizados, preliminarmente, o teste de germinação, peso de 1000 sementes e teor de água (Brasil, 1992), a fim de caracterizar as cultivares estudadas, CD 219 RR (GM) e CD 211, sendo esta última, convencional, sensível ao glifosato.

Para o ajuste das metodologias, as sementes foram submetidas aos bioensaios: germinação em papel umedecido com solução do glifosato e pré-embebição em substrato umedecido com solução do herbicida. Foram avaliadas diferentes soluções e três níveis de umidade no substrato, quantidade de solução equivalente a 2,0; 2,5 e 3,0 vezes o peso do papel seco, de agora em diante, referidas como umidades 2,0; 2,5 e 3,0, respectivamente.

### **Bioensaio 1 - Germinação em papel umedecido com solução do glifosato**

O substrato para germinação, papel germitest, foi umedecido com água no controle e com soluções de glifosato nas concentrações 0,01, 0,03, 0,06 e 0,12 % do equivalente ácido (e.a.) do herbicida nos demais tratamentos (Miranda et al., 2005). Os rolos de germinação, com 50 sementes cada, foram incubados em câmara de germinação por 7 dias, sob temperatura de  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Após este período, foram avaliadas as porcentagens de plântulas normais (PNO), plântulas anormais (PAN), plântulas com raízes secundárias (PRS), plântulas com comprimento superior a 15 cm (PMA15) e comprimento médio de plântulas (CMP). O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial (5 soluções x 3 níveis de umidade do substrato), com quatro repetições de 50 sementes.

### **Bioensaio 2 - Pré-embebição das sementes em papel umedecido com herbicida**

As sementes, em número de 50 por repetição, foram colocadas para pré-embebição em papel germitest umedecido com água no tratamento controle e com soluções do e.a. do herbicida nas concentrações de 0,3, 0,6 e 1,2 % por 16 horas em câmara de germinação

(25±1°C). Após este período foram transferidas para substrato umedecido com água destilada nas proporções de 2,0, 2,5 e 3,0 vezes o peso do papel seco para o teste de germinação. As avaliações foram realizadas no 7º dia da implantação do ensaio, computando-se as porcentagens de plântulas normais (PNO), plântulas anormais (PAN), plântulas com raízes secundárias (PRS), plântulas com comprimento superior a 15 centímetros (PMA15) e comprimento médio de plântulas (CME). O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial (4 soluções x 3 níveis de umidade do substrato), com quatro repetições.

### **Morfologia das plântulas**

Durante a obtenção dos protocolos, buscou-se estudar e caracterizar morfológicamente as plântulas tolerantes e sensíveis ao glifosato quando em presença do herbicida.

### **Análise estatística**

Os dados foram analisados com o auxílio do programa GENES (Cruz, 2001), procedendo a análise de variância e o teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade. Na análise, os dados em porcentagem foram transformados em  $\text{arc-sen}(x/100)^{0,5}$ , no entanto, para a visualização dos resultados obtidos, foram apresentados nas Tabelas os seus valores originais em porcentagem.

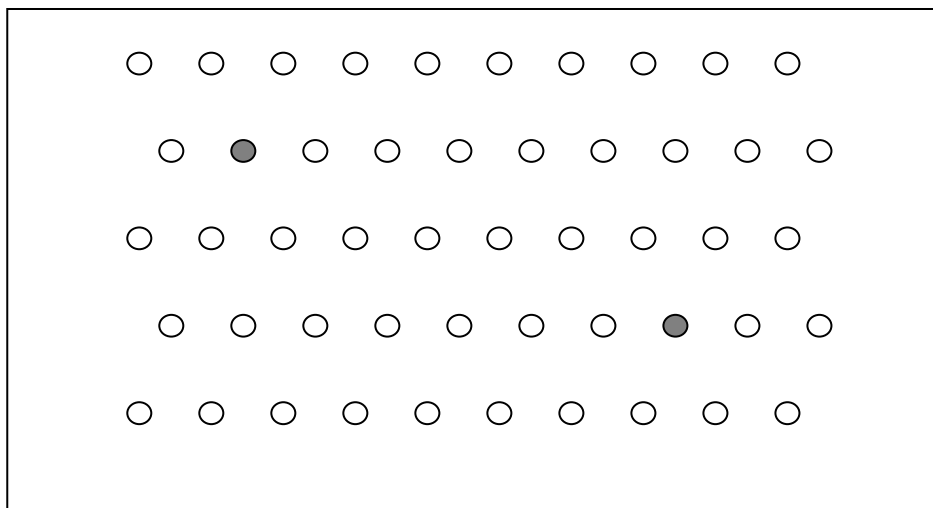
A partir da análise estatística, buscou-se obter um protocolo para cada bioensaio, visando a próxima etapa do trabalho. O julgamento das metodologias se baseou na verificação de qual protocolo (concentração do herbicida e umidade do substrato) permitiu a melhor discriminação dos genótipos quanto à tolerância e sensibilidade ao glifosato.

### **Quantificação de misturas**

Após a realização da primeira etapa deste estudo (ajuste dos bioensaios), na qual buscou-se definir o protocolo mais eficiente (melhor umidade e solução) para caracterizar genótipos contrastantes quanto à tolerância ao glifosato, foi executada a segunda etapa desta pesquisa, focada na aplicação destes protocolos como recurso para detecção e quantificação de mistura entre cultivares de soja, tolerante e sensível ao herbicida, no mesmo lote. Foram simuladas, sem o conhecimento do analista, quatro níveis de contaminações: 0, 1, 3 e 5 % de sementes da cultivar GM entre sementes da cultivar convencional, conforme realizado por Miranda et al. (2005). Adicionalmente, foi simulada a presença de sementes da cultivar convencional como minoria nas misturas, nas proporções de 0, 1, 3 e 5 % de contaminação na

cultivar GM. O ensaio contou com quatro repetições de 100 sementes, distribuídas em oito rolos de papel germitest, contendo 50 sementes cada.

Adaptando o método utilizado por Miranda et al. (2006), durante a montagem dos ensaios, foram utilizados croquis, indicando as posições no papel de germinação de todas as sementes de soja, tolerantes ou sensíveis ao glifosato (Figura 1). Deste modo, após a avaliação do analista, foi possível verificar se o que ele considerou como mistura realmente o era. A eficiência do bioensaio foi estimada com base na porcentagem de acertos obtida pelo analista. Para avaliar a eficiência dos bioensaios em possibilitar a *detecção* de amostras com mistura, o analista assinalou, para cada parcela experimental, a existência ou não de misturas. Na seqüência, para avaliar a acurácia dos bioensaios para a *quantificação* das misturas, ou seja, determinar a porcentagem exata de contaminação na parcela experimental, o analista preencheu uma planilha, na qual indicou o número de plântulas diferentes da maioria que ele encontrou em cada amostra.



**FIGURA 1.** Croqui adotado para a anotação das posições das sementes no papel de germinação para cada amostra de 50 sementes. Neste caso, a posição de duas sementes diferentes das demais quanto à tolerância ao herbicida, como exemplo.

Após a avaliação dos rolos pelo analista, suas conclusões foram corrigidas com base nos croquis experimentais construídos durante a montagem dos bioensaios. Na avaliação da eficiência em *detecção* de misturas, foram possíveis duas respostas: presença ou ausência de misturas. Na avaliação da eficiência em *quantificar* o percentual de contaminação, foram possíveis duas respostas: plântula tolerante ou sensível ao glifosato. Assim, foi obtida a porcentagem de acerto do analista e, na ocorrência de equívoco, a identificação do tipo de erro, sendo dois tipos possíveis: Falso positivo, quando o analista diagnosticou uma mistura incorretamente; e, falso negativo, situação na qual a mistura não foi percebida.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes de ambas as cultivares apresentaram taxa de germinação acima dos 85 %, valor superior ao mínimo exigido para comercialização (BRASIL, 2006), e teor de água inferior aos 11 %, adequado à conservação da qualidade das sementes (Martins-Filho et al., 2001) (Tabela 1).

**TABELA 1.** Porcentagem de germinação (G), peso de 1000 sementes (P1000) e, teor de água (TA) das sementes das cultivares de soja CD211 e CD219.

Cultivar	Valores		
	G (%)	P1000 (g)	TA (%)
CD211	86	116,23	10,2
CD219	91	127,10	10,3

Como em vários outros estudos sobre detecção de sementes de soja tolerante ao herbicida glifosato (Goggi and Stahr, 1997, Bevilaqua et al., 2000; Torres et al., 2003; Funguetto et al., 2004; Tillmann and West, 2004, Cunha et al., 2005; Miranda et al., 2005), a diferença marcante entre as cultivares foi a presença e ausência de plântulas normais quando em tratamento contendo o herbicida, tanto para o bioensaio em papel umedecido (Tabelas 2 e 3), quanto para o bioensaio de pré-embebição (Tabelas 6 e 7). O princípio de ambos bioensaios consiste no fato de que o contato entre as sementes de soja convencional com a solução de glifosato (Funguetto et al., 2004; Tillmann and West, 2004; Miranda et al., 2005) resulta em plântulas anormais. Nesta situação de contato com o herbicida, sementes de uma cultivar GM resultam plântulas normais. Neste sentido, esta discussão concentrou em comparar os tratamentos entre si e encontrar a melhor umidade e concentração do herbicida para cada bioensaio, ou seja, a metodologia mais eficiente em distinguir os genótipos em relação à tolerância ao glifosato.

### **Bioensaio 1 – Germinação em papel umedecido com solução do glifosato**

Para a cultivar convencional, a porcentagem de plântulas normais (PNO) observada no controle foi maior nas umidades 2,5 e 3,0, enquanto nos tratamentos contendo herbicida, o

desenvolvimento de plântulas normais foi inibido totalmente, independente do nível de umidade (Tabela 2), de acordo com Bevilaqua et al. (2000), Tillmann and West (2004) e Cunha et al. (2005).

**TABELA 2.** Porcentagens de plântulas normais (PNO) e de plântulas anormais (PAN) obtidas para a cultivar CD211, sensível ao glifosato, em função dos três níveis de umidade (2,0; 2,5 e 3,0 vezes o peso do substrato seco) no método do substrato umedecido com solução do herbicida em cinco concentrações.

% e. a. <sup>1</sup>	PNO (%)			PAN (%)		
	2,0	2,5	3,0	2,0	2,5	3,0
0,00	82aB <sup>2</sup>	86aA	87aA	15bA	10bA	13bA
0,01	0bA	0bA	0bA	99aA	97aA	100aA
0,03	0bA	0bA	0bA	96aA	98aA	98aA
0,06	0bA	0bA	0bA	98aA	99aA	97aA
0,12	0bA	0bA	0bA	99aA	97aA	99aA
CV	11,99			10,69		

<sup>1</sup> Concentração do equivalente ácido do herbicida utilizado na solução do tratamento.

<sup>2</sup> Médias seguidas de mesma letra (maiúscula na linha e minúscula na coluna) não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

A cultivar GM apresentou comportamento indiferente às umidades em relação à porcentagem de plântulas normais, exceto para o nível de 0,12 % e.a., onde se observou taxa de plântulas normais reduzida nas umidades 2,5 e 3,0. Na umidade 2,0, as concentrações 0,06 e 0,12 % e.a. reduziram a porcentagem de plântulas normais (Tabela 3).

**TABELA 3.** Porcentagens de plântulas normais (PNO) e de plântulas anormais (PAN) obtidas para a cultivar CD219, tolerante ao glifosato, em função dos três níveis de umidade (2,0; 2,5 e 3,0 vezes o peso do substrato seco) no método do substrato umedecido com solução do herbicida em cinco concentrações.

% e. a. <sup>1</sup>	PNO (%)			PAN (%)		
	2,0	2,5	3,0	2,0	2,5	3,0
0,00	94aA	90abA	88abA	6cA	10bcA	12cA
0,01	91abA	95aA	92aA	9cA	5cA	8cA
0,03	90abA	83bA	86abA	10bcA	17bA	13bcA
0,06	81bA	87abA	78bA	19bAB	12bcB	22bA
0,12	60cA	40cB	33cB	40aC	58aB	67aA
CV	7,19			25,13		

<sup>1</sup> Concentração do equivalente ácido do herbicida utilizado na solução do tratamento.

<sup>2</sup> Médias seguidas de mesma letra (maiúscula na linha e minúscula na coluna) não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Os três níveis de umidade testados não interferiram na porcentagem de plântulas anormais (PAN) da cultivar convencional e a concentração de 0,01 % do herbicida foi

suficiente para a incidência de 100 % de anormalidade, evidenciando a sensibilidade desta cultivar ao herbicida (Tabela 2). No grupo controle, maior número de plântulas da cultivar convencional emitiu raízes secundárias (PRS) na umidade 3,0 quando comparada à umidade 2,0, enquanto que nos tratamentos contendo glifosato, verificou-se ausência de PRS (Tabela 4). Funguetto et al. (2004), verificaram inibição completa na formação de raízes secundárias neste tipo de bioensaio, independente da concentração do herbicida, e consideraram as raízes secundárias como uma característica adequada para diferenciar as cultivares GM das não-GM. Considerando a cultivar GM, a solução 0,12 % do e.a. do herbicida afetou significativamente o percentual de raízes secundárias em todos os níveis de umidade, com maior queda na umidade 3,0 (Tabela 5). Isto se justifica pelo fato de que a introdução do gene *cp4 epsps* no genoma da planta lhe confere tolerância ao herbicida e não resistência. Deste modo, elevadas concentrações do herbicida podem afetar o desenvolvimento tanto de plântulas de cultivares convencionais quanto de geneticamente modificadas para este caracter.

**TABELA 4.** Porcentagem de plântulas com raízes secundárias (PRS), comprimento médio de plântulas (CME) e porcentagem de plântulas maiores que 15 cm (PMA15) obtidas para a cultivar CD211, sensível ao glifosato, em função dos três níveis de umidade (2,0; 2,5 e 3,0 vezes o peso do substrato seco) no método do substrato umedecido com solução do herbicida em cinco concentrações.

% e. a. <sup>1</sup>	PRS (%)			CME (cm)			PMA15 (%)		
	2,0	2,5	3,0	2,0	2,5	3,0	2,0	2,5	3,0
0,00	90aB	91aAB	94aA	12,4aB	13,3aA	13,2aA	65aB	77aA	76aA
0,01	0bA	0bA	0bA	0,0bA	0,0bA	0,0bA	0,0bA	0,0bA	0,0bA
0,03	0bA	0bA	0bA	0,0bA	0,0bA	0,0bA	0,0bA	0,0bA	0,0bA
0,06	0bA	0bA	0bA	0,0bA	0,0bA	0,0bA	0,0bA	0,0bA	0,0bA
0,12	0bA	0bA	0bA	0,0bA	0,0bA	0,0bA	0,0bA	0,0bA	0,0bA
CV	9,89			13,53			34,39		

<sup>1</sup> Concentração do equivalente ácido do herbicida utilizado na solução do tratamento.

<sup>2</sup> Médias seguidas de mesma letra (maiúscula na linha e minúscula na coluna) não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Nota-se, a partir das Tabelas 4 e 5 que no método do substrato umedecido com solução do herbicida, as umidades 2,5 e 3,0 favoreceram o comprimento médio das plântulas (CME) de ambas as cultivares no tratamento controle, e o aumento da concentração do herbicida reduziu o comprimento médio das plântulas da cultivar GM. Na concentração 0,01 % e umidade 3,0, a cultivar GM apresentou número superior de plântulas maiores que 15 cm (PMA15), enquanto a solução 0,03 %, independente da umidade, inibiu a ocorrência de PMA15.

Neste método, a utilização da umidade de 3,0 vezes o peso do substrato seco permitiu o melhor desempenho das plântulas de soja. Como o princípio dos bioensaios se baseia no melhor desempenho das plântulas, adotou-se como protocolo a umidade 3,0. Em relação à concentração, 0,01 % do e.a. inibiu o desenvolvimento de plântulas da cultivar convencional, mas essas plântulas chegaram a emitir os primeiros sinais de raízes secundárias, podendo levar a equívocos na interpretação. Por outro lado, como também relatado por Cunha et al. (2005), concentrações mais altas do herbicida, como 0,06 e 0,12 % do e.a. causam prejuízos também ao desenvolvimento das plântulas da cultivar GM, como, aumento na taxa de plântulas anormais, redução na emissão de raízes secundárias e no comprimento médio de plântula (Tabelas 3 e 5). Portanto, para este bioensaio, a concentração 0,03 % e a umidade 3,0 constituíram o protocolo mais eficiente para a caracterização das plântulas em relação à tolerância ou sensibilidade ao herbicida glifosato.

**TABELA 5.** Porcentagem de plântulas com raízes secundárias (PRS), comprimento médio de plântulas (CME) e porcentagem de plântulas maiores que 15 cm (PMA15) obtidas para a cultivar CD219, tolerante ao glifosato, em função dos três níveis de umidade (2,0; 2,5 e 3,0 vezes o peso do substrato seco) no método do substrato umedecido com solução do herbicida em cinco concentrações.

% e. a. <sup>1</sup>	PRS (%)			CME (cm)			PMA15 (%)		
	2,0	2,5	3,0	2,0	2,5	3,0	2,0	2,5	3,0
0,00	98aA	97aA	96aA	11,1aB	12,7aA	13,2aA	49aC	67aB	74aA
0,01	98aA	99aA	96aA	8,7bB	8,7bB	9,5bA	16bB	14,7bB	29bA
0,03	93aA	93aA	95aA	7,6cA	7,1cA	7,3cA	0,5cA	0cA	1,2cA
0,06	92aA	92aA	90aA	4,5dA	4,7dA	4,5dA	0cA	0cA	0cA
0,12	71bA	44bB	33bC	4,0dA	4,0dA	4,0dA	0cA	0cA	0cA
CV	5,49			5,11			23,35		

<sup>1</sup> Concentração do equivalente ácido do herbicida utilizado na solução do tratamento.

<sup>2</sup> Médias seguidas de mesma letra (maiúscula na linha e minúscula na coluna) não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

## Bioensaio 2 – Pré-embebição das sementes em papel umedecido com herbicida

No tratamento controle, as cultivares tolerante e sensível ao glifosato apresentaram porcentagens similares de plântulas normais nas diferentes umidades (Tabelas 6 e 7). Na presença do herbicida, a umidade 2,0 se destacou pelo fato de que as plântulas da cultivar GM não foram prejudicadas nem nas mais altas concentrações do herbicida (0,6 e 1,2 % e.a.) e, indiferentemente às umidades 2,0, 2,5 e 3,0, o tratamento 0,3 % não prejudicou a ocorrência de plântulas normais (PNO) nesta cultivar (90, 88 e 86 %, respectivamente).

Para porcentagem de plântulas com raízes secundárias (PRS), a umidade 3,0 foi mais favorável ao desenvolvimento dessas raízes pela cultivar convencional no tratamento controle

quando comparada com a umidade 2,0 (Tabela 8). Por outro lado, a umidade 2,0, em combinação com as diferentes concentrações do herbicida, não causou prejuízos à cultivar GM (Tabela 9).

**TABELA 6.** Porcentagens de plântulas normais (PNO) e de plântulas anormais (PAN) obtidas para a cultivar CD211, sensível ao glifosato, em função dos três níveis de umidade (2,0; 2,5 e 3,0 vezes o peso do substrato seco) no método de pré-embebição das sementes em substrato umedecido com solução do herbicida em quatro concentrações.

% e. a. <sup>1</sup>	PNO (%)			PAN (%)		
	2,0	2,5	3,0	2,0	2,5	3,0
0,00	88aA <sup>2</sup>	89aA	87aA	11cA	9bA	11bA
0,30	0bA	0bA	0bA	100aA	100aA	96aA
0,60	0bA	0bA	0bA	98abA	96aA	98aA
1,20	0bA	0bA	0bA	94bB	99aA	97aAB
CV	8,57			3,78		

<sup>1</sup> Concentração do equivalente ácido do herbicida utilizado na solução do tratamento.

<sup>2</sup> Médias seguidas de mesma letra (maiúscula na linha e minúscula na coluna) não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

**TABELA 7.** Porcentagens de plântulas normais (PNO) e de plântulas anormais (PAN) obtidas para a cultivar CD219, tolerante ao glifosato, em função dos três níveis de umidade (2,0; 2,5 e 3,0 vezes o peso do substrato seco) no método de pré-embebição das sementes em substrato umedecido com solução do herbicida em quatro concentrações.

% e. a. <sup>1</sup>	PNO (%)			PAN (%)		
	2,0	2,5	3,0	2,0	2,5	3,0
0,00	87aA	90aA	87aA	13aA	9cA	11bA
0,30	90aA	88abA	86aA	10aA	13bcA	13bA
0,60	90aA	77bcB	79aB	9aB	23abA	20bA
1,20	83aA	74cB	66bB	17aB	25aAB	34aA
CV	6,41			31,90		

<sup>1</sup> Concentração do equivalente ácido do herbicida utilizado na solução do tratamento.

<sup>2</sup> Médias seguidas de mesma letra (maiúscula na linha e minúscula na coluna) não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

**TABELA 8.** Porcentagens de plântulas com raízes secundárias (PRS), comprimento médio de plântulas (CME) e porcentagem de plântulas maiores que 15 cm (PMA15) obtidas para a cultivar CD211, sensível ao glifosato, em função dos três níveis de umidade (2,0; 2,5 e 3,0 vezes o peso do substrato seco) no método de pré-embebição das sementes em substrato umedecido com solução do herbicida em quatro concentrações.

% e. a. <sup>1</sup>	PRS (%)			CME (cm)			PMA15 (%)		
	2,0	2,5	3,0	2,0	2,5	3,0	2,0	2,5	3,0
0,00	92aB	95aAB	96aA	14,1aA	14,09aA	14,2aA	89aA	87aA	89aA
0,30	0bA	0bA	0bA	0bA	0bA	0bA	0bA	0bA	0bA
0,60	0bA	0bA	0bA	0bA	0bA	0bA	0bA	0bA	0bA
1,20	0bA	0bA	0bA	0bA	0bA	0bA	0bA	0bA	0bA
CV	6,97			4,94			11,46		

<sup>1</sup> Concentração do equivalente ácido do herbicida utilizado na solução do tratamento.

<sup>2</sup> Médias seguidas de mesma letra (maiúscula na linha e minúscula na coluna) não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

**TABELA 9.** Porcentagens de plântulas com raízes secundárias (PRS), comprimento médio de plântulas (CME) e porcentagem de plântulas maiores que 15 cm (PMA15) obtidas para a cultivar CD219, tolerante ao glifosato, em função dos três níveis de umidade (2,0; 2,5 e 3,0 vezes o peso do substrato seco) no método de pré-embebição das sementes em substrato umedecido com solução do herbicida em quatro concentrações.

% e. a. <sup>1</sup>	PRS (%)			CME (%)			PMA15 (%)		
	2,0	2,5	3,0	2,0	2,5	3,0	2,0	2,5	3,0
0,00	95aA	97aA	95aA	13,9aA	14,2aA	14,7aA	85,5aA	88,4aA	96,6aA
0,30	97aA	96aA	95aA	12,1bA	10,5bB	10,6bB	61,1bA	37,9bB	39,0bB
0,60	95aA	93aA	89aA	8,7cA	6,9cB	7,9cA	14,2cA	2,1cA	4,9cA
1,20	90aA	81bB	78bB	6,6dA	5,6cAB	5,5dB	1,16cA	0,6cA	0cA
Média	91,54			9,81			35,99		
CV	4,05			6,14			21,36		

<sup>1</sup> Concentração do equivalente ácido do herbicida utilizado na solução do tratamento.

<sup>2</sup> Médias seguidas de mesma letra (maiúscula na linha e minúscula na coluna) não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Na ausência do herbicida, as umidades não fizeram diferença para a cultivar convencional em relação ao comprimento médio de plântulas (CME) e porcentagem de plântulas com comprimento superior aos 15 cm (PMA15) (Tabela 8), ao contrário do ocorrido para a cultivar GM, onde os maiores comprimentos nos tratamentos 0,3 e 1,2 % foram encontrados quando utilizada a umidade 2,0 (Tabela 9). De acordo com estes resultados, o aumento na concentração do herbicida reduziu a taxa de plântulas com comprimento superior aos 15 cm, contudo, na concentração 0,3 % do herbicida, ocorreu alta taxa de plântulas maiores que 15 cm na umidade 2,0 (Tabela 9). Funguetto et al. (2004) também observaram que soluções do herbicida, em certas concentrações, reduziram o comprimento total de plântulas da cultivar GM.

Considerando os desempenhos das plântulas de ambas as cultivares, concluiu-se que o melhor protocolo para este bioensaio foi a combinação da concentração 0,3 % do e.a. do herbicida e a umidade 2,0. O excesso do herbicida causou prejuízos ao desenvolvimento das plântulas da cultivar tolerante.

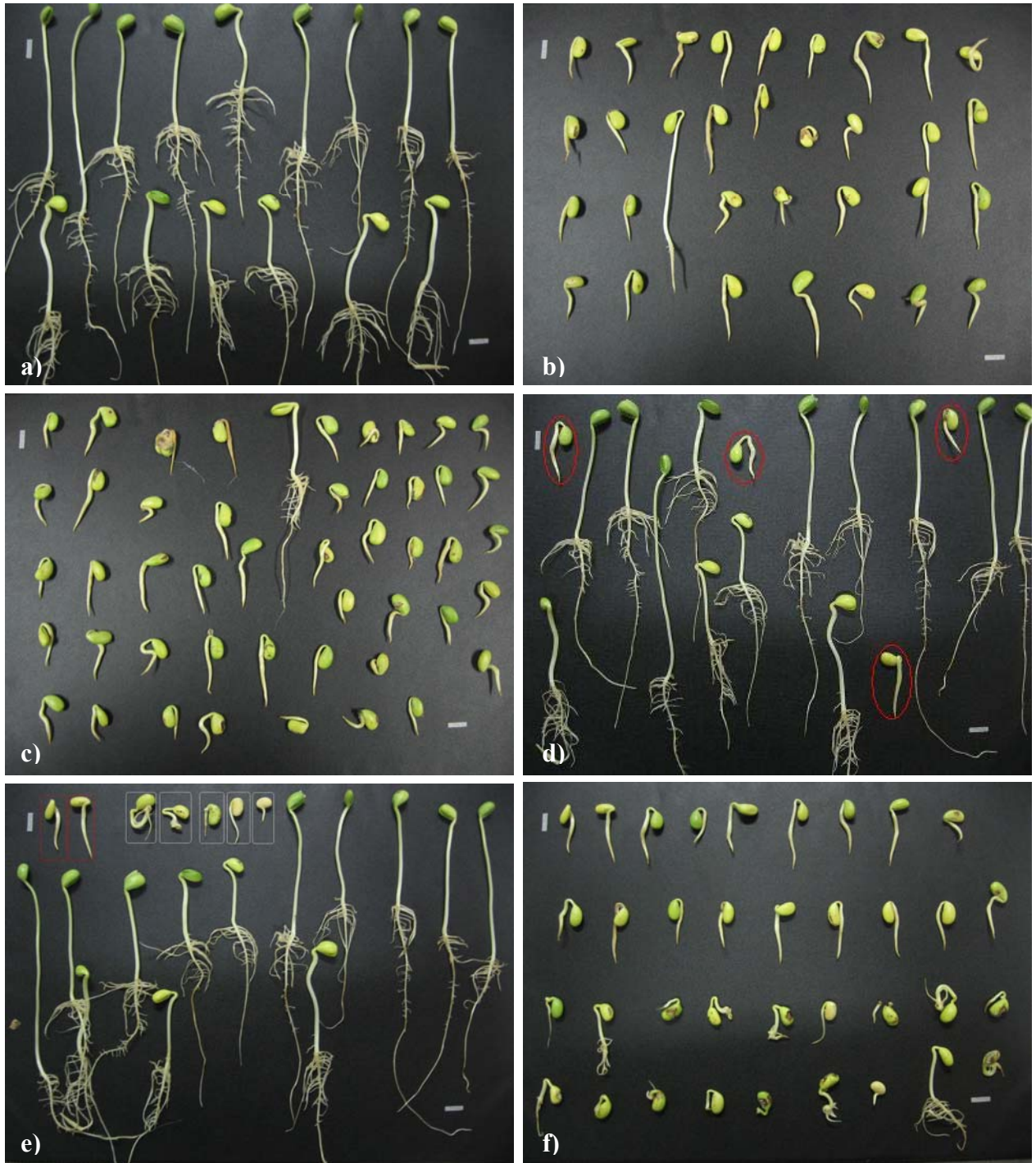
### **Morfologia das plântulas**

Os perfis morfológicos das plântulas tolerantes (Figura 2A) e sensíveis (Figura 2B) ao herbicida foram analisados, sendo os mesmos para ambos os bioensaios. Sob exposição ao glifosato, as plântulas da cultivar GM apresentaram desenvolvimento normal, com a emissão de raiz primária e raízes secundárias, indicando o potencial para formação de plantas (Figura 2C). A explicação é a presença da enzima CP4 EPSPS que possibilita à plântula não sofrer os

efeitos negativos causados pelo herbicida (Kruse et al., 2000). Por outro lado, plântulas da cultivar convencional, sensível ao glifosato, caracterizam-se pela ausência de raízes secundárias e, na maioria das vezes, nem sinal de sua emissão; sua raiz primária apresenta engrossamento relativamente ao seu comprimento (Funguetto et al., 2004), normalmente não passando dos 5 cm (Figura 2D). O glifosato inibe a enzima EPSPS ao se ligar e inativar o complexo intermediário EPSPS-S3P (shiquimato-3-fosfato). Nesta condição, a reação catalítica  $S3P + PEP$  (fosfoenolpiruvato), sob ação da EPSPS, não é realizada, e o composto EPSP não é formado. Como resultado, ocorre o bloqueio na rota metabólica da síntese dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano. O EPSP é também precursor de outros compostos aromáticos importantes como vitaminas (K e E), hormônios (auxina, etileno), alcalóides, lignina, antocianina entre outros produtos secundários (Kruse et al., 2000). É provável que a redução de hormônios de crescimento, como auxina e etileno, tenha afetado o desenvolvimento de raízes de plântulas normais neste estudo.

Uma limitação dos bioensaios para verificação de cultivares quanto à tolerância ao glifosato reside no fato de que o êxito desses testes depende da qualidade dos lotes de sementes (Miranda et al., 2005). Mesmo aqueles com alta qualidade fisiológica geram plântulas anormais. É presumível então, que apareça a dificuldade em distinguir a anormalidade causada pelo herbicida da anormalidade resultante de outras causas. Assim, erros tipo falso-negativo (não percepção da mistura) podem ocorrer numa quantificação de plântulas tolerantes no meio de plântulas sensíveis, enquanto, erros tipo falso-positivo (percepção equivocada de mistura) podem surgir na quantificação de plântulas sensíveis no meio de plântulas tolerantes (Figura 2E). Por isso, buscou-se caracterizar as anormalidades causadas pelo glifosato.

Foi possível notar que anormalidades causadas pelo herbicida são: ausência de raízes secundárias (Goggi and Stahr, 1997; Funguetto et al., 2004; Cunha et al., 2005), redução no comprimento de raiz primária e seu engrossamento (Funguetto et al., 2004), e sinal de paralisação do desenvolvimento (Figura 2F). Anormalidades por outras causas exibem outros padrões como: hipocótilo quebrado, sinais de ataque por insetos, raiz primária retorcida, delgada ou com sua extremidade danificada, sinais de deterioração, e presença de raízes secundárias, mesmo que pouco desenvolvidas (Figura 2F). Sendo assim, a anormalidade das plântulas não pode ser adotada de forma generalizada como padrão para a identificação de sementes convencionais em um bioensaio de detecção de sementes de soja GM, mas sim, faz-se necessária uma análise conjunta dos caracteres morfológicos para posterior conclusão.



**FIGURA 2.** Padrões morfológicos das plântulas de soja. (a) Cultivar de soja tolerante ao glifosato; (b) cultivar de soja sensível ao glifosato; (c) amostra da cultivar convencional contendo uma plântula tolerante ao herbicida; (d) amostra de cultivar de soja tolerante ao glifosato contendo quatro plântulas sensíveis (em destaque); (e) amostra de situação iminente de erro de avaliação. Contornadas em vermelho, plântulas anormais sensíveis ao glifosato; contornadas em branco, plântulas anormais tolerantes; (f) caracterização das plântulas: plântulas sensíveis ao glifosato na metade superior da Figura e de plântulas tolerantes ao herbicida, mas, anormais na parte inferior. A tarja branca indica 1 cm. Viçosa, 2007.

## Quantificação de misturas

Os resultados da avaliação da eficiência dos protocolos na detecção e quantificação de misturas em amostras de sementes convencionais, contendo ou não sementes da cultivar GM, e amostras de sementes da cultivar GM, contendo ou não, sementes da cultivar convencional são apresentados na Tabela 10. Os dados estão apresentados em porcentagem de acertos.

**TABELA 10.** Resultado em porcentagem de acertos da avaliação da eficiência dos métodos Papel Umedecido com Herbicida (PUH) e Pré-Embebição de Sementes (PES) para detecção e quantificação de misturas de sementes geneticamente modificadas (GM) entre sementes convencionais e vice-versa.

Eficiência para detecção de misturas (%)								
Métodos	Sementes convencionais contaminadas				Sementes GM contaminadas			
	0	1	3	5	0	1	3	5
PUH	100	100	100	100	50 (FPs) <sup>2</sup>	100	100	100
PES	100	75 (FN) <sup>3</sup>	100	100	75 (FP)	75 (FN)	100	100
Eficiência para quantificação de misturas (%)								
	0	1	3	5	0	1	3	5
PUH (TE) <sup>1</sup>	–	–	1FP	1FP	3FP	2FP	1FP,1FN	2FP
Acerto (%)	100	100	99,75	99,75	99,25	99,5	99,5	99,5
PES (TE)	–	1FN	1FN	1FN,2FP	1FP	1FP,1FN	–	1FN
Acerto (%)	100	99,75	99,75	99,25	99,75	99,5	100	99,75

<sup>1</sup>TE – Tipo de erro.

<sup>2</sup>FP – Falso positivo, afirmação de presença na ausência.

<sup>3</sup>FN – Falso negativo, afirmação de ausência na presença.

No que se refere à detecção, os melhores resultados foram obtidos na identificação da presença de sementes da cultivar GM, entre sementes da cultivar convencional. No bioensaio papel umedecido com herbicida, o analista obteve 100 % de acertos nas quatro situações: 0, 1, 3 e 5 % de contaminação. No bioensaio pré-embebição, uma parcela contendo 1 % de mistura não foi corretamente avaliada, ocorrendo o erro tipo falso-negativo, ou seja, o analista considerou que não havia mistura. Neste caso, a semente da cultivar GM propositalmente colocada nesta repetição não germinou, e logo, acabou não sendo detectada. Este tipo de erro foi anunciado e também relatado por Miranda et al. (2005).

Na verificação de amostras de sementes da cultivar GM contendo sementes da cultivar convencional, erros dos tipos falso-negativo e falso-positivo ocorreram. Discute-se que ambos surgiram de interpretações equivocadas, porque amostras de sementes de soja GM apresentam plântulas anormais, as quais podem ser confundidas com plântulas anormais de uma cultivar sensível ao glifosato. A experiência do analista em caracterizar as plântulas anormais de cada cultivar dita o êxito do teste. Na Figura 2C, verifica-se uma amostra de plântulas de soja

convencional contendo uma plântula tolerante ao herbicida. Na Figura 2D, é apresentada uma parcela experimental, na qual existem quatro plântulas, em destaque, de cultivar sensível ao herbicida. É notável a praticidade visual em detectar, numa parcela experimental, a presença de plântulas de cultivar tolerante entre plântulas de cultivar sensível (Figuras 2C, 2D).

Na quantificação de misturas, ocorreram 20 erros de interpretação em 6.400 avaliações. Destes, 7 na verificação de sementes de soja GM entre sementes de soja convencional (papel umedecido: 2 erros; pré-embebição: 5 erros). Na verificação de sementes da cultivar sensível entre sementes da cultivar tolerante, ocorreram 13 equívocos (papel umedecido: 9 erros; pré-embebição: 4 erros). Entretanto, estes erros não comprometeram a credibilidade dos bioensaios, visto que foram identificadas corretamente 6.380 plântulas em 6.400 avaliações possíveis, ou seja, uma acurácia de 99,69 % de acerto.

Em acordo com Miranda et al. (2006), notou-se que foi mais fácil e prático detectar a existência de mistura em amostras com maior taxa de contaminação. Isso é coerente, pois, quanto mais sementes de outras cultivares existirem em uma amostra, mais provável é que se encontre pelo menos uma. Também de acordo com Miranda et al. (2006), foi mais difícil quantificar com exatidão as misturas com mais sementes contaminantes. Isso se justifica pelo fato de que quanto maior for a quantidade de sementes de outra cultivar numa amostra, mais provável é que pelo menos uma não seja encontrada.

## CONCLUSÕES

1. Os bioensaios com soluções do herbicida no umedecimento do substrato de germinação ou pré-embebição das sementes apresentam elevado potencial para a detecção e quantificação de misturas entre sementes de soja convencional e geneticamente modificada, e podem constituir em eficientes testes para identificação de cultivares GM tolerantes ao herbicida glifosato na rotina do laboratório de análise de sementes.
2. Em amostras com maior taxa de contaminação é maior a acurácia em detectar e menor em quantificar misturas.
3. Identificar plântulas tolerantes entre plântulas sensíveis ao glifosato é mais prático do que identificar plântulas sensíveis entre plântulas tolerantes, mas, em ambas situações, os bioensaios são eficientes.
4. Os ajustes de umidade do substrato e concentração do herbicida contribuem para o êxito nos estudos de detecção e quantificação de misturas.

## REFERÊNCIAS

BEVILAQUA, G.A.P.; BONATO, E.R.; ROMAN, E.S. Identificação de soja tolerante a glyphosate através do teste de germinação. **Revista Brasileira de Herbicidas**, Brasília, v. 1, n. 3, p. 261-265, 2000.

BERTAGNOLLI, C.M.; TILLMANN, M.A.A.; VILLELA, F.A. Sistema hidropônico com uso de solução de herbicida na detecção de soja geneticamente modificada resistente ao glifosato. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 182-192, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura. 2005. **Instrução Normativa Número 25. Anexo IX: Padrões para produção e comercialização de sementes de soja**. Disponível em: [http://www.apassul.com.br/arquivo/in25\\_novos\\_padroes/anexo9-soja.pdf](http://www.apassul.com.br/arquivo/in25_novos_padroes/anexo9-soja.pdf). Acesso em 20 de março de 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/ DNDV/ CLAV, 1992. 365p.

CUNHA, C.S.M.; TILLMANN, M.A.A.; VILLELA, F.A.; DODE, L.B.; BALERINI, F. Comparação de métodos na detecção de sementes de soja geneticamente modificada resistente ao glifosato. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 167-175, 2005.

CRUZ, C.D. **Programa GENES - versão Windows. Aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV, 2001. 648p.

FUNGUETTO, C.I.; TILLMANN, M.A.A.; VILLELA, F.A.; DODE, L.B. Detecção de sementes de soja geneticamente modificada tolerante ao herbicida glifosato. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 130-138, 2004.

GOGGI, A.S.; STAHR, M.G. Roundup<sup>TM</sup> pre-emergence treatment to determine the presence of the Roundup Ready<sup>TM</sup> gene in soybean seed: A Laboratory Test. **Seed Technology**, United States, v. 19, n. 1, p. 99-102, 1997.

JAMES, C. **Resumo executivo: Situação global das culturas biotecnológicas/GM Comercializadas: 2009**. ISAAA Briefs n.41. ISAAA: Ithaca, NY, 2009.

KLEBA, J.B. Riscos e benefícios de plantas transgênicas resistentes a herbicidas: o caso da soja RR da Monsanto. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 15, n. 1, p. 9-42, 1998.

KRUSE, N.D.; TREZZI, M.M.; VIDAL, R.A. Herbicidas inibidores da EPSPS: Revisão de Literatura. **Revista Brasileira de Herbicidas**, Brasília, v. 1, n. 2, p. 139-146, 2000.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495p.

MARTINS-FILHO, S.; LOPES, J.C.; RANGEL, O.J.P.; TAGLIAFERRE, C. Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja armazenadas em condições de ambiente natural em Alegre-ES. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n.2, p. 201-208, 2001.

MENEZES, S.M.; TILLMANN, M.A.A.; DODE, L.B.; VILLELA, F.A. Detecção de soja geneticamente modificada tolerante ao glifosato por métodos baseados na atividade de enzimas. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 26, n. 2, p. 150-155, 2004.

MIRANDA, D.M.; TILLMANN, M.A.A.; BALERINI, F.; VILLELA, F.A. Bioensaios na detecção e quantificação de sementes de soja geneticamente modificada resistente ao glifosato. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 93-103, 2005.

MIRANDA, D.M.; TILLMANN, M.A.A.; NOLDIN, J.A.; BALERINI, F. Bioensaio em casa-de-vegetação na detecção e quantificação de sementes de soja geneticamente modificada. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 187-192, 2006.

PADGETTE, R.; KOLACZ, K.H.; DELANNAY, X.; RE, D.B.; LAVALLEE, B.J.; TINIUS, C.N.; RHODES, W.K.; OTERO, I.; BARRY, G.F.; KISHORE, G.M. Development, identification and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. **Crop Science**, Madison, v. 35, p. 1451-1461, 1995.

PEREIRA, W.A.; DEL GIÚDICE, M.P.; CARNEIRO, J.E.S.; DIAS, D.C.F.S.; BORÉM, A. Fluxo gênico em soja geneticamente modificada e método para sua detecção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 7, p. 999-1006, 2007.

TILLMANN, M.A.A.; WEST, S. Identification of genetically modified soybean seeds resistant to glyphosate. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 61, n. 3, p. 336-341, 2004.

TORRES, A.C.; NASCIMENTO, W.M.; PAIVA, S.A.V.; ARAGÃO, F.A.S. Bioassay for detection of transgenic soybean seeds tolerant to glyphosate. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 9, p. 1053-1057, 2003.

## Capítulo 2

# IMPLICAÇÕES DO FLUXO GÊNICO EM SOJA SOB A PERSPECTIVA DA GENÉTICA DE POPULAÇÕES

RESUMO – Entre os exemplos da aplicação da engenharia genética no melhoramento de plantas, a soja tolerante ao herbicida glifosato tornou-se uma conquista significativa e sua adoção, em escala mundial, demonstra o quanto os produtores aprovaram a tecnologia. Ainda existe discussão sobre o fluxo gênico envolvendo cultivares geneticamente modificadas e convencionais, em detrimento da preocupação quanto ao comportamento desses organismos na natureza. No Brasil, o principal receio se refere ao escape gênico em campos de produção de sementes. O objetivo deste trabalho consistiu em aplicar os conceitos teóricos da genética de populações no contexto do fluxo gênico em soja, discutindo a possibilidade da persistência do transgene em uma população receptora. A partir da pressuposição de que o fluxo transgênico ocorra, a discussão passa a ser especular sobre a chance desse transgene permanecer na população. Basicamente, a fixação de um alelo qualquer é função de sua relevância para a aptidão do organismo, ou então, de uma ligação a um alelo de elevada importância, situação conhecida por efeito carona. No caso de autógamias, a predição das frequências gênicas e genotípicas para um determinado loco depende das frequências gênicas ( $p$  e  $q$ ) e do coeficiente de endogamia ( $F$ ), que por sua vez, é função da taxa de autofecundação ( $S$ ) na população. As mudanças nas frequências gênicas que se seguem após a migração dependem das frequências iniciais dos alelos em questão nas populações envolvidas e também do tamanho da população. Quanto maior, menos significativos são os efeitos do fluxo gênico sobre o *pool* gênico, o que pode ser compreendido como efeito diluição. É relevante ressaltar que em apenas uma geração de seleção contra um alelo dominante é possível eliminá-lo, o que não se observa contra um alelo recessivo. Geralmente, os transgenes têm caráter dominante, e desta forma, o controle da pureza genética pode ser monitorado.

Palavras-chave: *Glycine max*, OGM, Fluxo gênico, Efeito diluição, Biossegurança.

## GENE FLOW IMPLICATIONS IN SOYBEAN IN THE POPULATION GENETICS PERSPECTIVE

ABSTRACT – Between examples of the application of genetic engineering in plant breeding, the herbicide-tolerant soybean has become a progress significant and its adoption, in global scale, shows how producers have adopted the technology. There is still discussion about the gene flow involving modified genetically and conventional cultivars, because of concern as the behavior of these organisms in nature. In Brazil, the main concern is the gene escape in seeds production fields. The objective of this study was to apply the theoretical concepts of population genetics in the context of gene flow in soybean, discussing the possibility of the transgene persistence in a recipient population. From the assumption that the transgenic flow occurs, the discussion becomes speculate on the chance of transgene remain in the population. Basically, the allele setting is function of its relevance to the fitness of the organism, or else, a link to one allele of high importance, a situation known as free-rider effect. In the case self-pollinated, the gene and genotype frequency prediction for a particular loco depends on gene frequencies ( $p$  and  $q$ ) and endogamic coefficient ( $F$ ), which in turn is a function of the self-pollination rate ( $S$ ) in the population. Changes in gene frequencies that follow after the migration depend on the alleles initial frequencies in the populations involved and also of the population size. If was larger, less significant are the effects of gene flow on the gene pool, which can be understood as the dilution effect. It's important to note that in just one generation of selection against a dominant allele can eliminate it, which is not observed against a recessive allele. Generally, the transgenes are dominant character, and thus, the genetic purity control can be monitored.

Key words: Glycine max, OGM, Gene flow, Dilution effect, Biosafety.

## INTRODUÇÃO

As técnicas moleculares utilizadas na transformação genética consistem, basicamente, na introdução e integração de pequenos fragmentos de DNA isolados e clonados de um organismo doador no genoma de um organismo receptor (Borém e Ramalho, 2002). Assim, define-se como transgênico, ou geneticamente modificado, qualquer organismo que tenha em seu genoma uma ou mais seqüências engenheiradas de DNA, ou seja, manipuladas em laboratório por técnicas do DNA recombinante. A biotecnologia supera a barreira reprodutiva entre espécies diferentes e, junto ao melhoramento convencional, possibilita a combinação genética naturalmente improvável.

Apesar da existência de diversas técnicas seguras e eficientes para a obtenção de organismos geneticamente modificados (OGMs), dos benefícios reconhecidos destes organismos para a produção agrícola e para o homem, e dos diversos estudos realizados por instituições de ensino e pesquisa que garantem a segurança ambiental e nutricional destes produtos, muito se discute sobre os riscos dos transgênicos para a sociedade de um modo geral, incluindo a saúde humana e o meio ambiente.

Entre as preocupações acerca dos OGMs, ambientalistas consideram como uma das principais o fluxo gênico de uma cultivar transgênica para uma cultivar *G. max* convencional (Borém e Ramalho, 2002). Fluxo gênico é o processo de migração de alelos entre populações da mesma espécie, e os seus efeitos sobre o *pool* gênico local dependem do número de indivíduos migrantes e da diferença entre as populações quanto às freqüências alélicas (Falconer and Mackay, 1998). O fluxo gênico que se deseja evitar, ou, fluxo gênico não intencional, é denominado escape gênico. Diz-se da possibilidade de um gene migrar, via polinização cruzada, indesejavelmente para populações onde este gene não existia anteriormente (Benedito e Figueira, 2005). No caso de fluxo gênico envolvendo transgênicos, a população receptora não possui naturalmente um loco para o gene que foi inserido no genoma da variedade transgênica, mas, a genética mendeliana se aplica normalmente, pois o conjunto genômico dos gametas produzidos pelos indivíduos geneticamente modificados

passa a conter o alelo, que por sua vez, fará parte do genoma receptor. Portanto, no caso de um híbrido entre uma população convencional e outra transgênica, ao invés de heterozigotos, seriam encontrados indivíduos hemizigóticos para o *loco* do transgene.

Em termos ecológicos, o fluxo gênico no reino animal se verifica quando indivíduos de uma população migram para o território de uma segunda população e ali geram descendentes. No reino vegetal, como estes seres não dispõem da capacidade de locomoção, o fluxo gênico se dá por meio da polinização cruzada entre populações geograficamente próximas ou por sementes. Proximidade, por sua vez, é uma questão relativa para os vegetais, pois depende do tipo de reprodução da espécie. No caso da soja, predominantemente autógama, a taxa de fecundação cruzada é relativamente baixa, e a partir da distância de 4 metros entre cultivares, a fecundação cruzada se torna rara (Abud et al. 2003, Ray et al. 2003, Pereira et al. 2007). Para o milho, uma alógama, a situação é bem diferente, pois os seus grãos de pólen são dispersos pelo vento e, mesmo à grandes distâncias, ocorre fecundação cruzada.

Enquadram-se como culturas autógamas feijão, soja, trigo, alface, cujas taxas de fecundação cruzada geralmente não ultrapassam 5%. Por outro lado, são classificadas como alógamas, o milho, girassol, eucalipto e cebola, cujas taxas de fecundação cruzada superam os 90%. Existem também espécies cujas taxas de polinização cruzada intermedeiam 5 e 90%, caracterizando as espécies intermediárias (Borém e Ramalho, 2002).

Admitida a ocorrência de fluxo gênico, especificamente em soja, envolvendo uma variedade transgênica e outra convencional, questiona-se sobre quais seriam as conseqüências deste evento para o *pool* gênico da população receptora. É de interesse científico refletir se um transgene traria alguma vantagem à população que o recebeu via escape gênico, tornando-a uma invasora. Crawley et al. (2001) monitoraram por uma década cultivares geneticamente modificadas de canola, milho, beterraba e batata quanto ao seu potencial invasivo e não observaram nenhum caso de crescimento abundante. De fato, embora o tempo de observação seja relativamente ínfimo diante da história evolutiva de uma espécie, esses resultados são indicadores de que plantas cultivadas possuem menor possibilidade de portarem valor adaptativo superior ao de espécies silvestres em ambientes fora do sistema de plantio, principalmente, em locais de elevada competição.

Neste sentido existem pelo menos dois fatores discutíveis sobre os efeitos do fluxo transgênico para o ambiente: o valor adaptativo do transgene em questão para a população que o recebeu e a localização do transgene no genoma receptor. Isto significa que, além da relevância do transgene sobre o metabolismo, fisiologia e bioquímica do organismo receptor,

sua localização no genoma pode também ser determinante para a sua permanência no *pool* gênico, caso seja ligado a um gene/alelo de elevada relevância para a espécie: efeito carona.

O objetivo deste trabalho consistiu em discutir os efeitos do fluxo gênico sobre o *pool* gênico da espécie *G. max* sob a perspectiva da genética de populações, fornecendo uma reflexão sobre possíveis efeitos da transgenia.

## **Soja RR**

O glifosato, herbicida inibidor da enzima EPSPS, é classificado como sistêmico, pós-emergente, não-seletivo, controlando plantas mono e dicotiledôneas anuais e perenes (Kruse et al. 2000), logo, possui alta eficiência no controle de plantas daninhas. No entanto, a sensibilidade de plantas cultivadas a este herbicida limita a sua utilização na pós-emergência da lavoura. Desse contexto, surgiu o desafio de se desenvolver variedades tolerantes ao herbicida, o que facilitaria o manejo de espécies daninhas (Kruse et al. 2000).

Em soja, uma das primeiras aplicações práticas da engenharia genética foi o desenvolvimento do evento (*Glyphosate tolerant soybean*) GTS 40-3-2, que originou a linhagem de soja tolerante ao glifosato (Padgett et al., 1995), obtida a partir da introdução do gene *cp4 epsps* no genoma da planta. Este gene é proveniente de uma cepa bacteriana do gênero *Agrobacterium*, identificada a partir de uma seleção entre microorganismos decompositores deste herbicida no solo. O gene *cp4 epsps* codifica uma enzima (CP4 EPSPS) catalisadora da reação entre os precursores shiquimato-3-fosfato (S3P) e fosfoenolpiruvato (PEP), originando o intermediário químico 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato (EPSP). Nas plantas, o EPSP é fundamental para várias vias biossintéticas vitais, como exemplo, a via de síntese dos aminoácidos aromáticos essenciais fenilalanina, triptofano e tirosina. Compostos secundários como alcalóides, cumarinas, flavonóides, lignina, ácidos benzóicos, vitaminas (K e E) e alguns hormônios (auxina e etileno) também dependem do EPSP (Trezzi et al. 2001).

O princípio da tolerância consiste na elevada afinidade, ainda que na presença do glifosato, da enzima CP4 EPSPS oriunda da *Agrobacterium* para com o fosfoenolpiruvato (PEP) (Kruse et al., 2000). Ao contrário, plantas convencionais expressam a enzima EPSPS, que tem mais afinidade com o glifosato do que com o PEP, o que determina sua sensibilidade natural.

## **Avaliação de riscos**

Antes de progredir neste tópico, é relevante elucidar três termos, perigo, risco e dano. Entende-se por perigo um agente ou uma ação que pode resultar em um dano. Risco é a

probabilidade de um agente causar um dano, por sua vez, resultante da exposição a um perigo. Dano, por fim, é a materialização do perigo. De posse destes conceitos, o tamanho do risco é convencionalmente função do produto entre perigo e exposição. Caso o perigo (ou a exposição) seja nulo, o risco também é nulo. Porém, admite-se que a filosofia do risco nulo é impraticável no mundo atual (Guilherme, 2005). A partir daí, deduz-se que caso o perigo tenha elevado valor, reduzir a exposição deve ser a medida tomada. Por esta razão, avaliar os riscos é o ponto de partida para a elaboração de planos e gerenciamento desses mesmos riscos (Guilherme, 2005).

No caso do risco associado ao cultivo de espécies transgênicas, sua natureza depende das características particulares de cada espécie, do transgene, do ambiente onde se encontra, do manejo e sua aplicação (Benedito e Figueira, 2005). A possibilidade de que um transgene se transfira de uma população geneticamente transformada para uma população silvestre deve ser avaliada e suas principais conseqüências julgadas, quantificadas e discutidas. Como exemplo, o risco da transferência de um transgene da soja para uma população silvestre no Brasil não existe, visto a inexistência de populações silvestres da *G. max* no País. O que poderia causar alguma preocupação seria a transferência de transgenes entre cultivares diferentes em campos de produção de sementes.

A soja apresenta taxa de fecundação cruzada em torno de 1 %, conforme a literatura. Biologia floral e cleistogamia são os principais responsáveis pelo predomínio da autofecundação como processo de reprodução desta espécie (Borém e Miranda, 2005). Consideradas duas populações de soja, a taxa de fecundação cruzada observada entre as mesmas é função de outros fatores, como a distância geográfica entre as cultivares, sincronia de florescimento, presença de insetos polinizadores, condições favoráveis do clima e do ambiente. Inúmeros estudos já foram realizados, em diversos ambientes e condições, nos quais a incidência de fluxo gênico foi estimada para cultivares de soja. Em geral, tal valor situou-se abaixo de 1%.

Para os propósitos deste estudo, deve ser conhecido e estabelecido o fluxo gênico potencial da espécie *G. max*. A partir da pressuposição de que o fluxo transgênico ocorra, mesmo que em baixa frequência, a discussão especula sobre a chance de um determinado alelo permanecer na população. Com base na teoria de genética de populações, a fixação ou a perda de um determinado alelo depende de uma intrincada rede de fatores. O interesse em se conhecer tal contexto se justifica pela possibilidade de serem elucidados os aspectos ecológicos dos transgênicos.

A transferência de um transgene para uma população selvagem poderia modificar o valor adaptativo desta, e assim, a dinâmica natural das populações desta comunidade, configurando riscos diretos e indiretos. Esta seria uma das principais preocupações acerca dos OGMs. Sob o ponto de vista agrícola, questiona-se se por ventura a transferência destes transgenes para populações nativas provocariam o surgimento de plantas invasoras, afetando o equilíbrio natural já estabelecido. Para este fato se concretizar, os indivíduos necessitariam ser competitivos, atingindo um estado de reprodução e fertilidade normal ou superior para espécie em questão (Nodari e Guerra, 2001). Uma vez dentro de populações silvestres, os transgenes poderiam tornar biótipos mais invasivos e, portanto, potencialmente perigosos para a agricultura ou a biodiversidade (Fontes et al., 1996).

Sob ponto de vista genético, a frequência de um determinado alelo aumentaria no *pool* gênico de uma população basicamente por dois motivos: benefício oferecido à sobrevivência e/ou fecundidade dos seus portadores (aumento do valor adaptativo); ligação gênica deste alelo com outro de elevada significância para a população, o que se conhece por efeito carona, evento possível dada a localização imprevisível do transgene durante a transformação gênica.

### **O equilíbrio de Hardy – Weinberg**

O equilíbrio de Hardy e Weinberg é um conceito teórico fundamental para a compreensão da dinâmica dos alelos em uma determinada população, pois é exatamente a desobediência a este equilíbrio o indicador da ocorrência de algum fenômeno biológico (ecológico) significativo para a dinâmica genética das populações. A teoria proposta por Hardy e Weinberg determina que, desde que satisfeitas algumas pressuposições como população numerosa, em panmixia, isenta de mutações, migrações e seleção, a frequência de determinado alelo na população permanece inalterada ao longo das gerações.

Segundo a Lei de Hardy e Weinberg, considerando uma espécie diplóide, e, para certo gene, dois alelos possíveis,  $A$  e  $a$ , de frequências  $p$  e  $q$ , respectivamente, as frequências genotípicas são fornecidas pelas combinações das probabilidades associadas a cada um dos alelos. Se  $f(A) = p$  e  $f(a) = q$ , tem-se, para as frequências genotípicas:

$$P(AA) = p^2; P(Aa) = 2pq; P(aa) = q^2.$$

Para populações naturais, sob as pressuposições supracitadas, o equilíbrio de Hardy e Weinberg possibilita o acompanhamento da dinâmica das frequências gênicas.

Quando uma espécie autógama é analisada, o equilíbrio de Hardy e Weinberg contribui para a base do entendimento da dinâmica gênica, mas, considerações adicionais são

necessárias já que a população se reproduz por autofecundação e a pressuposição de acasalamento ao acaso não é cumprida. Neste caso, faz-se a inclusão de outros conceitos da genética de populações no intuito de relevar o sistema reprodutivo da espécie.

### **Coefficiente de endogamia**

Endogamia é um sistema reprodutivo próprio de várias espécies, pelo qual, acasalamentos entre indivíduos geneticamente relacionados são mais prováveis do que acasalamentos entre indivíduos geneticamente não-relacionados. Por derivação, um indivíduo é tratado como endogâmico quando os seus pais são parentes, e se um indivíduo é endogâmico, os seus pais possuem um ancestral comum.

Coefficiente de endogamia é a probabilidade de dois alelos de um determinado gene, em um indivíduo, serem idênticos por ascendência. É possível demonstrar por meio de algumas deduções que o coeficiente de endogamia ( $F$ ) de um indivíduo é igual ao coeficiente de parentesco ( $r$ ) entre os seus pais.

Sejam considerados dois indivíduos,  $W$  e  $Y$ , e sua descendência,  $Z$ . Sejam ainda, para um determinado loco, as possibilidades de alelos  $A$  e  $B$ , em  $W$ , e, dos alelos  $C$  e  $D$ , em  $Y$ . O coeficiente de parentesco entre  $W$  e  $Y$  é função da probabilidade dos seus alelos ( $A, B, C$  e  $D$ ) serem idênticos por ascendência ( $\equiv$ ). O coeficiente de endogamia de  $Z$  ( $F_Z$ ) é igual ao coeficiente de parentesco entre seus pais [ $r_{(W \times Y)}$ ].

$$\begin{array}{l}
 W_{(A,B)} \times Y_{(C,D)} \qquad r_{(W \times Y)} = \frac{1}{4} [P_{(A \equiv C)} + P_{(A \equiv D)} + P_{(B \equiv C)} + P_{(B \equiv D)}] \\
 \downarrow \\
 \text{Logo, } r_{(W \times Y)} = F_Z \qquad F_Z = \frac{1}{4} [P_{(A \equiv C)} + P_{(A \equiv D)} + P_{(B \equiv C)} + P_{(B \equiv D)}]
 \end{array}$$

Quanto às conseqüências, a endogamia caracteriza-se pelo aumento na freqüência dos genótipos homozigotos e na probabilidade de surgimento de anormalidades condicionadas por alelos deletérios. A endogamia por si não é um fator modificador das freqüências alélicas. Logo, no cumprimento das demais pressuposições da Lei de Hardy e Weinberg, a freqüência de um determinado alelo tende a ser a mesma ao longo das gerações. Entretanto, o equilíbrio de Hardy e Weinberg pode ser restabelecido em apenas uma geração de acasalamentos ao acaso, mesmo após sucessivas gerações de reprodução por autofecundação. É relevante ressaltar, no entanto, que no caso de espécies autógamias, é nula a possibilidade de uma geração de acasalamentos ao acaso.

Teoricamente, caso uma população seja completamente endogâmica, verifica-se apenas indivíduos homozigotos, enquanto que numa população de acasalamento ao acaso valem as expectativas do equilíbrio de Hardy e Weinberg para as freqüências gênicas e

genotípicas. A espécie *G. max* é autógama, mas apresenta alguma taxa de alogamia. Portanto, a previsão das frequências gênicas e genotípicas da próxima geração deve levar em consideração a parcela da população que se reproduz por autofecundação e a parcela da população que se reproduz via acasalamento ao acaso. O coeficiente de endogamia para determinada espécie deve ser calculado tendo como base o tipo de reprodução predominante e a taxa de autofecundação observada.

Para obtenção dos valores da endogamia, devem ser levadas em conta as seguintes considerações. Para a parcela da população que é endogâmica, o  $F$  tem valor 1 (um) na proporção  $S$ ; para a parcela da população não-endogâmica, o  $F$  tem valor 0 (zero) na proporção complementar  $1 - S$ . Assim, o valor de  $F$ , em função da taxa de autofecundação ( $S$ ) de uma espécie autógama, com taxa de alogamia, pode ser obtido a partir da média entre os valores das populações endogâmicas e não-endogâmicas (Tabela 1).

**TABELA 1.** Valores da endogamia e proporções encontradas em populações com sistemas mistos de reprodução, autofecundação e acasalamento ao acaso.

	Autofecundação	Acasalamento ao acaso
$F_t$	$\frac{1}{2} (1 + F_{t-1})$	0
Proporção	$S$	$1 - S$

Em soja,  $F_t = F_{t-1} = F$

Dessa forma, segue o cálculo do valor de  $F$ .

$$F = \frac{1}{2} (1 + F) S + 0 (1 - S) \quad \rightarrow \quad 2 F = S + SF \quad \rightarrow \quad 2 F - SF = S \quad \rightarrow \quad F (2 - S) = S$$

$$F = S / (2 - S)$$

Portanto, o valor de  $F$  é função de  $S$ , valor este atribuído à autofecundação de uma determinada espécie. Se  $S = 0$ , então,  $F = 0$ ; se  $S = 1$ , então,  $F = 1$ . Porém,  $F$  não é sempre igual a  $S$ , como pode ser observado a seguir. Como este trabalho discute o caso da soja, admite-se uma taxa de fecundação cruzada em torno de 1 %. Assim sendo, a autofecundação é estimada em cerca de 99 %. A partir destes valores, é possível obter o valor de  $F$ :

$$F = 0,99 / (2 - 0,99) = 0,9801.$$

### **Estimativa das frequências genotípicas de uma população autógama com determinada taxa de alogamia**

Como já estabelecido por Hardy e Weinberg para as populações em geral, o cálculo das frequências genotípicas são calculadas com base nas probabilidades associadas às frequências dos alelos em questão.

Como pode ser observado na Tabela 2, em uma parcela da população completamente autógama, para um determinado loco com dois alelos,  $A$  e  $a$ , as freqüências possíveis dos genótipos  $AA$ ,  $Aa$ ,  $aa$  são  $p$ ,  $0$  e  $q$ , respectivamente, portanto, não havendo heterozigotos. Na parcela da população, de acasalamento ao acaso, as freqüências genotípicas são  $p^2$ ,  $2pq$  e  $q^2$ , para  $AA$ ,  $Aa$  e  $aa$ , respectivamente. Em uma população autógama, com determinada taxa de alogamia, as freqüências genotípicas são função do valor de  $F$ . Tais freqüências são obtidas a partir da média entre as duas parcelas da população, como pode ser verificado na Tabela 2.

**TABELA 2.** Freqüências genotípicas de populações autógamas, de acasalamento ao acaso e de autogamia parcial, em função do coeficiente de autogamia ( $F$ ), freqüências de  $p$  e  $q$ .

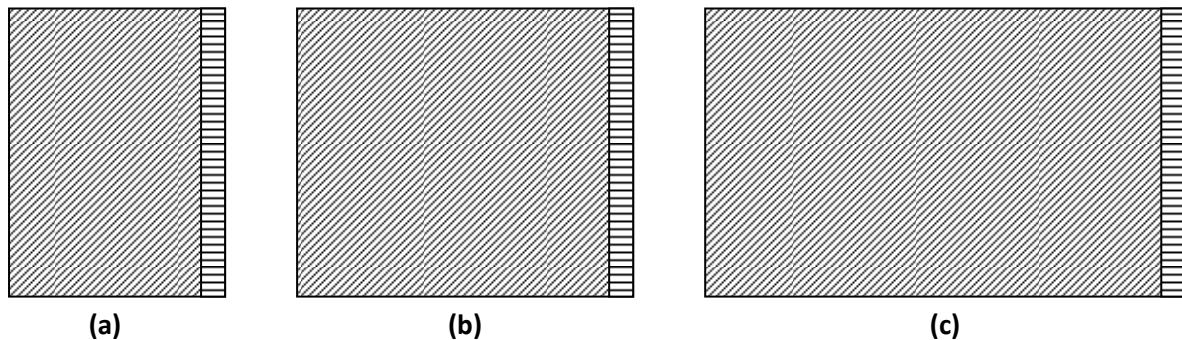
	Autofecundação ( $F$ )	Acasalamento ao acaso ( $1 - F$ )	Freqüências genotípicas	Autogamia < 100%
$AA$	$p$	$p^2$	$pF + p^2(1 - F)$	$p^2 + pqF$
$Aa$	$0$	$2pq$	$0F + 2pq(1 - F)$	$2pq - 2pqF$
$aa$	$q$	$q^2$	$qF + q^2(1 - F)$	$q^2 + pqF$

Para aplicar os conceitos até então apresentados para a espécie *G. max*, é necessário admitir uma taxa de fecundação cruzada, pois assim, seria possível prosseguir com os demais cálculos. Seja admitida a taxa de fecundação cruzada de 1% entre duas cultivares, plantadas lado a lado em campo. Seria esperado um heterozigoto em cada grupo de 100 indivíduos. Porém, há que se considerar que esta taxa não é válida para a população inteira, mas apenas para as fileiras de plantas imediatamente vizinhas. Como observado em vários estudos, a taxa de fecundação cruzada cai significativamente depois de 2m de distância da fonte de pólen vizinha, chegando à nulidade aos 4m de distância.

Como aplicação, seja o plantio de duas cultivares de soja na mesma área agrícola, uma geneticamente modificada, contendo um transgene, e a outra, convencional. Dada a ocorrência de 1% de fecundação cruzada, espera-se 1% de sementes heterozigotas nas fileiras onde se deram polinizações cruzadas. Deste modo, é plausível admitir que a freqüência desse transgene ( $p$ ) na progênie das fileiras de soja consideradas seria de 0,005. Logo, a freqüência para a ausência do alelo  $q$  seria de 0,995.

Considerando que estas reflexões são válidas apenas para algumas fileiras, e não para a população inteira, a amplitude das freqüências torna-se função do tamanho populacional. Caso a população seja muito grande, a porcentagem de híbridos na geração seguinte é irrisória. Como pode ser visualizado na Figura 1, o efeito da fecundação cruzada sobre as freqüências alélicas na situação “a” seria teoricamente mais significativo para as freqüências alélicas da população como um todo do que aquela da situação “c”. É notável que, para a

freqüência do novo alelo na população, haveria nos três casos (*a*, *b* e *c*) indicados na Figura 1, um *efeito de diluição* diferente para cada um. Quanto maior a população, menos significativos seriam os efeitos do fluxo gênico sobre o *pool* gênico da população, considerando que a taxa de fecundação cruzada cai drasticamente com a distância, chegando à nulidade já nos primeiros metros.



**Figura 1.** Esquemas representativos de diferentes situações de campo, onde a faixa de plantas potencialmente fecundadas por uma cultivar diferente, ou seja, híbridas, estão representadas pela área hachurada horizontalmente. O tamanho da população livre de contaminantes está representado pela área hachurada diagonalmente.

Admita-se a ocorrência de fluxo gênico em uma população de soja. Uma vez que as sementes oriundas de fecundação cruzada compõem a população de sementes semeadas na geração seguinte, é importante que se conheça a dinâmica das freqüências gênicas nesta geração, pois a nova pergunta a ser respondida agora é o que vai acontecer com o novo alelo nesta população. Ele se perde ou persiste? Na ausência de seleção, as freqüências genotípicas seguiriam as expectativas embasadas no equilíbrio de Hardy e Weinberg.

As fórmulas para o cálculo das freqüências genotípicas nestas condições, conforme Tabela 2, são:  $P(AA) = p^2 + pqF$ ,  $P(Aa) = 2pq - 2pqF$ , e,  $P(aa) = q^2 + pqF$ . Caso *F* tomasse valor 0, as freqüências genotípicas se distribuiriam como se não houvesse endogamia ( $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ ); por outro lado, caso *F* tomasse valor 1, a taxa de heterozigotos cairia pela metade à cada geração até o seu desaparecimento. Assim, as freqüências genotípicas para a próxima geração das fileiras consideradas, admitindo os valores de *p*, *q* e *F* no parágrafo anterior, seriam:

$$P(AA) = p^2 + pqF \rightarrow 0,005^2 + 0,005 \cdot 0,995 \cdot 0,9802 \rightarrow 0,004901495$$

$$P(Aa) = 2pq - 2pqF \rightarrow 2 \cdot 0,005 \cdot 0,995 - 2 \cdot 0,005 \cdot 0,995 \cdot 0,9802 \rightarrow 0,00019701$$

$$P(aa) = q^2 + pqF \rightarrow 0,995^2 + 0,005 \cdot 0,995 \cdot 0,9802 \rightarrow 0,994901495$$

Na seqüência, admita-se que tal população seja isolada definitivamente da população que lhe possibilitou o primeiro cruzamento, ou seja, que as cultivares não sejam mais plantadas lado a lado e, logo, o fluxo gênico não se repita. Neste caso, existiria uma tendência

para que a taxa de heterozigotos se reduzisse à metade a cada geração, pois a grande maioria dos indivíduos da população se reproduz por autofecundação e a pequena parte resultante de polinização cruzada envolveria genótipos similares. Na  $n$ -ésima geração, desconsiderando seleção e deriva genética, a frequência de heterozigotos seria nula e as frequências de homozigotos  $p^2$  e  $q^2$ , seriam 0,005 e 0,995, respectivamente, ou seja, a frequência inicial do alelo  $p$  e  $q$ , visto que a endogamia não afeta frequências gênicas, mas frequências genotípicas.

Para a ocorrência de fluxo gênico em soja, devem ser admitidas, além da proximidade entre cultivares vizinhas, outras pressuposições, como, sincronia de florescimento e presença de insetos polinizadores. No entanto, para a produção e comercialização de sementes de soja, recomendações do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento devem ser cumpridas. Para tal, vistorias são realizadas por fiscais do MAPA e caso as exigências não sejam satisfeitas e não exista possibilidade de reverter alguma não conformidade, existe a possibilidade do campo de produção ser cancelado. A distância de isolamento recomendada nos padrões para produção e comercialização de sementes é 3,0 metros (Brasil, 2005). Para esta distância, em vários estudos, não foram encontrados casos de fecundação cruzada entre cultivares de soja.

Com segurança estatística, empresas produtoras de sementes manteriam o controle da pureza genética de suas sementes de soja a partir de procedimentos relativamente simples, como, o plantio de cultivares espaçadas 3 a 5 metros entre si, eliminação de duas fileiras da borda da lavoura, o que equivale a 1 metro de espaçamento na lavoura, e, plantio escalonado, no qual seria possível evitar a sincronia no florescimento das cultivares.

### **Efeito diluição**

Diversos autores publicaram seus estudos sobre a taxa de fecundação cruzada apresentando os valores encontrados para as fileiras de plantas investigadas, porém, o efeito concreto em termos de contaminação é função do tamanho total da lavoura, visto que somente as fileiras da borda estariam sujeitas ao fluxo gênico. No intuito de possibilitar uma análise numérica da hibridação natural, é possível disponibilizar estimadores que permitam prever o número de sementes híbridas resultantes da fecundação cruzada, bem como, a taxa de hibridação natural populacional.

Inicialmente, para verificar a taxa de fluxo gênico populacional e, portanto, a porcentagem de indivíduos híbridos na geração seguinte, deve-se utilizar o estimador:

$$FC_G = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \%FC_{Fi}, \text{ em que,}$$

$FC_G$  = Taxa de fecundação cruzada populacional;  
 $\%FC_{Fi}$  = Taxa de fecundação cruzada na fileira  $i$ ; e,  
 $n$  = número de fileiras na lavoura.

Caso seja de interesse estimar a quantidade de sementes híbridas no lote, procede-se:

$$NSH = \sum_{i=1}^n \%FC_{Fi} * CFi * Ei * \bar{Si}, \text{ onde,}$$

$NSH$  = Número de sementes híbridas;  
 $\%FC_{Fi}$  = Taxa de fecundação cruzada na fileira  $i$ ;  
 $CFi$  = Comprimento da fileira  $i$ ;  
 $Ei$  = Estande da fileira  $i$ , ou seja, número médio de plantas por metro;  
 $\bar{Si}$  = Número médio de sementes por planta da fileira  $i$ ;

É consolidada a expectativa de que a taxa de fecundação cruzada entre duas variedades de soja reduz-se bruscamente com a distância, ou seja, quanto maior a distância entre duas cultivares, menos provável é a ocorrência de sementes híbridas (Abud et al., 2003; Ray et al., 2003; Schuster et al., 2007; Pereira et al., 2007). Desta forma, com base nas discussões deste trabalho, é plausível admitir a existência de relação entre extensão da vizinhança entre duas cultivares e o número de sementes híbridas esperado na geração seguinte. Quanto maiores as extensões das fileiras nas lavouras, maior seria a vizinhança entre duas cultivares distintas e, assim, maior seria o número de flores polinizadas em relação à população inteira.

Como ilustração, sejam consideradas duas áreas agrícolas de  $100\text{m}^2$ ,  $A$  e  $B$ , cada qual com duas cultivares diferentes de soja, sendo a primeira área ( $A$ ) formada por 10 fileiras de 10m de comprimento da cultivar 1 e 10 fileiras de 10m de comprimento da cultivar 2, e, a segunda área ( $B$ ) formada por 20 fileiras de 5m de comprimento da cultivar 1 e 20 fileiras de 5m de comprimento da cultivar 2. Admitindo um estande de 14 plantas por metro e um espaçamento entre fileiras de 0,5m, o número esperado de plantas em cada lavoura ( $A$  e  $B$ ) seria 2.800, 1.400 de uma cultivar e 1.400 da outra. O formato geométrico é a diferença marcante entre as duas lavouras: 10 x 10m na primeira ( $A$ ) e 20 x 5m na segunda ( $B$ ).

É primordial frisar que a vizinhança entre as cultivares na área  $A$  seria de 140 plantas ( $14 \text{ plantas m}^{-1} \times 10\text{m}$ ), ou seja, 140 plantas da cultivar 1 estariam a 0,5m de distância de 140 plantas da cultivar 2, enquanto na área  $B$ , o tamanho da vizinhança seria menor, de cerca 70 plantas ( $14 \text{ plantas m}^{-1} \times 5\text{m}$ ).

Considerando uma taxa de fecundação cruzada de 1% a 0,5m de distância nas duas lavouras e substituindo os valores supracitados nos estimadores anunciados no início deste

tópico, seriam esperadas taxas de fecundação cruzada populacionais de 0,1 e 0,05 % para as lavouras A e B, respectivamente, demonstrando que o tamanho da fileira (vizinhança) é um fator crítico para a taxa de fecundação cruzada populacional.

$$\begin{array}{cc} \text{Lavoura A} & \text{Lavoura B} \\ FC_G = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \%FC_{Fi} = \frac{1}{10} (0,01+0+0+0+0) = 0,001 & FC_G = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \%FC_{Fi} = \frac{1}{20} (0,01+0+0+0+0) = 0,0005 \end{array}$$

Admitindo um número médio de 100 sementes por planta e a partir dos valores encontrados, é possível estimar o número de sementes híbridas após a colheita de cada lavoura. O número total de sementes pode ser calculado a partir da utilização do seguinte estimador:

$$\begin{array}{c} \text{Lavoura A} \\ NSH = \sum_{i=1}^n \%FC_{Fi} * CFi * Ei * \overline{Si} = (0,001 * 10 * 14 * 100) + \dots + (0 * 10 * 14 * 100) = 14 \end{array}$$

$$\begin{array}{c} \text{Lavoura B} \\ NSH = \sum_{i=1}^n \%FC_{Fi} * CFi * Ei * \overline{Si} = (0,0005 * 10 * 14 * 100) + \dots + (0 * 10 * 14 * 100) = 7 \end{array}$$

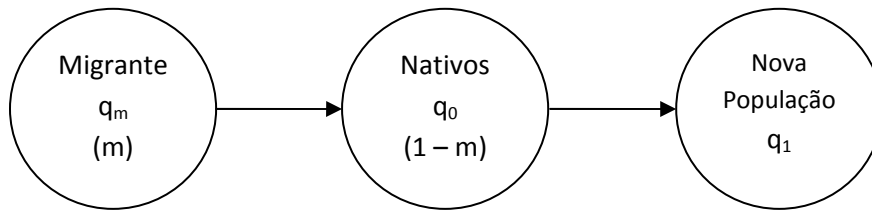
Portanto, apesar de serem as mesmas cultivares em ambas as lavouras e se encontrar a mesma taxa de fecundação cruzada nos ensaios de detecção, os números absolutos de indivíduos híbridos na geração seguinte podem ser diferentes, sendo função do tamanho da vizinhança existente entre as duas cultivares distintas, como pôde ser acompanhado no exemplo apresentado. Enfim, pode-se concluir que, com base no efeito diluição, quanto maior o comprimento da fileira, ou, maior o estande, ou, menor o número de fileiras na lavoura, mais significativo é o fluxo gênico para as freqüências alélicas de uma população.

### **Processos sistemáticos que afetam as freqüências alélicas: Migração**

Para os seus efeitos na genética de populações, migração é o processo pelo qual, indivíduos de uma população migram para os domínios de uma segunda, e ali, participam da formação da próxima geração, deixando descendentes.

A significância da migração para o *pool* gênico de uma determinada população depende do seu tamanho, tamanho do grupo migrante, freqüência alélica na população nativa e freqüência alélica na população migrante. Assim, as freqüências alélicas são alteradas em função da proporção de migrantes a cada geração, proporção de nativos e freqüências alélicas nas populações formadas por migrantes e nativos, o que em outras palavras significa dizer que as novas freqüências alélicas na população são obtidas a partir da média ponderada entre duas

freqüências, a freqüência do alelo na população migrante e na geração anterior da população nativa.



$$q_1 = \frac{q_0(1-m) + q_m(m)}{(1-m) + (m)} = q_0 - mq_0 + mq_m = q_0 - m(q_0 - q_m)$$

$$q_1 = q_0 - m(q_0 - q_m)$$

Logo, a mudança na freqüência alélica em razão da migração depende da diferença de freqüências alélicas entre as populações envolvidas ( $q_0 - q_m$ ) e da proporção de migrantes ( $m$ ). Extrapolando para as gerações seguintes, tem-se que, a variação seria:

$$\begin{array}{lll} \Delta_0 = q_0 - q_m & \Delta_2 = q_2 - q_m & \dots = \dots - \dots \\ \Delta_1 = q_1 - q_m & \Delta_3 = q_3 - q_m & \Delta_n = q_n - q_m \end{array}$$

Para facilitar o trabalho com os efeitos da migração é possível a generalização das fórmulas para obtenção da variação na freqüência gênica numa determinada geração.

$$\begin{array}{lll} \Delta_1 = q_1 - q_m & \Delta_2 = q_2 - q_m & \Delta_3 = q_3 - q_m \\ \Delta_1 = q_0 - m(q_0 - q_m) - q_m & \Delta_2 = (q_1 - q_m)(1-m) & \Delta_3 = (q_2 - q_m)(1-m) \\ \Delta_1 = (q_0 - q_m)(1-m) & \Delta_2 = (q_0 - q_m)(1-m)(1-m) & \Delta_3 = (q_0 - q_m)(1-m)(1-m)(1-m) \end{array}$$

Generalizando,  $\Delta_n = (q_0 - q_m)(1-m)^n$ , ou ainda,  $(1-m)^n = \frac{q_n - q_m}{q_0 - q_m}$ , sendo  $n$  a geração

considerada,  $q_0$  a freqüência do alelo na geração inicial,  $q_m$  a freqüência do alelo na população migrante,  $m$  a proporção de migrantes em cada geração.

Após a descrição teórica dos conceitos envolvidos na migração, é possível aplicá-los numa condição hipotética para duas populações de soja, uma convencional e a outra geneticamente modificada. Sejam consideradas duas cultivares, plantadas lado a lado em campo, cuja taxa de fecundação cruzada seja estabelecida em 1%. Na população convencional, a freqüência do alelo para a tolerância ao herbicida é zero, enquanto na população transgênica é 1. Na Tabela a seguir, os cálculos para 10 gerações sucessivas de cultivo neste mesmo modelo, considerando apenas as fileiras nas quais se observa fecundação cruzada entre cultivares diferentes.

**TABELA 3.** Frequências<sup>1</sup> do alelo *p* durante o período de 10 gerações de condições propícias<sup>2</sup> à polinização cruzada.

Geração	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
f( <i>p</i> )	1	1,99	2,97	3,94	4,90	5,85	6,79	7,72	8,64	9,56

<sup>1</sup>Valores expressos em porcentagem

<sup>2</sup>Cultivares de soja contrastantes em relação aos alelos de um determinado gene cultivadas a menos de 1 metro de distância entre si.

Os valores apresentados na Tabela 3 para a frequência do alelo *p* durante 10 gerações de fluxo gênico indicam um crescimento significativo para o estabelecimento deste alelo na população, contudo, as condições indicadas para esta situação se efetivar são improváveis. Inicialmente, a população não se encontra em acasalamento ao acaso e, depois, as mesmas duas cultivares teriam de ser plantadas lado a lado todas as 10 gerações, com florescimento sincronizado. Deste modo, o que foi apresentado na Tabela 3 não se aplicaria para a soja.

### **Processos sistemáticos que afetam as frequências alélicas: Seleção**

Antes de definir seleção, é relevante introduzir alguns conceitos para a compreensão dos efeitos deste processo sobre o *pool* gênico de uma população. A evolução, no seu sentido mais amplo, significa mudança, de modo que é possível notar a evolução em diferentes setores da sociedade e ecossistema. A habilidade de um microrganismo lidar com um hospedeiro evolui, assim como, o comportamento entre predador e presa, a anatomia, a fisiologia, a bioquímica, entre tantos outros fenômenos biológicos evoluem.

Citar sociedade e biologia como exemplos de processos que evoluem, é bastante esclarecedor. Idéias de um economista serviram de inspiração para a elaboração do conceito base da evolução, a seleção natural. Thomas Malthus, economista britânico, certa vez, publicou suas observações em um ensaio sobre populações onde relatava que o crescimento da população humana era uma tendência restringida pelas limitações naturais. Segundo Malthus, as restrições faziam parte da existência humana e normalmente penderiam para o lado dos mais fracos de uma sociedade. A partir da idéia central do ensaio de Malthus, Charles Darwin extrapolaria que o mesmo poderia ser notado na natureza. Segundo este princípio, Darwin relatou que a progênie deixada por cada espécie em uma determinada geração era muito maior do que a capacidade suporte do meio ambiente. Com isso, somente os indivíduos mais aptos conseguiriam chegar à maturidade efetiva e deixar descendentes. Como se sabe, para cada espécie, existe variabilidade genética, e assim sendo, numa população diversa, habitando um determinado ambiente, existem aqueles indivíduos mais

aptos que deixam mais descendentes que os demais, de modo que na próxima geração alguns tipos<sup>5</sup> tornam-se mais representados na população.

Em termos genéticos, o resultado esperado da seleção é que genótipos com maior valor adaptativo deixam, em média, mais descendentes do que os menos adaptados. A seleção, como definida, só se verifica na existência de genótipos com diferentes valores adaptativos, pois, caso todos os indivíduos tenham a mesma probabilidade de deixar descendentes e contribuir para a formação da geração seguinte, as frequências gênicas não mudam.

Para demonstrar como obter valores de  $s$  (coeficiente de seleção) em situações concretas, sejam consideradas as situações a seguir e analisados os valores de  $s$  em cada caso.

**TABELA 4.** Considerações realizadas a respeito da hemofilia na espécie humana.

	Nascimentos	Reprodução	Descendência	Criança/pai
Hemofílicos	100	40	70	1,75
Normais	100	96	240	2,50
Valor adaptativo	1 e 1	0,42 e 1	0,29 e 1	0,7 e 1
Valor de $s$	0	0,58	0,71	0,3

Na Tabela 4, verifica-se claramente que indivíduos normais superam os hemofílicos na formação do *pool* gênico da geração seguinte. Com isso, a frequência do alelo favorável sobe e a frequência do alelo desfavorável cai em função de  $s$ . É importante observar que o referencial adotado interfere no valor de  $s$  (reprodução, descendência e criança/pai).

Outro fator importante no tópico da seleção é a relação entre o tipo de seleção e o tipo de interação entre os alelos de determinado gene. A partir das propriedades existentes em cada grau de dominância com relação ao valor adaptativo, é possível distribuir os efeitos do coeficiente de seleção (Tabela 5). A partir dos valores atribuídos e relação dos mesmos com as frequências gênicas é possível descobrir a frequência do alelo em questão depois de uma geração de seleção, desde que estabelecida a intensidade de seleção aplicada. A mudança na frequência gênica é simples de ser obtida, bastando para isso a análise da diferença entre a frequência  $q$  e  $q_1$ . Dada a intensidade de seleção  $s$  e o valor de  $q$  atual, é possível calcular o número de gerações necessárias para o valor de  $q$  atingir um valor esperado  $q_t$ . A seguir, a Tabela 6 contém as fórmulas utilizadas para a obtenção dos referidos valores.

<sup>5</sup> Tipo: Termo utilizado para representar a progênie dos indivíduos mais aptos da geração anterior, teoricamente, portando as características, logo, os alelos favorecidos no ambiente em questão.

**TABELA 5.** Distribuição dos valores adaptativos e coeficientes de seleção nos diferentes tipos interações entre alelos.

Interação alélica	A <sub>1</sub> A <sub>1</sub>	A <sub>1</sub> A <sub>2</sub>	A <sub>2</sub> A <sub>2</sub>	Tipo de relação
Dominância completa	1	1	1 - s	Seleção contra o recessivo
	1	1 - s	1 - s	Recessivo letal
	1 - s	1 - s	1	Seleção contra o dominante
Ausência de dominância	1	(1 - s)/2	1 - s	Ausência de dominância
Sobredominância	1 - s	1	1 - t	Vantagem do heterozigoto
Dominância parcial	1	1 - t	1 - s	Desvantagem do heterozigoto

As incógnitas  $s$  e  $t$  representam os coeficientes de seleção

**TABELA 6.** Tipo de seleção e sua relação com a frequência alélica, variação da frequência alélica, variação máxima e efeitos sob gerações.

Seleção	$q_t$	$\Delta_q$	$\Delta_{q(\text{Max})}$	$T$
Parc. contra recessivo	$\frac{q(1-sq)}{1-sq^2}$	$q_1 - q$	$\frac{-sq^2(1-q)}{1-sq^2}$	$\frac{1}{s} \left[ \frac{q_0 - q_t}{q_0 q_t} + Ln \frac{q_0(1-q_t)}{q_t(1-q_0)} \right]$
Tot. contra recessivo	$q_{t+1} = \frac{-qt}{1+q_t}$	$\frac{-q^2}{1+q}$	-	$\frac{q - q_t}{qq_t} = \frac{1}{q_t} - \frac{1}{q}$
Ausência de dominância	-	$\frac{-1/2qs(1-q)}{1-sq}$	-	$\frac{2}{s} \left[ Ln \frac{q_0(1-q_t)}{q_t(1-q_0)} \right]$
Contra um dominante	$\frac{q(1-s)}{1-sq(2-q)}$	$\frac{-sq(1-q)^2}{1-s(1-p^2)}$	-	-

<sup>1</sup> $q_t$ :  $f(q)$  após a seleção;  $\Delta_q$  – mudança na frequência gênica com uma geração de seleção;  $\Delta_{q(\text{Max})}$  – valor máximo de  $\Delta_q$ ;  $t$  – número de gerações para uma mudança específica.

Considerando os demais graus de dominância, existem outros modelos para o cálculo dos efeitos da seleção. No entanto, as informações disponíveis na Tabela 6 são suficientes para exemplificar a possibilidade de predições, bem como para os propósitos deste estudo.

Seja citado como exemplo o alelo para tolerância ao herbicida glifosato, o qual é dominante sobre sua contrapartida, sensível a este herbicida. Na verdade, uma determinada planta possui ou não o gene em questão, ou seja, não existe um loco específico para o gene *epsps cp4* oriundo da bactéria *Agrobacterium tumefaciens*. Assim, considerando o poder de seleção contra um alelo dominante (Tabela 6), é necessária apenas uma geração para que ele seja eliminado da população, como se pode verificar na solução da equação a seguir ( $S = 1$ ).

$$\frac{-sq(1-q)^2}{1-s(1-p^2)} = \frac{-q(1-q)^2}{1-(1-p^2)} = \frac{-q(1-2q+q^2)}{1-1+1-2q+q^2} = -q$$

Notar que a seleção completa contra um alelo dominante o elimina em apenas uma geração de seleção é relevante sob o ponto de vista do melhoramento genético, principalmente se tratando de manutenção da pureza genética de uma variedade. Eliminar um alelo dominante para a cor da flor, por exemplo, pode ser facilmente imaginado, considerando que

é relativamente prático visualizar a flor roxa em campo e eliminá-la da população. Entretanto, no caso da tolerância ao herbicida, a planta portadora do alelo dominante é morfológicamente idêntica àquela que não o possui. Desta forma, eliminar a tolerância ao herbicida de uma população é um processo mais complexo do que eliminar uma planta de flor roxa de uma população de plantas com flores brancas.

Dito isto, seria um recurso prático o desenvolvimento de tecnologias que possibilitassem em campo a identificação, seguida de eliminação, de indivíduos portadores de determinadas características, o que permitiria o controle da pureza genética de uma cultivar.

### **Processos sistemáticos que afetam as frequências alélicas: Mutação**

A mutação é um fenômeno genético caracterizado pela súbita alteração no material genético. Dependendo da célula onde ocorra, pode ser herdável. Existem vários níveis de mutações, como, modificação de uma única base, perda ou inclusão de várias bases, perda de parte do cromossomo, de cromossomos inteiros e até mesmo de um conjunto de cromossomos. Causas dessas aberrações são erros no processo da replicação do DNA, quebras físicas de cromossomos, falhas na disjunção cromossômica durante a divisão celular, entre outras.

Quanto aos seus efeitos, a mutação pode ser neutra, favorável ou desfavorável, sendo esta última a mais provável, pois, o material genético de um indivíduo é resultado da história evolutiva de uma espécie. Dessa forma, é plausível admitir que mudanças na estrutura de um gene têm mais chances de serem danosas do que benéficas.

O conceito da mutação não possui relação direta com o que ocorre no fluxo gênico entre uma lavoura de soja geneticamente modificada e uma convencional, mesmo porque, de fato, o que ocorre neste último caso é a migração de um novo alelo de uma população para outra. Contudo, o fluxo gênico pode ser um processo único, resultado do plantio de duas lavouras próximas (transgênica e convencional) em determinada safra. Assim, a modificação súbita no genoma de algumas plantas em potencial (oosfera convencional fecundada por um grão de pólen contendo o transgene), poderia ser interpretada como uma forma de mutação, ao se tratar do surgimento de um gene a mais no genoma. A maioria das mutações têm como resultado a produção de polipeptídeos truncados ou sem função. Ao contrário, o fluxo gênico traz uma proteína funcional, o que não deixa de ser de forma abrupta.

Como conseqüências disto, conceitos aplicados à compreensão dos efeitos da mutação sobre o *pool* gênico de uma população poderiam ser utilizados na interpretação de casos de fluxo gênico entre uma população de soja convencional e uma transgênica. Existe

similaridade entre os processos fluxo gênico e mutação no que se refere à mudança ou introdução de um alelo diferente no *pool* gênico da população.

De acordo com Fisher (1930), a probabilidade de extinção de um alelo mutante da população, considerando que ele não forneça nenhuma vantagem seletiva ao seu portador, aumenta com o número de gerações, superando 98 % de chance em 127 gerações. Só existe alguma chance de sobrevivência para o alelo caso o mesmo propicie alguma vantagem ao seu portador. Por exemplo, o alelo para a tolerância ao herbicida só fornece vantagem ao seu portador na presença do herbicida glifosato. Na prática, um sojicultor somente aplicaria herbicida glifosato em uma lavoura cuja cultivar fosse tolerante a este herbicida. Assim, se por ventura houver um fluxo gênico entre uma cultivar tolerante e outra sensível ao herbicida, as plantas tolerantes ao glifosato não teriam, teoricamente, nenhuma vantagem sobre as demais sensíveis, visto que o produtor não aplicaria glifosato na lavoura, que é considerada sensível a este herbicida.

A outra forma de manutenção deste alelo seria totalmente atribuída ao acaso, pois a introdução de um novo gene em uma espécie não é previsível quanto a localização deste gene no genoma, logo, ele poderia ser ligado a um gene altamente relevante à espécie e que lhe trouxesse alguma vantagem diante de suas formas alélicas alternativas. Neste caso, muito possivelmente o desaparecimento do transgene do *pool* gênico da população seria menos provável. Contudo, dado o fato do transgene chegar à população não trazendo vantagem seletiva aos indivíduos que o possui, a expectativa é de que o mesmo seria perdido do *pool* gênico da população convencional ao longo das gerações.

## CONCLUSÕES

1. A preocupação diante dos organismos geneticamente modificados deve ser específica para cada caso e espécie.
2. Taxa de autofecundação ( $S$ ) e coeficiente de endogamia ( $F$ ) são utilizados para a predição de frequências gênicas e genotípicas em espécies autógamas.
3. O efeito diluição mostra que a taxa de fecundação cruzada para espécies autógamas pode se apresentar significativa se for relevado o tamanho total da população.
4. Um alelo dominante pode, por seleção artificial negativa, ser eliminado de uma população em apenas uma geração de seleção.
5. A persistência de um alelo na população é função da aptidão que fornece ao seu portador ou da sua proximidade com algum alelo de elevada relevância para a espécie.

## REFERÊNCIAS

- ABUD, S.; SOUZA, I.M.; MOREIRA, C.T.; ANDRADE, S.R.M.; ULBRICH, A.V.; VIANNA, G.R.; RECH, E.L.; ARAGÃO, F.J.L. Dispersão de pólen em soja transgênica na região Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 10: 1229 – 1235. 2003.
- BENEDITO, V.A.; FIGUEIRA, A.V.O. Risco e segurança ambiental: Efeitos potenciais da introdução de plantas transgênicas. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**. 34: 56 – 64. 2005.
- BORÉM, A.; RAMALHO, M.A.P. Escape gênico e impacto ambiental: O caso do milho Brasil. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**. 28: 44 – 47. 2002.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. **Melhoramento de Plantas** (5. Ed) Viçosa: UFV, 2009. 529 p.: il. 2009.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2005. **Instrução Normativa Número 25, Padrão para produção e comercialização de sementes de arroz**. Disponível em: [www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br). Acesso em: 31 de maio 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2005. **Instrução Normativa Número 25. Anexo IX: Padrões para produção e comercialização de sementes de soja**. Disponível em: [www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br). Acesso em 20 de março de 2010.
- CRAWLEY, M.J.; BROWN, S.L.; HAILS, R.S.; KOHN, D.D.; REES, M. Transgenic crop in natural habitats. **Nature**, v.409, p.682-683, 2001.
- FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introduction to quantitative genetics**. 4 ed. Edinburgh: Longman Group. 464 p. 1998.
- FISHER, R.A. **The genetical theory of natural selection**. Oxford: Clarendon Press. 1930.
- FONTES, E.G.; SANTOS, I.K.S.M.; GAMA, M.I.C. A biossegurança de plantas cultivadas transgênicas. In. Teixeira P, Valle S (Org.). **Biossegurança. Uma abordagem multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Fiocruz, p. 313 – 327. 1996.
- GUILHERME, L.R.G. Fundamentos da análise de risco. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**. 34: 44 – 55. 2005.
- KRUSE, N.D.; TREZZI, M.M.; VIDAL, R.A. Herbicidas inibidores da EPSPS: Revisão de Literatura. **Revista Brasileira de Herbicidas**, 1: 139 – 146. 2000.

LUNA, V.; et al. (2001) Maize pollen longevity and distance isolation requirements for effective pollen control. **Crop Science**, 41: 1551 – 1557. 2001.

NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Avaliação de riscos ambientais de plantas transgênicas. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**. 18: 81 – 116. 2001.

PADGETTE, R.; KOLACZ, K.H.; DELANNAY, X.; RE, D.B.; LAVALÉE, B.J.; TINIUS, C.N.; RHODES, W.K.; OTERO, Y.I.; BARRY, G.F.; EICHHOLTZ, D.A.; PESCHKE, V.M.; NIDA, D.L.; TAYLOR, N.B.; KISHORE, G.M. Development, identification and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. **Crop Science**, 35: 1451 – 1461. 1995.

PEREIRA, W.A.; DEL GIÚDICE, M.P.; CARNEIRO, J.E.S.; DIAS, D.C.F.S.; BORÉM, A. Fluxo gênico em soja geneticamente modificada e método para sua detecção, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 42: 999 – 1006. 2007.

RAY, J.D.; KILEN, T.C.; ABEL, C.A.; PARIS, R.L. Soybean natural cross-pollination rates under field conditions. **Environmental Biosafety Research**, 2:133 – 138. 2003.

TREZZI, M.M.; KRUSE, N.D.; VIDAL, R.A. Inibidores de EPSPS. In: Vidal RA, Merotto Jr A (Eds.). **Herbicidologia**, Porto Alegre, p.37-45. 2001.

VERNETTI, F.J.; BONATO, E.R.; TERESAWA, F.; GATAL, M.F.C. Observações sobre a taxa de cruzamentos naturais em soja, em Pelotas e Sertão, RS e Ponta Grossa, PR. **Ciência e Cultura**, 24: 36 – 41. 1972.

### Capítulo 3

## FLUXO GÊNICO RECÍPROCO ENTRE CULTIVARES DE SOJA CONVENCIONAL E GENETICAMENTE MODIFICADA

RESUMO – O objetivo deste trabalho consistiu em verificar o fluxo gênico recíproco entre duas cultivares de soja, uma geneticamente modificada (GM) tolerante ao herbicida glifosato e a outra convencional. Para tal, duas populações foram cultivadas lado a lado na safra 2007/2008. O experimento foi composto de quatro blocos de 40 fileiras (5,0m) de soja, 20 da cultivar CD219 (GM) e 20 da cultivar CD217, espaçadas 0,5m entre si. No estádio R8 de cada cultivar, 5 fileiras foram colhidas, trilhadas e as sementes armazenadas em câmara fria. As fileiras colhidas, correspondentes às distâncias de 0,5, 1,0, 2,0, 4,0 e 8,0m da cultivar vizinha. As sementes obtidas foram analisadas quanto à ocorrência ou não do fluxo gênico. Como características marcadoras do cruzamento foram utilizadas as cores da flor, do hipocótilo, da pubescência e a tolerância ao herbicida glifosato. Considerando que as cultivares são contrastantes para as características analisadas e que as mesmas são condicionadas por um gene com dois alelos cada, cuja interação alélica é de dominância completa, o híbrido apresentaria, com base nos ensaios realizados, as evidências da ocorrência do fluxo gênico recíproco entre as cultivares. Para esta investigação, foram utilizados quatro métodos de detecção, dois para verificar o fluxo gênico no sentido CD217 para CD219 e dois para o sentido oposto, CD219 para CD217. A cor roxa da flor e do hipocótilo, a cor preta do hilo e a cor marrom da pubescência são características descritoras da cultivar CD217, dominantes sobre aquelas encontradas na cultivar CD219. Logo, na progênie desta última, deveriam ser encontrados indivíduos com tais caracteres para caracterizar a condição híbrida, pois, do contrário, seria caso de autofecundação. Do mesmo modo, a tolerância ao herbicida glifosato, caso da cultivar CD219, é dominante sobre sua alternativa sensibilidade, apresentada pela cultivar CD217. Assim, o híbrido encontrado na progênie da cultivar CD217 apresenta tolerância ao herbicida. As maiores taxas de fluxo gênico encontradas, da cultivar CD217 para CD219, foram de 0,13 e 0,27%, enquanto da cultivar CD219 para CD217 foram de 0,83 e 0,61%, para 0,5m entre cultivares. Aplicando a teoria do efeito diluição, as taxas de hibridação natural populacional cairiam para 0,052, 0,104, 0,388 e 0,216 %, respectivamente.

Palavras-chave: *Glycine max*, transgênicos, fluxo gênico, taxa de alogamia, biossegurança.

## RECIPROCAL GENE FLOW AMONG MODIFIED GENETICALLY AND CONVENTIONAL CULTIVARS SOYBEAN

**ABSTRACT** – The objective of this work was to verify the reciprocal gene flow between two soybean cultivars, one genetically modified (GM) glyphosate-tolerant and one conventional. For this, two populations were grown side by side in the 2007/2008 harvest. The experiment was composed of four blocks of 40 rows (5,0 m) of soybean, 20 CD219 (GM) cultivar CD219 and 20 CD217 cultivar, spaced 0,5 m apart. At the R8 stage of each cultivar, 5 rows were harvested, threshed and the seeds stored in cold chamber. Rows harvested, corresponding to distances 0,5, 1,0, 2,0, 4,0 and 8,0 m from the farm next door. The seeds obtained were analyzed for the presence or absence of gene flow. The cross marker characteristics used were the flower, hypocotyl, and pubescence colors and the herbicide-tolerant. Considering that, cultivars are contrasting to analyzed features, they are conditioned by one gene with two alleles each, and the allelic interaction is complete dominance, the hybrid should shows, based on tests carried out, evidence of the occurrence of reciprocal gene flow among cultivars. For this investigation, we used four methods of detection, two to verify the gene flow in the direction CD217 to CD219 and two in the opposite direction, CD219 to CD217. The flower and hypocotyl purple color, the hilo black color and the pubescence brown color are characteristics of the cultivar CD217, dominant over those found in the cultivar CD219. Therefore, in the progeny of the latter, should be found organisms with this characteristics to show the hybrid condition, because otherwise it would be a self-pollination case. Similarly, the glyphosate herbicide-tolerance, typical for cultivar CD219, is dominant over their alternative sensitivity, presented by the cultivar CD217. Thus, the hybrid found in the progeny of the CD217 cultivar is herbicide-tolerant. The highest gene flow rates found, direction CD217 to CD219, were 0,13 and 0,27%, while in the direction CD219 to CD217 were 0,83 and 0,61%, to 0.5 m distance between cultivars. Applying the dilution effect theory, populational out-crossing rates would drop to 0,052, 0,104, 0,388 and 0,216%, respectively.

**Key words:** *Glycine max*, transgenics, gene flow, allogamy rate, biosafety.

## INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max*) é uma espécie autógama e manifesta o fenômeno biológico conhecido como cleistogamia, no qual a polinização ocorre antes da antese. Na prática, quando as flores encontram-se abertas o processo de autofecundação já ocorreu. No período noturno, anterior à abertura floral, as anteras liberam os grãos de pólen que caem no estigma da mesma flor (Carlson & Lersten, 2004). Deste modo, seria plausível esperar que não houvesse casos de fecundação cruzada, mas, alguns insetos são visitantes das flores da soja e a fecundação cruzada se verifica.

Apesar da taxa de hibridação natural em autógamias ser pequena relativamente às alógamas, o risco de escape gênico tem chamado a atenção de ambientalistas no que se refere à possibilidade de plantas, principalmente daquelas cujo genoma é geneticamente modificado (GM), chegarem a áreas de preservação, reservas ecológicas ou parques, e neste ambiente se tornarem invasoras (Schuster et al., 2007). Todavia, pesquisas de observação e monitoramento de plantas GM no ambiente (canola, milho, beterraba e batata) demonstraram que é improvável que este risco se concretize, visto que é reduzido o vigor de plantas domesticadas em um ambiente competitivo (Crawley et al., 2001).

Existe também a preocupação de que os genes inseridos em algumas cultivares de soja sejam transferidos para espécies silvestres e tragam desequilíbrios ecológicos, o que no caso de países como o Brasil, não constitui um risco real, dada a inexistência de parentes silvestres de *Glycine max* no País (Borém & Miranda, 2009). Por outro lado, o receio de que algum transgene seja transferido entre cultivares distintas em campos de produção de sementes merece atenção. A legislação para produção e comercialização de sementes abrange normas que orientam os procedimentos básicos necessários à manutenção da pureza genética das sementes produzidas em um campo de produção de sementes (Brasil, 2005). No advento e expansão da adoção dos cultivares GM, pesquisas são necessárias para nortear os órgãos fiscalizadores e certificadores, responsáveis pelo estabelecimento e regulamentação de tratamentos culturais adequados à manutenção da pureza genética das cultivares produzidas.

Com a finalidade de se conhecer a taxa de fluxo gênico em soja no Brasil, pesquisas têm sido feitas desde o final da década de 50 (Miyasaka, 1958; Sedyama et al., 1970; Verneti et al., 1972). Recentemente, novos estudos foram realizados, considerando a chegada das cultivares de soja GM (Abud et al., 2003, Schuster et al., 2007; Pereira et al., 2007). Em todos estes estudos, a taxa de fecundação cruzada ficou em torno de 1,0 %, demonstrando que o fato da cultivar ser transgênica não altera a expectativa já existente para o fluxo gênico em soja convencional (Pereira et al., 2007). O interesse na investigação da taxa de fecundação cruzada não se limita em conhecer o risco de um escape gênico da cultivar GM para uma convencional ou espécie silvestre. Entre os produtores de sementes para comercialização, o receio é de que o seu material perca a pureza genética, ou seja, de que ocorra fecundação cruzada em qualquer sentido, seja da cultivar GM para uma convencional ou de uma cultivar convencional para uma GM.

Desta forma, torna-se relevante investigar a taxa de fecundação cruzada recíproca entre uma cultivar GM e uma convencional. Existem autores que defenderam a idéia de que a quantidade de plantas híbridas encontradas em uma subpopulação fosse duplicada como estimativa da quantidade de plantas híbridas na população total (Culter, 1934; Caviness, 1966; Boerma & Moradshahi, 1975). Isto significaria admitir que as taxas de hibridação natural seriam as mesmas em ambos os sentidos, logo, que a mesma quantidade de pólen que migraria em uma direção, o faria na direção oposta. Entretanto, considerando que a taxa de fecundação cruzada é influenciada por vários fatores, entre eles, o próprio cultivar (Culter, 1934; Rubis, 1970; Beard & Knowles, 1971; Ahrent & Caviness, 1994), o local (Sedyama et al., 1970; Beard & Knowles, 1971), o ano (Caviness, 1966), distância entre as plantas (Caviness, 1966; Ahrent & Caviness, 1994) e até mesmo o manejo de pragas com inseticidas (Abud et al., 2003), não parece ser plenamente correta essa admissão.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar o fluxo gênico recíproco entre uma variedade de soja geneticamente modificada e uma convencional, estimado pela taxa de híbridos encontrados nas duas variedades.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material genético

Para estudo do fluxo gênico recíproco entre duas populações de soja, foram escolhidas duas cultivares cujas características satisfizessem alguns pré-requisitos. Priorizou-se que as cultivares apresentassem características contrastantes, as quais seriam utilizadas como marcadoras fenotípicas dos genótipos, e ainda, que seu controle genético fosse classificado como de dominância completa ( $F_2$ : 3:1). Adicionalmente, cada cultivar manifestaria, em pelo menos um caráter, a condição dominante sobre a alternativa encontrada na outra cultivar. Os descritores utilizados estão listados na Tabela 1.

**TABELA 1.** Características descritoras das cultivares CD217 e CD219 relevantes para o experimento.

Característica	Cultivares	
	CD217	CD219
Ciclo total (média em dias)	116 (MG)	122 (MG)
Ciclo vegetativo (média em dias)	54 (MG)	51 (MG)
Cor da flor	Roxa *	Branca
Cor do hipocótilo	Roxa *	Verde
Cor da pubescência	Marrom *	Cinza
Cor do hilo	Preta *	Marrom clara
Altura média de planta (cm)	71	78
Hábito de crescimento	Determinado	Determinado
Tolerância ao herbicida	Sensível	Tolerante *

\* Característica monogênica dominante utilizada como marcador

Fonte: COODETEC, 2005ab.

As cultivares selecionadas foram concedidas para a realização deste estudo pela Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola, COODETEC. Analisando os descritores (Coodetec, 2005ab), verificou-se que a cultivar CD217 apresenta características em condição de dominância sobre suas alternativas encontradas na cultivar CD219. A cultivar CD219, por sua vez, apresenta tolerância ao herbicida glifosato, condição dominante ( $F_2$ : 3:1) sobre a alternativa sensibilidade (Padgette et al., 1995), apresentada pela cultivar CD217 (Tabela 1).

A cultivar convencional não possui naturalmente o loco gênico para o gene de tolerância ao herbicida, mas as leis mendelianas se aplicam normalmente, já que o conjunto genômico do gameta gerado pela cultivar GM passa a conter o alelo.

Características que não foram utilizadas como marcadoras fenotípicas, mas necessárias para o planejamento e execução deste experimento, foram o ciclo total e período vegetativo das cultivares. Para propiciar condições favoráveis à estimativa do fluxo gênico entre as cultivares, a sincronia do florescimento foi prevista no plantio escalonado, de modo que o início do florescimento para ambas cultivares foi previsto para o dia 28 de janeiro de 2008. O conhecimento da duração do ciclo das cultivares também foi importante para que a data da colheita fosse prevista.

### **Instalação do experimento**

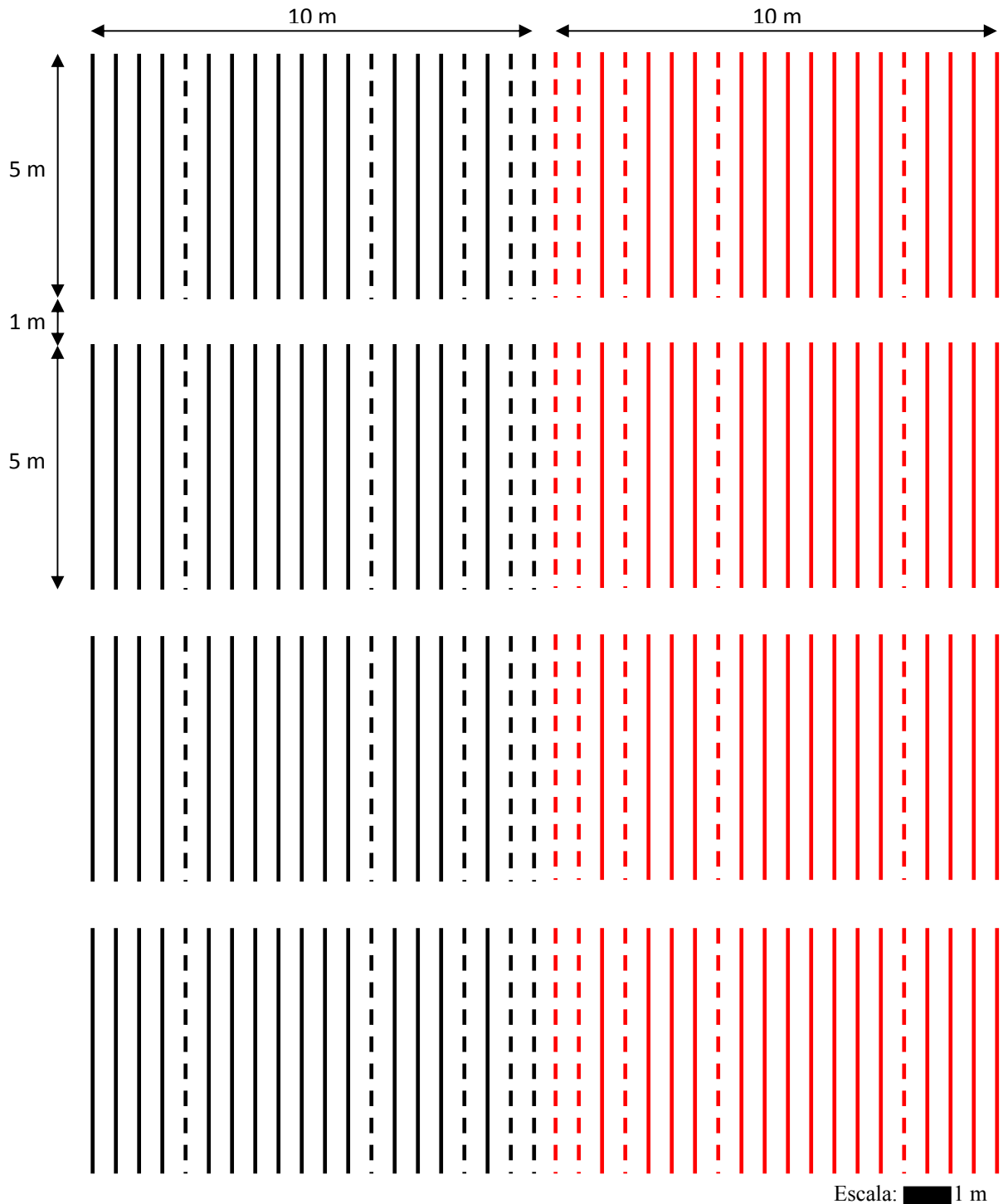
O trabalho iniciou com a implantação do experimento na safra 2007/08, a partir do qual, todas as outras etapas de checagem da ocorrência ou não de fluxo gênico entre as duas cultivares foram exploradas. A lavoura foi instalada no campo experimental do aeroporto, pertencente à Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais (latitude 20°45'14" Sul, longitude 42°52'55" Oeste, altitude 648m).

Os plantios das cultivares CD217 e CD219 se deram, respectivamente, nos dias 05 e 08 de dezembro de 2007, e as colheitas previstas para os dias 20 e 29 de abril. Previamente à semeadura, o terreno foi gradeado e sulcado com tratores, sendo na seqüência, os sulcos adubados. Após a preparação do terreno, os sulcos foram marcados com estacas e etiquetas, deixando a área experimental demarcada para os procedimentos posteriores.

Na Figura 1, o croqui do experimento mostra quatro blocos espaçados 1,0 m entre si, constituídos por 40 fileiras de 5 metros de comprimento cada, com espaçamento de 0,5 m entre fileiras. Cada bloco foi composto por 20 fileiras da cultivar CD217 e 20 fileiras da cultivar CD219, simulando um campo contínuo de produção de sementes de tais genótipos.

Durante o plantio propriamente dito, já com o campo totalmente demarcado, cada envelope contendo a quantidade suficiente de sementes para cada fileira (calculada com base na porcentagem de germinação, comprimento de 5,0 m do sulco e estande 14 plantas m<sup>-1</sup>) foi colocado próximo à sua respectiva estaca/fileira. Assim, após a distribuição dos envelopes no campo experimental, procedeu-se a semeadura manual. Cautela foi adotada na semeadura das fileiras de cultivares diferentes imediatamente vizinhas, ou seja, nas primeiras fileiras, pois, com o plantio manual, existiria a possibilidade de que as sementes, ao serem deixadas cair no

solo, pudessem acabar na fileira vizinha, destinada à outra cultivar. Assim, para estas primeiras fileiras, particularmente, as sementes foram colocadas no sulco, e não lançadas.



**Figura 1.** Esquema do experimento em campo. Blocos com linhas de cor preta e vermelha, representado as linhas das cultivares CD217 e CD219, respectivamente. Linhas tracejadas representam as fileiras (1ª; 2ª; 4ª; 8ª e 16ª) que foram colhidas no fim do ciclo para investigação da taxa de fecundação cruzada entre cultivares em função da distância. No canto inferior direito do esquema, escala corrigida para 1 m.

Para os demais sulcos, tornou-se desnecessária tamanha cautela e as sementes foram semeadas normalmente sendo deixadas cair no sulco na altura de 50 cm do solo, altura aproximada da mão do plantador em relação ao solo. Neste caso, mesmo que sementes acabassem em sulcos vizinhos, isto não teria relevância visto que seria da mesma cultivar.

Época, densidade de semeadura, adubação, manejo de insetos, entre outras práticas culturais seguiram as recomendações que predominam para a lavoura de soja no Estado de Minas Gerais. É importante destacar, entretanto, a isenção de aplicação de inseticida próximo e durante a época do florescimento, procedimento permissivo à existência de insetos polinizadores no campo experimental.

Em diferentes momentos do ciclo da cultura, foram realizadas vistorias com o intuito de confirmar a pureza genética das cultivares do experimento, utilizando para este fim características diferenciadoras das cultivares. Na preparação das sementes para o plantio, foi utilizada a cor do hilo para verificar a ocorrência de misturas (Tabela 1). No período de florescimento, foi realizada uma vistoria para confirmar o florescimento simultâneo das cultivares envolvidas, bem como, para verificar a ocorrência de plantas com cor de flor indevida para a variedade em questão. A cor da pubescência também pôde ser explorada em uma nova vistoria, realizada nos estádios R7 e R8, visto que estas cultivares são diferentes neste aspecto (Figura 2). A cultivar CD219 possui pubescência cinza e a cultivar CD217 apresenta pubescência marrom (Tabela 1).

No estádio R8, ocorrido em abril de 2008, foram colhidas, de cada cultivar, 5 fileiras a diferentes distâncias da cultivar vizinha. Assim, tanto para a população CD217, quanto para a população CD219, foram colhidas as fileiras a 0,5, 1,0, 2,0, 4,0 e 8,0 m de distância da população vizinha, correspondentes às fileiras 1, 2, 4, 8 e 16, respectivamente (Figura 1). As fileiras foram colhidas separadamente em cada bloco, de modo que cada um dos blocos passasse a constituir uma repetição do mesmo tratamento (cultivar x distância).

Durante os procedimentos de colheita e trilhagem, cuidados extras foram adotados de modo a prevenir a ocorrência de misturas acidentais, as quais confundiriam os resultados obtidos nas análises. Nesse intuito, fileiras a serem avaliadas foram colhidas e transportadas para o local da trilhagem individual e separadamente.

O procedimento da trilhagem seguiu uma ordem pré-definida, começando da fileira que esteve mais distante (16<sup>a</sup>) da cultivar vizinha durante o experimento, até a fileira que esteve mais próxima (1<sup>a</sup>). Antes do início dos trabalhos, a máquina trilhadeira foi rigorosamente examinada quanto à existência de outras sementes. Após a trilhagem de cada

fileira, a máquina era novamente examinada, de modo a garantir que misturas acidentais não ocorressem.



**Figura 2.** Sincronia de florescimento entre as cultivares. À esquerda, cultivar CD219. Destaque para a cor branca da flor e para a cor cinza da pubescência. À direita, cultivar CD217. Destaque para a cor roxa da flor e marrom da pubescência.

O ato de começar a trilhagem a partir da fileira mais distante da outra cultivar teve como princípio a expectativa, com base na literatura, de que a probabilidade de fecundação cruzada entre duas cultivares diminui com o aumento da distância entre elas. Neste sentido, mesmo que por descuido ou falha na limpeza da máquina, caso alguma semente de determinada fileira permanecesse na trilhadeira, e, durante a trilhagem da fileira seguinte, viesse fazer parte deste grupo, pouco provavelmente prejudicaria os resultados.

Depois de ser trilhado, o material foi armazenado em câmara fria, sob temperatura média de 9°C, até a realização dos ensaios de verificação quanto à ocorrência de fluxo gênico.

### **Verificação de fluxo gênico**

Quatro tipos distintos de ensaios foram conduzidos com o intuito de verificar a ocorrência de fecundação cruzada recíproca entre as cultivares CD217 e CD219. Para a obtenção do tamanho mínimo da amostra a ser avaliada em cada tratamento, foi usada a expressão matemática  $n = \lceil \log(1-P) / \log(1-p) \rceil$ ; sendo

$n$  = tamanho da amostra recomendada;

$P$  = probabilidade de o evento não ocorrer devido ao acaso; e

$p$  = taxa de fecundação cruzada esperada (Ramalho et al., 2000).

O valor de  $n$  foi adotado para orientar quanto ao tamanho mínimo necessário da amostra da população, para que pelo menos um indivíduo da característica em questão tivesse chance estatística de ocorrer.

Conforme revisão de literatura, constatou-se que as taxas de fecundação cruzada em soja, em diversos estudos, variaram entre 0,00 e 2,43 % (Tabela 2).

**TABELA 2.** Autores, ano, local do estudo sobre fluxo gênico e percentagem de fecundação cruzada observada. Adaptado de Verneti et al., (1972). Viçosa, 2009.

Autores	Ano	Localidade(s)	Percentagem (%)
Woodhouse, E.J. & Taylor, C.S.	1913	Índia	<0,50
Jones, D.F. & Hayes, H.K.	1916	-	0
Woodworth, C.M.	1922	Wisconsin (EUA)	0,04
Garber, R.J. & Odland, T.E.	1926	Virgínia (EUA)	0,07 e 0,18
Takagi, M.	1927	-	0,62
Culter, G.H.	1934	Indiana (EUA)	0,38 e 2,43
Miyasaka, S.	1958	Piracicaba (BRA)	0,50
Probst, A.H.	1961	Indiana (EUA)	0,50
Caviness, C.E.	1966	Arkansas (EUA)	0,03; 0,03 e 0,44
Sediyama, T.	1971	Viçosa e Capinópolis (BRA)	0,09; 1,3 e 0,9
Verneti et al.	1972	Pelotas e Ponta Grossa (BRA)	0,03 e 1,22
Ray et al.	2003	Mississippi (EUA)	1,8; 0,41 e 0,03
Abud et al.	2003	Planaltina (BRA)	0,44; 0,45; 0,04 e 0,14
Schuster et al.	2007	Cascavel (BRA)	0,61
Pereira et al.	2007	Viçosa e Florestal (BRA)	0,25 e 1,27
Taxa de fecundação cruzada média obtida dos estudos			0,525

Para os fins desta pesquisa, admitiu-se a probabilidade de fecundação cruzada esperada ( $p$ ) em 0,525 %, que corresponde à média dos valores encontrados na literatura (Tabela 2). Assim, adotando  $P = 0,99$ , e,  $p = 0,00525$ , o ' $n$ ' encontrado foi de 875. Deste modo foi estabelecido o tamanho mínimo da amostra a ser avaliada em cada parcela experimental.

### **Fluxo gênico da cultivar CD217 para CD219**

Dois ensaios foram realizados para verificar o fluxo gênico no sentido CD217 para CD219. Em ambos foram exploradas duas características morfológicas como marcadoras: cor da flor, pleiotrópica com a cor do hipocótilo, e cor da pubescência da vagem.

#### **1º) Semeadura em campo para verificação da cor da flor**

Na safra 2008/09, o ensaio foi instalado na área experimental do aeroporto, pertencente à Universidade Federal de Viçosa, no município de Viçosa, MG. Sementes da cultivar CD219 (1000 por parcela experimental) oriundas das fileiras 1, 2, 4, 8 e 16, dos blocos 1, 2, 3 e 4, foram amostradas da safra 2007/08, as quais, foram semeadas separadamente no campo experimental, em novembro de 2008. Durante o seu florescimento,

ocorrido em janeiro de 2009, foi realizada uma avaliação com o objetivo de verificar a ocorrência de plantas com flores roxas, o que seria indicativo de fluxo gênico (Sedyama et al., 1970; Ray et al., 2003) da cultivar CD217 para a CD219.

As plantas dotadas de flor roxa identificadas em campo no estágio de florescimento foram marcadas com um barbante branco para posterior localização ao final do ciclo. Durante os estádios R7 e R8, uma nova avaliação foi feita, sendo agora objeto de visualização a cor marrom da pubescência da vagem. Plantas com pubescência marrom também foram etiquetadas. Ao final do ciclo da lavoura, as sementes produzidas por cada planta considerada híbrida foram armazenadas sob condições de câmara fria para posterior análise confirmativa.

A análise confirmativa foi realizada a partir da emergência das plântulas em leito de areia. As sementes oriundas de cada planta de flor roxa, encontradas durante as avaliações, foram semeadas em bandejas contendo areia e aguardou-se dez dias para a sua emergência e verificação da ocorrência de segregação em relação à cor do hipocótilo, condição esperada para plantas híbridas. Teste qui-quadrado, ao nível de 5% de probabilidade, foi aplicado para visualização da segregação  $F_2$ : 3:1 das características, porém, o surgimento de pelo menos uma plântula de hipocótilo verde, já seria indicativo de que a planta mãe, de fato, seria híbrida para tal característica. Aplicando a fórmula do tamanho mínimo da amostra,  $n = [\log (1-P)]/[\log (1-p)]$ , e admitindo,  $P = 0,99$  e um  $p = 0,75$ , chega-se ao valor 16. Este é o número mínimo de indivíduos, estatisticamente necessário para que pelo menos um apresente a característica recessiva.

## **2º) Semeadura em leito de areia para verificação da cor do hipocótilo**

De cada fileira coletada em campo da variedade CD219 (1ª, 2ª, 4ª, 8ª e 16ª), 1000 sementes foram separadas e semeadas em leito de areia, sendo 250 por bandeja plástica [(38x25x7 cm) contendo 3 kg de areia], dispostas em seis sulcos por bandeja e aproximadamente 42 sementes por sulco.

As plântulas encontradas nestas bandejas, cujos hipocótilos apresentassem a cor roxa, representariam a taxa de fluxo gênico. Para confirmação desta informação, as plântulas identificadas com hipocótilo roxo foram transplantadas para vasos contendo solo, sendo mantidos sob condições de casa de vegetação para que tais plântulas completassem o ciclo. Durante este período, foi verificada a cor roxa da flor, em caráter confirmatório, bem como a cor da pubescência, esperada ser marrom. Ao final do ciclo, suas sementes foram coletadas e semeadas em leito de areia para observação quanto à segregação de sua progênie, o que

confirmaria a sua condição híbrida. Teste qui-quadrado, ao nível de 5% de probabilidade, foi aplicado para visualização da segregação  $F_2$ : 3:1 das características.

### **Fluxo gênico da cultivar CD219 para CD217**

Dois ensaios foram realizados para verificação do fluxo gênico de CD219 para CD217. Em ambos foi explorada a tolerância ao herbicida glifosato como característica morfológica marcadora.

### **3º) Aplicação de herbicida glifosato em condições de casa de vegetação**

A partir das fileiras coletadas em campo (1ª, 2ª, 4ª, 8ª e 16ª), da população CD217, foram separadas 1500 sementes por parcela experimental, as quais foram semeadas em leito de areia, 300 por bandeja [(38x25x7 cm) contendo 3 kg de areia], dispostas em seis sulcos, com 50 sementes cada sulco. No décimo segundo dia após o plantio, foi aplicado sobre as plântulas o herbicida glifosato, na dose de 4L.ha<sup>-1</sup> e volume de calda de 150 L.ha<sup>-1</sup> (Miranda et al., 2006).

Após duas semanas da aplicação do herbicida, foi observada a ação do glifosato sobre as plântulas, em que indivíduos sensíveis secaram e morreram e indivíduos tolerantes mantiveram-se com vitalidade.

### **4º) Germinação de sementes em substrato umedecido com solução do herbicida**

Com base nos estudos realizados e descritos por Pereira et al. (2009), a estimativa da taxa de fecundação cruzada entre a cultivar CD219 e CD217 foi realizada utilizando-se o bioensaio de germinação de sementes em substrato umedecido com solução do herbicida. Foram separadas 900 sementes de cada parcela experimental da cultivar CD217, as quais foram submetidas ao teste de germinação entre folhas de papel germitest umedecidas com solução 0,03 % do equivalente ácido do herbicida numa proporção de solução 3,0 vezes maior que o peso do papel seco, distribuídas em 18 rolos de papel germitest, com 50 sementes cada.

Os rolos de germinação confeccionados foram incubados em câmara de germinação por 7 dias, sob temperatura controlada (25±1°C). Após este período, os rolos foram retirados da câmara germinadora e avaliadas quanto à presença de plântulas normais, caracterizadas pela presença de raízes secundárias e raiz primária desenvolvida, não apresentando raiz primária com engrossamento. As parcelas foram avaliadas até mesmo quanto à presença de plântulas dotadas de anormalidades não típicas dos casos de sensibilidade ao herbicida

glifosato, pois, como verificado por Pereira et al. (2009), é possível distinguir entre os tipos de anormalidades, aquele típico da sensibilidade ao glifosato.

### Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente com o auxílio do aplicativo GENES (Cruz, 2001). O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado para todos os métodos aplicados, com 4 repetições. Procedeu-se a análise de variância seguida da análise de regressão. Com base na opção regressão múltipla, foi possível identificar o modelo mais coerente para explicar os resultados de cada método aplicado. As equações de regressão foram ajustadas utilizando-se as médias das quatro repetições de cada tratamento.

A partir dos dados de fecundação cruzada obtidos em função da distância, foi calculada, com base no estimador apresentado a seguir, a taxa de fecundação populacional, ou efeito diluição, bem como a quantidade estimada de sementes híbridas em cada situação.

$$FC_G = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \%FC_{Fi}, \text{ em que:}$$

$FC_G$  = Taxa de fecundação cruzada populacional;

$\%FC_{Fi}$  = Taxa de fecundação cruzada na fileira  $i$ ;

$n$  = Número de fileiras.

$$NSH = \sum_{i=1}^n \%FC_{Fi} * CFi * Ei * \bar{Si}, \text{ onde:}$$

$NSH$  = Número de sementes híbridas na progênie;

$\%FC_{Fi}$  = Taxa de fecundação cruzada observada na fileira  $i$ .

$CFi$  = Comprimento da fileira  $i$  em metros;

$Ei$  = Estande da fileira  $i$ , ou seja, número médio de plantas por metro;

$\bar{Si}$  = Número médio de sementes por planta na fileira  $i$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a preparação do material para o plantio não foi encontrado caso de misturas, ou seja, nenhuma semente com hilo de cor preta no lote de sementes da cultivar CD219, e nenhuma semente com hilo de cor marrom clara em lotes de sementes da cultivar CD217.

Na avaliação realizada no início do período reprodutivo, foi verificada sincronia de florescimento entre as cultivares e não foram encontradas plantas com cor de flor diferente daquela esperada para cada cultivar em questão, o que evidenciou a pureza genética em cada cultivar. A cor da pubescência, discrepante entre as duas populações, também contribuiu para a checagem, nos estádios R7 e R8, da pureza genética das cultivares estudadas.

### **1º) Semeadura em campo para verificação da cor da flor**

No período do florescimento da cultivar CD219, alguns indivíduos com flor roxa foram encontrados entre as fileiras de plantas analisadas (1ª, 2ª, 4ª, 8ª e 16ª), ou seja, evidência de fluxo gênico foi observada. Segundo Destro et al. (1990), a cor da flor é uma característica que pode ser utilizada como marcadora de hibridações por ser condicionada por um par de alelos,  $W$  e  $w$ , sendo que, o alelo  $W$  (cor roxa) domina o alelo  $w$  (cor branca).

No estádio R7 e R8, a cor marrom da pubescência corroborou que o material seria resultado de fecundação cruzada, já que a cultivar CD217 apresenta cor marrom para este caracter, enquanto que a cultivar CD219 possui pubescência cinza. Assim, no caso de ocorrência de fluxo gênico, as plantas híbridas apresentariam pubescência marrom, além de flor roxa. O número de plantas com flor roxa e pubescência marrom encontradas em condições de campo, o número total de plantas analisadas por fileira e a porcentagem estimada de fluxo gênico encontram-se apresentados na Tabela 3.

É importante destacar que foi possível verificar, em condições de campo, evidências da ocorrência de fluxo gênico utilizando duas características fenotípicas visuais, a cor roxa da flor (característica da cultivar CD217), dominante sobre sua alternativa cor branca (própria da cultivar CD219), e a cor marrom da pubescência, dominante sobre sua alternativa cor cinza

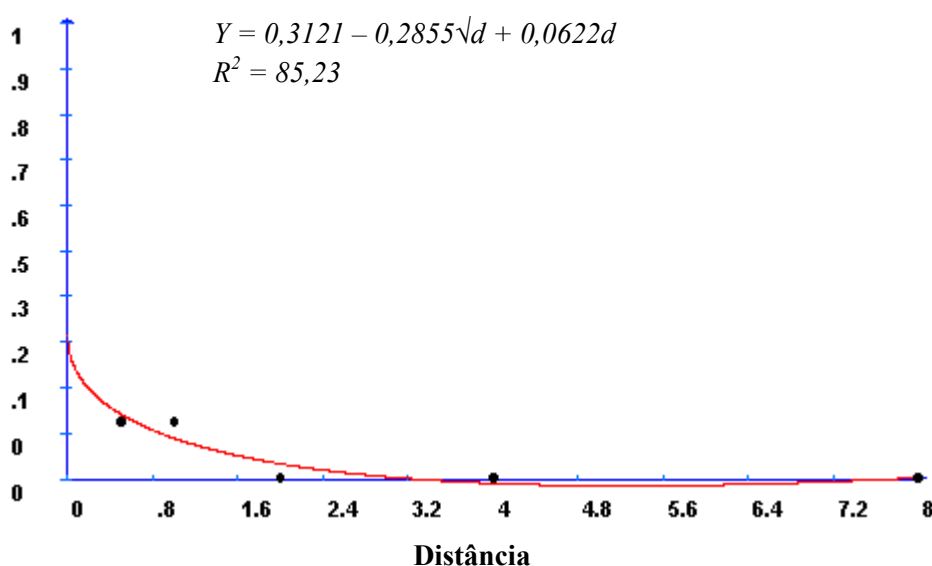
(Destro et al., 1990). A cor da pubescência, característica que pode ser usada como marcadora em cruzamentos, é controlada por um único par de alelos, sendo a cor marrom (*T*) completamente dominante sobre a cor cinza (*t*) (Woodworth, 1921 apud Destro et al., 1990).

**TABELA 3.** Número\* de plantas híbridas (flor roxa e pubescência marrom) encontradas na população CD219, total de plantas analisadas em cada tratamento e porcentagem estimada de fluxo gênico a diferentes distâncias da fonte de pólen.

	Número de plantas	Plantas analisadas	Porcentagem média
Fileira/0,5 m	4	3039	0,1316
Fileira/1,0 m	4	3077	0,1299
Fileira/2,0 m	0	3120	0
Fileira/4,0 m	0	3173	0
Fileira/8,0 m	0	3109	0

\* Os valores apresentados se referem aos totais dos quatro blocos.

A taxa estimada de fluxo gênico encontrada neste ensaio foi de 0,13 % a uma distância de 0,5 m da fonte de pólen, confirmando ser baixa a taxa de fecundação cruzada em soja. A 1,0 m de distância, a taxa continuou em 0,13 %, e a partir daí, não mais foram identificados casos de fecundação cruzada, resultados inferiores aos encontrados por Sedyama et al. (1970) e Ray et al. (2003). Pela curva de regressão, verificou-se uma expectativa de taxa nula de fecundação cruzada a aproximadamente 1 m de distância da fonte de pólen contaminante, distância esta menor que a recomendada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para o isolamento entre campos de produção de sementes de soja para comercialização (Brasil, 2005).



**Figura 3.** Análise de regressão raiz quadrada para os dados de fecundação cruzada coletados a partir do método de verificação da cor da flor em campo.

Considerando as plantas coletadas em campo como híbridas, esta condição deveria ser confirmada, já que a existência de plantas com flor roxa na população poderia não consistir no resultado de fluxo gênico, mas sim em misturas acidentais entre materiais diferentes, embora isto tenha sido prevenido durante todas as etapas deste trabalho. De qualquer forma, todas as sementes coletadas de cada planta híbrida no estágio R8 foram semeadas em bandejas de areia e avaliadas quanto à cor do hipocótilo. Como pode ser verificado na Tabela 4 e observado no Anexo I, para todas as plantas coletadas, ocorreu segregação para a cor do hipocótilo. A cor do hipocótilo e a cor da flor são características controladas por um gene de efeito pleiotrópico.

**TABELA 4.** Plantas coletadas dentro da população da cultivar CD219 apresentando cor de flor roxa, número de sementes (n) obtidas a partir de cada planta e segregação de sua progênie quanto à cor do hipocótilo, roxo (*WW* ou *Ww*) ou verde (*ww*), sob ensaio de emergência em leito de areia. O teste  $\chi^2$  para segregação 3:1 encontra-se disponibilizado.

Plantas	Progênie (n)	Segregação para cor do hipocótilo			
	Total de sementes (un.)	Roxo ( <i>WW</i> ou <i>Ww</i> )	Verde ( <i>ww</i> )	$\chi^2_{Calculado}$	Probabilidade (%)
Fileira 1, Bloco 1	15	10	5	0,555	45,60
Fileira 1, Bloco 1	19	14	5	0,017	89,46
Fileira 1, Bloco 3	16	12	4	0,000	100
Fileira 1, Bloco 4	16	8	8	5,333	2,09
Fileira 2, Bloco 1	17	11	6	0,961	32,69
Fileira 2, Bloco 3	73	52	21	0,555	45,73
Fileira 2, Bloco 4	28	15	13	6,857	0,88

O princípio desta confirmação reside no fato de que, na progênie de cada planta de flor roxa coletada em campo, poderiam surgir na emergência de sua progênie, além de plântulas com os hipocótilos roxos, também plântulas de hipocótilos de cor verde, o que evidenciaria sua natureza híbrida, por meio da segregação deste carácter. Assim, a segregação quanto à cor do hipocótilo das plântulas (Anexo I) consistiu na evidência de que não se tratou de alguma mistura acidental de sementes.

## 2º) Semeadura em leito de areia para verificação da cor do hipocótilo

A cultivar CD219 apresenta hipocótilo verde, enquanto que a cultivar CD217 possui hipocótilo roxo. Dessa forma, plântulas híbridas devem apresentar o hipocótilo roxo, considerando a dominância desta última condição sobre a primeira. Conforme Destro et al. (1990), passados aproximadamente 7 dias após a emergência das plântulas, é possível avaliar a cor do hipocótilo, possibilitando a verificação da ocorrência de fluxo gênico entre cultivares contrastantes quanto à este carácter. Os números de plântulas apresentando hipocótilo roxo, os

números de plântulas analisadas e a taxa de fecundação cruzada estimada em cada tratamento encontram-se na Tabela 5.

**TABELA 5.** Número\* de plântulas híbridas (hipocótilo de cor roxa) encontradas na população CD219 semeada em leito de areia, total de plântulas analisadas em cada tratamento e porcentagem estimada de fluxo gênico a diferentes distâncias da fonte de pólen.

	Número de plantas	Plantas analisadas	Porcentagem média
Fileira/0,5 m	7	2527	0,27
Fileira/1,0 m	3	1906	0,16
Fileira/2,0 m	2	2214	0,09
Fileira/4,0 m	0	2101	0,00
Fileira/8,0 m	0	2007	0,00

\* Os valores apresentados se referem aos totais dos quatro blocos

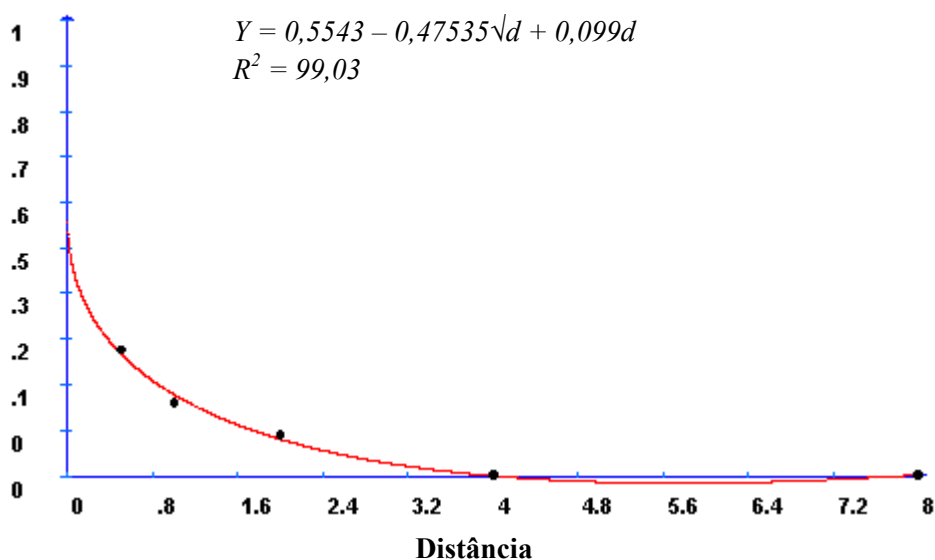
Este ensaio apresentou algumas vantagens de ordem prática sobre àquele realizado em campo, como a economia de espaço, mão-de-obra e tempo para instalação do experimento em casa de vegetação. Adicionalmente, o tempo para obtenção dos resultados foi menor em relação àquele necessário no experimento de campo, pois neste último é necessário aguardar o florescimento para a realização das análises. Outra vantagem atribuída ao método em casa de vegetação é a praticidade de avaliação. Em campo, durante o florescimento, a lavoura fechada dificulta o trânsito do pessoal, enquanto que em casa de vegetação cada bandeja pode ser facilmente transportada para um local que forneça as melhores condições para o trabalho do analista. Por fim, cita-se ainda que no campo o ambiente pode influenciar o trabalho do analista, seja interferindo no desenvolvimento das plantas (ataque de patógenos, pragas e doenças), seja nos momentos de avaliação. Em casa de vegetação o trabalho consistiu na contagem das plântulas.

Na época do florescimento foi confirmada a cor roxa da flor, assim como a cor marrom da pubescência, corroborando a eficiência da metodologia de verificação da cor do hipocótilo. No anexo II, as vagens de cor marrom de algumas destas plantas podem ser visualizadas, assim como as sementes produzidas. A cor escura do hilo também evidencia a existência do alelo oriundo da cultivar CD217, logo, a natureza híbrida das plântulas da cultivar CD219 coletadas. Na tabela 6 estão apresentados os números de sementes obtidas de cada planta, os números de plântulas emergidas, a quantidade de plântulas cujos hipocótilos são roxos ou verdes e o teste de qui quadrado na averiguação da segregação  $F_2$ : 3:1. No anexo III estão as plântulas segregantes para a cor do hipocótilo.

**TABELA 6.** Plantas transplantadas das bandejas de areia para vasos, apresentando hipocótilo de cor roxa, progênie ou número de sementes (n) obtidas a partir de cada planta e segregação de sua progênie quanto à cor do hipocótilo, roxo (*WW* ou *Ww*) e verde (*ww*), sob ensaio de emergência em leito de areia. O teste  $\chi^2$  para segregação 3:1 está disponibilizado.

Plantas	Progênie (n)	Cor do hipocótilo		$\chi^2_{Calc.}$	Probabilidade (%)
	Total de sementes colhidas/emergidas	Roxo ( <i>WW</i> ou <i>Ww</i> )	Verde ( <i>ww</i> )		
Fileira 1, Bloco 1	149/113	80	33	1,065	30,21
Fileira 1, Bloco 2	155/102	72	30	1,059	30,35
Fileira 1, Bloco 2	105/89	70	19	0,633	42,63
Fileira 1, Bloco 4	134/126	98	28	0,518	47,14
Fileira 1, Bloco 4	137/115	85	30	0,072	78,77
Fileira 2, Bloco 1	125/111	83	28	0,003	95,63
Fileira 2, Bloco 3	144/125	94	31	0,003	95,88
Fileira 4, Bloco 1	153/140	107	33	0,152	69,63
Fileira 4, Bloco 4	145/123	89	34	0,458	49,86

Assim como verificado para o experimento realizado em campo, a comprovação de segregação para a característica cor do hipocótilo foi a informação necessária para confirmar de fato sua natureza híbrida, validando os resultados estimados para o fluxo gênico da população CD217 para a CD219.



**Figura 4.** Análise de regressão raiz quadrada para os dados de fecundação cruzada coletados a partir do método de verificação da cor do hipocótilo em casa de vegetação.

Conforme apresentado pela Figura 4, a curva de regressão intercepta o eixo zero em torno dos 2 m de distância, demonstrando que a distância de isolamento entre campos de produção de sementes recomendada pelo MAPA é satisfatória para a manutenção da pureza

genética em soja. Outros autores também verificaram a partir dessa distância redução brusca na taxa de hibridação natural (Abud et al., 2003; Ray et al., 2003; Schuster et al., 2007; Pereira et al., 2007).

### 3º) Aplicação de herbicida glifosato em condições de casa de vegetação

Como já relatado neste trabalho, a cultivar CD217 é originalmente sensível à ação do herbicida glifosato enquanto a cultivar CD219 é tolerante. Caso ocorra uma planta híbrida entre estas duas cultivares, esta deverá apresentar a condição de tolerância ao glifosato, considerando a sua herança monogênica de dominância completa ( $F_2$ : 3:1). No caso deste ensaio realizado em casas de vegetação, plântulas híbridas sobreviveriam mesmo depois da aplicação do herbicida. Deste modo, a presença de plântulas tolerantes ao herbicida na progênie da população CD217 constitui evidência de que houve fecundação cruzada entre esta e a cultivar CD219. No anexo IV, diferentes estágios do ensaio foram registrados.

Os números de plântulas com sinais de tolerância ao herbicida, de sementes semeadas no leito de areia e a taxa de fecundação cruzada estimada por tratamento encontram-se na Tabela 7. As maiores taxas de fecundação cruzada ocorreram às menores distâncias.

**TABELA 7.** Número\* de plantas híbridas (tolerantes ao herbicida) encontradas na população CD217, total de sementes semeadas em cada tratamento e porcentagem estimada de fluxo gênico a diferentes distâncias da fonte de pólen. Viçosa, 2009.

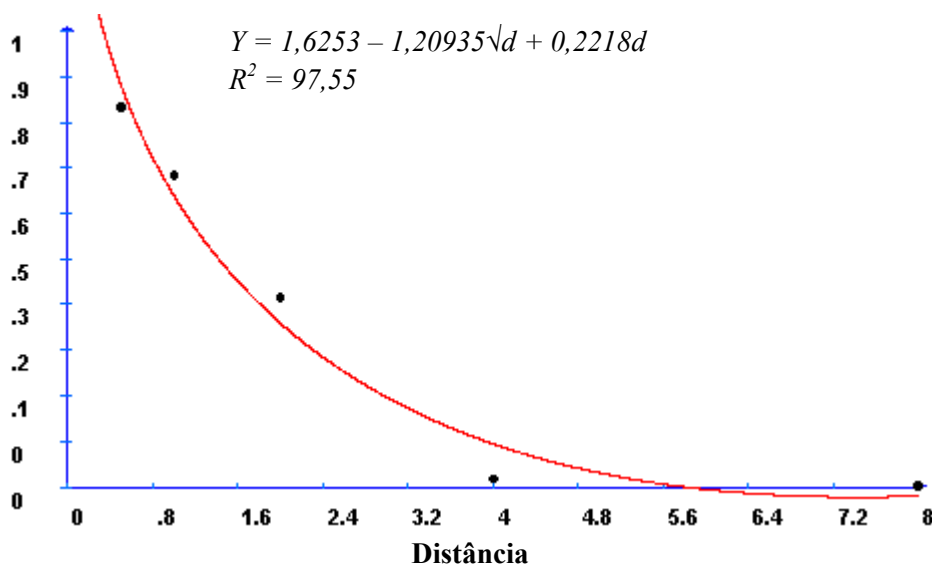
	Plântulas tolerantes	Sementes semeadas	Porcentagem média
Fileira/0,5 m	50	6000	0,83
Fileira/1,0 m	41	6000	0,68
Fileira/2,0 m	25	6000	0,42
Fileira/4,0 m	01	6000	0,01
Fileira/8,0 m	00	6000	0,00

\* Os valores apresentados se referem aos totais dos quatro blocos

Como verificado por Miranda et al. (2006), neste tipo de bioensaio existe um nível de acerto superior a 92 %, o que valoriza sua utilização em estudos desta natureza. A taxa de fecundação cruzada encontrada foi de 0,83 % a 0,5m de distância da fonte de pólen, maior do que aquela apresentada no sentido CD217 para CD219. Neste caso, já é possível notar que a taxa de fecundação cruzada recíproca não é a mesma em ambos os sentidos.

Os resultados encontrados neste ensaio confirmam a expectativa de que, para pequenas distâncias, a taxa estimada de fluxo gênico é maior do que para distâncias maiores. Esses resultados podem ser importantes para a definição de distância mínima entre campos de produção de sementes, necessários para produção de sementes de soja e para isolamento de

experimentos de avaliação da biossegurança de novos eventos geneticamente modificados. Na Figura 5, a curva de regressão intercepta o ponto zero na distância entre três e quatro metros, mostrando que a utilização da distância de isolamento pode ser determinante no controle da pureza genética de campos de produção de sementes de soja vivinhos.



**Figura 5.** Análise de regressão raiz quadrada para os dados de fecundação cruzada coletados a partir do método de aplicação do herbicida sobre as plântulas em condições de casa de vegetação.

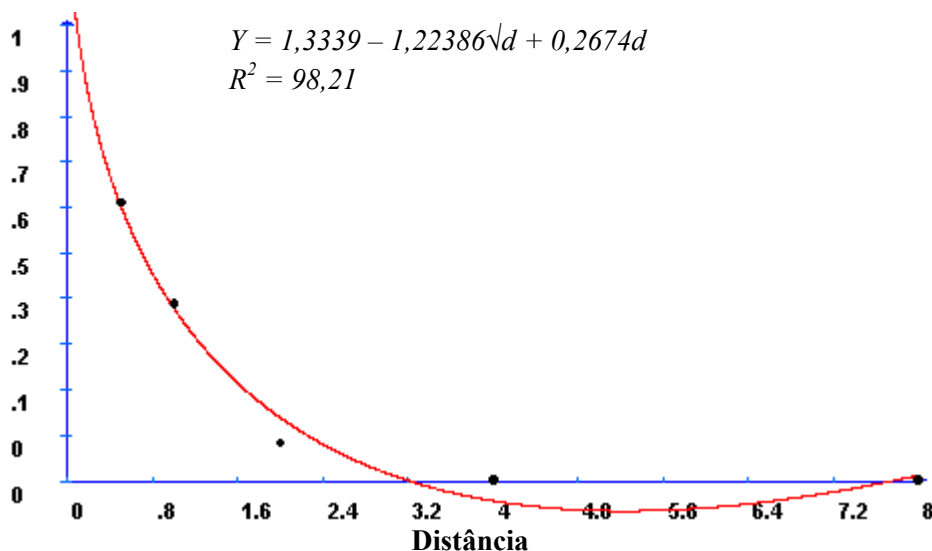
#### 4º) Germinação de sementes em substrato umedecido com solução do herbicida

Verificou-se que sementes de soja tolerantes ao herbicida germinaram normalmente na presença deste em solução no papel germitest, enquanto que sementes de cultivares sensíveis ao herbicida não o fazem (Pereira et al., 2009). Os resultados deste ensaio (Tabela 8) não foram iguais àqueles do ensaio conduzido em casa de vegetação (aplicação de herbicida glifosato em condições de casa de vegetação), mas concordantes no que se refere à baixa taxa de fecundação cruzada nesta espécie (Figura 6).

**TABELA 8.** Número\* de plântulas híbridas (tolerantes ao herbicida) encontradas na população CD217, total de sementes analisadas em cada tratamento e porcentagem estimada de fluxo gênico a diferentes distâncias da fonte de pólen. Viçosa, 2009.

	Plântulas tolerantes	Sementes analisadas	Porcentagem média
Fileira/0,5 m	22	3600	0,61
Fileira/1,0 m	14	3600	0,39
Fileira/2,0 m	03	3600	0,08
Fileira/4,0 m	00	3600	0,00
Fileira/8,0 m	00	3600	0,00

\* Os valores apresentados se referem aos totais dos quatro blocos



**Figura 6.** Análise de regressão raiz quadrada para os dados de fecundação cruzada coletados a partir do método de germinação de plântulas em substrato umedecido com solução do herbicida em câmaras de germinação.

Com base nos quatro ensaios utilizados, notou-se que a partir dos 4 metros de distância é pouco provável a ocorrência de fluxo gênico entre cultivares de soja, como verificado por outros autores (Abud et al., 2003; Ray et al., 2003; Pereira et al., 2007), o que pode orientar produtores de sementes no planejamento de seus campos de produção. A partir da análise conjunta de dois ou mais caracteres morfológicos confirmou-se a condição híbrida das plântulas tidas como tal. Autores recomendam a análise molecular, porém, utilizar métodos clássicos mendelianos continua sendo uma boa alternativa para pesquisas genéticas.

### Efeito diluição

Aplicando o estimador para verificação do efeito diluição e, portanto, da taxa de fecundação cruzada populacional, foi possível estimar a porcentagem de contaminação das 5 (cinco) fileiras avaliadas de cada um dos quatro blocos. É importante ressaltar, entretanto, que a população inteira possui um número maior de fileiras (20). Como não foram verificadas todas, mas apenas cinco (1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup>, 8<sup>a</sup> e 16<sup>a</sup>), ficou estabelecida como uma estimativa da população total. Admitindo um estande de 14 plantas por metro e 100 sementes por planta, é possível estimar o tamanho total da população. Foram tiradas amostras de 5 fileiras, medindo 5 metros de comprimento cada uma, dos 4 blocos. Assim, seriam, ao todo, 35.000 sementes por bloco, ou seja, 140.000 sementes na população inteira das cinco fileiras avaliadas. A seguir, a análise do fluxo gênico populacional segundo os quatro métodos utilizados nesta pesquisa, bem como o número esperado de sementes híbridas na geração seguinte.

### 1º) Semeadura em campo para verificação da cor da flor

$$FC_G = \frac{\sum_{i=1}^n \%FC_{Fi}}{n} = \frac{0,1316 + 0,1299 + 0 + 0 + 0}{5} = 0,0523 \%$$

$$NSH = \sum_{i=1}^n \%FC_{Fi} * CFi * Ei * \bar{Si} = \frac{1}{100} (0,1316 * 20 * 14 * 100) + (0,1299 * 20 * 14 * 100) + \dots + (0 * 20 * 14 * 100)$$

$$NSH = 73 \text{ sementes}$$

### 2º) Semeadura em leito de areia para verificação da cor do hipocótilo

$$FC_G = \frac{\sum_{i=1}^n \%FC_{Fi}}{n} = \frac{0,27 + 0,16 + 0,09 + 0 + 0}{5} = 0,104 \%$$

$$NSH = \sum_{i=1}^n \%FC_{Fi} * CFi * Ei * \bar{Si} = \frac{1}{100} (0,27 * 20 * 14 * 100) + (0,16 * 20 * 14 * 100) + (0,09 * 20 * 14 * 100) + \dots + (0)$$

$$NSH = 146 \text{ sementes}$$

### 3º) Aplicação de herbicida glifosato em condições de casa de vegetação

$$FC_G = \frac{\sum_{i=1}^n \%FC_{Fi}}{n} = \frac{0,83 + 0,68 + 0,42 + 0,01 + 0}{5} = 0,388 \%$$

$$NSH = \sum_{i=1}^n \%FC_{Fi} * CFi * Ei * \bar{Si} = \frac{1}{100} (0,83 * 28.000) + (0,68 * 28.000) + (0,42 * 28.000) + (0,01 * 28.000) + (0 * 28.000)$$

$$NSH = 543 \text{ sementes}$$

### 4º) Germinação de sementes em substrato umedecido com solução do herbicida

$$FC_G = \frac{\sum_{i=1}^n \%FC_{Fi}}{n} = \frac{0,61 + 0,39 + 0,08 + 0 + 0}{5} = 0,216 \%$$

$$NSH = \sum_{i=1}^n \%FC_{Fi} * CFi * Ei * \bar{Si} = (0,61 * 28.000) + (0,39 * 28.000) + (0,08 * 28.000) + \dots + (0)$$

$$NSH = 302 \text{ sementes}$$

A aplicação do estimador de fluxo gênico populacional pode constituir um novo modo para analisar a taxa de fecundação cruzada de uma espécie. Quando os estudos divulgam uma determinada taxa de hibridação natural, os dados podem ser equivocadamente interpretados. Afirmar que a soja possui, em média, uma taxa de fecundação cruzada em torno de 1% pode induzir ao julgamento de que esta seja a taxa de contaminação encontrada em um lote de sementes. Geralmente as taxas de hibridações publicadas são referentes àquelas fileiras analisadas e não à população inteira. Sendo assim, acredita-se que com a utilização deste estimador seja possível a divulgação de dados mais aprofundados em estudos desta natureza.

O número esperado de sementes híbridas em um lote também é uma informação relevante, pois é possível gerar uma expectativa concreta quanto ao número de híbridos que seguem para a próxima geração. As quantidades de sementes híbridas esperadas a partir deste estudo foram 73, 146, 543 e 302, de 140.000 sementes em cada método: verificação da cor da flor em campo, verificação da cor do hipocótilo em casa de vegetação, sobrevivência das plântulas após a aplicação do herbicida em casa de vegetação e germinação em substrato umedecido com solução do herbicida, o que representa a taxa de contaminação populacional encontrada na espécie *G. max* sob condições de campo.

## CONCLUSÕES

1. As maiores taxas de fluxo gênico verificadas foram a 0,5 m da fonte de contaminação, conforme os quatro métodos usados: da cultivar CD217 para CD219: 0,13 e 0,27 %; da cultivar CD219 para CD217: 0,83 e 0,61%. Em termos populacionais, conforme o efeito diluição, tais valores caíram para 0,05, 0,10, 0,39 e 0,22 % de contaminantes, respectivamente.
2. Considerando duas variedades de soja, o fluxo gênico não foi o mesmo em ambas as direções.
3. A distância entre cultivares de soja consiste em um fator crítico para o isolamento reprodutivo, limitando a ocorrência de fecundação cruzada natural entre variedades.
4. A partir dos 4m de distância entre populações é rara a ocorrência de fluxo gênico.
5. Marcadores morfológicos constituem numa alternativa eficaz para estudos genéticos, e ganham em evidência e segurança quando mais de uma característica pode ser analisada e quando a geração  $F_2$  pode ser explorada.
6. Entre as metodologias analisadas, as avaliações em casa de vegetação foram mais práticas, rápidas e eficientes do que em condições de campo.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela concessão de bolsa de estudos;

À COODETEC, na pessoa de Ivan Schuster, pela concessão do material genético para a realização deste trabalho.

## REFERÊNCIAS

- ABUD, S.; SOUZA, P.I.M.; MOREIRA, C.T.; ANDRADE, S.R.M.; ULBRICH, A.V.; VIANNA, G.R.; RECH, E.L.; ARAGÃO, F.J.L. Dispersão de pólen em soja transgênica na região do Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, p.1229-1235, 2003.
- AHRENT, D.K.; CAVINESS, C.E. Natural cross-pollination of twelve soybean cultivars in Arkansas. **Crop Science**, v.34, p.376-378, 1994.
- BEARD, B.H.; KNOWLES, F. Frequency of cross-pollination of soybeans after seed irradiation. **Crop Science**, v.11, p.489-492, 1971.
- BOERMA, H.R.; MORADSHAHI, A. Pollen movement within and between rows to male-sterile soybeans. **Crop Science**, v.15, p.858-861, 1975.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. **Melhoramento de plantas**. 5.ed. Viçosa: UFV, 2009. 529p.
- BORÉM, A.; RAMALHO, M.A.P. Escape gênico e impacto ambiental: O caso do milho Brasil. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**. 28: 44 – 47. 2002.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento. 2005. Instrução Normativa Número 25, Padrão para produção e comercialização de sementes de soja. Disponível em: [www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br). Acesso em: 31 de maio 2007.
- CARLSON, J.B.; LERSTEN, N.R. Reproductive morphology. In: BOERMA, R.; SPECHT, J.E. (Ed.). **Soybeans: improvement, production, and uses**. 3rd ed. Madison: CSA, CSSA, SSSA, 2004. p.59-95.
- CAVINESS, C.E. Estimates of natural cross-pollination in Jackson soybeans in Arkansas. **Crop Science**, v.6, p.211-212, 1966.
- COODETEC, Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola, **Guia de produtos 2005, 125 p.**
- COODETEC, Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola, **Cultivares de soja RR<sup>®</sup> 2005, 15 p.**
- CRAWLEY, M.J.; BROWN, S.L.; HAILS, R.S.; KOHN, D.D.; REES, M. Transgenic crop in natural habitats. **Nature**, v.409, p.682-683, 2001.
- CRUZ, C.D. **Programa GENES - versão Windows. Aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV, 2001. 648p.

CULTER, G.H. A simple method for making soybean hybrids. **Journal of the American Society of Agronomy**, v.26, p.252-254, 1934.

DESTRO, D.; SEDIYAMA, T.; GOMES, J.L.L. **Genes qualitativos em soja: Alguns comentários e listagem**. Caderno didático, Viçosa: UFV, 1990. 67 p.

FERREIRA, J.L. **Análise do fluxo gênico em feijoeiro**. 2004, 33p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

MIRANDA, D.M.; TILLMANN, M.A.A.; NOLDIN, J.A.; BALERINI, F. Bioensaio em casa-de-vegetação na detecção e quantificação de sementes de soja geneticamente modificada. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 187-192, 2006.

MIYASAKA, S. **Contribuição para o melhoramento da soja no Estado de São Paulo**. 1958, 49p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1958.

PADGETTE, S.R.; KOLACZ, K.H.; DELANNAY, X.; RE, D.B.; LAVALLEE, B.J.; TINIUS, C.N.; RHODES, W.K.; OTERO, Y.I.; BARRY, G.F.; EICHHOLTZ, D.A.; PESCHKE, V.M.; NIDA, D.L.; TAYLOR, N.B.; KISHORE, G.M. Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. **Crop Science**, v.35, p.1451-1461, 1995.

PEREIRA, W.A.; DEL GIUDICE, M.P.; CARNEIRO, J.E.S.; DIAS, D.C.F.S.; BORÉM, A. Fluxo gênico em soja geneticamente modificada e método para sua detecção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 7, p. 999-1006, 2007.

PEREIRA, W.A.; LISBOA, S.P.; DIAS, D.C.F.S.; ALVARENGA, E.M.; BORÉM, A. Ajuste de metodologias para a identificação de cultivares de soja quanto à tolerância ao glifosato

RAMALHO, M. A. P., SANTOS, J. B., PINTO, C.A.B.P. **Genética na Agropecuária**, Lavras – MG. Editora UFLA. 472p., 2000.

RAY, J.D.; KILEN, T.C.; ABEL, C.A.; PARIS, R.L. Soybean natural cross-pollination rates under field conditions. **Environmental Biosafety Research**, v.2, p.133-138, 2003.

RUBIS, D.D. Breeding insect-pollinated crops. P. 19-24. In: **The indispensable Pollinators**. A report of the 9<sup>th</sup> Polination Conf. Miss. Publ. 127. Ark. Agric. Exp. Stn. Fayetteville, AR. 1970.

SCHUSTER, I.; VIEIRA, E.S.N.; SANTANA, H.; SINHORAT, D.; SILVA, R.B.; OLIVEIRA, M.A.R. Fluxo gênico em soja na Região Oeste do Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 4, p. 515-520, 2007.

SEDIYAMA, T.; CARDOSO, A.A.; VIEIRA, C.; ANDRADE, D. Taxa de hibridação natural em soja, em Viçosa e em Capinópolis, Minas Gerais. **Revista Ceres**, v.2, p.329-331, 1970.

VERNETTI, F.J.; BONATO, E.R.; TERESAWA, F.; GASTAL, M.F.C. Observações sobre a taxa de cruzamentos naturais em soja, em Pelotas e Sertão, RS e Ponta Grossa, PR. **Ciência e Cultura**, v.1, n.24, p.36-41, 1972.

## ANEXO I



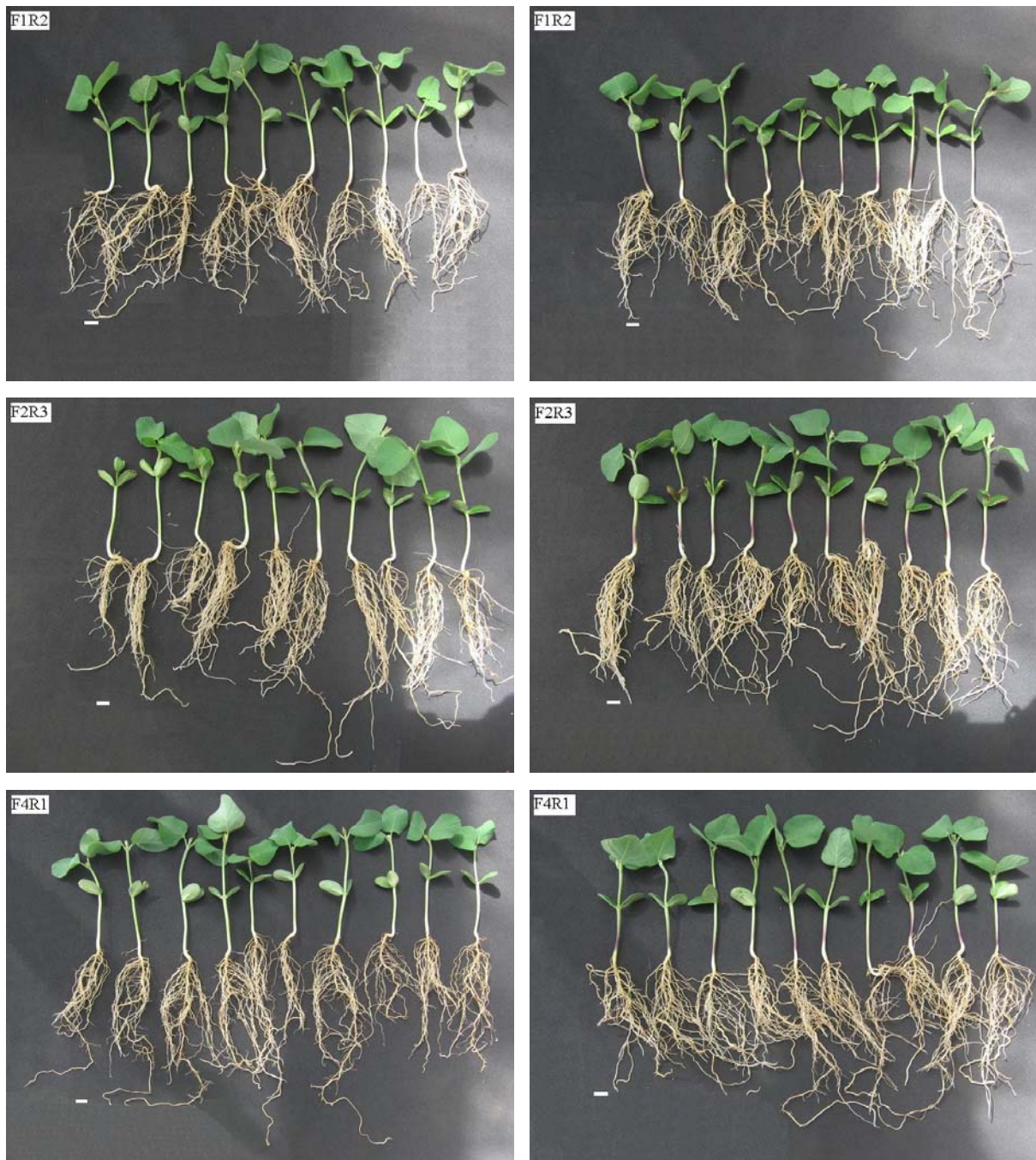
Em destaque, a segregação para a cor do hipocótilo observada na geração  $F_2$  ( $\sigma^{\text{CD217}} \times \text{CD219}^{\text{f}} \text{f}$ ). A partir do experimento montado em campo, as plantas com flor roxa e pubescência marrom foram coletadas e suas sementes semeadas em leito de areia. Dez dias depois, foi possível realizar a leitura da cor dos hipocótilos: roxo ou verde. Em cada figura, a progênie segregante das plantas coletadas na fileira 1, bloco 1 (A), fileira 1, bloco 3 (B), fileira 1, bloco 4 (C), fileira 2, bloco 1 (D), fileira 2, bloco 3 (E), e, fileira 2, bloco 4 (F). Chaves vermelhas e brancas limitam os grupos de plântulas com hipocótilos roxos e verdes, respectivamente. Fotografias tiradas pelo autor, 2009.

## ANEXO II



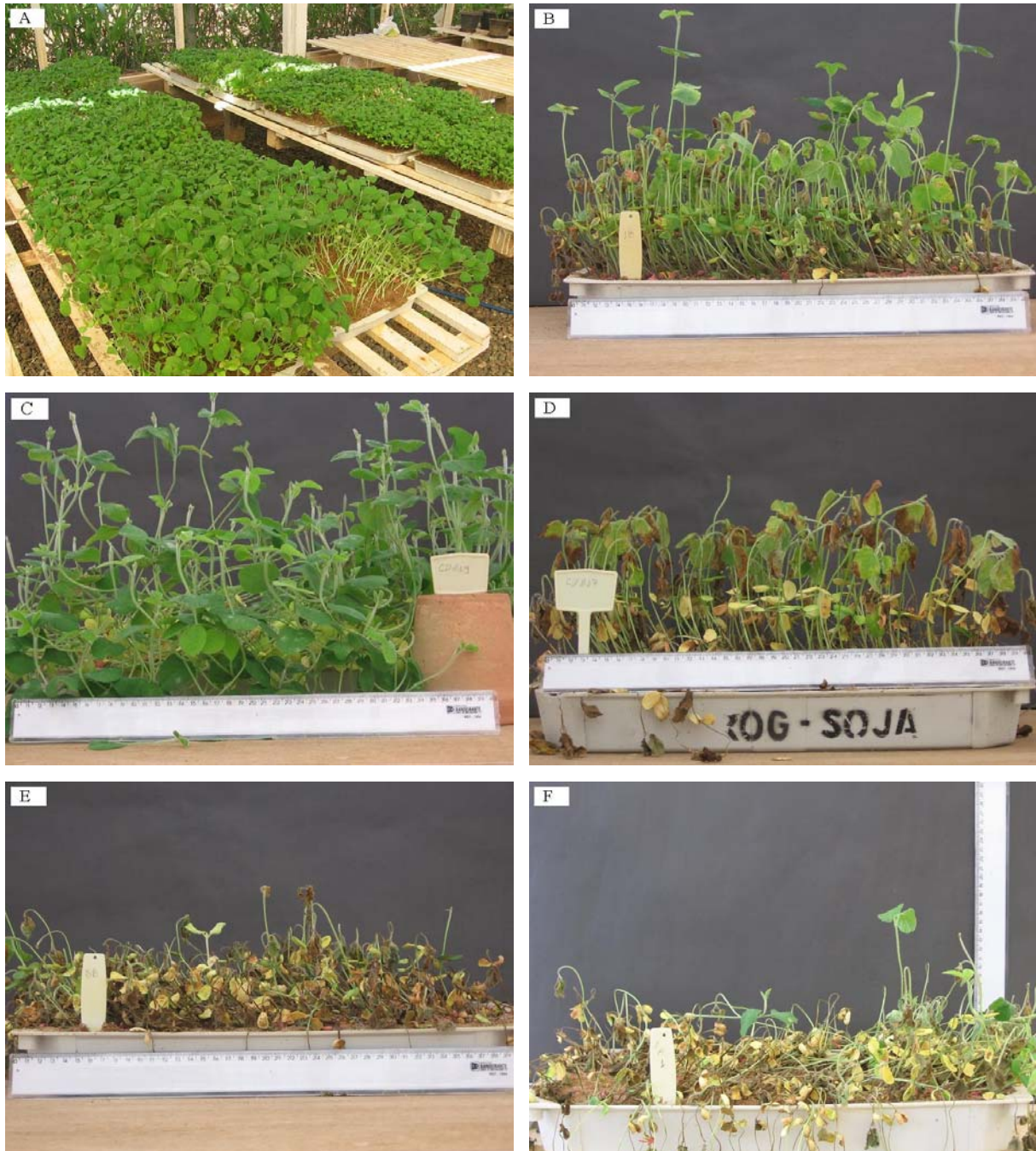
Em destaque, as cores, preta do hilo e marrom da pubescência, apresentadas pelas plantas consideradas híbridas ( $\sigma^7$ CD217 x  $\text{CD219}\text{f}$ ) no ensaio de verificação da cor do hipocótilo em casa de vegetação. Plântula com hipocótilo roxo neste ensaio foi transplantada para vaso contendo solo e teve suas vagens e sementes coletadas ao final do ciclo. A cor marrom da vagem corrobora para a condição híbrida e a cor do hilo é uma herança materna. As sementes foram semeadas em leito de areia para confirmação de sua condição híbrida via segregação (3:1) na geração  $F_2$  para a cor do hipocótilo (ANEXO IV). Letras *F* e *R* indicam qual fileira e bloco da cultivar CD219, respectivamente, tal plântula foi observada. Fotografias tiradas pelo autor, 2010.

## ANEXO III



Em destaque, segregação para a cor do hipocótilo observada na geração  $F_2$  ( $\sigma^{\text{CD217}} \times \text{CD219}^{\text{f}}_{\text{f}}$ ). A partir do experimento montado em casa de vegetação, as plântulas com hipocótilo roxo foram transferidas para vasos contendo solo, onde ao final do ciclo, tiveram suas sementes coletadas e semeadas em leito de areia na expectativa de segregação. Dez dias depois, foi possível realizar a leitura da cor dos hipocótilos: roxo ou verde. À esquerda, plântulas com hipocótilos verdes, à direita, plântulas com hipocótilos roxos. O local onde a plântula progenitora da família foi encontrada no experimento encontra-se no canto superior esquerdo de cada figura, a saber, fileira 1, bloco 2, fileira 2, bloco 3, e fileira 4, bloco 1. Fotografias tiradas pelo autor, 2010.

## ANEXO IV



Diferentes estágios do experimento para identificação de híbridos ( $\sigma^{\text{CD219}} \times \text{CD217}^{\text{f}}$ ) na progênie da cultivar CD217, por meio do ensaio de pulverização das plantas com o herbicida glifosato em casa de vegetação. A) Plântulas com 12 dias; ponto de aplicação do herbicida glifosato; B) Sete dias após a aplicação do herbicida; secagem das plântulas sensíveis; C) Expectativa para a morfologia das plântulas tolerantes ao glifosato; controle experimental; D) Expectativa para a morfologia das plântulas sensíveis ao glifosato; controle experimental; E) Parcela experimental sem nenhuma planta tolerante; F) Parcela experimental com algumas plantas tolerantes ao herbicida. Fotografias tiradas pelo autor, 2009.