

MARIA HELOISA MORENO JULIÃO

**FLUXO GÊNICO EM CITROS GENETICAMENTE MODIFICADOS EM ÁREAS DE
LIBERAÇÃO PLANEJADA NO MEIO AMBIENTE**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara, para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia
Vegetal

Orientador: Prof. Dr. Nelson Arno Wulff
Coorientadora: Dr^a. Eliane Cristina Locali

Araraquara
2024

J94f

Julião, Maria Heloisa Moreno

Fluxo gênico em citros geneticamente modificados em áreas de liberação planejada no meio ambiente / Maria Heloisa Moreno Julião. -- Araraquara, 2024

109 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara

Orientador: Nelson Arno Wulff

Coorientadora: Eliane Cristina Locali

1. Plantas transgênicas. 2. Cítricos. 3. Biossegurança. 4. Agricultura - Legislação. 5. Frutas cítricas - Pesquisa. I. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

A avaliação do fluxo gênico (FG) em citros geneticamente modificados (GM) valida a eficácia do uso de bordaduras como medida de contenção do FG e fomenta a segurança alimentar e ambiental na citricultura. A pesquisa demonstrou a superioridade de polinização do citrandarin e a limitação da ocorrência de FG entre laranjeiras doce, principalmente devido às características de apomixia facultativa e autocompatibilidade. Além disso, esses resultados podem apoiar a futura liberação de cultivo comercial de citros GM, oferecendo soluções para pragas, doenças e desafios climáticos que impactam o setor citrícola, ao mesmo tempo em que combinam inovação tecnológica com práticas agrícolas sustentáveis.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

The evaluation of gene flow (GF) in genetically modified (GM) citrus validates the effectiveness of borders as a measure to contain GF, thus promoting food and environmental safety in citriculture. The research demonstrated the superiority of citrandarin pollination and showed limited GF occurrence between sweet oranges, primarily due to their facultative apomixis and self-compatibility traits. In addition, these findings may support the future release of commercial GM citrus crops, offering solutions to pests, diseases and climatic challenges in the citrus sector, while combining technological innovation with sustainable agricultural practices.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Fluxo gênico em citros geneticamente modificados em áreas de liberação planejada no meio ambiente"

AUTORA: MARIA HELOISA MORENO JULIÃO

ORIENTADOR: NELSON ARNO WULFF

COORDINADORA: ELIANE CRISTINA LOCALI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. NELSON ARNO WULFF (Participação Presencial)

Departamento Científico, Departamento de Pesquisa & Desenvolvimento / Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS) - Araraquara/SP

Dr. LEANDRO ANTONIO PEÑA GARCIA (Participação Presencial)

Instituto Universitario Mixto de Biología Molecular y Celular de Plantas / UPV - Espanha

Dr. FRANCISCO JOSÉ LIMA ARAGÃO (Participação Presencial)

Laboratório de Expressão de Genes / Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia - EMBRAPA - Brasília, DF

Prof. Dr. JESUS APARECIDO FERRO (Participação Presencial)

Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental / FCAV UNESP Jaboticabal

Pesquisador Dr. PAULO HENRIQUE MÜLLER DA SILVA (Participação Presencial)

Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF) / Piracicaba/SP

Araraquara, 21 de novembro de 2024

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO	
	MARIA HELOISA MORENO JULIÃO 29/01/1997
Nacionalidade	Brasileira
Nome em citações bibliográficas:	Julião, Maria Heloisa Moreno Julião, MHM.
Endereço profissional	Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Campus de Araraquara Rua Francisco Degni, 55 Quitandinha, Araraquara – SP CEP 14800-900 Telefone: (16) 3301-9500
Currículo Lattes	http://lattes.cnpq.br/8492563054460761
ORCID	https://orcid.org/0000-0002-2604-404X
Outro identificador	https://www.linkedin.com/in/mhmjuliao/
FORMAÇÃO ACADÊMICA	
2014/2017	Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD.
2018/2020	Mestrado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP.
PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA	
SILVA, SAURA R.; MORAES, ANA PAULA; PENHA, HELEN A.; JULIÃO, MARIA H. M.; DOMINGUES, DOUGLAS S.; MICHAEL, TODD P.; MIRANDA, VITOR F. O.; VARANI, ALESSANDRO M. The Terrestrial carnivorous plant <i>Utricularia reniformis</i> sheds light on environmental and life-form genome plasticity. International Journal of Molecular Sciences , v. 21, p. 3, 2020.	

FERRASA, A.; MURATA, M. M.; COFRE, T. D. C. G.; PERON, G.; CAVALLINI, J. S.; JULIAO, M. H. M.; BELASQUE JR, J.; FERREIRA, H.; FERRO, M. I. T.; LEITE JR., R. P.; PENHA, HELEN A.; CARVALHO, F. M. S.; VARANI, ALESSANDRO M.; HERAI, R.H.; FERRO, JESUS A. CitrusKB: a comprehensive knowledge base for transcriptome and interactome of *Citrus* spp. infected by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* at different infection stages. **Database-The Journal of Biological Databases and Curation**, v. 2020, p. 1-11, 2020.

JULIÃO, MARIA H. M.; SILVA, SAURA R.; FERRO, JESUS A.; VARANI, ALESSANDRO M. A Genomic and transcriptomic overview of MATE, ABC, and MFS transporters in *Citrus sinensis* Interaction with *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Plants**, v. 9, p. 794, 2020.

PARTICIPAÇÃO EM BANCAS E ORIENTAÇÕES

Bancas de trabalhos de conclusão

PENHA, H.A; VIEIRA, F.C.F.; JULIÃO, M.H.M. Participação em banca de Felipe Pereira de Matos. **Screening de biblioteca de mutantes de *Xanthomonas citri* pv. *Aurantifolii* patótipo C para genes relacionados à patogenicidade e virulência.** 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2021.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

9º Encontro Bienal de Biossegurança, 2023, (Vitória - ES). Avaliação da eficácia da bordadura de biossegurança preconizada na RN Nº 10 para LMPA de citros geneticamente modificados. Apresentação de poster.

VII Simpósio Mastercitrus, 2023 (Araraquara – SP). Participação no evento.

67th Brazilian Congress of Genetics, 2023 (Natal - RN). Pollen competition and polyembryony in sweet orange drastically reduce the pollen-mediated transgenic flow. Apresentação de poster.

6TH International Meeting on Plant Breeding - "Understanding The Plant-Microbe Interaction To Innovative Plant Breeding". 2022 (Piracicaba – SP, *online*). Participação no evento.

XVI Curso de Inverno em Genética, 2022, (Jaboticabal - SP). Mini-curso: Extração, quantificação e análise de ácidos nucleicos de diferentes materiais. 2022.

Dedico este trabalho a todos os que mergulham na busca pela verdade e na disseminação de informações precisas, especialmente sobre temas científicos que impactam a vida de todos nós. Que este trabalho possa ser uma singela contribuição para a construção de uma sociedade curiosa, crítica e bem informada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço de todo o meu coração a Deus, à minha família e a todos os que contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente ao meu companheiro de vida e maior incentivador, Tiago. Obrigada por trazer alegria à essa jornada com tanto bom humor e com o sorriso mais lindo do mundo. Seu apoio, compreensão e carinho foram mais do que essenciais. Sem você, eu não teria chegado até aqui.

À Cacauzinha, por todos os lambeijos de incentivo, por trazer ainda mais amor ao nosso lar e por alegrar os meus dias, me fazer companhia e entender (mesmo reclamando com rosnados) as minhas ausências nas brincadeiras e passeios.

Aos meus pais, Adailto e Helena, ao meu irmão Gui e à minha cunhada Dani, à minha prima-irmã, amiga e companheira de todos os momentos, Ariely, ao Sr. Carlos, Eliane, Bruno e Paulinha e toda a família Santos, Moreno e Julião: vocês são os meus maiores presentes. Obrigada pelo apoio incondicional, por estarem comigo em cada detalhe mesmo de longe e por todas as orações. Amo vocês!

Aos meus vizinhos que se tornaram a minha segunda família: Sérgio, Alê, Dona Maga e Gabriel e, Dani e Marko. Obrigada por estarem sempre conosco, pela preocupação, carinho e cuidados. Que sorte a minha ter vocês!

Ao Fundecitrus, pela oportunidade de conduzir o presente trabalho e por disponibilizar todos os recursos necessários para que o mesmo fosse realizado da melhor maneira possível, e a todos os funcionários, o meu “muito obrigada!”.

Ao Nelson e Eliane, pelo apoio, confiança e direcionamento. Vocês me ensinaram muito e sou extremamente grata pelos ensinamentos e pela amizade construída. Que sorte poder trabalhar com profissionais inspiradores como vocês!

Aos companheiros de equipe, Jaci, Tati e Afrânio, meu eterno agradecimento e admiração por vocês. Obrigada por combinarem bom humor com excelência e o melhor ritmo de trabalho possível. Equipe de milhões!

Aos queridos parceiros de vários e vários dias de semeadura e coletas na estufa, obrigada pela paciência e alegria de sempre: André, Anélio, Caio, Thiago, Eliabe, Zé, Sr. Rogério, Miguel. Vocês são fenomenais!

À Tami, obrigada por me recepcionar tão bem no Fundecitrus e me auxiliar desde o primeiro até o último dia de trabalho. Obrigada por sua energia tão boa e por tornar a vida mais leve.

À Mi, Tami, Moni, Bia e Josi, é difícil expressar em poucas palavras o quanto vocês se tornaram importantes na minha vida profissional e pessoal. Obrigada pelos cafés, pela parceria, suporte e por tantas boas memórias construídas. Foi uma honra poder trabalharmos juntas!

À dupla mais querida do Fundecitrus, Josi e Jane, obrigada por cuidarem de nós e do laboratório com tanto cuidado. Josinha, obrigada pelos abraços e injeções de ânimo diárias!

Aos queridos colegas que tornaram o dia a dia muito mais alegre e ofereceram total suporte para a realização deste trabalho, Elaine, Sidney, Deividson, Jean, Dani Coletti, Dani Runho, Luana, Lê, Mateus, Matheus, Vanessa, Letícia, Pedro e Juan. Juan, agradeço também o enorme apoio com as análises dos dados!

Aos que me acolheram todos os dias, sendo os primeiros a desejar um “bom dia, Helô!” com um grande sorriso no rosto: Regen, Sr. Pereira, Flaviana, Adriano, Pri e Gabi.

À minha mais querida amiga e melhor arquiteta do Brasil, Carol, obrigada pelos 22 anos de amizade, pelo apoio incondicional e pelos podcasts semanais que aquecem e confortam o coração. Obrigada pelas orações, por me incentivar nos desafios e celebrar cada conquista comigo. Amo muito você!

Aos amigos da Lemma e Synova, obrigada por me apoiarem nessa jornada e por fazerem parte dessa história de uma forma tão bonita. Vocês moram no meu coração!

Ao Jesus Ferro e Leandro Peña, pelas valiosas contribuições realizadas no processo de qualificação.

Ao Prof. Saulo, Wennia, Rafael e todos os colaboradores do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, agradeço imensamente o suporte e atenção.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de pesquisa (processo 403604/2020-6).

RESUMO

A engenharia genética é uma tecnologia com potencial para promover competitividade e sustentabilidade das culturas e possibilita adicionar, por meio de transformação genética, características como resistência a doenças e pragas e/ou tolerância a variações ambientais na citricultura. Para garantir a biossegurança de plantas geneticamente modificadas (GM), a análise de risco inclui a avaliação da movimentação e introgressão de genes da população GM na população não-GM (fluxo gênico, FG). Para minimizar o FG, barreiras físicas e genéticas são empregadas em áreas de liberação planejada no meio ambiente (LPMA) de citros GM como medidas de contenção e monitoramento do fluxo transgênico. Os experimentos foram conduzidos em quatro áreas de LPMA, com bordadura de plantas não GM compostas por duas linhas de citrandarin, duas de tangerineira Clemenules e duas de laranja doce 'Pera', dispostas excentricamente ao redor da área de plantas GM, conforme a Resolução Normativa N° 10 de 02/10/2013 da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. O FG foi avaliado em progênies de Clemenules e laranja doce 'Pera' de bordadura e em Clemenules e laranjeiras doces 'Pera', 'Valencia' e 'Pineapple' localizadas na área interna às bordaduras (plantas controle) a partir da identificação molecular do gene marcador de seleção *npftII*, presente nas plantas GM. O FG médio nas plantas de bordadura foi de 5,34% em Clemenules e de 0,31% em laranja doce 'Pera', enquanto nas plantas controle foi de 26,06% em Clemenules e 7,45% em laranjeiras doces. As características de apomixia facultativa e autocompatibilidade atuaram como barreiras genéticas relevantes para suprimir o FG em laranjeiras doces. Além disso, foi evidenciada a superior capacidade de fecundação do genótipo citrandarin em relação aos genótipos GM em condições de polinização aberta. O citrandarin H3 apresentou o maior percentual de grãos de pólen viáveis *in vitro* ($79,7 \pm 8,0\%$). Em polinização controlada com pólen de laranja doce GM e citrandarin H3, este foi identificado como parental predominante. Ademais, a distância entre as plantas receptoras de pólen e as plantas de citrandarin influenciou o FG, que tende a diminuir com a redução da distância ao genótipo superpolinizador. Em conjunto, os resultados mostram a dinâmica do FG em áreas de LMPA de citros GM, nas quais as barreiras físicas e genéticas impostas foram eficientes na limitação da dispersão do pólen GM. Esses achados podem orientar políticas de

regulamentação e servir de fundamentação para futura liberação comercial de citros GM.

Palavras-chave: fluxo gênico mediado por pólen; transgene; estratégias de contenção; superpolinizador; citros geneticamente modificados.

ABSTRACT

Genetic engineering is a technology with the potential to enhance the competitiveness and sustainability of crops. By enabling the introduction of traits such as resistance to diseases and pests or tolerance to environmental stresses, genetic transformation offers a powerful tool for citrus improvement. To ensure the biosafety of genetically modified (GM) plants, risk assessment includes evaluating of gene flow (GF) – the movement and introgression of genes from GM populations into non-GM population. To minimize GF, physical and genetic barriers are implemented in “planned environmental release areas” (LPMA) for GM citrus, acting as containment measures and ensuring monitoring of transgene flow. Experiments were carried out in four LPMA, with non-GM border plants consisting of two rows of citrandarin, two of Clemenules mandarin and two of Pera sweet orange. These plants were eccentrically arranged around the GM plot, in accordance with Normative Resolution N° 10 of October 2, 2013 from the National Technical Biosafety Commission. GF was assessed in progenies from the Clemenules and ‘Pera’ sweet orange border plants, and well as in control plants Clemenules and ‘Pera’, ‘Valencia’ and ‘Pineapple’ sweet oranges within the border area. Transgene flow was monitored by identifying the presence of the selection marker gene *nptII*, which is present in GM plants. The average GF in border plants was 5.34% for Clemenules and 0.31% for ‘Pera’. In the control plants, GF rates were higher, with 26.06% in Clemenules and 7.45% in sweet oranges. The facultative apomixis and self-compatibility traits of sweet orange served as important genetic barriers, significantly reducing GF. Additionally, citrandarin exhibit superior pollen fertilization capacity under open pollination conditions. Citrandarin H3 had the highest percentage of viable pollen grains ($79.7 \pm 8.0\%$). When sweet orange flowers were pollinated with GM and citrandarin pollens, the latter was the predominant parental source. Distance was a critical factor in GF dynamics. The GF rate increased as the distance between pollen-receiving plants and citrandarin plants increased. These findings highlight the effectiveness of physical and genetic barriers in limiting the dispersion of GM pollen in citrus LPMA and provide guidance for regulatory policies, supporting the potential for the future commercial release of GM citrus.

Keywords: pollen-mediated gene flow; transgene; containment strategies; super-pollinator; genetically modified citrus.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Flores de tangerineira (*Citrus reticulata*): (A e B) flor única, (C) ovário fertilizado, (D) órgão sexual feminino (pistilo); An: antera, Fi: filamento: Pe: pétalas, Ov: ovário, Ne: néctar, Sti: estigma, Sty: estilete.33
- Figura 2.** Micrografias de microscopia eletrônica de varredura de pólen de citros. Macroreticulado tipo II em seções equatorial e polar: (A-C) *C. reshni*, (D-F) *C. sinensis* ‘Moro’, (G- I) *C. volkameriana*. Microreticulado tipo III em seções equatorial e polar: (J- L) *C. reticulata* Clementina. Perfurado tipo IV em seções equatorial e polar: (M-O) *C. deliciosa*. Barras de escala: (A, B, D, E, G, H, J, K, M, N): 5 µm, (C, F, I, L, O): 2 µm.34
- Figura 3.** Variação da temperatura do ar (°C; em vermelho), umidade relativa (%; em rosa) e precipitação (mm; em azul) em estação meteorológica localizada na Unidade Operativa de A) Santa Cruz do Rio Pardo – SP, experimento 2, no período de julho de 2018 a julho de 2020 e B) Ibaté – SP, próxima aos experimentos 1, 3 e 6, no período de julho de 2019 a julho de 2023.39
- Figura 4.** Representação esquemática da área de LPMA localizada na Unidade Operativa de Ibaté - SP que abrange os experimentos A) 1, 3 e 6, e detalhes do B) experimento 1, C) experimento 6 e D) experimento 3. Citrandarin acesso 1600 do Centro de Citricultura Sylvio Moreira utilizado no experimento 1 e acesso H3 do Instituto Valenciano de Investigações Agrárias nos experimentos 3 e 6. O sistema de bordaduras foi disposto segundo a RN Nº 10 da CTNBio.40
- Figura 5.** Representação esquemática do experimento 2, área de LPMA localizada na Unidade Operativa de Santa Cruz do Rio Pardo - SP. Citrandarin acesso H3 do Instituto Valenciano de Investigações Agrárias. O sistema de bordaduras foi disposto segundo a RN Nº 10 da CTNBio.41
- Figura 6.** Representação esquemática da distância entre linhas de plantio (6,5 m) e entre plantas da mesma linha (2,5 m) nas áreas de LPMA do Fundecitrus.42
- Figura 7.** Representação esquemática da disposição das plantas nas bordaduras dos experimentos 1, 2, 3 e 6 do Fundecitrus (áreas de LPMA de citros GM, sob a RN Nº 10 da CTNBio) e descrição dos genótipos utilizados nas bordaduras.43
- Figura 8.** Representação esquemática ilustrando a disposição dos grupos de plantas nos experimentos, com destaque para as bordaduras interna e externa de cada

genótipo amostrado na avaliação do fluxo gênico e para a área com plantas geneticamente modificadas (GM) e plantas controle (não GM).	44
Figura 9. Representação esquemática da disposição das plantas de Clemenules controle amostradas para avaliação de FG no experimento 1, localizadas a 6,5 m, 13,0 m e 19,5 m das plantas de citrandarin e adjacentes às plantas GM (ruas 20, 21 e 22, respectivamente). Área de LPMA sob RN Nº 10 da CTNBio na Unidade Operativa de Ibaté - SP.	47
Figura 10. Representação esquemática da disposição das plantas de Clemenules controle amostradas para avaliação de FG no experimento 2. Área de LPMA sob RN Nº 10 da CTNBio na Unidade Operativa de Santa Cruz do Rio Pardo - SP.....	48
Figura 11. Representação esquemática da disposição das plantas de laranja doce controle (variedades 'Pera', 'Valencia' e 'Pineapple') no experimento 3. Área de LPMA sob a RN Nº 10 da CTNBio na Unidade Operativa de Ibaté - SP.	49
Figura 12. Folhas com característica a) trifoliolada e b) monofoliolada de plântulas aos 120 dias após a semeadura (progênes de tangerineira Clemenules de polinização aberta do experimento 3, área de LPMA sob a RN Nº 10 da CTNBio).	50
Figura 13. Detecção do transgene <i>nptII</i> em progênes de plantas de Clemenules. Cada ponto representa o percentual de <i>nptII</i> detectado em progênes de uma mesma planta, nos experimentos 1 (E1), 2 (E2), 3 (E3) e 6 (E6), áreas de LPMA sob a RN Nº 10, nas safras 2018 a 2021 (ano da colheita dos frutos), na Unidade Operativa de Ibaté - SP (E1, E3 e E6) e de Santa Cruz do Rio Pardo (E6). Em azul: plantas localizadas na bordadura externa (a 13,0 m das plantas de citrandarin); em verde: plantas localizadas na bordadura interna (a 6,5 m das plantas de citrandarin).....	56
Figura 14. Fluxo gênico (%) em função da distância entre linhas (m) entre plantas de Clemenules controle e plantas de citrandarin.....	59
Figura 15. Representação esquemática da localização das plantas de Clemenules controle do experimento 2, área de LPMA sob a RN Nº 10 da CTNBio na Unidade Operativa de Santa Cruz do Rio Pardo - SP, nas safras 2018/19 e 2019/20 e respectivos percentuais de fluxo gênico (FG). O número de amostras avaliadas para a presença do transgene foi de 1.034 (safra 2018/19) e 402 (safra 2019/20).....	60
Figura 16. Representação esquemática da localização das plantas de laranjeiras doces controle dados de FG (%) no experimento 3, área de LPMA sob RN Nº 10 da CTNBio na Unidade Operativa de Ibaté - SP. GM: geneticamente modificada, FGMP: Fluxo gênico mediado por pólen.	62

Figura 17. Trifoliolados (%) em progênies de Clemenules de A) bordadura e B) controle. No experimento 1, os dados de plantas controle estão exibidos de acordo com a localização das plantas: 6,5 m, 13,0 m e 19,5 m entre linhas de plantio das plantas de citrandarin (Ruas 22, 21 e 20, respectivamente). No experimento 2, os dados de plantas controle não foram estratificados (Geral). No experimento 1: citrandarin acesso 1600 Centro de Citricultura Sylvio Moreira. Nos experimentos 2, 3 e 6: citrandarin acesso H3 Instituto Valenciano de Investigações Agrárias.	78
Figura 18. Correlação entre os dados de paternidade atribuída ao citrandarin via análise fenotípica (%) e combinação dos resultados das análises fenotípica e genotípica (via análise de marcadores moleculares microssatélites; %). Cada ponto representa o resultado por planta de Clemenules de bordadura e controle amostradas no experimento 1, área de LPMA sob RN Nº 10 da CTNBio na Unidade Operativa de Ibaté - SP. Citrandarin acesso 1600 do Centro de Citricultura Sylvio Moreira. $P < 0,001$ para todos os conjuntos de dados.....	80
Figura 19. Grãos de pólen de citrandarin H3, laranjeira doce ‘Pera’ não GM e laranjeira doce ‘Pera’ de eventos GM (GM1 e GM2). Grãos de pólen viáveis são corados e apresentam bordas completas, enquanto grãos de pólen inviáveis não são corados e apresentam degeneração.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Informações das Áreas de Liberação Planejada no Meio Ambiente (LPMAs): tamanho da área, número de plantas e coordenadas geográficas de quatro pontos.	38
Tabela 2. Idade das plantas de bordadura nas safras em que ocorreram as avaliações de fluxo gênico.	45
Tabela 3. Safras de avaliação e genótipos amostrados para verificação de fluxo gênico.....	45
Tabela 4. Dados de amostragem em plantas de tangerineira Clemenules de bordadura: número de plantas amostradas, frutos coletados, sementes extraídas e média de sementes por fruto.....	54
Tabela 5. Fluxo gênico (%) em plantas de tangerineira Clemenules de bordadura..	55
Tabela 6. Dados de sementes de laranjeira doce ‘Pera’ de bordadura do experimento 3 (área de liberação planejada no meio ambiente na Unidade Operativa de Ibaté - SP): número de sementes, plântulas germinadas por semente e percentual de poliembrionia.....	57
Tabela 7. Dados de fluxo gênico em plantas de laranjeira doce ‘Pera’ de bordadura do experimento 3 (área de liberação planejada no meio ambiente na Unidade Operativa de Ibaté - SP).....	57
Tabela 8. Dados de amostragem em plantas de tangerineira Clemenules controle dos experimentos 1 e 2 (áreas de liberação planejada no meio ambiente): número de plantas amostradas, frutos coletados, sementes extraídas e média de sementes por fruto.	58
Tabela 9. Fluxo do transgene (%) em plantas de Clemenules controle do experimento 1 (área de liberação planejada no meio ambiente na Unidade Operativa de Ibaté - SP) nas safras 2017/18 a 2020/21.....	58
Tabela 10. Dados de amostragem em plantas de laranjeiras doces controle do experimento 3 (área de liberação planejada no meio ambiente na Unidade Operativa de Ibaté - SP): número de plantas amostradas, frutos coletados, sementes extraídas e média de sementes por fruto.....	61
Tabela 11. Dados de sementes de laranjeiras doces controle do experimento 3 (área de liberação planejada no meio ambiente na Unidade Operativa de Ibaté - SP): número de sementes, de plântulas germinadas por semente e percentual de poliembrionia.	61

Tabela 12. Fluxo gênico em plantas de laranjeiras doces controle do experimento 3 (área de liberação planejada no meio ambiente na Unidade Operativa de Ibaté - SP).	62
Tabela 13. Dados de fluxo gênico em plantas de Clemenules e laranjeiras doces de bordadura e controle: total de plantas amostradas, plântulas germinadas, amostras positivas para o transgene (<i>nptII</i>), fluxo gênico por planta (mínimo e máximo) e fluxo gênico médio por genótipo e tratamento, nos experimentos 1, 2, 3 e 6, em todas as safras avaliadas.	63
Tabela 14. Atribuição de paternidade para plântulas monofolioladas oriundas de sementes de Clemenules controle e de bordadura do experimento 1 (área de liberação planejada no meio ambiente na Unidade Operativa de Ibaté - SP) via genotipagem por marcadores moleculares microssatélites.....	79
Tabela 15. Viabilidade (%) e germinação (%) <i>in vitro</i> de grãos de pólen de citros. ..	81
Tabela 16. Resultados de polinização controlada em plantas receptoras Clemenules e laranjeira doce 'Pera' no experimento 3 na área de LPMA sob RN Nº 10 da CTNBio na Unidade Operativa de Ibaté.....	82

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Dados de literatura para taxas de fluxo gênico mediado por pólen entre plantas geneticamente modificadas (GM) e não GM.	26
Quadro 2. Especificações dos iniciadores utilizados nas PCRs para genotipagem por marcadores moleculares microssatélites.....	52
Quadro 3. Alelos (pb) esperados para os marcadores moleculares microssatélites em genótipos de citros potencialmente doadores de pólen.	53
Quadro 4. Genótipos doadores de pólen utilizados em análises <i>in vitro</i> e em polinização controlada.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CTNBio	Comissão Técnica Nacional em Biossegurança
DAS	Dias após a semeadura
FG	Fluxo gênico
FGMP	Fluxo gênico mediado por pólen
<i>g</i>	Força centrífuga
GM	Geneticamente modificado
h	Horas
ha	Hectares
LPMA	Liberação planejada no meio ambiente
m	Metros
mM	Milimolar
NOS	Nopalina sintase de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>npfl</i>	Neomicina fosfotransferase tipo II de <i>A. tumefaciens</i>
OGM	Organismo geneticamente modificado
RN N° 10	Resolução Normativa N° 10 de 02/10/2013 da CTNBio
RN N° 30	Resolução Normativa N° 30 de 16/09/2020 da CTNBio
s	Segundo
SAD69	<i>South American Datum</i>
SPF	Semente por fruto
SSR	<i>Simple Sequence Repeat</i>
UTM	Universal Transversa de Mercator

LISTA DE SÍMBOLOS

μ	Micro
$\pm$	Mais ou menos
$\geq$	Maior ou igual
$^{\circ}$	Graus

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO 1. A BIOTECNOLOGIA NA CITRICULTURA E O FLUXO GÊNICO DE PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS (GM) PARA PLANTAS NÃO GM....	23
1.1 OS DESAFIOS DA CITRICULTURA E A BIOTECNOLOGIA.....	23
1.2 FLUXO GÊNICO EM PLANTAS.....	24
1.3 CONTEXTO REGULATÓRIO E AVALIAÇÕES DE RISCO.....	29
1.4 ESTRATÉGIAS DE CONTENÇÃO DO FLUXO GÊNICO	31
1.5 SISTEMA REPRODUTIVO DOS CITROS E IMPLICAÇÕES PARA O FLUXO GÊNICO.....	32
2 CAPÍTULO 2. FLUXO GÊNICO DE CITROS GM PARA CITROS NÃO GM DE BORDADURA E PLANTAS CONTROLE.....	36
2.1 INTRODUÇÃO.....	36
2.2 OBJETIVOS.....	37
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
2.3.1 Áreas experimentais e genótipos.....	37
2.3.2 Sistema de bordaduras.....	43
2.3.3 Coleta de frutos e extração de sementes.....	44
2.3.4 Análise fenotípica.....	50
2.3.5 Análises moleculares	51
2.3.5.1 <i>Extração de DNA</i>	51
2.3.5.2 <i>Reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction – PCR)</i>	51
2.3.5.3 <i>Avaliação por marcadores moleculares microssatélites (Simple Sequence Repeat - SSR)</i>	52
2.3.6 Análise dos dados.....	53
2.4 RESULTADOS	54
2.4.1 Fluxo do transgene para plantas de bordadura: tangerineira Clemenules e laranjeira doce ‘Pera’	54
2.4.1.1 <i>Fluxo do transgene para tangerineira Clemenules de bordadura</i>	54
2.4.1.2 <i>Fluxo do transgene para laranjeira doce ‘Pera’ de bordadura</i> ...	56
2.4.2 Fluxo do transgene para plantas controle: tangerineira Clemenules e laranjeiras doces ‘Pera’, ‘Valencia’ e ‘Pineapple’	57

2.4.2.1 Fluxo do transgene para tangerineira Clemenules controle.....	57
2.4.2.2 Fluxo do transgene para laranjeiras doces controle	60
2.4.2.3 Fluxo do transgene: comparativo geral.....	62
2.5 DISCUSSÃO	64
2.5.1 Fluxo do transgene para plantas de bordaduras: tangerineira Clemenules e laranja doce ‘Pera’ não GM.....	64
2.5.1.1 Fluxo do transgene para tangerineira Clemenules de bordadura	64
2.5.1.2 Fluxo do transgene para laranjeiras doces ‘Pera’ de bordadura..	67
2.5.2 Fluxo do transgene para plantas GM controle: tangerineira Clemenules e laranjeiras doces ‘Pera’, ‘Valencia’ e Pineapple.....	68
2.5.2.1 Fluxo do transgene para tangerineira Clemenules controle.....	68
2.5.2.2 Fluxo do transgene para laranjeiras doces controle	69
2.6 CONCLUSÕES	71
3 CAPÍTULO 3. POTENCIAL DE POLINIZAÇÃO DO GENÓTIPO SUPERPOLINIZADOR CITRANDARIN EM BORDADURA DE LIBERAÇÃO PLANEJADO NO MEIO AMBIENTE	72
3.1 INTRODUÇÃO.....	72
3.2 OBJETIVOS.....	73
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS	73
3.3.1 Potencial de polinização do citrandarin em polinização aberta.....	73
3.3.1.1 Áreas experimentais e genótipos, sistema de bordaduras, coleta de frutos e extração de sementes, análise fenotípica e análises moleculares.....	73
3.3.1.2 Análise dos dados	74
3.3.2 Potencial de polinização do citrandarin em polinização controlada	75
3.3.2.1 Obtenção e preparo do pólen	75
3.3.3.2 Viabilidade de pólen in vitro	76
3.3.3.3 Germinação de pólen in vitro.....	76
3.3.3.4 Polinização controlada.....	77
3.4 RESULTADOS	77
3.4.1 Potencial de polinização do citrandarin em polinização aberta.....	77
3.4.2 Potencial de polinização do citrandarin em polinização controlada	80
3.4.2.1 Germinação e viabilidade de pólen in vitro	80
3.4.2.2 Polinização controlada.....	81

3.5 DISCUSSÃO	82
3.5.1 Potencial de polinização do citrandarin em polinização aberta	82
3.5.2 Potencial de polinização do citrandarin em polinização controlada	84
3.5.2.1 Germinação e viabilidade de pólen <i>in vitro</i>	84
3.5.2.2 Polinização controlada	85
3.6 CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS	88
APÊNDICE A	97

1. CAPÍTULO 1. A BIOTECNOLOGIA NA CITRICULTURA E O FLUXO GÊNICO DE PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS (GM) PARA PLANTAS NÃO GM

1.1 OS DESAFIOS DA CITRICULTURA E A BIOTECNOLOGIA

Os citros são uma das culturas frutíferas mais populares e amplamente cultivadas no mundo, totalizando mais de 140 países produtores. O setor citrícola é diversificado e contempla uma ampla variedade de produtos, processos e mercados em sua cadeia produtiva. Além da fruta fresca e do suco, óleo e ácido cítrico são produzidos a partir de frutas cítricas, enquanto os subprodutos são utilizados principalmente como ração animal. As plantas são cultivadas em áreas de variados tamanhos, desde pequenas propriedades até extensas áreas agrícolas. As laranjas constituem mais de 50% da produção global de citros e representam mais de 40% das exportações mundiais de frutas cítricas (FAO 2024).

A citricultura é altamente relevante para o agronegócio brasileiro, em especial para o mercado externo. Os cítricos foram introduzidos no Brasil no início do século XVI, e atualmente, o Brasil é o principal produtor de laranjas doce do mundo e responsável por cerca de 75% das exportações mundiais de suco de laranja. Estima-se que a área plantada de citros no Brasil seja superior a 650 mil hectares e a produção seja de 15,3 milhões de toneladas, correspondendo a cerca de 70% da produção global de laranja (USDA 2024). O cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro compõe a principal região da citricultura brasileira, onde 168,5 milhões de árvores produtivas ocuparam uma área de 336.267 hectares na safra 2023/24 e totalizaram uma produção de 232,4 milhões de caixas (40,8 kg) de laranja (Fundecitrus 2024).

As plantas cítricas, perenes e com múltiplas floradas ao longo de uma safra, são suscetíveis às variações climáticas e à incidência de pragas e doenças, o que pode comprometer o volume de produção e a qualidade dos frutos (USDA 2024). Os desafios fitossanitários são crescentes e a principal ameaça à citricultura, o *greening*, tem tornado o manejo dos pomares cada vez mais complexo e oneroso (Bassanezi et al. 2020), especialmente após o desenvolvimento de resistência do inseto vetor da doença (*Diaphorina citri*) a inseticidas de grupos químicos com modo de ação distintos (Tiwari et al. 2011;

Grupo Cultivar de Publicações, 2023).

Nesse sentido, o uso da biotecnologia na geração de plantas geneticamente modificadas (GM) pode representar uma solução para as adversidades enfrentadas na citricultura. O emprego da transgenia oferece vantagens sobre os métodos convencionais de melhoramento genético, face à possibilidade de (i) introduzir características de interesse via transferência de genes entre organismos relacionados ou não, (ii) reduzir o tempo de obtenção de uma variedade em determinados casos e (iii) mitigar os efeitos da heterozigotidade dos cruzamentos sexuais. A transgenia tem potencial para gerar soluções genéticas como variedades resistentes a doenças e pragas, bem como de melhor qualidade nutricional do suco de laranja (Pons et al. 2011; Santos 2019). Portanto, a biotecnologia pode contribuir para a sustentabilidade da produção citrícola e para a competitividade do setor (Germanà et al. 2020).

1.2 FLUXO GÊNICO EM PLANTAS

A evolução biológica é um processo dinâmico impulsionado, dentre outros fatores, pela movimentação e estabelecimento de genes e alelos entre populações ou espécies. O fluxo gênico (FG) é constituído por mecanismos que resultam no movimento de material genético de uma população para outra (Slatkin 1985), o qual ocorre em processos reprodutivos entre populações (FG vertical) ou independente de processos reprodutivos, entre organismos que não estão diretamente relacionados filogeneticamente (FG horizontal) (Ellstrand 2003).

Em plantas, o FG pode ser mediado por pólen (FGMP), por disseminação de sementes ou de propágulos vegetativos. No contexto de fluxo de transgenes mediado por pólen de plantas GM, as plantas receptoras de pólen podem ser as suas plantas não GM correspondentes, plantas daninhas da mesma espécie ou de espécies selvagens relacionadas (Lu 2008). No caso de plantas cítricas, as plantas receptoras de pólen restringem-se aos cultivos de citros não GM. Cabe destacar que os cítricos são exóticos no continente Americano.

O FGMP é determinado principalmente pela biologia da polinização das espécies vegetais, das taxas de cruzamento e da competição por fertilização de pólen entre doadores e receptores. Condições físicas ou ambientais, como distâncias entre plantas doadoras e receptoras de pólen, temperatura e umidade

do ar também exercem grande impacto sobre o FGMP (Hüsken et al. 2010). Em espécies cuja polinização cruzada é mediada por insetos polinizadores, a frequência de visitas e a intensidade da atividade dos insetos pode impactar a extensão do FG, conforme verificado no algodoeiro (Van Deynze et al. 2005) e em árvores neotropicais (Ward et al. 2005).

No contexto da biossegurança de cultivos de plantas transgênicas, o FG é considerado um elemento primordial (Hüsken et al. 2010) que pode ser mensurado em progênies de plantas não GM a partir da identificação molecular do(s) transgene(s) ou de forma indireta via análises com marcadores fenotípicos. A detecção do FG entre plantas GM e plantas não GM foi descrita na literatura para várias espécies (Quadro 1).

Quadro 1. Dados de literatura para taxas de fluxo gênico mediado por pólen entre plantas geneticamente modificadas (GM) e não GM.				
Espécie	Nome popular	Resumo da Condição experimental	Fluxo Gênico	Referência
Sistema de reprodução principal: polinização cruzada				
<i>Agrostis stolonifera</i>	Agrostis	Vias espaçadas 1,6 km na direção norte-sul e 0,8 km na direção leste-oeste. 76 plantas localizadas a favor do vento	0,0% a 54%	(Watrud et al. 2004)
<i>Agrostis stolonifera</i>	Agrostis	Áreas de acesso público e ao longo dos canais e valas, áreas privadas	0,0 a 2,73%	(Zapiola e Mallory-Smith 2017)
<i>Prunus domestica</i> (ameixa)	Ameixa	De 132 a 854 m distantes das parcelas não GM	Ocorreu em 4 de 11 anos e em 0,31% das sementes analisadas	(Scorza et al. 2013)
<i>Carthamus tinctorius</i>	Cártamo	Área GM central e plantas controle localizadas entre 0 a 100 m	0,48 a 1,67% entre 0 e 3 m e de 0,002 a 0,03% entre 50 e 100 m.	(McPherson et al. 2009)
<i>Eucalyptus urophylla</i> × <i>E. grandis</i>	Eucalipto	Área GM ao centro e plantas não GM a diferentes distâncias e direções ao redor da área	0 a 1,5% até 857 m e 0% em distâncias maiores	(Da Silva e Abrahão 2021)
<i>Paspalum notatum</i>	Gramma-bahia	De 0,5 a 3,5 m à fontes de pólen GM	0,03% em plantas diploide e 0,17% em plantas tetraploides	(Sandhu et al. 2010)
<i>Sweet orange, Citrus sinensis</i> × <i>Poncirus trifoliata</i> e <i>Citrus</i> × <i>aurantiifolia</i>	Laranja doce, lima e citrange	Área GM ao centro e plantas receptoras autoincompatíveis não GM ao redor da área	0,17 a 2,86%	(Pons et al. 2011)
<i>Carica papaya</i>	Mamão	Plantas não GM adjacentes à duas ou quatro plantas GM	1,3% em plantas hermafroditas e 67,4% em plantas femininas	(Gonsalves et al. 2012)
<i>Carica papaya</i>	Mamão	Sementes de plantas silvestres não GM em regiões que cultivam mamão GM	16% dos frutos de plantas femininas continham ao menos uma semente GM; 0% em plantas hermafroditas	(Manshardt et al. 2016)
<i>Zea mays</i>	Milho	Campos comerciais de milho GM à distâncias variadas de áreas de refúgio não GM	0,56% a 40 m, 0,83% a 100 m e 0,13% a 330 m	(Galeano et al. 2010)
<i>Panicum virgatum</i>	Panicum	Uma parcela de fonte de pólen e detecção de fluxo gênico nas quatro direções cardeais, estendendo-se a 20, 30, 50 e 100 m.	79,2% a 10 m 9,3% a 100 m	(Millwood 2019)

Quadro 1. Dados de literatura para taxas de fluxo gênico mediado por pólen entre plantas geneticamente modificadas (GM) e não GM.				
Espécie	Nome popular	Resumo da Condição experimental	Fluxo Gênico	Referência
Sistema de reprodução principal: autopolinização				
<i>Gossypium hirsutum</i>	Algodão	Área central de 40 x 40 m de plantas GM circundado por plantas não GM, totalizando 4 ha e uma área central de 20 x 100 m de plantas GM circundado por plantas não GM, totalizando 4,8 ha	0 a 0,64% a 1 m de 0 a 0,98% a 10 m e de 0 a 0,16% a 25 m	(Loureiro et al. 2016)
<i>Gossypium hirsutum</i>	Algodão	Área experimental de monocultura de algodão e uma área de cultivo misto que inclui culturas polinizadas por abelhas, como pomares, melões e sementes de alfafa	7,65% a 0,3m, inferior a 1% a 9 m e 0,04% a 1625 m	(Van Deynze et al. 2005)
<i>Gossypium hirsutum</i>	Algodão	Uma parcela GM no centro de um plantio não GM	10,13% a 1 m e 0,08% a 50 m	(Zhang et al. 2005)
<i>Gossypium hirsutum</i>	Algodão	Área retangular de plantas GM circundado por área de plantas não GM, em estufa	1,04% a 14,38% a depender do inseto polinizador	(Yan et al. 2015)
<i>Oryza sativa</i>	Arroz	Parcelas circulares, com plantas a 1 m de distância do núcleo central de plantas GM.	Inferior a 0,1% em plantas adjacentes e no máximo 0,53% em disposições circulares	(Messeguer et al. 2001)
<i>Oryza sativa</i> , <i>O. sativa f. spontanea</i> e <i>O. rufipogon</i>	Arroz	Duas condições de campo imitando a ocorrência natural de arroz selvagem na Ásia.	0,011% a 0,046% para <i>O. sativa f. spontanea</i> e 1,21% a 2,19% para <i>O. rufipogon</i>	(Chen 2004)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Arabidopsis	Área GM ao centro e sete linhas de plantas não GM dispostas em cruz	0 a 0,078% a 0,5 m	(Tan et al. 2005)
<i>Brassica napus</i>	Canola	Campos comerciais em quatro regiões edafoclimáticas	1,4% em plantas adjacentes 0,04% em 400 m	(Beckie e Warwick 2010)
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Feijão comum	Plantas não GM ao redor de uma parcela central cultivada com a linhagem GM em dez blocos	0,007% a 2,5 m e 0% a 6,5 m	(Faria et al. 2010)
<i>Linum usitatissimum</i>	Linhaça	Quatro locais compostos por plantas doadoras e receptoras	1,85% a 0,1 m, 0,13% a 3 m e 0,003% a 35 m	(Jhala et al. 2011)
<i>Capsicum annuum</i>	Pimenta	Área de plantas GM (5m x 5m) circundada por 4 linhas (20 m) de plantas não GM a leste e a oeste e uma área de 3 blocos (7 x 8 m) de plantas GM e 6 blocos de plantas não GM	0,17% a 6,19%	(Kim et al. 2009)

Quadro 1. Dados de literatura para taxas de fluxo gênico mediado por pólen entre plantas geneticamente modificadas (GM) e não GM.				
Espécie	Nome popular	Resumo da Condição experimental	Fluxo Gênico	Referência
Sistema de reprodução principal: autopolinização				
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Repolho	Área de 9 x 5 m com blocos intercalados de plantas GM e não GM	19,70%	(Kim et al. 2014)
<i>Glycine max</i>	Soja	Área de plantas GM circundada por 4 áreas de plantas não GM, nas direções cardeais	0,52% a 1 m, 0,01% a 9 m e 0,00% a 10 m	(Abud et al. 2003)
<i>Triticum aestivum</i>	Trigo	Distâncias de 0.2 a 2760 m de uma fonte central de plantas GM	0,005% a 300 m e inferior a 0.5% nas demais distâncias	(Matus-Cádiz et al. 2004)
<i>Triticum aestivum</i>	Trigo	Distâncias de 0 a 11.8 km de áreas comerciais com plantas GM	Inferior a 0,01%	(Matus-Cádiz et al. 2007)
<i>Triticum aestivum</i>	Trigo	Distâncias de 0,5 a 2,5 m de uma fonte central de doadores de pólen GM	3,4% a 0,03%	(Rieben et al. 2011)
× <i>Triticosecale Wittmack</i>	Triticale	Área GM ao centro (20 x 20 m) circundada por 120 x 120 m de plantas não GM	3,4% em plantas adjacentes a plantas GM e 0,09% a 50 m	(Kavanagh et al. 2012)

1.3 CONTEXTO REGULATÓRIO E AVALIAÇÕES DE RISCO

A transferência de genes entre plantas GM e não GM torna-se possível quando estas coexistem em uma mesma área geográfica. Em avaliações de risco de FG em citros GM, cabe considerar que as sementes de frutas cítricas não são consumidas deliberadamente por humanos, embora as sementes de laranjeiras doce sejam consumidas por animais (majoritariamente o javali) (Peris et al. 2019).

No entanto, para as laranjeiras doce, há dependência da intervenção humana para a propagação e persistência das plantas cítricas no ambiente, o que reduz as possibilidades de propagação adventícia de plantas de sementes transgênicas. Além disso, praticamente não há espécies cítricas selvagens simpátricas e parentes nas áreas de produção de citros no mundo, exceto no Leste Asiático, o que impede que as plantas transgênicas se tornem populações selvagens (Talon et al. 2020). A presença de embriões zigóticos GM em sementes de frutos de plantas não GM pode ter implicações sobre a comercialização das frutas e sobre a aceitação dos consumidores (Ellstrand 2003, 2014).

Em caso de efetivo fluxo não intencional do transgene, outros fatores podem influenciar a estabilidade e a herança do caráter transgênico, como a estrutura genética das populações de plantas, a compatibilidade genética entre as variedades, a taxa de recombinação genética, a natureza do transgene e a forma como ele é integrado no genoma da planta (Ellstrand 2003, 2014).

Os aspectos relativos ao FG devem estar contemplados em processos de solicitação de liberação de plantas transgênicas para cultivo comercial, nas quais avaliações de risco de plantas GM devem ser apresentadas às agências regulatórias, de acordo com as particularidades de cada país. As características gerais das avaliações de risco requeridas no Brasil, União Europeia e Estados Unidos estão descritas a seguir.

No Brasil, as avaliações das plantas transgênicas ocorrem nos âmbitos de saúde humana e animal, assim como ambiental e da própria planta GM. O Brasil é signatário do Protocolo de Cartagena, o qual estabelece a aplicação do princípio da precaução a produtos GM e novas tecnologias, além de princípios gerais de biossegurança para a manipulação, transporte e uso de OGMs (Convention on Biological Diversity 2024). A legislação nacional sobre

biossegurança em vigor é a Lei nº 11.105/2005, cujos dispositivos são regulados pelo Decreto nº 5.591, de 22 de novembro de 2005 (BRASIL 2005, 2013). A Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), instância colegiada multidisciplinar de caráter consultivo e deliberativo, é o órgão responsável por implementar o Protocolo de Cartagena no país, por estabelecer normas técnicas de segurança e autorizar a condução de atividades que envolvam pesquisa e uso comercial de OGMs no território nacional (BRASIL 2005). As plantas GM são inicialmente avaliadas em ensaios experimentais em áreas de liberação planejada no meio ambiente (LPMA), cujos dados são compilados em um dossiê de liberação comercial que deve ser submetido e avaliado pela CTNBio. Em caso de parecer técnico favorável, a comercialização pode ocorrer (Comissão Técnica Nacional em Biossegurança 2024).

O processo ocorre de maneira similar nos Estados Unidos, cujo requerente deve fornecer informações sobre a biologia da planta receptora, dados e publicações experimentais, descrições genotípicas e fenotípicas da planta GM, bem como relatórios de testes de campo, entre outros. A agência avalia uma variedade de questões, incluindo o potencial de risco das plantas GM, a expressão de produtos gênicos, novas enzimas ou alterações no metabolismo da planta, a presença de plantas daninhas e o impacto sobre plantas sexualmente compatíveis, práticas agrícolas ou de cultivo; efeitos sobre organismos não alvo e o potencial de transferência de genes para outros tipos de organismos (USDA-APHIS 2024).

Na União Europeia, a análise de risco ambiental de OGMs da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) deve abordar sete áreas principais: (i) persistência e invasividade da planta GM, ou seus parentais compatíveis, incluindo transferência de genes de planta para planta; (ii) transferência de genes de planta para micro-organismo; (iii) interação da planta GM com organismos alvo e (iv) não alvo; (v) impacto das técnicas específicas de cultivo, manejo e colheita; incluindo consideração dos sistemas de produção e do(s) ambiente(s) receptor(es); (vi) efeitos sobre os processos biogeoquímicos e (vii) efeitos sobre a saúde humana e animal (EFSA Panel 2011).

Embora não haja eventos de citros GM liberados para uso comercial, duas instituições de pesquisa desenvolvem estudos com citros GM em áreas de LPMA no Brasil, o Fundecitrus (Fundo de Defesa da Citricultura) e o Instituto

Agrônomo de Campinas/Centro de Citricultura Sylvio Moreira (Comissão Técnica Nacional em Biossegurança 2024). Os primeiros ensaios de LPMAs de citros GM com efetivo florescimento foram conduzidos pelo Fundecitrus e estão sob o crivo da Resolução Normativa N° 10 de 02/10/2013 (RN N° 10) (BRASIL 2013), cujas plantas GM foram geneticamente transformadas com os objetivos de desenvolver plantas resistentes à doenças (pinta preta, cancro cítrico), mais resistentes à podridão pós-colheita, com maior emissão de cariofileno para repelência do inseto vetor do *greening*, além de frutos com maior conteúdo e biodisponibilidade de carotenoides e antocianinas (Fundecitrus, dados não publicados), implantados no campo entre 2013 e 2019.

A RN N° 10 estabelece o uso de três tipos de bordaduras de plantas compostas por duas linhas de cultivo não GM cada, sendo genótipo: i) polinizador, citrandarin, ii) receptor de pólen autoincompatível e monoembriônico (como a Clemenules) e iii) no mínimo, duas linhas de cultivo de uma variedade de laranja doce (*Citrus × sinensis* (L.) Osbeck) não GM (BRASIL 2013). O sistema de bordaduras com genótipo polinizador não GM constitui uma barreira genética ao FG, baseada na superior capacidade de competição pela fertilização de pólen apresentada pelo citrandarin (superpolinizador) e na baixa compatibilidade reprodutiva das laranjeiras doce (BRASIL 2013; Sanches 2014). A RN N° 10 foi revogada pela Resolução Normativa N° 30 de 16/09/2020 (RN N° 30), a qual determina a utilização de três ou mais linhas de cultivo com genótipo poliembriônico não GM ao redor da área de citros GM, preferencialmente o citrandarin (BRASIL 2020).

1.4 ESTRATÉGIAS DE CONTENÇÃO DO FLUXO GÊNICO

O fluxo não intencional de transgenes de plantas GM para plantas não GM impulsionou a busca por estratégias eficazes de contenção do FG. Ao longo dos últimos anos, a compreensão dos mecanismos envolvidos no FG e o desenvolvimento de novas tecnologias permitiram analisar e aprimorar medidas de contenção genéticas, físicas e temporais para diferentes espécies e ambientes, de acordo com o nível de contenção desejado e as regulamentações em vigor.

Hüsken e colaboradores (2010) conduziram uma revisão acerca de medidas de contenção biológica do FG que foram testadas quanto à eficiência a

longo prazo em estufa ou a campo, incluindo a transformação de plastídeos, a excisão do transgene, a cleistogamia e a macho esterilidade citoplasmática. Embora os métodos de contenção biológica discutidos foram promissores na contenção do FG, atingindo níveis de 0,03% de FG com a estratégia de direcionamento do transgene para o genoma do cloroplasto em *Setaria italica*, nenhuma estratégia resultou em 100% de contenção do FG (Hüsken et al. 2010). A tecnologia de *Gene-Splitting Technology* surgiu como uma nova abordagem para a contenção do fluxo de transgenes, possibilitando uma redução de até 75% do fluxo de transgene em *Nicotiana tabacum* (Wang et al. 2014) e de aproximadamente 100% para plantas de arroz (Wang et al. 2020).

Nos casos em que o FG deve ser evitado completamente, são necessárias combinações de sistemas de contenção complementares, enquanto estratégias de contenção isoladas podem ser suficientes para possibilitar a coexistência de plantas GM e não GM (Hüsken et al. 2010).

Em espécies cítricas, a competição por pólen foi relatada como uma barreira reprodutiva para contenção do FG (Pons et al. 2011). A competição por pólen foi igualmente útil para conter a hibridização entre espécies estreitamente relacionadas em *Silene dioica* e *S. latifolia* (Rahmé et al. 2009) e para o controle da formação de híbridos entre *Helianthus annuus* e *H. petiolaris* (Rieseberg et al. 1995).

1.5 SISTEMA REPRODUTIVO DOS CITROS E IMPLICAÇÕES PARA O FLUXO GÊNICO

As particularidades do sistema reprodutivo dos citros podem influenciar diretamente o FG. As flores de citros são atrativas para os insetos polinizadores, principalmente para as abelhas. A morfologia floral favorece a polinização cruzada e, em determinados genótipos, existem fatores que previnem a autofecundação, como a autoincompatibilidade e a embrionia nucelar. Uma flor de espécie cítrica apresenta entre quatro e seis sépalas e pétalas, geralmente oito ou mais estames de longos filamentos, anteras com pólen amarelado, que se abrem ao longo de seu comprimento para liberar o pólen sobre o estigma pegajoso (Figura 1) (Gurung e Chettri 2022).

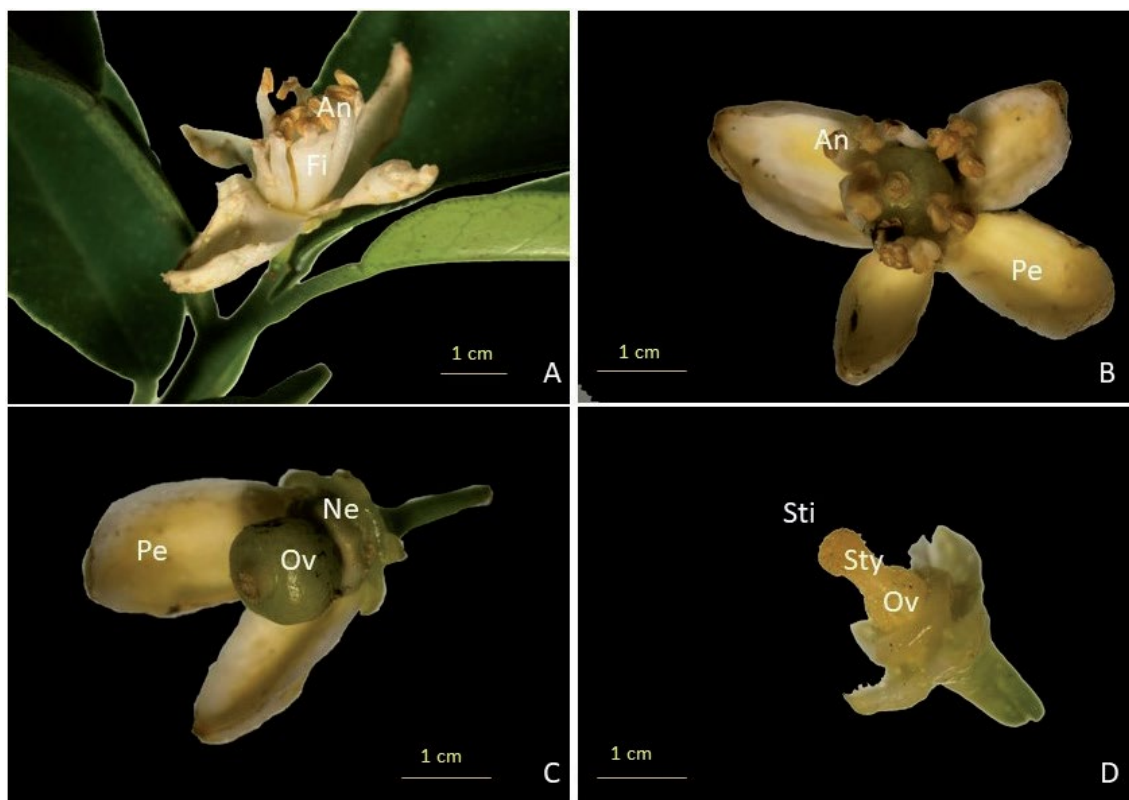


Figura 1. Flores de tangerineira (*Citrus reticulata*): (A e B) flor única, (C) ovário fertilizado, (D) órgão sexual feminino (pistilo); An: antera, Fi: filamento; Pe: pétalas, Ov: ovário, Ne: néctar, Sti: estigma, Sty: estilete.

Fonte: (Gurung e Chettri 2022).

O pólen dos citros é pesado e pegajoso e não é adaptado para a polinização pelo vento, sendo dependente do contato de partes da flor ou de polinizadores para que a polinização ocorra (Jackson e Futch 1997). A reprodução sexuada em espécies cítricas geneticamente compatíveis ocorre via autopolinização ou polinização cruzada, sendo a polinização cruzada realizada majoritariamente pela ação de insetos polinizadores (Moffett e Rodney 1971), principalmente pela abelha *Apis mellifera*, o polinizador mais frequentemente observado em laranjeiras doces (Malerbo-Souza et al. 2003, 2008; Malerbo-Souza 2010, 2013) e em limeira ácida 'Tahiti' (Malerbo-Souza 2010).

No processo de reprodução sexuada, o pólen é depositado na superfície pegajosa do estigma, germina e o tubo polínico se desenvolve, crescendo pelo interior do estilete até o ovário e, em um dos lóculos, ocorre a fertilização do óvulo, resultando na formação de uma semente (Vansell e Watkins 1942; Jackson e Futch 1997). A diversidade da morfologia do pólen de espécies cítricas está representada na Figura 2.

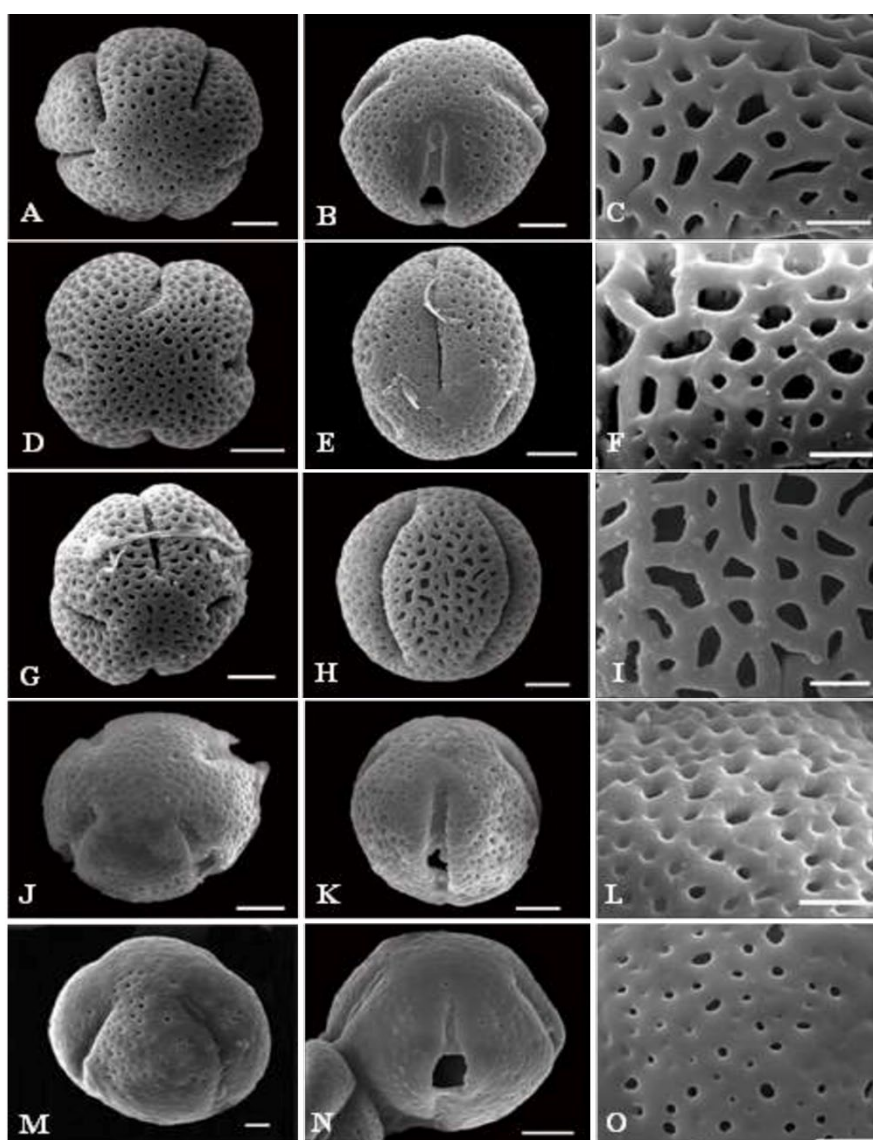


Figura 2. Micrografias de microscopia eletrônica de varredura de pólen de citros. Macroreticulado tipo II em seções equatorial e polar: (A-C) *C. reshni*, (D-F) *C. sinensis* 'Moro', (G- I) *C. volkameriana*. Microreticulado tipo III em seções equatorial e polar: (J-L) *C. reticulata* Clementina. Perfurado tipo IV em seções equatorial e polar: (M-O) *C. deliciosa*. Barras de escala: (A, B, D, E, G, H, J, K, M, N): 5 μ m, (C, F, I, L, O): 2 μ m.

Adaptado de: (AL-Anbari et al. 2015).

Ademais, as espécies cítricas podem se reproduzir assexuadamente devido à ocorrência de apomixia facultativa. Em consequência desta característica, podem ser formados embriões nucelares a partir de células maternas de óvulos maduros por sucessivas divisões mitóticas (adicionalmente aos embriões zigóticos de origem sexual), possibilitando a geração de descendentes geneticamente idênticos à planta mãe (Cameron et al. 1957; Koltunow et al. 1996; Aleza et al. 2010).

Dessa forma, em um contexto de coexistência de plantas cítricas GM e não GM, poderiam ser formados embriões não GM (nucelares ou sexuais) e embriões GM de origem sexual em sementes de frutos de plantas não GM. A posição do(s) embrião(ões) zigóticos e portanto, dos embriões GM na semente é menos favorável quanto à aquisição de nutrientes em comparação ao embrião(ões) nucelar(es) (Cameron et al. 1957; Koltunow et al. 1996; Aleza et al. 2010), o que pode impactar a germinação e o desenvolvimento dos embriões de origem sexual e, conseqüentemente, o fluxo do transgene. Diante da relevância das características reprodutivas dos citros, torna-se fundamental considerá-las nos contextos de avaliação e mitigação de FG.

2 CAPÍTULO 2. FLUXO GÊNICO DE CITROS GM PARA CITROS NÃO GM DE BORDADURA E PLANTAS CONTROLE

2.1 INTRODUÇÃO

A citricultura constitui um setor de grande relevância para a economia nacional. Entretanto, nos últimos anos, vem enfrentando uma série de desafios climáticos e fitossanitários que comprometem a produção e a qualidade dos frutos, impactando negativamente toda a cadeia citrícola (FAO 2024; Fundecitrus 2024; USDA 2024).

Elevadas temperaturas ($\geq 35\text{ }^{\circ}\text{C}$), por exemplo, podem causar abortamento e queda de frutos, influenciando diretamente a produção (Crestana et al. 2018). Sucessivas ondas de calor resultaram no comprometimento da segunda florada da última safra (2023/24) e causaram queda significativa dos frutos recém-formados (Fundecitrus 2024). Além das alterações climáticas, pragas e doenças afetam severamente a citricultura a nível global (Barbieri et al. 2023), sendo o *greening* o principal desafio da citricultura em todo o mundo (Bassanezi et al. 2020).

Para além da possibilidade de gerar soluções ao *greening*, a biotecnologia permite o desenvolvimento de variedades de citros com características de interesse via transgenia, como maior resistência a estresses, maior produtividade e frutos com maior qualidade nutricional, por exemplo, superando os desafios dos métodos convencionais de melhoramento genético (Germanà et al. 2020).

No entanto, a coexistência de citros GM e não GM possibilita o fluxo não intencional de transgenes para sementes de frutos não GM (Lu 2008). Nesse sentido, avaliações do FG e de outros aspectos relacionados à biossegurança, bem como avaliações de performance agrônômica de plantas GM, devem ser apresentadas em avaliações de risco submetidas às agências regulatórias em processos de liberação comercial de plantas transgênicas, de acordo com as particularidades de cada país.

Os experimentos com citros GM conduzidos pelo Fundecitrus estão sob o crivo da RN Nº 10 da CTNBio, a qual determina a utilização de um sistema de bordaduras ao redor da área experimental com plantas GM baseada na superior capacidade de competição pela fertilização de pólen apresentada pelo

citrandarin (superpolinizador) e na baixa compatibilidade reprodutiva das laranjeiras doce, constituindo uma barreira ao FG (Pons et al. 2011; BRASIL 2013; Sanches 2014).

Dessa forma, o presente trabalho objetiva avaliar a eficácia de bordaduras de plantas não GM como medida de contenção de FG preconizada na RN Nº 10 (BRASIL 2013), cujos resultados têm potencial para orientar aspectos regulatórios de uma futura liberação de cultivo comercial de citros GM.

2.2 OBJETIVOS

Avaliar o FG em plantas não GM de tangerineira Clemenules (*Citrus × clementina* hort. ex Tanaka; genótipo monoembriônico autoincompatível) e de laranjeira doce (*Citrus × sinensis*; genótipo poliembriônico autocompatível) sujeitas a polinização aberta, localizadas nas bordaduras (linhas interna e externa) e na área interna às bordaduras (plantas controle), em LPMA de citros GM.

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 Áreas experimentais e genótipos

O presente trabalho foi desenvolvido em quatro áreas de LPMA, instaladas e conduzidas de acordo com a RN Nº 10 da CTNBio, nomeadas de experimentos 1, 2, 3 e 6, localizadas nos municípios de Ibaté (experimento 1, 3 e 6) e Santa Cruz do Rio Pardo (experimento 2), ambos no estado de São Paulo. As coordenadas geográficas foram obtidas para quatro pontos de cada experimento utilizando o sistema de coordenada UTM (Universal Transversa de Mercator); SAD69 (*South American Datum*) (Tabela 1).

A classificação do clima das localidades é do tipo CWA (tropical de altitude com inverno seco) em Ibaté e CFA (Clima subtropical) em Santa Cruz do Rio Pardo (Köppen), enquanto o bioma predominante em Ibaté é o Cerrado e em Santa Cruz do Rio Pardo é a Mata Atlântica (IBGE 2024). A temperatura do ar, umidade relativa e precipitação foram registradas em estação meteorológica (EM) localizada na fazenda do experimento 2, nos períodos de julho de 2018 a julho de 2020 e na EM mais próxima ao experimento 1, 3 e 6 (aproximadamente

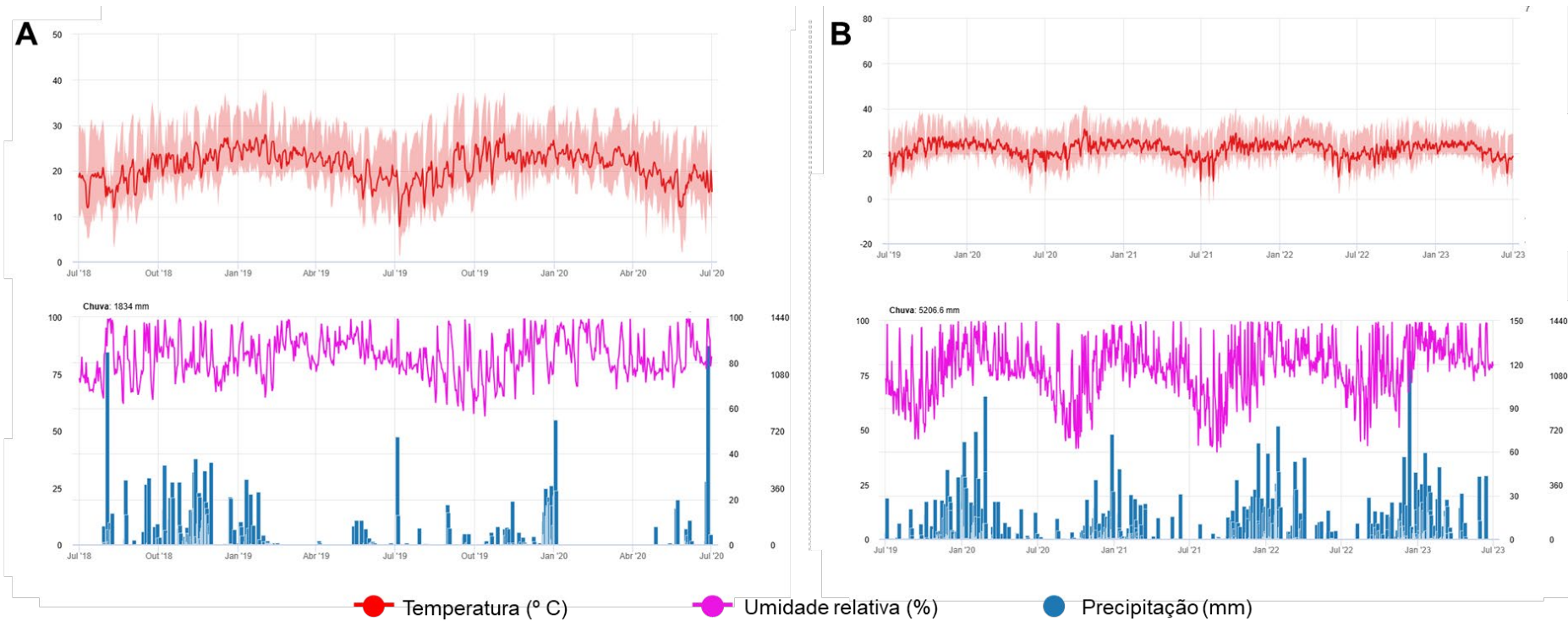
5 km de distância entre a EM e a área de LPMA), nos períodos de julho de 2019 a julho de 2023. Os dados diários de temperatura, umidade relativa e precipitação estão exibidos na Figura 3 e as médias mensais estão dispostas no Apêndice A - 3.

Tabela 1. Informações das Áreas de Liberação Planejada no Meio Ambiente (LPMAs): tamanho da área, número de plantas e coordenadas geográficas de quatro pontos.

Experimento	Tamanho da área (ha)	Total de plantas (GM/não GM)	Coordenadas Geográficas		
			Ponto	X	Y
1	3,29	2.025 (650/1.375)	1	796252,0006	7565209,5470
			2	796268,6031	7565010,2380
			3	796456,8744	7565205,4770
			4	796508,1463	7565045,7160
2	4,53	2.790 (1.590/1.200)	1	46793,2619	7467137,5344
			2	47059,9485	7466962,6400
			3	46974,0215	7466818,6330
			4	46708,2031	7466994,9826
3	4,23	1.932 (1.156/776)	1	796489,8710	7565047,7832
			2	796476,4880	7565203,2312
			3	796644,2161	7565062,0172
			4	796630,8331	7565217,4652
6	0,61	375 (165/210)	1	796456,8744	7565205,4770
			2	796494,2154	7565208,9270
			3	796470,8053	7565042,2660
			4	796508,1463	7565045,7160

Fonte: elaborada pelo Autor (2024).

As LPMAs foram implantadas em dezembro de 2013 (experimento 1), novembro de 2014 (experimento 2), janeiro de 2016 (experimento 3) e dezembro de 2019 (experimento 6). O experimento 6 originou-se a partir de uma reformulação da área dos experimentos 1 e 3 (adjacentes) e é constituído por plantas de bordadura anteriormente pertencentes ao experimento 3 (plantio em 2016) e por plantas GM e controle da área interna às bordaduras cujo plantio ocorreu em 2019. Com a implantação do experimento 6, os experimentos 3 e 6 tornaram-se adjacentes e circundados por plantas de bordadura (originalmente da bordadura do experimento 3) de mesma data de plantio (Figura 4). Os croquis experimentais, incluindo a representação da disposição das plantas amostradas para avaliação de FG, estão dispostos na Figura 4 e Figura 5, respectivamente.



1
2 **Figura 3.** Variação da temperatura do ar (°C; em vermelho), umidade relativa (%; em rosa) e precipitação (mm; em azul) em estação meteorológica localizada
3 na Unidade Operativa de A) Santa Cruz do Rio Pardo – SP, experimento 2, no período de julho de 2018 a julho de 2020 e B) Ibaté – SP, próxima aos
4 experimentos 1, 3 e 6, no período de julho de 2019 a julho de 2023.

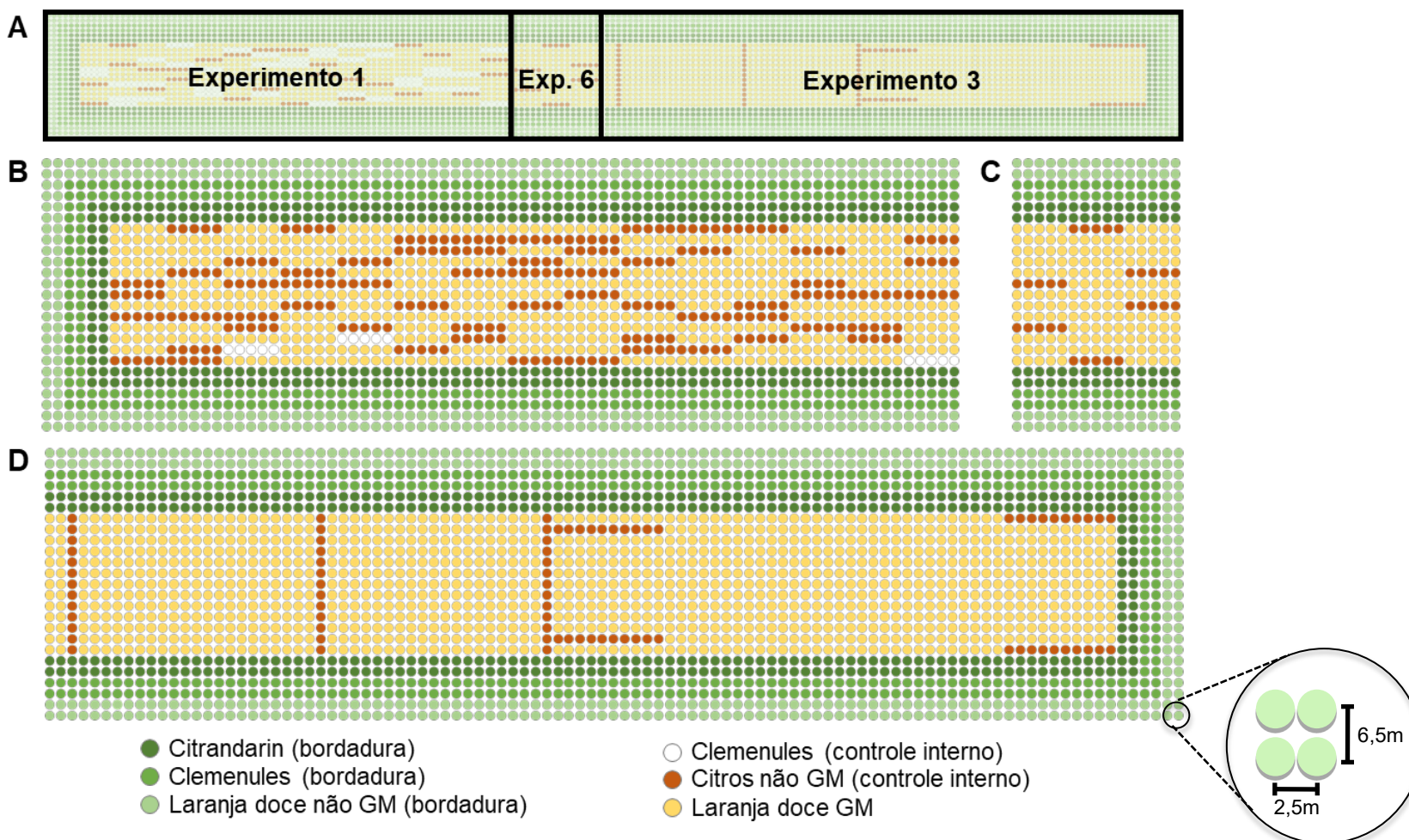


Figura 4. Representação esquemática da área de LPMA localizada na Unidade Operativa de Ibaté - SP que abrange os experimentos A) 1, 3 e 6, e detalhes do B) experimento 1, C) experimento 6 e D) experimento 3. Citrandarin acesso 1600 do Centro de Citricultura Sylvio Moreira utilizado no experimento 1 e acesso H3 do Instituto Valenciano de Investigações Agrárias nos experimentos 3 e 6. O sistema de bordaduras foi disposto segundo a RN Nº 10 da CTNBio.

Fonte: elaborada pelo Autor (2024).

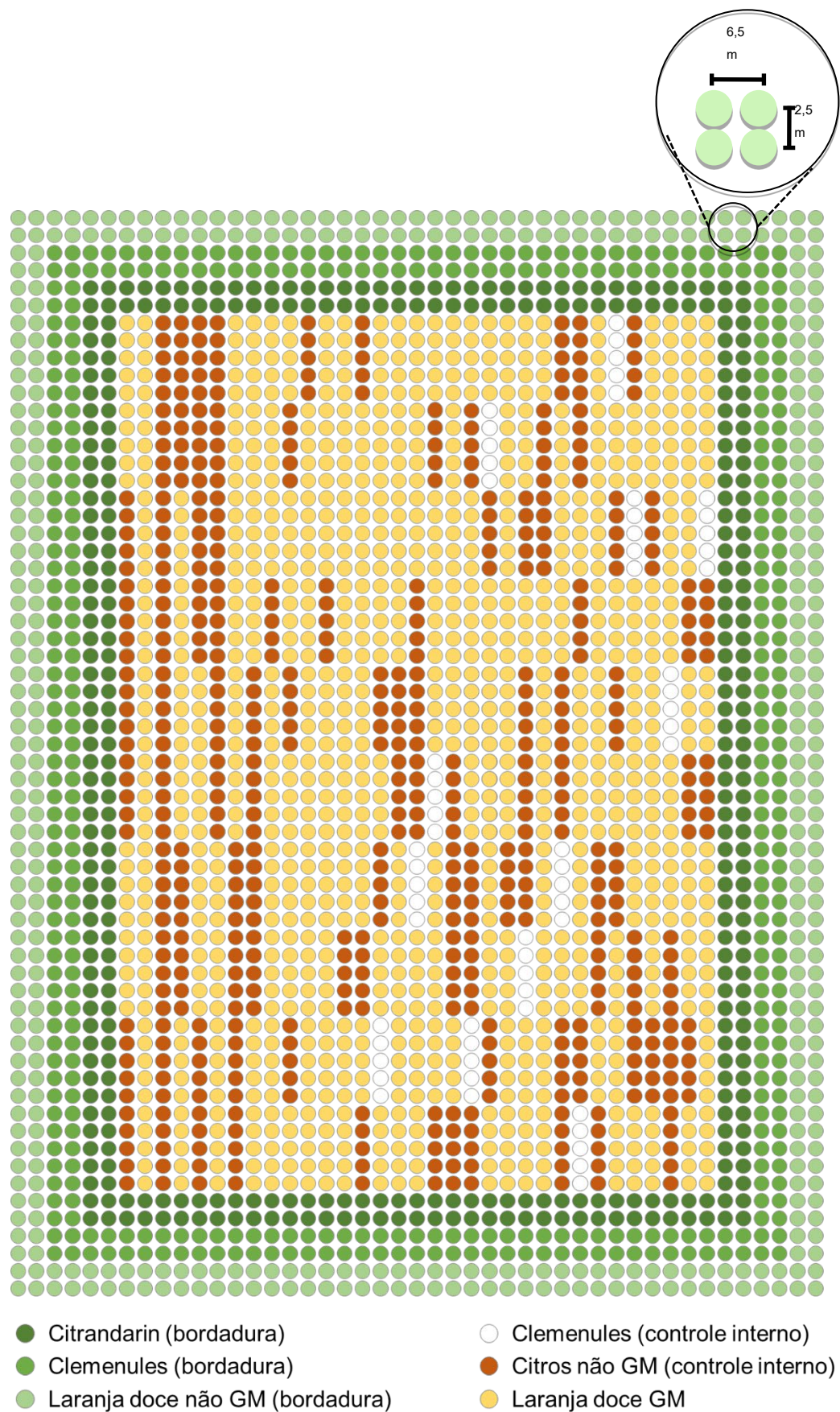


Figura 5. Representação esquemática do experimento 2, área de LPMA localizada na Unidade Operativa de Santa Cruz do Rio Pardo - SP. Citrandarin acesso H3 do Instituto Valenciano de Investigações Agrárias. O sistema de bordaduras foi disposto segundo a RN Nº 10 da CTNBio.

Fonte: elaborada pelo Autor (2024).

Os experimentos 1, 3 e 6 foram constituídos por 25 linhas de plantio (ruas) de plantas cada, com 81, 101 e 15 plantas/rua, respectivamente, enquanto o experimento 2 foi constituído por 45 linhas de plantas com 62 plantas/rua. Em todos os experimentos, o plantio ocorreu considerando a distância de 6,5 m entre ruas e 2,5 m entre plantas da mesma linha (615 plantas/ha) (Figura 6).

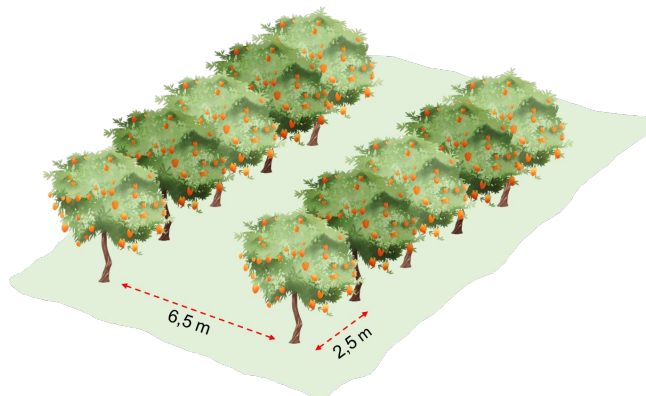


Figura 6. Representação esquemática da distância entre linhas de plantio (6,5 m) e entre plantas da mesma linha (2,5 m) nas áreas de LPMA do Fundecitrus.

Fonte: elaborada pelo Autor (2024).

Os genótipos utilizados como porta-enxerto foram o citrumeleiro Swingle (*Citrus paradisi* × *Poncirus trifoliata*) nos experimentos 1, 3 e 6 e o limoeiro cravo (*Citrus* × *limonia*) no experimento 2. Os genótipos utilizados como copa em plantas localizadas na área interna às bordaduras foram: I) experimento 1: laranjeiras doces (*Citrus* × *sinensis*) ‘Navelina’ (GM e não GM), ‘Pineapple’ (GM e não GM) e ‘Natal’ (não GM), laranja azeda (*Citrus* × *aurantium*) e lima ácida Tahiti (*Citrus latifolia* [Yu. Tanaka]; não GM); II) experimento 2: ‘Navelina’ (GM e não GM), ‘Pineapple’ (GM e não GM), ‘Natal’ (não GM), laranja azeda e lima ácida (não GM), ‘Pera’ e ‘Valencia’ (GM e não GM); III) experimento 3: ‘Pineapple’, ‘Pera’ e ‘Valencia’ (GM e não GM); IV) e experimento 6: ‘Pera’ e ‘Valencia’ (GM e não GM).

Os genótipos utilizados como copa em plantas localizadas nas bordaduras foram: I) citrandarin (*Citrus reshni* hort. ex Tanaka × *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) acesso 1600 (Centro de Citricultura Sylvio Moreira) no experimento 1; II) citrandarin (*Citrus reshni* hort. ex Tanaka × *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) acesso H3 (Instituto Valenciano de Investigações Agrárias) nos experimentos 2, 3 e 6, III) tangerineira Clemenules (*Citrus* × *clementina* hort. ex

Tanaka) em todos os experimentos e IV) laranjeira doce 'Pera' em todos os experimentos.

Os eventos das plantas GM presentes em cada área experimental estão descritos no Apêndice A - 1. Os eventos GM cujo gene marcador de seleção é o *nptII* (neomicina fosfotransferase tipo II, que confere resistência a antibióticos aminoglicosídeos) têm a expressão controlada por promotor constitutivo CaMV35S (do vírus do mosaico da couve-flor 35S) ou NOS (nopalina sintase) de *Agrobacterium tumefaciens* (Santos 2019; Alquezar et al., 2021; Pons et al., 2014).

2.3.2 Sistema de bordaduras

O sistema de bordaduras utilizado em todos os experimentos é composto por seis linhas de plantas não GM no total (disposto conforme a RN N° 10), sendo duas linhas de: I) citrandarin, genótipo superpolinizador capaz de competir eficazmente por fertilização com o pólen de laranjeiras doce; II) Clemenules, genótipo monoembriônico e autoincompatível, que permite o monitoramento do FG e III) laranjeira doce 'Pera', genótipo poliembriônico (no mínimo duas linhas) (Figura 7) (BRASIL 2013).

De forma a completar a área credenciada com Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB 130/00) das áreas experimentais, duas ou mais linhas extras de plantas de laranjeira doce 'Pera' foram dispostas ao redor das bordaduras. Não foi realizada avaliação do FG nestas plantas.

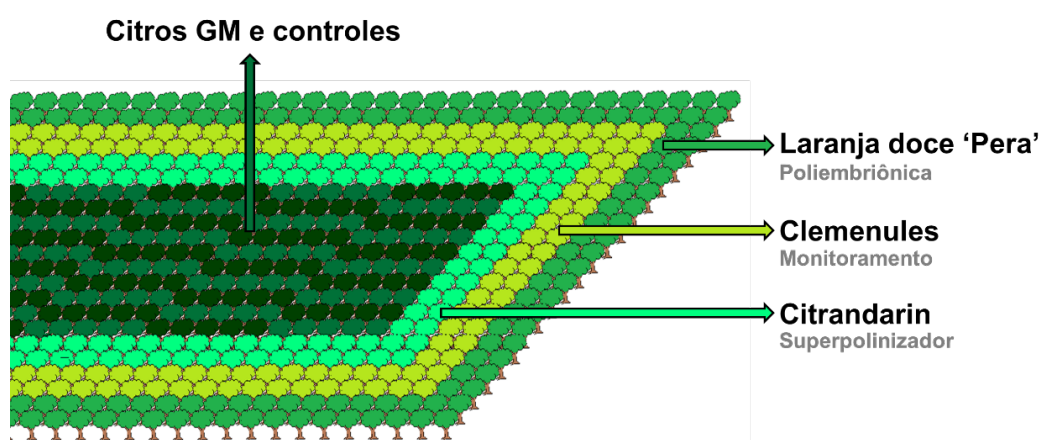


Figura 7. Representação esquemática da disposição das plantas nas bordaduras dos experimentos 1, 2, 3 e 6 do Fundecitrus (áreas de LPMA de citros GM, sob a RN N° 10 da CTNBio) e descrição dos genótipos utilizados nas bordaduras.

Fonte: (Santos 2019).

Para facilitar a compreensão, os termos ‘bordadura interna’ e ‘bordadura externa’ foram utilizados ao longo do presente documento e referem-se, respectivamente, às linhas de plantas de bordadura de cada genótipo que se encontram mais próximas da área de plantas GM e às mais distantes desta área. Ou seja, a primeira linha de plantio, mais próxima à área GM, é denominada bordadura interna e a segunda linha de plantio, mais distante à área GM, bordadura externa. As plantas não GM localizadas internamente às bordaduras foram denominadas plantas controle. A nomenclatura definida e os genótipos amostrados para as avaliações de FG estão representados na Figura 8.

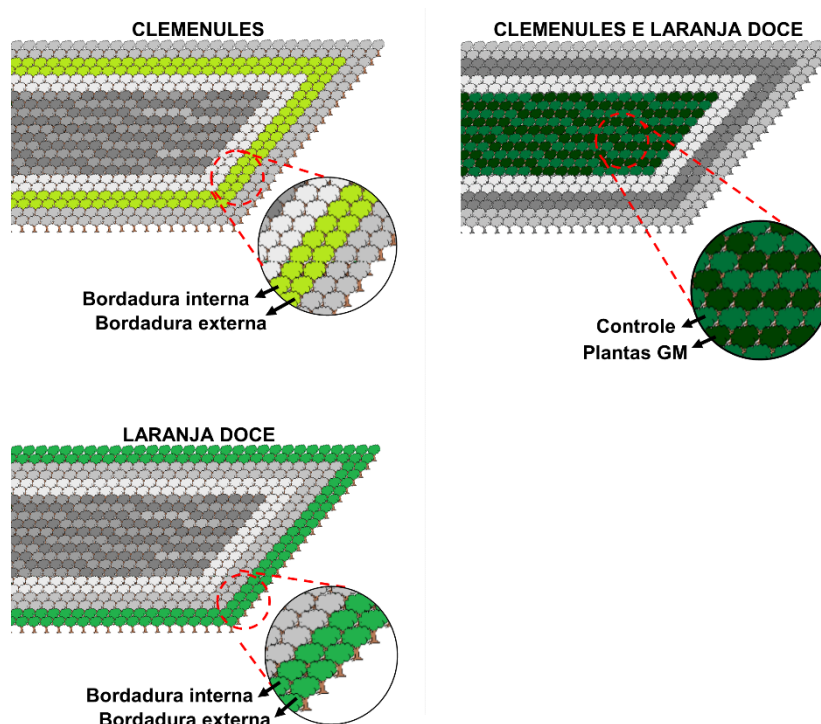


Figura 8. Representação esquemática ilustrando a disposição dos grupos de plantas nos experimentos, com destaque para as bordaduras interna e externa de cada genótipo amostrado na avaliação do fluxo gênico e para a área com plantas geneticamente modificadas (GM) e plantas controle (não GM).

Fonte: elaborada pelo Autor (2024).

2.3.3 Coleta de frutos e extração de sementes

A coleta de frutos teve início após três a quatro anos de plantio de cada experimento, período correspondente ao início da produção consistente de frutos. As avaliações de FG foram conduzidas entre 2018 e 2023, adicionalmente à avaliação conduzida em 2017/18 (Guimarães, 2020; dados não publicados). A

idade das plantas nos respectivos anos de amostragem está exibida na Tabela 2.

Tabela 2. Idade das plantas de bordadura nas safras em que ocorreram as avaliações de fluxo gênico.

	2017/18*	2018/19	2019/20	2020/21	2021/22	2022/23
Experimento 1	4	5	6	7	NA ^a	NA
Experimento 2	NA	4	5	NA	NA	NA
Experimento 3	NA	NA	3	4	5	6
Experimento 6	NA	NA	3	4	5	6

Fonte: elaborada pelo Autor (2024).

(a) Não houve amostragem no período.

(*) Resultados obtidos por Guimarães, 2020 (dados não publicados)

As safras em que ocorreram as avaliações de FG e os genótipos amostrados são exibidos na Tabela 3. Em virtude da conclusão da LPMA do experimento 2 no ano de 2021, erradicação de todas as plantas e, consequentemente, impossibilidade de coleta de frutos, os dados coletados neste experimento abrangem duas safras.

Tabela 3. Safras de avaliação e genótipos amostrados para verificação de fluxo gênico.

	Safra	Clemenules			Laranjeira doce 'Pera'			Laranjeira doce 'Valencia'	Laranjeira doce 'Pineapple'
		BI ^a	BE ^b	C ^c	BI	BE	C	C	C
Experimento 1	2017/18	X*		X*					
	2018/19	X	X	X					
	2019/20	X	X	X					
	2020/21	X	X	X					
Experimento 2	2018/19	X	X	X					
	2019/20	X	X	X					
	2019/20	X	X				X	X	X
Experimento 3	2020/21	X	X				X	X	X
	2021/22	X	X		X	X			
	2022/23				X	X			
	2022/23								
Experimento 6	2019/20	X	X						
	2020/21	X	X						
	2021/22	X	X						

Fonte: elaborada pelo Autor (2024).

(a) Bordadura Interna

(b) Bordadura Externa

(c) Controle

(*) Resultados obtidos por Guimarães, 2020 (dados não publicados)

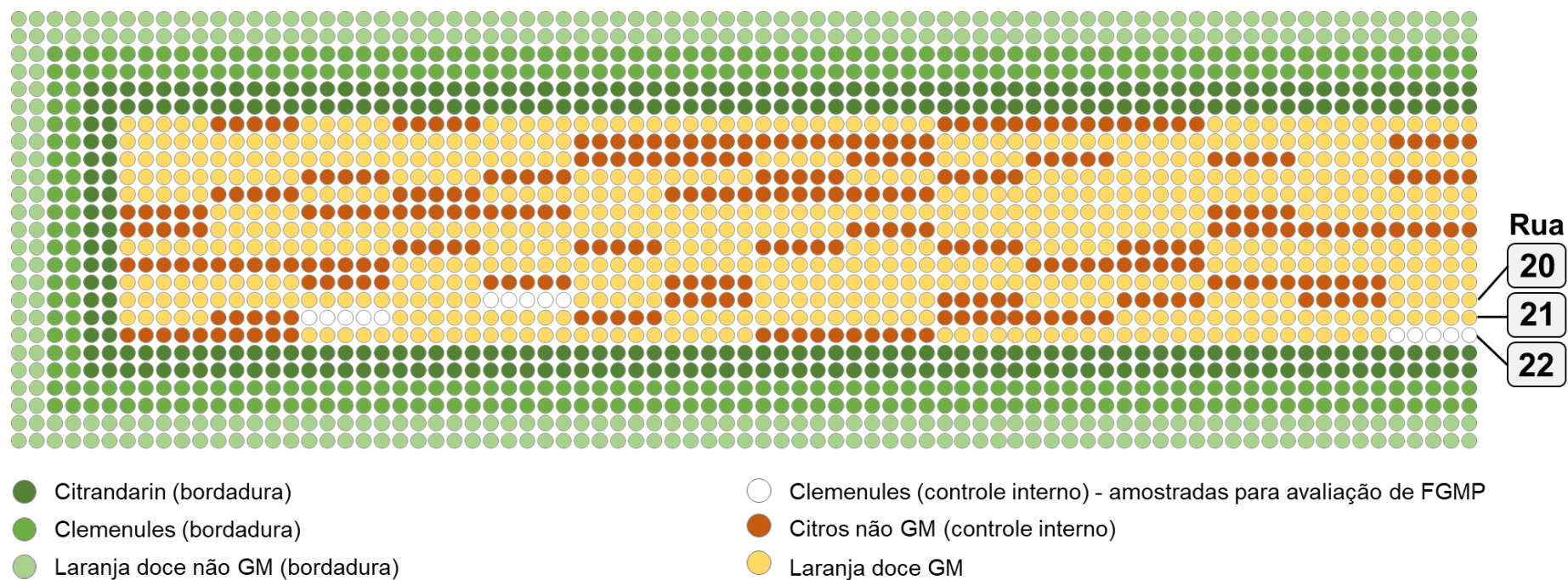
a) Amostragem das plantas de bordadura

A amostragem das plantas de bordadura, cujos frutos foram coletados para as análises de FG, ocorreu de forma aleatória para todos os experimentos, sendo que as plantas selecionadas na primeira amostragem de cada

experimento representaram as mesmas unidades amostrais em todas as safras avaliadas. No entanto, o número de plantas amostradas variou entre as safras devido à erradicação de plantas com *greening*, o que impossibilitou a coleta das referidas plantas nas safras posteriores.

b) Amostragem das plantas controle

A amostragem das plantas controle cujos frutos foram coletados para as análises ocorreu de forma aleatória para todos os experimentos. As plantas de Clemenules controle avaliadas no experimento 1, localizam-se nas ruas 20, 21 e 22, dispostas a 19,5 m, 13,0 m e 6,6 m entre linhas de plantio da bordadura interna de citrandarin, respectivamente (Figura 9). No experimento 2, as plantas amostradas estão dispostas ao longo da área GM, com distâncias variáveis (de 2,5 m a 104 m entre linhas de plantio) à bordadura interna de citrandarin (Figura 10). As plantas de laranjeira doce controle das variedades 'Pera', Pineapple e 'Valencia' foram amostradas no experimento 3 (Figura 11).



1

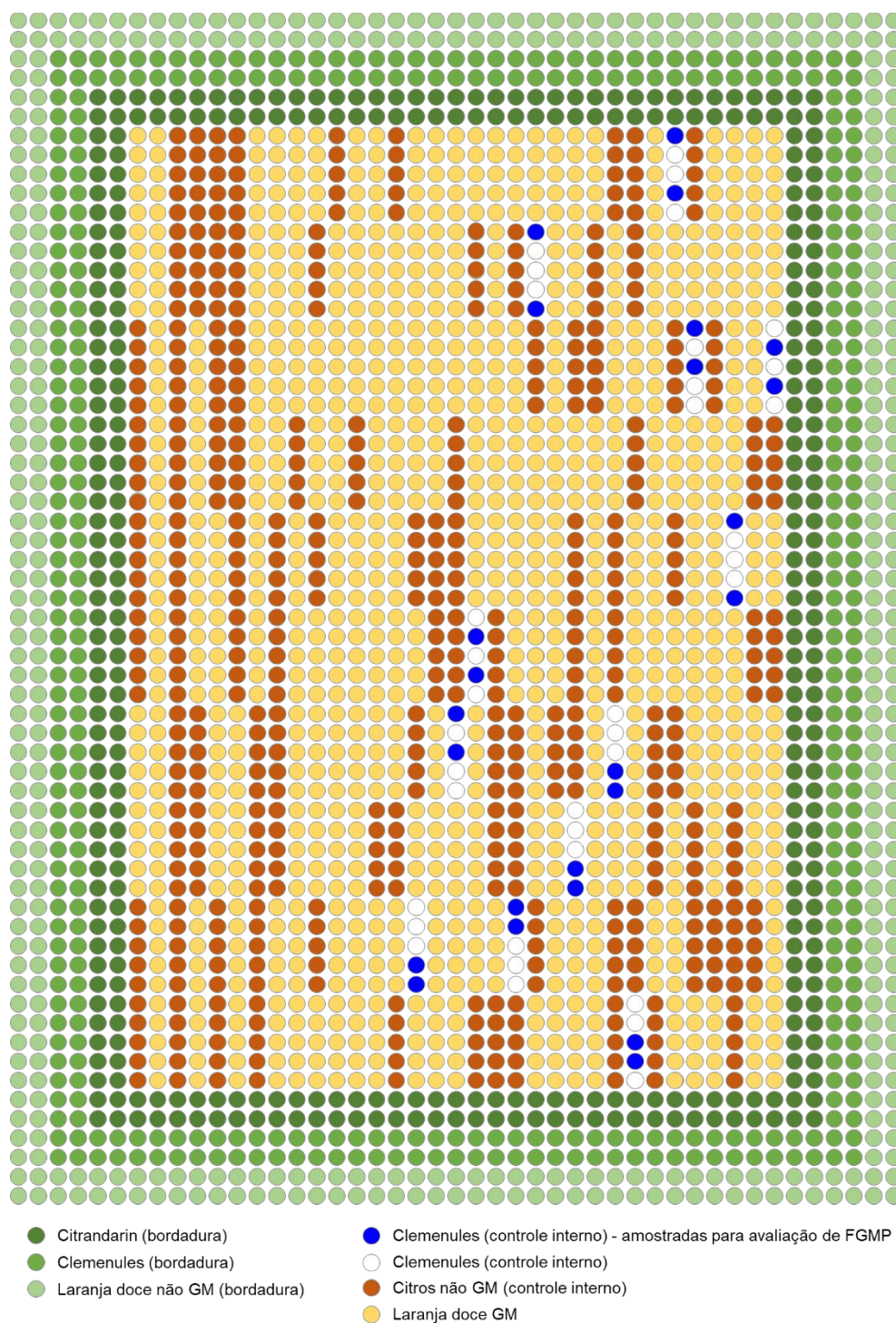
2

3 **Figura 9.** Representação esquemática da disposição das plantas de Clemenules controle amostradas para avaliação de FG no experimento 1, localizadas a
 4 6,5 m, 13,0 m e 19,5 m das plantas de citrandarin e adjacentes às plantas GM (ruas 20, 21 e 22, respectivamente). Área de LPMA sob RN Nº 10 da CTNBio
 5 na Unidade Operativa de Ibaté - SP.

5

Fonte: elaborada pelo Autor (2024).

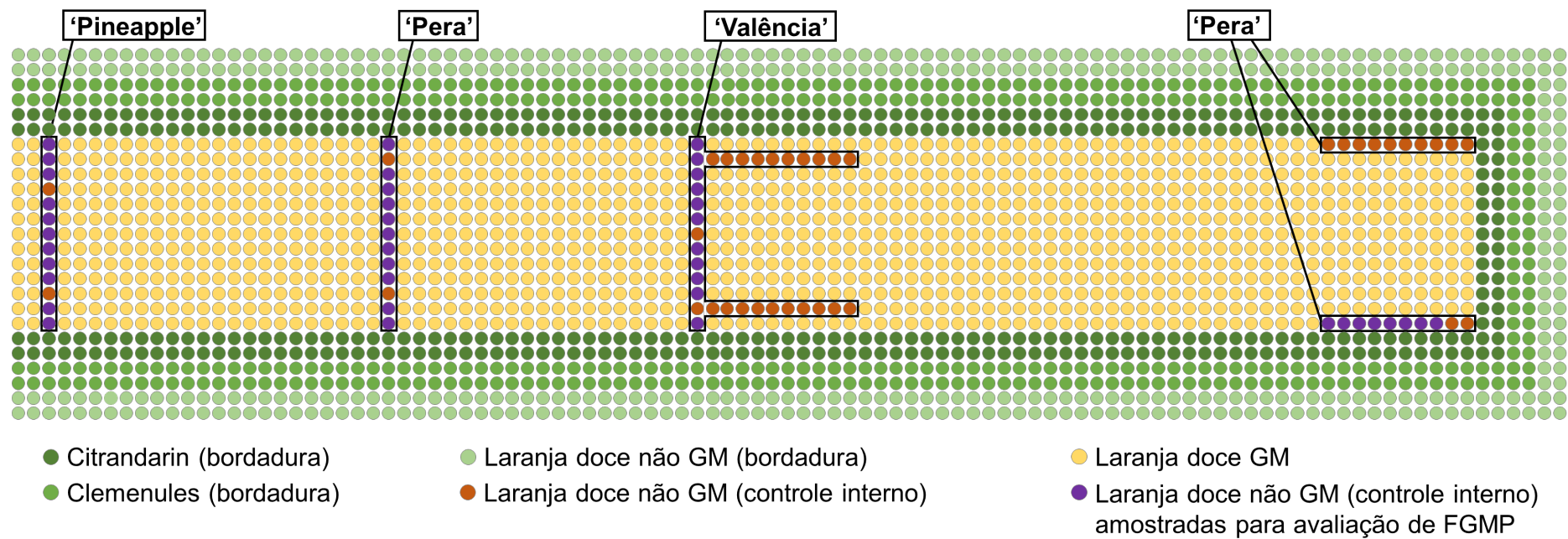
6



7

8 **Figura 10.** Representação esquemática da disposição das plantas de Clemenules controle amostradas
 9 para avaliação de FG no experimento 2. Área de LPMA sob RN N° 10 da CTNBio na Unidade Operativa
 10 de Santa Cruz do Rio Pardo - SP.
 11 **Fonte:** elaborada pelo Autor (2024).

12



13

14 **Figura 11.** Representação esquemática da disposição das plantas de laranjeira doce controle (variedades 'Pera', 'Valência' e 'Pineapple') no experimento 3.

15 Área de LPMA sob a RN Nº 10 da CTNBio na Unidade Operativa de Ibaté - SP.

16 **Fonte:** elaborada pelo Autor (2024).

Para garantir a obtenção de ≥ 100 sementes por planta, foram coletados entre 25 e 100 frutos de polinização aberta por planta, com base em uma avaliação prévia do número médio de sementes por fruto (SPF) em cada safra e em cada experimento. As amostras foram coletadas em cinco repetições nas safras 2020/21 e 2021/22, enquanto nas demais safras, todas as sementes coletadas de frutos de uma mesma planta foram avaliadas em conjunto. Realizou-se a extração e assepsia de sementes para as sementes de todos os frutos coletados conforme Sanches (2014), seguido do procedimento de semeadura (Sanches 2014).

2.3.4 Análise fenotípica

A análise fenotípica foi realizada entre 90 e 120 dias após a semeadura (DAS). As plântulas foram classificadas de acordo com a morfologia das folhas em trifolioladas ou monofolioladas (Figura 12). Nas localidades dos experimentos deste trabalho, a característica trifoliolada está presente exclusivamente em plantas de citrandarin, que é uma característica dominante sobre o caráter monofoliado (Soares Filho et al. 2000), possibilitando a identificação do citrandarin como parental em progênies trifolioladas.

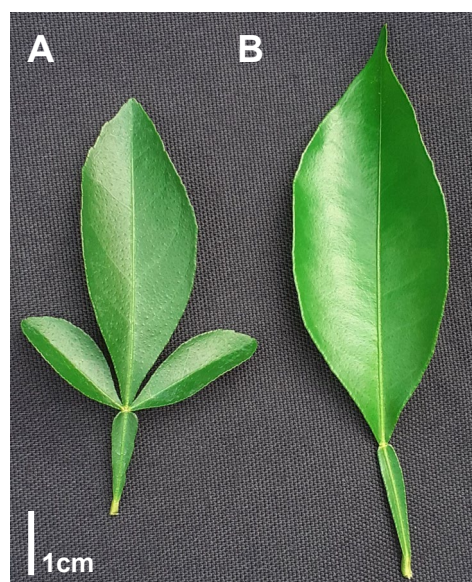


Figura 12. Folhas com característica a) trifoliolada e b) monofoliolada de plântulas aos 120 dias após a semeadura (progênies de tangerineira *Clemenules* de polinização aberta do experimento 3, área de LPMA sob a RN N° 10 da CTNBio).

Fonte: elaborada pelo Autor (2024).

2.3.5 Análises moleculares

De cada progênie monofoliolada, foi coletado um disco de tecido foliar (6 mm de diâmetro) e armazenado em microtubo tipo Eppendorf a -20 °C até o início das análises moleculares.

2.3.5.1 Extração de DNA

As extrações de DNA ocorreram segundo o protocolo de Murray & Thompson (1980), com modificações. Em cada microtubo, foram adicionados uma esfera metálica de 6 mm de diâmetro e 400 µL de tampão de extração (CTAB 2%; NaCl 1,4M; PVP 2% 10.000; EDTA 0,5M pH 8; Tris-HCl 1M pH 8; β-mercaptoethanol 0,2%). As amostras foram trituradas em triturador automático (Tissuelyser II, Qiagen) por 30 seg a 30 Hz e mantidas em banho-maria a 65 °C por 30 min. Em seguida, foram adicionados 400 µL de clorofórmio e procedeu-se a homogeneização em vortex por 30 seg. Os tubos foram centrifugados a 15.294 g, a 23 °C por 5 min, seguido de recuperação do sobrenadante (200 µL) e adição de isopropanol (120 µL). As amostras foram incubadas a -20 °C por pelo menos 30 min e, em seguida, centrifugadas a 15.294 g por 15 min. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado 1000 µL de etanol 70% e centrifugado por 10 min a 15.294 g. O sobrenadante foi descartado, o precipitado foi seco a vácuo (Concentrator plus, Eppendorf) por 7 min e ressuspenso em 40 µL de água ultra-pura. Para parte das amostras, a concentração e a pureza do DNA obtido foram determinadas em espectrofotômetro (NanoDrop 1000, Thermo Scientific).

2.3.5.2 Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction – PCR*)

As reações de PCR foram realizadas para amplificação do gene marcador *np1II*, a partir dos iniciadores NPTI (5' – GACGAGGCAGCGCGGCTAT – 3') e NPTII (5' – AAGAAGGCGATAGAAGGCGA – 3') (Ghorbel et al. 2000), com produto de reação (*amplicon*) de tamanho esperado de 750 pares de bases. Para a detecção de *np1II*, as reações foram realizadas nas seguintes condições: tampão de PCR 1X, 0,15 mM de desoxirribonucleotídeos, 1,5 mM de cloreto de magnésio, 2 unidades de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 0,3 µM de cada *primer*, 1 µL de DNA genômico (aproximadamente 100 ng) e água ultrapura para completar o volume final de 20 µL.

Os ciclos de amplificação foram compostos por desnaturação inicial a 94 °C por 3 min, seguida de 35 ciclos compostos por desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento

a 62 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 45 s e uma extensão final a 72 °C por 10 min. Os produtos de PCR foram avaliados em eletroforese em gel de agarose 1,0% em tampão TAE 1X (Tris-HCl 40 mM, ácido acético 40 mM, EDTA 1 mM), utilizando-se o marcador de massa molecular de 100 pb (Invitrogen). Os géis foram corados com brometo de etídio (0,1 µg/mL) e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (Sambrook e Russell 2006).

2.3.5.3 Avaliação por marcadores moleculares microssatélites (*Simple Sequence Repeat - SSR*)

A atribuição de paternidade via análise de marcadores moleculares microssatélites foi realizada para 20 amostras de progênes de cada planta, selecionadas aleatoriamente, para as quais o resultado da PCR para o transgene foi negativo. Reações de PCR triplex foram otimizadas e as amostras foram analisadas com seis pares de iniciadores, sendo os iniciadores senso (*forward*) marcados com fluorescência TAMRA, FAM ou HEX (Quadro 2; Quadro 3; Apêndice A - 2).

Quadro 2. Especificações dos iniciadores utilizados nas PCRs para genotipagem por marcadores moleculares microssatélites.

ID Acesso	Tipo de repetição	Tamanho (pb)	Sequência	Referência
Ci03C08	Não informado	200 - 225	CAGAGACAGCCAAGAGA GCTTCTTACATTCTCAAA	Ollitrault et al. (dados não publicados)
Ci01F08a	(GAAT) ₆	110-136	ATGAGCTAAAGAGAAGAGG GGACTCAACACAACACAA	Froelicher et al., 2008
Ci07E06	(GA) ₈	216–245	AATAAACGCCCACCTGAGAC CAGTTGTAAAAGGGAAGAATGAA	Froelicher et al., 2008
Ci07E05	(GA) ₉	110-130	GGAGAACAAAACACAATG ATCTTTCGGACAATCTT	Froelicher et al., 2008
Ci01C07	(CT) ₁₀	240–265	GTCACACTCTCGCTCTTG TTGCTAGCTGCTTTAACTTT	Froelicher et al., 2008
Ci02B07	(GA) ₁₄	160–175	CAGCTCAACATGAAAGG TTGGAGAACAGGATGG	Froelicher et al., 2008

Fonte: elaborada pelo Autor (2024).

Quadro 3. Alelos (pb) esperados para os marcadores moleculares microssatélites em genótipos de citros potencialmente doadores de pólen.

	Ci03C08	Ci01F08a	Ci07E06	Ci07E05	Ci01C07	Ci02B07
Clemenules	204/223	115	227	110/112	243	163/165
Laranja doce	204/209	115/135	227/242	110/114	262	161/165
Citrandarin	212/220	111/115	227/238	112/122	243/258	170

Fonte: elaborada pelo Autor (2024).

As reações de PCR foram realizadas utilizando tampão de PCR 1 X, 0,2 mM de desoxirribonucleotídeos, 5 mM de cloreto de magnésio, 0,5 µM de cada *primer*, 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 1 µL de DNA genômico (aproximadamente 100 ng) e água ultrapura para completar o volume final de 20 µL.

Os ciclos de amplificação foram compostos por uma desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguida de 40 ciclos compostos por desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 60 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 30 s e uma extensão final a 72 °C por 45 min. Do produto final da reação de PCR, recuperou-se 1 µL e foi adicionado 9 µL de água. Dessa diluição, tomou-se uma alíquota de 1 µL e foi adicionado 0,2 µL de GeneScan 500 ROX Size Standard e 8,8 µL de formamida (Applied Biosystems).

A separação dos fragmentos foi efetuada em sequenciador automático ABI 3730XL DNA Analyser (Applied Biosystems®, Foster City, California, CA) e os resultados foram analisados utilizando o software Genemapper. As amostras cuja paternidade não puderam ser atribuídas foram consideradas indeterminadas.

2.3.6 Análise dos dados

As médias de FG por planta foram calculadas a partir da divisão do número de amostras positivas para o transgene de uma determinada planta pelo total de progênes germinadas de sementes da mesma planta, seguido da multiplicação por 100 para obter o percentual. Esse percentual de FG por planta foi utilizado para calcular a média de FG em cada bordadura, tratamento (ruas, para plantas controle) e safras, bem como para calcular as médias das bordaduras, tratamentos e safras, não sendo utilizada a média das médias.

Para atender aos pressupostos de normalidade e homogeneidade das variâncias, a variável resposta (FG) foi transformada utilizando o logaritmo natural somado a um, quando necessário.

A análise de variância (ANOVA) foi realizada para os dados de fluxo do transgene, seguida da comparação de médias pelo teste de Tukey a nível de probabilidade de 5%.

A relação entre o FG e a distância das plantas receptoras ao citrandarin foi investigada por meio de uma regressão linear simples, considerando o FG como variável resposta e a distância das plantas receptoras ao citrandarin como variável independente. As análises foram realizadas nos softwares R e Excel (R Core Team 2021; Microsoft Corporation 2024).

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Fluxo do transgene para plantas de bordadura: tangerineira Clemenules e laranja doce 'Pera'

2.4.1.1 Fluxo do transgene para tangerineira Clemenules de bordadura

Mais de 28 mil frutos foram coletados de plantas das bordaduras interna e externa de Clemenules para avaliação do FG. O número total de plantas amostradas, frutos coletados e sementes extraídas encontram-se detalhados na Tabela 4. O percentual de frutos que não apresentou sementes variou de 16% a 64% (Apêndice A - 4).

Tabela 4. Dados de amostragem em plantas de tangerineira Clemenules de bordadura: número de plantas amostradas, frutos coletados, sementes extraídas e média de sementes por fruto.

Experimento	Safra	Plantas	Frutos	Sementes	SPF ^a
1	2017/18*	60	2.839	9.189	3,3 ± 1,3
	2018/19	60	5.843	10.759	1,8 ± 1,2
	2019/20	47	2.157	2.313	1,1 ± 0,8
	2020/21	45	2.250	4.925	2,1 ± 1,5
2	2018/19	56	5.542	3.261	0,6 ± 0,2
	2019/20	55	2.145	6.315	2,9 ± 1,2
3	2019/20	120	2.816	3.857	1,4 ± 0,5
	2020/21	103	2.492	3.263	1,3 ± 0,4
	2021/22	87	2.499	5.257	2,5 ± 1,5
6	2019/20	6	136	144	1,0 ± 0,4
	2020/21	6	150	230	1,5 ± 0,6
	2021/22	5	125	267	2,2 ± 0,7

(*) Resultados obtidos por Guimarães, 2020 (dados não publicados)

(a) Média de sementes por fruto

Fonte: elaborada pelo Autor (2024).

A média geral de detecção de progênes GM por planta de Clemenules de bordadura foi de 5,34%, calculada a partir da média do FG de todas as plantas Clemenules de bordadura amostradas. A influência da interação entre safra e bordadura no FG ($F = 8,01$; $p < 0,001$) foi observada no experimento 1, mas não foi significativa para os demais experimentos. Ademais, o FG variou entre as bordaduras interna e externa no experimento 1 nas safras de 2018/19 ($F = 11,34$; $p = 0,001$) e 2020/21 ($F = 9,71$; $p < 0,01$), enquanto o FG variou entre as safras avaliadas no experimento 2 ($F = 86,15$; $p < 0,001$) (Tabela 5).

Tabela 5. Fluxo gênico (%) em plantas de tangerineira Clemenules de bordadura.

Tabela 3. Fluxo gênico (%) em plantas de Tangerineira Clementines de bordadura.					
Safra	Idade das plantas ^a	Plântulas ^b	Fluxo gênico (%)		Média na safra
			Bordadura Interna	Bordadura Externa	
Experimento 1					
2018 ^c	4	2.836	12,06	na ^d	12,06
2019	5	3.584	3,16 Ab	17,43 Aa	10,54
2020	6	1.004	2,62 Aa	3,53 Ba	3,18
2021	7	2.802	4,92 Aa	1,89 Bb	3,34
Média na bordadura			4,33	4,87	
Experimento 2					
2019	4	1.809	13,15	19,26	15,79 A
2020	5	1.716	2,79	1,48	2,08 B
Média na bordadura			8,57 a	9,46 a	
Experimento 3					
2020	3	2.381	1,72	3,42	2,59 A
2021	4	2.634	4,84	4,30	4,55 A
2022	5	4.242	3,36	8,00	5,89 A
Média na bordadura			3,91 A	5,66 A	
Experimento 6					
2020	3	69	13,6	26,4	21,3
2021	4	138	6,34 Aa	2,84 Aa	5,42
2022	5	57	3,89 Ab	18,94 Aa	7,65
Média na bordadura			5,07	10,89	

(a) Idade das plantas dos experimentos após o plantio inicial.

(b) Total de plântulas avaliadas.

(c) Dados obtidos por Guimarães, 2020 (dados não publicados). Não incluído nas análises estatísticas.

(d) Não avaliado.

O cálculo das médias das linhas “Média na bordadura” foi realizado considerando a média do FG das plantas amostradas em cada bordadura, por experimento. O cálculo das médias da coluna “Média na safra” foi realizado considerando a média do FG das plantas amostradas em cada safra, por experimento. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula (entre linhas) ou minúsculas (entre colunas) não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p = 0.05$).

Fonte: elaborado pelo Autor (2024).

A ausência de fertilização de pólen GM em frutos de uma mesma planta (FG = 0%) ocorreu com maior expressividade na safra 2019/20, em todos os experimentos

(Figura 13). O maior número de plantas sem detecção GM em progênes ocorreu na safra 2019/20 no experimento 3, em 60 plantas de um total de 85 plantas avaliadas (Apêndice A - 5). Nesta safra, ocorreu o plantio do experimento 6 (adjacente ao experimento 3, em 2019), cujas plantas GM não floresceram neste período, possivelmente resultando em uma menor pressão de pólen GM na área.

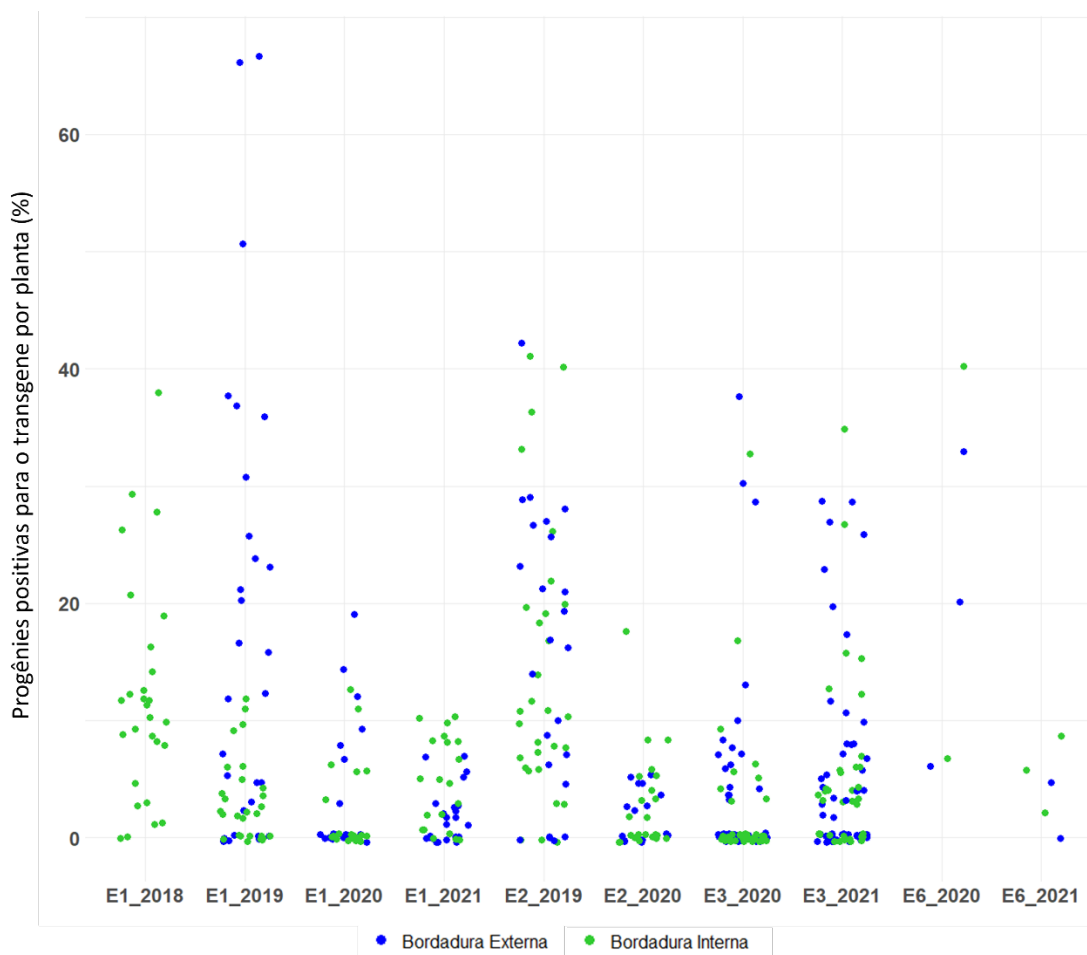


Figura 13. Detecção do transgene *npftII* em progênes de plantas de Clemenules. Cada ponto representa o percentual de *npftII* detectado em progênes de uma mesma planta, nos experimentos 1 (E1), 2 (E2), 3 (E3) e 6 (E6), áreas de LPMA sob a RN Nº 10, nas safras 2018 a 2021 (ano da colheita dos frutos), na Unidade Operativa de Ibaté - SP (E1, E3 e E6) e de Santa Cruz do Rio Pardo (E6). Em azul: plantas localizadas na bordadura externa (a 13,0 m das plantas de citrandarin); em verde: plantas localizadas na bordadura interna (a 6,5 m das plantas de citrandarin).

Fonte: elaborado pelo Autor (2024).

2.4.1.2 Fluxo do transgene para laranja doce 'Pera' de bordadura

Foram coletados 900 frutos de plantas de laranja doce 'Pera' de bordadura nas safras 2021/22 e 2022/23. Um total de 2.722 sementes foram extraídas, o que resultou em uma média de 2,2 e 4,0 SPF nas safras 2021/22 e 2022/23, respectivamente. O percentual de frutos que não apresentou sementes variou de 8,0% a 60,0% (2021/22) e de 0,0% a 20,0% (2022/23) por planta.

A germinação das sementes foi de 76%, em média. Entre uma e cinco plântulas por semente germinaram, sendo que 44,9% das sementes originaram duas ou mais plântulas, sendo consideradas poliembriônicas (Tabela 6).

Tabela 6. Dados de sementes de laranja doce 'Pera' de bordadura do experimento 3 (área de liberação planejada no meio ambiente na Unidade Operativa de Ibaté - SP): número de sementes, plântulas germinadas por semente e percentual de poliembria.

Bordadura	Safr	Sementes	Plântulas	Plântulas por semente					Poliembria	
				1	2	3	4	5	n ^a	%
Interna	2021/22	201	319	102	83	16	0	1	100	49,7
	2022/23	1.185	1.947	1.311	230	56	2	0	636	53,6
Externa	2021/22	650	959	393	210	41	6	0	257	39,5
	2022/23	686	451	432	98	11	5	1	254	37,0

(a) Número de sementes que originaram duas ou mais plântulas (poliembriônica).

Fonte: elaborada pelo Autor (2024)

A média geral do fluxo do transgene para laranjeiras doces 'Pera' de bordadura foi de 0,31%, considerando a média do FG de todas as plantas de bordadura amostradas. Não houve diferença estatística entre as bordaduras ($F = 0,0790$; $p = 0,7802$), bem como entre as safras avaliadas ($F = 3,2222$; $p = 0,0810$) (Tabela 7).

Tabela 7. Dados de fluxo gênico em plantas de laranja doce 'Pera' de bordadura do experimento 3 (área de liberação planejada no meio ambiente na Unidade Operativa de Ibaté - SP).

Bordadura	Safr 2021/22		Safr 2022/23		Média
	Amostras /positivas ^a	FG (%)	Amostras /positivas ^a	FG (%)	
Externa	959/2	0,21 ± 0,21	451/2	0,44 ± 0,44	0,33 ± 0,24
Interna	319/0	0 ± 0	1.947/11	0,58 ± 0,27	0,29 ± 0,15
Média	1.278/2	0,11 ± 0,11	2.398/13	0,51 ± 0,25	

(a) Número de amostras avaliadas/número de amostras positivas para o transgene na detecção por PCR.

Fonte: elaborada pelo Autor (2024).

2.4.2 Fluxo do transgene para plantas controle: tangerineira Clemenules e laranjeiras doces 'Pera', 'Valencia' e 'Pineapple'

2.4.2.1 Fluxo do transgene para tangerineira Clemenules controle

Aproximadamente 7 mil frutos foram coletados de Clemenules controle, dos quais foram extraídas mais de 12 mil sementes. O número de plantas, frutos e sementes avaliados por safra encontram-se detalhados na Tabela 8.

Tabela 8. Dados de amostragem em plantas de tangerineira Clemenules controle dos experimentos 1 e 2 (áreas de liberação planejada no meio ambiente): número de plantas amostradas, frutos coletados, sementes extraídas e média de sementes por fruto.

Experimento	Safra	Plantas	Frutos	Sementes	SPF ^a
1	2017/18	15	1.142	4.506	3,8 ± 1,2
	2018/19	13	1.289	1.272	1,0 ± 0,3
	2019/20	15	725	530	0,7 ± 0,2
	2020/21	15	750	1.098	1,5 ± 0,3
2	2018/19	24	2.141	1.699	0,8 ± 0,3
	2019/20	24	952	3.430	3,6 ± 0,6

(a) Média de sementes por fruto

Fonte: elaborada pelo Autor (2024).

O fluxo do transgene ocorreu em progênie de 103 de um total de 106 plantas de Clemenules controle amostradas, cuja média geral do FG foi de 26,06% (considerando os experimentos 1 e 2).

No experimento 1, o FG médio nas safras 2017/18 a 2020/21 foi de 19,52%, 26,90% e 33,67% para os grupos de plantas localizadas a 6,5 m, 13,0 m e 19,5 m entre linhas de plantio da bordadura de citrandarin mais próxima (Ruas 22, 21 e 20, respectivamente; Tabela 9).

Tabela 9. Fluxo do transgene (%) em plantas de Clemenules controle do experimento 1 (área de liberação planejada no meio ambiente na Unidade Operativa de Ibaté - SP) nas safras 2017/18 a 2020/21.

Localização das plantas amostradas	Distância ao Citrandarin mais próximo ^a	Safra				Média no tratamento
		2017/18 ^b	2018/19	2019/20	2020/21	
Rua 20	19,5 m	9,97	36,74	38,07	34,51	33,67
Rua 21	13,0 m	22,90	19,91	25,72	29,33	26,90
Rua 22	6,5 m	22,28	18,23	5,65	23,04	19,52
Média na safra		19,67	26,00	24,40	28,81	

(a) Distância entre linhas de plantio, em metros

(b) Resultados obtidos por Guimarães, 2020 (dados não publicados)

O cálculo das médias da linha “Média na safra” foi realizado considerando a média do FG das plantas amostradas em cada tratamento (rua), por experimento. O cálculo das médias da coluna “Média no tratamento” foi realizado considerando a média do FG das plantas amostradas em cada tratamento (rua), por experimento. O número de amostras avaliadas foi de 2.731 (safra 2017/18), 498 (safra 2018/19), 232 (safra 2019/20) e 698 (safra 2020/21).

Fonte: elaborada pelo Autor (2024).

Foi verificada uma relação linear positiva entre o FG e a distância das plantas avaliadas ao citrandarin ($p = 0,008$). Embora a força da relação linear varie entre as safras, indicado pela variação dos coeficientes de correlação ($r = 0,179 - 0,687$) e

pelos valores de significância ($p = 0,006 - 0,2$), o FG tende a aumentar à medida que a distância ao genótipo superpolinizador aumenta (Figura 14).

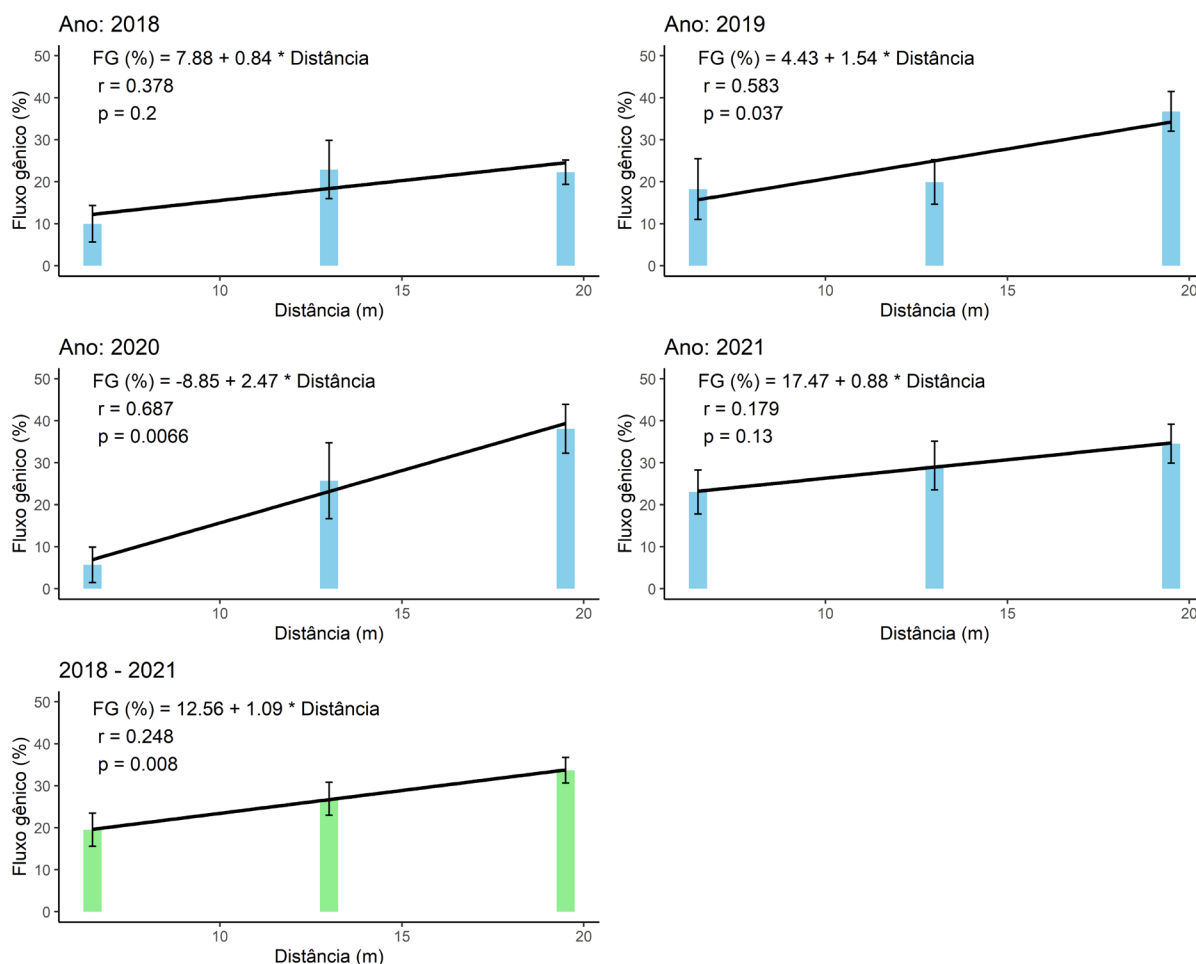


Figura 14. Fluxo gênico (%) em função da distância entre linhas (m) entre plantas de Clemenules controle e plantas de citrandarin.

Fonte: elaborada pelo Autor (2024).

No experimento 2, a média de FG foi de 25,48% e 20,34% nas safras 2018/19 e 2019/20, respectivamente, e de 23,59% considerando a média do FG das plantas Clemenules controle amostradas no experimento 2 (Figura 15).

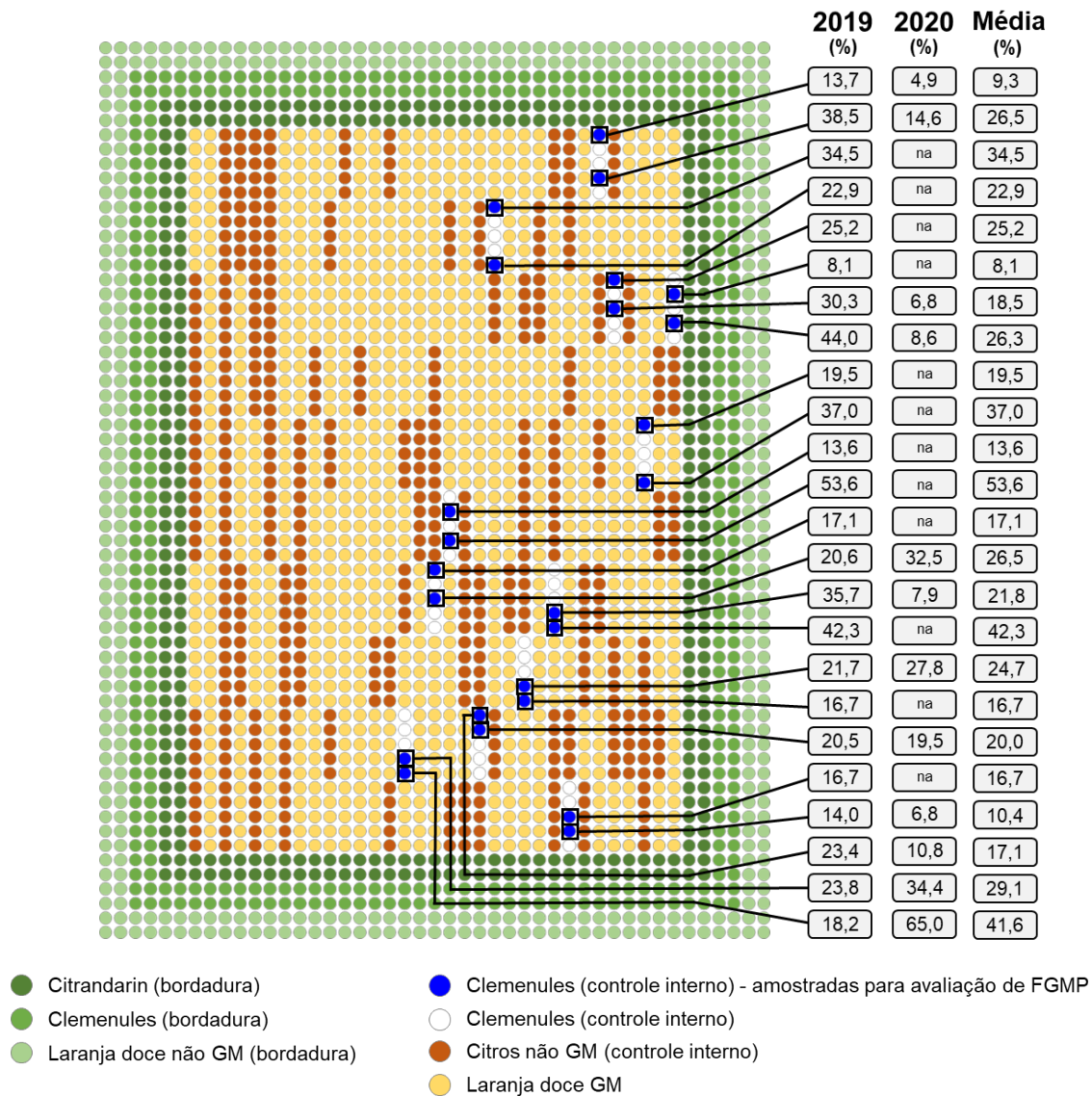


Figura 15. Representação esquemática da localização das plantas de Clemenules controle do experimento 2, área de LPMA sob a RN Nº 10 da CTNBio na Unidade Operativa de Santa Cruz do Rio Pardo - SP, nas safras 2018/19 e 2019/20 e respectivos percentuais de fluxo gênico (FG). O número de amostras avaliadas para a presença do transgene foi de 1.034 (safra 2018/19) e 402 (safra 2019/20). (na) FG não avaliado

Fonte: elaborada pelo Autor (2024).

2.4.2.2 Fluxo do transgene para laranjeiras doces controle

Em plantas de laranjeiras doces controle das variedades ‘Pera’, ‘Valencia’ e ‘Pineapple’, 3.313 frutos foram coletados, totalizando 24.941 sementes (de 2,7 a 13,0 SPF; Tabela 10). Aproximadamente 30% das sementes foi utilizada para semeadura e avaliações subsequentes. O percentual médio de germinação das sementes extraídas em 2019/20 e 2020/21 foi de 45,6% e 62,9%, respectivamente. As sementes geraram de uma a seis plântulas cada, sendo o percentual de

poliembrião de 64,8%, 54,4% e 68,3% em 'Pineapple', 'Pera' e 'Valencia', respectivamente (Tabela 10).

Tabela 10. Dados de amostragem em plantas de laranjeiras doces controle do experimento 3 (área de liberação planejada no meio ambiente na Unidade Operativa de Ibaté - SP): número de plantas amostradas, frutos coletados, sementes extraídas e média de sementes por fruto.

Safra	Variedade	Plantas	Frutos	Sementes	SPF ^a
2019/20	'Pera'	13	640	1.713	2,7 ± 1,5
	'Valencia'	12	407	1.644	4,1 ± 1,8
	'Pineapple'	11	550	6.057	11,0 ± 2,9
2020/21	'Pera'	28	805	3.961	4,2 ± 1,4
	'Valencia'	22	811	3.371	4,3 ± 2,0
	'Pineapple'	13	650	8.195	13,0 ± 3,1

(a) Média de sementes por fruto.

Fonte: elaborada pelo Autor (2024).

Tabela 11. Dados de sementes de laranjeiras doces controle do experimento 3 (área de liberação planejada no meio ambiente na Unidade Operativa de Ibaté - SP): número de sementes, de plântulas germinadas por semente e percentual de poliembrião.

Laranjeira (variedade)	Safra	Sementes	Plântulas	Número de plântulas por semente						Poliembrião	
				1	2	3	4	5	6	n ^a	%
'Pineapple'	2019/20	379	218	91	98	22	7	0	0	127	58,3
	2020/21	2.136	1.074	307	523	203	36	4	1	767	71,4
'Pera'	2019/20	1.127	647	273	289	70	10	4	1	374	57,8
	2020/21	1.311	812	397	339	66	9	1	0	415	51,1
'Valencia'	2019/20	1.023	518	152	262	77	20	7	0	366	70,7
	2020/21	1.891	963	327	417	166	38	12	3	636	66,0

(a) Número de sementes que originaram duas ou mais plântulas (poliembriônica).

Fonte: elaborada pelo Autor (2024).

O FG em plantas de laranjeiras doces controle variou entre as safras ($F = 11,13$; $p = 0,001$) e entre as variedades ($F = 39,56$; $p < 0,001$), sendo maior em 'Pera' em comparação aos demais genótipos e maior na safra 2019/20 em comparação à safra 2020/21 (Tabela 12). A presença do transgene foi verificada em progênies de 12 plantas, de um total de 41 plantas amostradas (70,7% das plantas não apresentaram progênies com o transgene nas duas safras avaliadas) (Apêndice A - 6; Figura 16).

Tabela 12. Fluxo gênico em plantas de laranjeiras doces controle do experimento 3 (área de liberação planejada no meio ambiente na Unidade Operativa de Ibaté - SP).

Laranjeira (Variedade)	2019/20		2020/21		Média FG (%) por variedade
	Positivas/ Total amostras ^a	FG (%)	Positivas/ Total amostras	FG (%)	
Pineapple	0/218	0 ± 0	3/1.074	0,13 ± 0,1	0,12 ± 0,09 B
Pera	9/647	0,34 ± 0,19	457/812	29,6 ± 6,16	23,95 ± 5,19 A
Valencia	0/518	0 ± 0	6/963	0,22 ± 0,18	0,19 ± 0,16 B
Média na safra	9/1.383	0,15 ± 0,09 b	466/2.849	8,58 ± 2,04 a	

(a) Número de plântulas positivas para o transgene dividido pelo total de amostras por variedade e safra.

O cálculo das médias da linha “Média na safra” foi realizado considerando a média do FG das plantas amostradas em cada tratamento (variedade), por safra. O cálculo das médias da coluna “Média por variedade” foi realizado considerando a média do FG das plantas amostradas em cada safra, por variedade. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula (entre linhas) ou minúsculas (entre colunas) não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p = 0.05$).

Fonte: elaborada pelo Autor (2024).

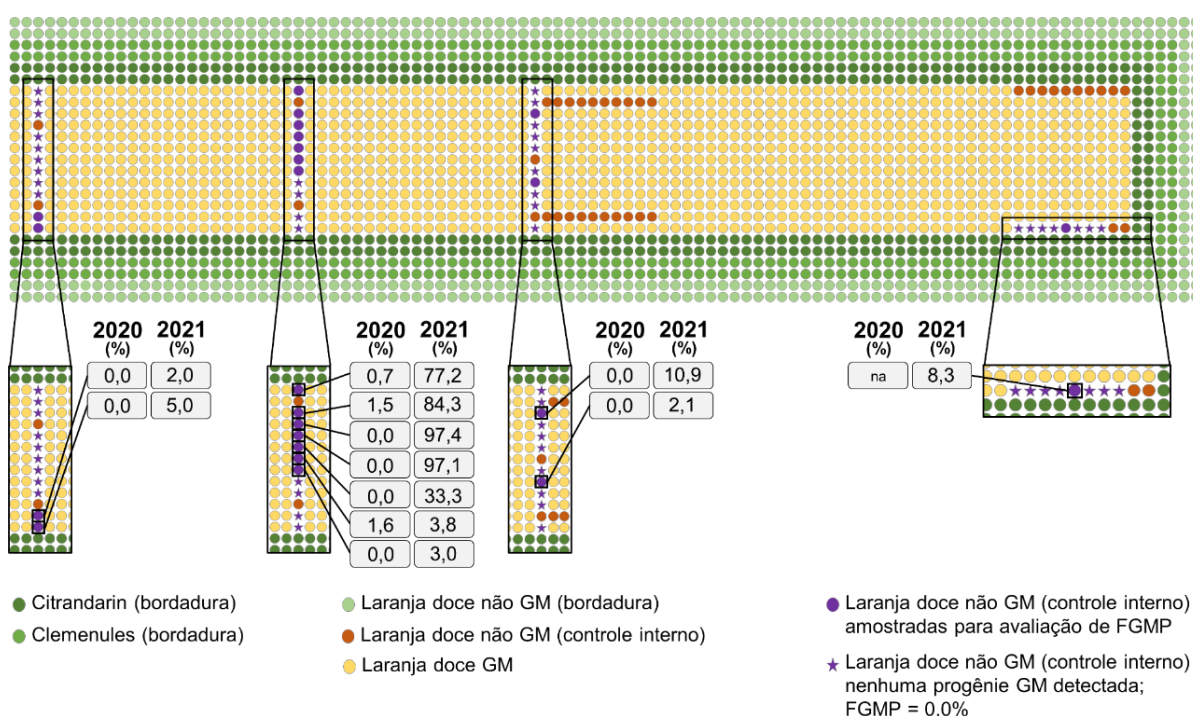


Figura 16. Representação esquemática da localização das plantas de laranjeiras doces controle, dados de FG (%) no experimento 3, área de LPMA sob RN N° 10 da CTNBio na Unidade Operativa de Ibaté - SP. GM: geneticamente modificada, FGMP: Fluxo gênico mediado por pólen.

(na) Não avaliado.

Fonte: elaborada pelo Autor (2024).

2.4.2.3 Fluxo do transgene: comparativo geral

Por fim, considerando as médias de FG por genótipo (Clemenules e laranjeiras doce) e por localização das plantas (bordadura e controle) de todos os experimentos e safras, foi observada influência da localização das plantas no FG ($F = 136,18$; $p < 0,001$), sendo a média geral de FG em plantas controle (15,79%) maior em

comparação ao FG em plantas de bordaduras (5,20%). Com relação ao efeito do genótipo, foi observada uma tendência de menor FG nas plantas de laranja doce em comparação às plantas de Clemenules, embora essa diferença não seja estatisticamente significativa ($F = 1,13$; $p = 0,2882$). O total de plantas amostradas, plântulas germinadas, amostras positivas para o transgene e fluxo gênico médio por genótipo e tratamento em todos os experimentos e safras avaliados estão resumidos na Tabela 13.

Tabela 13. Dados de fluxo gênico em plantas de Clemenules e laranjeiras doces de bordadura e controle: total de plantas amostradas, plântulas germinadas, amostras positivas para o transgene (*npII*), fluxo gênico por planta (mínimo e máximo) e fluxo gênico médio por genótipo e tratamento, nos experimentos 1, 2, 3 e 6, em todas as safras avaliadas.

Genótipo (tratamento)	Plantas ^a	Plântulas ^b	Positivas ^c	Fluxo gênico por planta (%) ^d		Fluxo gênico – Média geral (%) ^e
				Mínimo	Máximo	
Clemenules (bordadura)	650	23.272	1.721	0,00	67,24	5,34 ± 7,74
Clemenules (controle)	106	6.192	1.202	0,00	65,02	26,06 ± 16,52
Laranja doce (bordadura)	40	3.676	15	0,00	4,40	0,31 ± 8,30
Laranjeiras doce (controle)	99	4.232	475	0,00	97,37	7,45 ± 13,24

(a) Total de plantas amostradas.

(b) Total de plântulas germinadas.

(c) Total de amostras positivas para o transgene.

(d) Cálculo realizado a partir da divisão do número de amostras positivas para o transgene de cada planta pelo total de plântulas germinadas de sementes de frutos da mesma planta, seguido da multiplicação por 100.

(e) Média dos valores de fluxo gênico por planta das plantas amostradas, por genótipo e tratamento.

Fonte: elaborada pelo autor (2024).

2.5 DISCUSSÃO

2.5.1 Fluxo do transgene para plantas de bordaduras: tangerineira Clemenules e laranjeira doce 'Pera' não GM

2.5.1.1 Fluxo do transgene para tangerineira Clemenules de bordadura

O número médio de SPF dos frutos de Clemenules de bordadura variou de 0,6 a 3,3, enquanto em estudos anteriores foram reportados de 4,2 a 7,8 SPF (Azevedo et al. 2013) e de 0,8 a 7,9 SPF (Pons et al. 2011) em Clemenules de polinização aberta. Ademais, em Clemenules de polinização controlada, foi verificado de 9,5 a 16,6 (Sanches 2014) e de 6,8 a 13,5 (Pons et al. 2011) SPF, evidenciando o potencial de produção de sementes do genótipo nessas condições. A formação de sementes está relacionada a fatores como a variação no tipo e número de visitas de polinizadores, quantidade de grãos de pólen por estigma, viabilidade do pólen, fisiologia da planta e estádios reprodutivos, além do tipo de inflorescência e do posicionamento da flor no ramo (De Lange, Skarup e Vincent, 1974).

No experimento 1, dois dos cinco genótipos presentes na área experimental não produzem pólen viável, a laranjeira doce 'Navelina' e a lima ácida 'Tahiti', que juntas representam 45% do total de plantas do experimento. A 'Navelina' apresenta esterilidade do óvulo e macho-esterilidade (Reuther 1978; Yamamoto 2014; Barry et al. 2020) e a lima ácida 'Tahiti' é uma espécie triploide e estéril (Reuther 1978; Ali et al. 2013; Barry et al. 2020), o que pode impactar o número de SPF, bem como as taxas de FG. Ademais, a movimentação e fertilização de pólen não GM, de plantas controle ou de bordadura, foi evidenciada pela ausência de identificação do transgene em parte dos frutos de uma mesma planta e em parte das plantas amostradas.

A variação climática observada na maioria dos anos de condução dos ensaios experimentais impactou negativamente a frutificação e produção de laranjas doce a nível global (USDA 2018, 2020, 2023; Fundecitrus 2024). Os fatores climáticos podem influenciar a atividade das enzimas fotossintéticas, a disponibilidade de flores, pólen e néctar, viabilidade do pólen e fertilidade do óvulo (Spiegel-Roy e Goldschmidt 1996), além dos padrões de forrageamento de abelhas (Szabo 1980; KARBASSIOON et al. 2023). A atividade de voo de abelhas *A. mellifera* de 10 colônias de abelhas (5 colônias *overwintered* – que sobreviveram ao inverno – e 5 colônias de abelhas recém-formadas), apresenta correlação positiva com o aumento de temperatura (R^2 : 0,532 e

0,978) (Szabo 1980), o que pode impactar a taxa e distância de dispersão de pólen em citros, cuja polinização é majoritariamente entomófila, realizada principalmente por abelhas *A. mellifera* (Malerbo-Souza et al. 2003; Guimarães et al. 2009; Nascimento et al. 2011).

Outro fator importante que parece influenciar a extensão do FG no presente trabalho é a distância entre plantas, sendo entre (i) as plantas receptoras de pólen e as plantas GM, (ii) as plantas receptoras de pólen e as plantas de citrandarin (discutido em detalhes na seção 2.5.2.1 *FLUXO DO TRANSGENE PARA TANGERINEIRA CLEMENULES CONTROLE*) e (iii) as plantas em corredores formados em decorrência de erradicações devido à confirmação de *greening*.

Em um contexto de ocorrência de doenças como o *greening*, onde a eliminação de plantas para redução de fontes de inóculo é executada, a formação de corredores para a passagem de abelhas ocorre até que novas mudas de plantas alocados nestes espaços atinjam a maturidade. As erradicações de plantas atingiram até 54,9% (laranjeira 'Pera', experimento 1) das plantas de um mesmo tratamento nas bordaduras (Apêndice A - 7), o que reduziu as fontes de pólen não GM ao longo das safras e alterou a proporção de plantas GM e não GM nas áreas.

Em resposta ao espaçamento das plantas, abelhas *A. mellifera* individuais são capazes de alterar os padrões de movimento e gerar movimentos tendenciosos, ou seja, demonstrar preferência à uma planta mais do que à outra (Morris 1993). Além disso, com o aumento da distância entre plantas, há um aumento na distância de dispersão de pólen em *Brassica campestris* (Morris 1993), *Ipomopsis aggregate*, *Cucumis sativus* (Handel 1983; Campbell e Waser 1989). Portanto, a alteração no espaçamento das plantas em decorrência das erradicações pode ter impactado a extensão e variabilidade do FG registrado no presente trabalho.

Em citros, o FGMP foi avaliado em plantas de Clemenules de polinização aberta em área localizada em Valência (Espanha), compreendendo eventos GM de laranja doce 'Pineapple', citrange Troyer e lima mexicana (*Citrus × sinensis*, *Citrus sinensis × Poncirus trifoliata* e *Citrus × aurantiifolia*, respectivamente). A área experimental, de extensão de 1.638 m², foi constituída por 130 plantas adultas, sendo 48 plantas GM ao centro e 82 plantas não GM (Clemenules) ao redor da área (Pons et al. 2011). O percentual médio de FG por safra em Clemenules foi consistentemente baixo, entre 0,17% e 2,86% (Pons et al. 2011), em comparação aos valores obtidos no presente trabalho.

Cabe destacar que a proporção de plantas GM e não GM nas áreas experimentais foi distinta entre as áreas de cultivo do presente trabalho e do estudo conduzido por Pons e colaboradores (2011), o que pode resultar em variação na proporção de pólen GM disponível e pressão para a ocorrência de FG. Para cada planta GM, havia menos de uma planta não GM nos experimentos 2 e 3, enquanto duas plantas não GM estavam presentes para cada planta GM no estudo de Pons et al. (2011).

Além disso, o clima e, conseqüentemente, a presença e abundância de polinizadores são fatores distintos entre as áreas de cultivo de citros no Brasil e na Europa. O estresse hídrico pode ser o principal indutor de florescimento em condições semitropicais, semelhantes aos habitats originais de citros no sudeste asiático, enquanto a duração da florada é dependente das temperaturas predominantes, nas quais climas mais quentes (como o observado nos anos de condução do presente trabalho) resultam em floração, queda de pétalas e frutificação concomitantes (Spiegel-Roy e Goldschmidt 1996).

Visto isso, a diversidade climática entre Brasil e Espanha, podem impactar a indução e duração da florada dos citros, o que pode ter conseqüências importantes para as chances de polinização e FG. Nas regiões central e sudoeste do interior do estado de São Paulo (onde as LPMAs estavam localizadas e os experimentos foram conduzidos), as diferenças de temperaturas entre as estações do ano têm variação menor em comparação ao regime hídrico, principal fator na indução de floração nas referidas regiões. Em contraste, o frio é o principal indutor de floração na Europa e no clima mediterrânico de Valência (local de realização dos experimentos conduzidos por Pons et al., 2011), onde as estações do ano são mais definidas.

Ademais, outros fatores que podem afetar o desenvolvimento das plantas cítricas diferenciam os experimentos do presente trabalho, incluindo o sistema de irrigação (presente nos experimentos 1, 3 e 6 e ausente no experimento 2) e o genótipo utilizado como porta-enxerto (citrameleiro 'Swingle' nos experimentos 1, 3 e 6 e limoeiro 'Cravo' no experimento 2). As diferenças climáticas somadas ao tipo de porta-enxerto e sistema de irrigação podem ter contribuído para as variações verificadas na dinâmica de FG, uma vez que o clima atua em múltiplas etapas deste fenômeno. Adicionalmente, a sincronização da floração é outra característica importante para o FG e é afetada pelos fatores descritos anteriormente, a qual tende

a ser mais uniforme nos genótipos no clima temperado se comparado ao tropical e subtropical.

2.5.1.2 Fluxo do transgene para laranjeiras doces ‘Pera’ de bordadura

Além de as plantas de laranjeira doce ‘Pera’ se localizarem a uma distância maior às plantas GM (32,5 ou 39,0 m entre linhas de plantio) em relação às Clemenules (19,5 ou 26,0 m entre linhas de plantio), fatores intrínsecos aos genótipos também podem ter contribuído para que o FG apresentasse uma tendência a ser menor em laranjeira doce ‘Pera’ comparado à Clemenules.

Em laranjeiras doce, a autopolinização é possível, sendo o próprio pólen capaz de competir por fertilização com pólenes viáveis de outras plantas (incluindo pólen GM) e promover a formação de sementes. De forma contrastante, em Clemenules, a incompatibilidade com o próprio pólen não promove a fertilização dos óvulos (Azevedo et al. 2013) e, conseqüentemente, não há competição por fertilização com pólen exógeno.

O impacto da ausência de competição do próprio pólen com pólen exógeno no FG verificado em Clemenules, pode ser observado de maneira análoga ao FG em plantas femininas e hermafroditas de *Carica papaya* (mamão). Em plantas hermafroditas de *C. papaya*, a flor possui uma disposição característica que garante a ocorrência de autopolinização, o que resulta em desvantagem à polinização de pólenes externos de plantas compatíveis devido à competição com o próprio pólen (Gonsalves et al. 2012; Manshardt et al. 2016), nas quais o FG foi de 1,3%, enquanto em embriões de plantas femininas, nas quais não ocorre a autopolinização, foi cerca de 50 vezes maior (67,4%) (Gonsalves et al. 2012). Cabe ressaltar que o mamoeiro é frequentemente cultivado fora de áreas comerciais e a probabilidade de dispersão de sementes por aves é alta, diferentemente do que ocorre em laranjeiras doce, que são majoritariamente cultivadas em pomares comerciais.

Ainda em mamão, o FGMP foi avaliado em plantas que aparentemente foram estabelecidas e cresceram sem assistência humana em diversas distâncias de áreas de cultivo comercial de mamão GM, cujo registro de cultivo de plantas GM da espécie era de aproximadamente 77% no estado. Nos frutos de plantas hermafroditas, não houve detecção GM, enquanto 16% dos frutos de plantas femininas continham ao menos uma semente GM (Manshardt et al. 2016). O maior percentual de FG observado em plantas femininas em comparação a plantas hermafroditas em mamão

evidencia que a capacidade de autopolinização (presente em laranja doce) pode limitar o FGMP em contraste à ausência de autopolinização (o que ocorre em Clemenules).

Ademais, a maior parte das sementes de laranja doce analisadas foi classificada como poliembriônica. A competição por nutrientes entre os embriões nas sementes poliembriônicas (com favorecimento dos nucelares), pode beneficiar a germinação e o desenvolvimento dos embriões nucelares não GM em detrimento aos embriões GM. A apomixia é uma das barreiras genéticas que suprimem o FGMP em *Paspalum notatum* GM, espécie apomítica obrigatória (Sandhu et al. 2010), e potencialmente pode mitigar o FG em laranja doce GM, espécie apomítica facultativa. Tal característica não está presente em Clemenules, que é um genótipo monoembriônico.

Dessa forma, as características da biologia reprodutiva das laranjeiras, autocompatibilidade e a poliembrionia, podem ter atuado como barreira genética em conjunto à barreira física da distância entre a área interna de plantas GM e as bordaduras não GM dos experimentos, podendo representar um conjunto de barreiras adequado para mitigar o FG em citros GM. Ademais, considerando que a frequência máxima de FG de diversas espécies de plantas foi detectada em plantas adjacentes à fonte de pólen e suprimida de acordo com o aumento da distância até a planta receptora, caracterizando uma curva leptocúrtica (Free 1960; Degani et al. 1990, 1995; Jackson e Futch 1997; Wallace et al. 2002; García et al. 2005), espera-se que o FG seja menor do que 0,31% em plantas localizadas a distâncias de plantas de citros GM superiores à 39 m entre linhas de plantio (distância da última linha de plantas bordadura de laranjeiras doces avaliada, disposta de acordo com a RN Nº 10).

2.5.2 Fluxo do transgene para plantas GM controle: tangerineira Clemenules e laranjeiras doces 'Pera', 'Valencia' e Pineapple.

2.5.2.1 Fluxo do transgene para tangerineira Clemenules controle

Foi identificada uma tendência de maior FG médio em plantas de Clemenules controle em comparação a plantas de Clemenules de bordadura. As plantas controle estão localizadas de forma mais próxima às plantas GM (adjacentes no sentido da linha de plantio ou a 2,5 m entre linhas de plantio) em comparação às bordaduras de Clemenules (19,5 ou 26,0 m, entre linhas de plantio). Além disso, a distância entre

plantas torna-se ainda menor conforme os períodos de desenvolvimento vegetativo ocorrem e o volume das copas aumenta, sendo mais marcante nas plantas dispostas na mesma linha de plantio.

A distância física entre as fontes de pólen e as plantas receptoras é um fator determinante para a frequência e distância máxima de dispersão do FG em plantas cuja polinização é majoritariamente entomófila (De Jong et al. 2005), como os citros. Em diversas espécies de plantas, a frequência máxima de FG foi reduzida conforme o aumento da distância da fonte de pólen até a planta receptora (Free 1960; Degani et al. 1990, 1995; Jackson e Futch 1997; Wallace et al. 2002; García et al. 2005).

Ademais, no experimento 1, a distância entre as plantas controle e as plantas do genótipo superpolinizador (citrandarin) apresentou relação linear positiva com o FG nas safras 2017/18 a 2020/21, o qual tende a aumentar à medida que a distância ao genótipo superpolinizador aumenta. Cabe destacar que essa relação foi variável entre as safras, o que ressalta a influência de múltiplos fatores na ocorrência do FG, conforme discutido em detalhes na seção *2.5.1.1 FLUXO DO TRANSGENE PARA TANGERINEIRA CLEMENULES DE BORDADURA*.

2.5.2.2 Fluxo do transgene para laranjeiras doces controle

O FG médio em plantas de laranjeira doce controle apresentou uma tendência de ser menor em comparação ao FG em plantas de Clemenules controle, embora não tenha sido verificada influência estatística do genótipo nas médias de FG. Diferentemente da detecção do transgene em progênies de Clemenules, que ocorreu em praticamente todas as plantas amostradas (97%), em laranjeiras doces controle a detecção do transgene ocorreu em progênies de menos de um terço das plantas amostradas.

As plantas de laranjeiras doces não GM cujos frutos foram amostrados para a avaliação de FG estavam localizadas ao lado de plantas de laranjeiras doces GM na direção da linha de plantio, portanto a uma distância de plantio de 2,5 m a plantas GM, em cada sentido da linha de plantio. No período amostrado, as copas praticamente tocam-se nesta distância de plantio devido ao desenvolvimento vegetativo e expansão do volume de copa das plantas, o que pode favorecer a ocorrência do FG. As maiores taxas de FG foram obtidas no segundo ano de avaliação (2020/21), cujo desenvolvimento das copas das árvores e consequente redução da distância entre as copas ocorreu, possibilitando maior contato entre as árvores de mesma variedade e

maior probabilidade de apresentarem fenótipos semelhantes quanto ao florescimento, o que pode ter favorecido a ocorrência do FG.

A média geral de FG das plantas de laranjeiras doces controle foi impulsionada por detecções de FG superiores a 77% em quatro plantas de laranja doce 'Pera', enquanto em laranjeiras doces 'Pineapple' e 'Valencia' o FG foi menor do que 1,0% nas duas safras avaliadas. É possível que tenha ocorrido uma variabilidade na atratividade das flores entre as variedades de laranja doce 'Valencia', 'Pera' e 'Pineapple', o que poderia ter influenciado a abundância e o número de visitas de polinizadores, a quantidade de pólen GM depositado em cada uma delas e, consequentemente, de fertilização de pólen GM. Moffet e Rodney (1971) avaliaram a atratividade relativa de plantas cítricas individuais em floração, utilizando a cultivar 'Lisbon lemon' como referência (valor de atratividade 100). Dado o número de visitas de abelhas por flor, a atratividade das flores de citros para as abelhas *A. mellifera* diferiu entre variedades de laranja doce 'Valencia' (36 - 52) e Navelina (31 - 46) e entre outras espécies cítricas (Moffett e Rodney 1971).

Também cabe destacar que a sincronia de florescimento entre as plantas é uma característica que influencia a sobrevivência, a fecundidade e o FG entre plantas, as quais desenvolveram mecanismos para regular a sua fenologia reprodutiva (Gaudinier e Blackman 2020). A sincronia floral é importante não só para a promoção da disponibilidade de flores, concomitância da viabilidade dos grãos de pólen e estigma, como também para a sincronia de desenvolvimento do pólen e do pistilo pós-polinização, sendo o pistilo receptivo aos avanços do pólen durante um período de tempo relativamente curto (Herrero 2003). Em contraste a outras espécies de citros que possuem períodos de floração mais definidos e concentrados, as laranjeiras doces 'Pera' tendem a apresentar períodos de florescimento de forma mais distribuída ao longo do ano, o que promove maior disponibilidade de flores e oportunidade de polinização pela mesma população de plantas de laranjeiras doces 'Pera' em comparação com as demais variedades presentes na área experimental, reduzindo a dispersão das visitas de polinizadores entre genótipos e concentrando-as nas plantas de um mesmo genótipo, neste caso, de laranjeiras doces 'Pera'. Ainda, a compatibilidade com o próprio pólen e consequente competição com pólen exógeno em laranjeiras doce, somada à capacidade de gerar embriões nucelares não GM, possivelmente impactaram a ocorrência do FG nas plantas de laranjeiras doces

controle, alinhado à discussão na seção 2.5.1.2 *FLUXO DO TRANSGENE PARA LARANJEIRA DOCE 'Pera' LOCALIZADAS NAS BORDADURAS*.

2.6 CONCLUSÕES

Os resultados de FGMP obtidos em quatro áreas de LMPA de citros GM, por um período de dois a quatro anos consecutivos, mostram a partir de dados e discussões técnico-científicas a funcionalidade da medida de redução da dispersão de pólen GM, o sistema de bordaduras preconizado na RN Nº 10.O FG em plantas cítricas mostrou-se um processo complexo no qual múltiplos elementos interagiram entre si, incluindo, mas não se limitando à atividade dos polinizadores, temperatura e umidade relativa do ar, a distância entre plantas e entre fontes de pólen GM, a proporção de plantas GM e não GM na área e as características relacionadas ao processo reprodutivo dos genótipos, especialmente a sincronia do florescimento.

A distância entre as plantas receptoras e a fonte de pólen GM representou um fator importante na extensão da fertilização com pólen GM em citros, incluindo a ocorrência de erradicações de plantas, que criaram corredores de passagem, que podem ter impactado o padrão de forrageamento das abelhas e, consequentemente, o FG. Além disso, as variações climáticas observadas entre as safras possivelmente proporcionaram alterações no metabolismo das plantas e do florescimento, o que pode impactar a frequência de visitas e comportamento dos polinizadores.

Adicionalmente, as características de apomixia facultativa e autocompatibilidade presentes nas laranjeiras doce constituíram fatores importantes para suprimir o FG em laranjeiras doces em comparação a Clemenules, que não expressa as referidas características.

3 CAPÍTULO 3. POTENCIAL DE POLINIZAÇÃO DO GENÓTIPO SUPERPOLINIZADOR CITRANDARIN EM BORDADURA DE LIBERAÇÃO PLANEJADO NO MEIO AMBIENTE

3.1 INTRODUÇÃO

Os citrandarins são híbridos do cruzamento entre tangerinas e *Poncirus trifoliata* e são utilizados principalmente como porta-enxerto de plantas cítricas e, dependendo do genótipo, capazes de induzir a formação de plantas de copa de menor porte em comparação a outros porta-enxertos (Pompeu Junior e Blumer 2009). Além disso, os citrandarins apresentam tolerância moderada ou alta à seca, tolerância à tristeza dos citros e à morte súbita dos citros (Fundecitrus et al. 2021). A viabilidade, poliembrionia e taxa de emergência de sementes de sete variedades de citrandarin foram consideradas semelhantes ou superiores às de limoeiro Cravo IAC863 e citrumeleiro Swingle (n = 20 frutos por planta) (Schinor et al. 2020), genótipos comumente utilizados como porta-enxerto no Brasil.

Além da relevância como porta-enxerto, o citrandarin destacou-se como um genótipo apropriado para atuar como barreira genética na contenção da dispersão de pólen de citros GM. O pólen de citrandarin competiu eficazmente por fecundação com o pólen de citros GM e contribuiu para a contenção do transgene em condições de polinização aberta. A superior capacidade de competição pela fertilização foi verificada no citrandarin acesso H3 [tangerina Cleópatra (*Citrus reshni* hort. ex Tanaka) × *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.], em comparação aos genótipos de laranjeiras doce, lima mexicana e citrange Troyer GM presentes na área experimental (Pons et al. 2011). Em condições de polinização controlada, o pólen de citrandarin acesso CCSM 1600 exibiu capacidade competitiva superior ao pólen de laranjeiras doces ‘Pera’ e ‘Pineapple’ (Sanches 2014).

O potencial de polinização de um genótipo pode ser influenciado por diversos fatores, incluindo a variabilidade genética, condições ambientais como temperatura e umidade, além da influência de mecanismos biológicos sobre a fecundação, obstáculos físicos ou químicos que impedem o crescimento do tubo polínico, condições estruturais e do desenvolvimento do óvulo (Pacini e Franchi 2020), bem como a viabilidade e capacidade de germinação dos grãos de pólen. O pólen é o principal agente de polinização cruzada em citros geneticamente compatíveis (Moffett

e Rodney 1971) e sua viabilidade é crucial para garantir o sucesso da produção de frutos e sementes (Kundu et al. 2016).

A avaliação de viabilidade de pólen é uma importante fonte de informação na compreensão da dinâmica de fertilização em plantas por impactar diretamente o crescimento e desenvolvimento de frutos (Wilcock e Neiland 2002; Poppy e Wilkinson 2005). Para a determinação da viabilidade e capacidade de germinação de grãos de pólen *in vitro*, são realizadas análises que incluem (i) o cultivo de grãos de pólen em meio de cultura e a avaliação da formação do tubo polínico, (ii) testes colorimétricos que permitem a distinção entre grãos de pólen viáveis e não viáveis, (iii) análises de danos ou alterações na estrutura do grão de pólen via microscopia eletrônica, entre outros (Firmage e Dafni 2001).

3.2 OBJETIVOS

Determinar o potencial de polinização do citrandarin acesso H3 e acesso 1600 [tangerina Cleópatra (*Citrus reshni* hort. ex Tanaka) × *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] em progênie de tangerineira Clemenules (*Citrus* × *clementina* hort. ex Tanaka) sujeitas a polinização aberta em áreas de LPMA de citros GM;

Determinar o potencial de polinização do citrandarin H3 em polinização controlada frente a pólenes de laranja doce GM e não GM e avaliar a viabilidade e a germinação *in vitro* de grãos de pólen de citrandarin H3 e de laranjeiras doces (*Citrus* × *sinensis*) GM e não GM.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

O potencial de polinização do citrandarin em polinização aberta foi determinado com base na identificação de trifoliolados via análise fenotípica e, para um grupo de amostras, via análise de marcadores moleculares microssatélites.

3.3.1 Potencial de polinização do citrandarin em polinização aberta

3.3.1.1 Áreas experimentais e genótipos, sistema de bordaduras, coleta de frutos e extração de sementes, análise fenotípica e análises moleculares

Os métodos desta seção foram realizados conforme descrito nas seções 2.3.1 ÁREAS EXPERIMENTAIS e genótipos a 2.3.5 ANÁLISES MOLECULARES da seção 2.3 MATERIAIS E MÉTODOS.

3.3.1.2 Análise dos dados

O percentual de paternidade ao citrandarin (Pt) para progênies de uma mesma planta, considerando os resultados das avaliações fenotípica e genotípica, foi obtida a partir da fórmula:

$$Pt = (((m - np) * c) + t) / p$$

Onde: I) o total de progênies monofolioladas (m) subtraindo-se o número de positivas para o transgene *nptII* (np); II) multiplicado o resultado pelo percentual do total de progênies com a paternidade atribuída ao citrandarin via análise de marcadores moleculares microssatélites (c); III) somado o resultado ao total de progênies trifolioladas avaliadas via análise fenotípica (t) e; IV) dividido o resultado pelo total de progênies germinadas de frutos de cada planta (p).

As médias de trifoliolados por planta foram calculadas a partir da divisão do número de amostras trifolioladas de uma determinada planta pelo total de progênies germinadas de sementes da mesma planta, seguido da multiplicação por 100 para obter o percentual. Esse percentual de trifoliolados por planta foi utilizado para calcular a média de trifoliolados em cada bordadura, tratamento (ruas, para plantas controle) e safras, bem como para calcular as médias das bordaduras, tratamentos e safras, não sendo utilizada a média das médias.

Os dados das análises fenotípica e genotípica do experimento 1 (safras 2017/18 e 2018/19) foram submetidos à regressão linear simples, considerando o percentual de paternidade do citrandarin atribuído via análises fenotípica e genotípica como variável resposta e a ocorrência de trifoliolados como variável independente.

A análise de variância (ANOVA) foi realizada para os dados de viabilidade e germinação *in vitro*, número de SPF e trifoliolados em frutos de polinizações controladas. Adicionalmente, para os dados de viabilidade e germinação *in vitro*, foi realizado o teste de Tukey para comparações múltiplas, a fim de identificar diferenças significativas entre as médias dos grupos, adotando um nível de significância de 5%.

Quando necessário, os dados foram transformados em log da variável resposta +1, para atingir os critérios de normalidade e homogeneidade das variâncias. Entretanto, tais critérios não foram alcançados para os dados de FG de polinização

controlada. As análises foram realizadas no software R e Excel (R Core Team 2021; Microsoft Corporation 2024).

3.3.2 Potencial de polinização do citrandarin em polinização controlada

3.3.2.1 Obtenção e preparo do pólen

Os grãos de pólen foram obtidos de flores de citrandarin H3 e de laranja (genótipos doadores de pólen, descritos no Quadro 4).

Quadro 4. Genótipos doadores de pólen utilizados em análises *in vitro* e em polinização controlada.

Identificador	Genótipo	GM/não GM	Característica
'Pera'	Laranja doce 'Pera'	Não GM	Controle
GM1 ('Pera' P-FTA 20)	Laranja doce 'Pera'	GM	Aumento de sesquiterpenos
GM2 ('Pera' P-C (2) 1)	Laranja doce 'Pera'	GM	Vetor vazio
'Pineapple'	Laranja doce 'Pineapple'	Não GM	Controle
Citrandarin	Citrandarin ^a	Não GM	Superpolinizador

(a) Citrandarin acesso H3 (Instituto Valenciano de Investigações Agrárias).

Fonte: elaborada pelo Autor (2024).

Botões florais em máximo estágio de desenvolvimento e antecedente à antese foram coletados, transportados ao laboratório e dispostos sobre uma folha de papel à temperatura ambiente (20 – 25°C), onde permaneceram por um período de 24 h para viabilizar a deiscência das anteras. Após esse período, as anteras foram removidas com uma pinça, colocadas em placas de Petri e incubadas para secagem a 35 °C por 12 h.

Para padronizar a quantidade de grãos de pólen e permitir a proporcionalidade de pólen entre os tratamentos (nos tratamentos compostos por mistura de pólen), adotou-se o método descrito por Sanches (2014), com modificações. Dez anteras de cada genótipo foram colocadas em 1 mL de água em tubos do tipo Eppendorf e agitadas em vórtex. Em seguida, 200 µL da suspensão de pólen foram transferidos para a câmara de Neubauer. Procedeu-se a contagem dos grãos de pólen em quatro subcampos (os mais externos) de cada campo de visão da câmara de Neubauer. O procedimento mencionado foi realizado em triplicata e a média de grãos de pólen foi utilizada para calcular a quantidade de pólen a ser misturada de cada genótipo, a fim de manter a proporção 1:1 (Sanches 2014).

Para os tratamentos que consistiram em mistura de pólen de diferentes genótipos, as anteras dos respectivos genótipos foram transferidas para uma mesma placa de Petri, considerando a quantidade de anteras estabelecida para atingir a

proporção de pólen 1:1. No dia seguinte, as anteras foram transferidas para tubos do tipo Eppendorf e agitadas em um aparelho de "vortex" para homogeneização e liberação dos grãos de pólen (Sanches 2014).

3.3.3.2 Viabilidade de pólen *in vitro*

Para realizar a análise de viabilidade de pólen *in vitro*, foram utilizadas 40 anteras por genótipo, as quais foram transferidas para tubos do tipo Eppendorf contendo 0,5 mL de solução fixadora e agitadas em "vortex". A solução fixadora foi constituída de álcool absoluto:ácido acético glacial, em proporção 3:1 (v/v). Vinte microlitros da suspensão com pólen foram transferidos para uma lâmina de vidro e, em seguida, foi adicionado 20 µL do corante carmim acético 2,5% (Sanches 2014).

A área de visualização da lâmina foi dividida em quatro campos de visão iguais, demarcados na face abaxial da lâmina. Em microscópio óptico, foram contados 100 grãos de pólen em cada campo de visão, totalizando quatro repetições. Os grãos de pólen foram avaliados quanto à viabilidade, sendo considerados viáveis os que se apresentavam uniformemente corados, enquanto os não viáveis foram caracterizados por ausência de coloração ou coloração pouco intensa e/ou deformação.

3.3.3.3 Germinação de pólen *in vitro*

Para a realização do teste de germinação de pólen *in vitro*, foi preparado o meio de cultura contendo 15% de sacarose e 1% de agarose (pH 6,5). Em seguida, 1 mL deste meio de cultura foi vertido sobre lâminas de vidro e mantido em temperatura ambiente para proporcionar a solidificação. Posteriormente, os grãos de pólen foram depositados sobre a lâmina com o auxílio de um pincel (Sanches 2014).

As lâminas foram colocadas sobre papel toalha umedecido em uma placa de Petri, criando uma câmara úmida, e incubadas em uma câmara de germinação do tipo B.O.D. a 28 °C por um período de 24 h (Sanches 2014). A germinação dos grãos de pólen foi avaliada por meio da emissão do tubo polínico. Em microscópio óptico, foi realizada a contagem e determinação da germinação de 300 grãos por repetição, em quatro repetições. Os grãos de pólen com tubo polínico de comprimento igual ou maior do que o dobro do diâmetro do grão de pólen foram considerados germinados, enquanto os demais grãos de pólen foram considerados não germinados.

3.3.3.4 Polinização controlada

A polinização controlada foi realizada durante a safra 2020/21. Plantas receptoras de Clemenules e de laranjeira doce ‘Pera’ foram utilizadas como receptoras. Botões florais em máximo estágio de desenvolvimento e ainda fechados ($n = 100$, por tratamento) foram identificados nas plantas receptoras e as anteras foram retiradas (emasculação). Em seguida, as cargas de pólen obtidas conforme a seção 3.3.2.1 *OBTENÇÃO E PREPARO DO PÓLEN* foram depositadas no estigma das flores, com o auxílio de um pincel.

As flores foram polinizadas e cobertas com saco de papel, permanecendo protegidas de insetos e de pólen externo, os quais foram removidos após uma semana, de acordo com Sanches, 2014 (Sanches 2014). Todos os frutos gerados foram coletados e tiveram as sementes extraídas e semeadas em estufa. As análises fenotípica e molecular foram realizadas conforme descrito nas seções 2.3.4 *ANÁLISES FENOTÍPICAS* e 2.3.5 *ANÁLISES MOLECULARES*.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Potencial de polinização do citrandarin em polinização aberta

O percentual de trifoliolados variou entre as safras ($F = 63,21$; $p < 0,001$), experimentos ($F = 14,82$; $p < 0,001$) e entre as bordaduras ($F = 188,76$; $p < 0,001$), sendo maior em progênies de Clemenules da bordadura interna (6,5 m entre linhas de plantio da bordadura de citrandarin) em comparação à bordadura externa (13,0 m entre linhas de plantio da bordadura de citrandarin). Ademais, a ocorrência de progênies trifolioladas de plantas das bordaduras interna e externa foi superior nos experimentos cujo acesso de citrandarin presente é o H3 (experimentos 2, 3 e 6) em comparação ao experimento 1, cujas plantas de citrandarin correspondem ao acesso 1600 ($F = 162,44$; $p < 0,001$) (Figura 17A).

Em progênies de Clemenules controle, o citrandarin foi identificado como parental, via análise fenotípica, com maior frequência em plantas mais próximas da bordadura de citrandarin (Rua 22; 6,5 m entre linhas de plantio) em comparação às plantas mais distantes ($> 6,5$ m entre linhas de plantio) ($F = 6,28$; $p = 0,0027$), independentemente da safra ($F = 1,82$; $p = 0,1491$) (Figura 17B).

O percentual de progênies trifolioladas por planta variou de 0% a aproximadamente 60% (Apêndice A – 8).

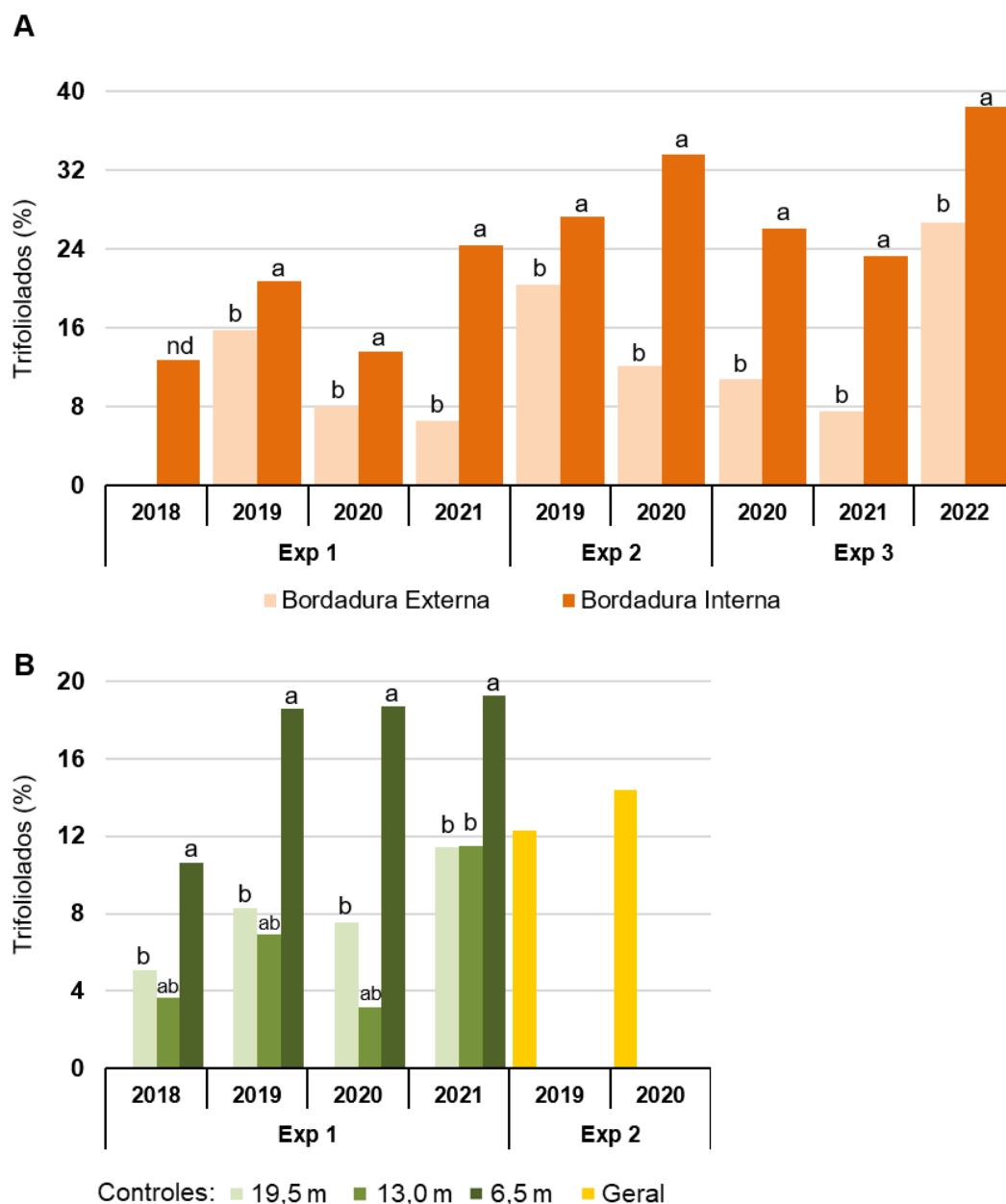


Figura 17. Trifoliolados (%) em progênies de *Clemenules* de A) bordadura e B) controle. No experimento 1, os dados de plantas controle estão exibidos de acordo com a localização das plantas: 6,5 m, 13,0 m e 19,5 m entre linhas de plantio das plantas de citrandarin (Ruas 22, 21 e 20, respectivamente). No experimento 2, os dados de plantas controle não foram estratificados (Geral). No experimento 1: citrandarin acesso 1600 Centro de Citricultura Sylvio Moreira. Nos experimentos 2, 3 e 6: citrandarin acesso H3 Instituto Valenciano de Investigações Agrárias.
(nd) Não incluído nas análises estatísticas.

Fonte: elaborada pelo Autor (2024).

A atribuição de paternidade via genotipagem por marcadores moleculares microssatélites foi realizada para parte das progênies monofolioladas e negativas para o transgene *nptII* (2.155 progênies) de 109 plantas do experimento 1, cujo acesso de citrandarin presente na área é o acesso 1600, a partir da qual foi possível atribuir a

paternidade à 77,1% das amostras (Tabela 14). O citrandarin 1600 foi identificado como parental em 24,1% das amostras, em média, sem diferença estatística entre os tratamentos e safras ($F = 2,3$; $p > 0,05$), enquanto os resultados de paternidade atribuída à laranjeira doce variaram entre tratamentos e safras ($F = 12,43$; $p < 0,001$).

Tabela 14. Atribuição de paternidade para plântulas monofolioladas oriundas de sementes de Clemenules controle e de bordadura do experimento 1 (área de liberação planejada no meio ambiente na Unidade Operativa de Ibaté - SP) via genotipagem por marcadores moleculares microsatélites.

Tratamento	Safra	Núm. Amostras	Indeterminados		Citrandarin		Laranjeira doce	
			n ^a	%	n	%	n	%
Bordadura Interna	2017/18	612	133	21,7 b	186	30,4 ns	293	47,9 a
Controle	2017/18	283	68	24,0 cb	49	17,3 ns	166	58,7 a
Bordadura Interna	2018/19	499	209	41,9 a	142	28,5 ns	148	29,7 b
Bordadura Externa	2018/19	527	77	14,6 c	102	19,4 ns	348	66,0 a
Controle	2018/19	234	28	12,0 cb	59	25,2 ns	147	62,8 a
Total		2.155	Média	22,8		24,1		53,0

(a) Número de amostras

Médias seguidas pela mesma letra entre linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p = 0,05$). ns: não significativo. Citrandarin presente no experimento 1: acesso 1600 Centro de Citricultura Sylvio Moreira.

Fonte: elaborada pelo Autor (2024).

Os resultados da análise de genotipagem foram acrescentados aos resultados da avaliação fenotípica, o que gerou um aumento da identificação da paternidade do citrandarin 1600 de 2,5 vezes por planta, em média. Ademais, foi verificada uma relação linear entre os percentuais de paternidade atribuída ao citrandarin 1600 via análise fenotípica e de paternidade final (análise genotípica somada à fenotípica) considerando os dados das safras 2017/18 e 2018/19 ($R^2 = 0,81$; $p < 0,001$; $y = 1,4626x + 8,2094$). Os resultados agrupados por tratamento e safra estão dispostos na Figura 18.

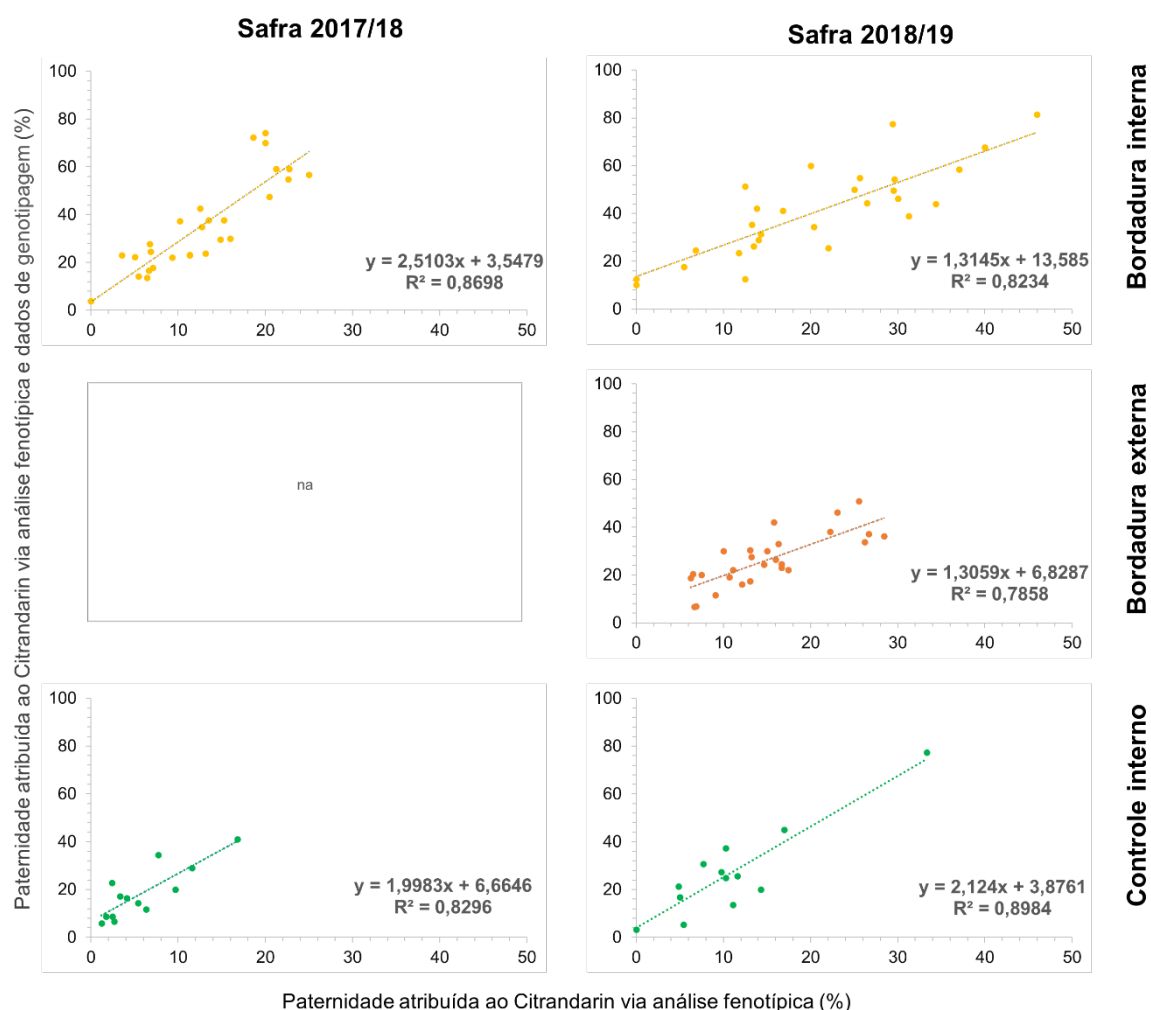


Figura 18. Correlação entre os dados de paternidade atribuída ao citrandarin via análise fenotípica (%) e combinação dos resultados das análises fenotípica e genotípica (via análise de marcadores moleculares microssatélites; %). Cada ponto representa o resultado por planta de Clemenules de bordadura e controle amostradas no experimento 1, área de LPMA sob RN Nº 10 da CTNBio na Unidade Operativa de Ibaté - SP. Citrandarin acesso 1600 do Centro de Citricultura Sylvio Moreira. $P < 0,001$ para todos os conjuntos de dados.

Fonte: elaborada pelo Autor (2024).

3.4.2 Potencial de polinização do citrandarin em polinização controlada

3.4.2.1 Germinação e viabilidade de pólen *in vitro*

O citrandarin H3 apresentou o maior percentual de grãos de pólen viáveis, atingindo $79,7 \pm 8,0\%$ de viabilidade, além de exibir grãos de pólen íntegros e fortemente corados em comparação aos demais genótipos (Figura 19). Em contraste, as laranjeiras doces (GM e não GM) apresentaram viabilidade inferior a 30% e, em laranjeira ‘Pera’ GM1, a maioria dos grãos de pólen apresentaram-se degenerados e não corados (Tabela 15; Figura 19), embora a viabilidade tenha sido similar os genótipos de laranjeira doce.

Tabela 15. Viabilidade (%) e germinação (%) *in vitro* de grãos de pólen de citros.

Carga de pólen	Viabilidade (%)	Germinação (%)
'Pera' GM1	23,7 ± 3,8 b	5,5 ± 2,1 b
'Pera' GM2	28,7 ± 6,7 b	1,0 ± 0,8 b
'Pera' não GM	25,7 ± 11,6 b	5,7 ± 4,3 b
'Pineapple' não GM	21,0 ± 6,8 b	29,2 ± 8,4 a
Citrandarin H3	79,7 ± 8,0 a	37,7 ± 7,8 a

Fonte: elaborada pelo Autor (2024).

Médias seguidas pela mesma letra entre linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p = 0,05$).

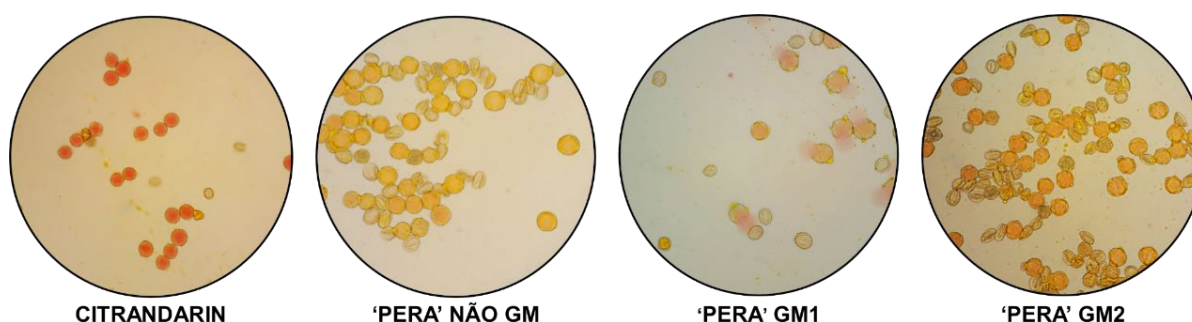


Figura 19. Grãos de pólen de citrandarin H3, laranja doce 'Pera' não GM e laranja doce 'Pera' de eventos GM (GM1 e GM2). Grãos de pólen viáveis são corados e apresentam bordas completas, enquanto grãos de pólen inviáveis não são corados e apresentam degeneração.

Fonte: elaborada pelo Autor (2024).

3.4.2.2 Polinização controlada

A partir das 800 flores polinizadas (taxa de fixação de frutos: 15 a 35% entre os tratamentos), foram coletados 198 frutos e extraídas 2.864 sementes. O número médio de SPF foi menor nas polinizações realizadas em plantas receptoras de laranja doce 'Pera' em comparação a Clemenules ($F = 107,70$; $p < 0,001$). Entretanto, não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos para o número médio de SPF ($F = 2,48$; $p = 0,0628$) (Tabela 16).

A característica trifoliolada foi mais frequentemente identificada em progênies de plantas receptoras Clemenules (48,0% a 54,5%) do que em progênies de laranja doce 'Pera' (11,8% a 19,0%) ($F = 164,37$; $p < 0,001$), sendo observada influência dos tratamentos nessa característica ($F = 3,50$; $p = 0,0168$).

Por fim, a frequência de fertilização de pólen GM não diferiu estatisticamente entre os genótipos receptores ($F = 1,35$; $p = 0,2474$) bem como entre os tratamentos ($F = 0,20$; $p = 0,8964$), sendo de 0,8 e de 1,5% nos tratamentos constituídos por mistura de pólen de citrandarin e de laranja doce GM quando polinizado em Clemenules e de 1,6% e 2,0% quando polinizado em laranja doce 'Pera' (Tabela 16).

Tabela 16. Resultados de polinização controlada em plantas receptoras Clemenules e laranja doce 'Pera' no experimento 3 na área de LPMA sob RN N° 10 da CTNBio na Unidade Operativa de Ibaté.

Tratamento	Fixação de frutos (%)	Sementes por fruto ^a	Trifoliolados (%)	FG ^b (%)	Frutos com ≥1 sementes GM (%)
Genótipo receptor: Clemenules					
'Pera' GM1 x citrandarin	29	18,5 ± 3,9	52,7 a	0,8	6,7
'Pera' GM2 x citrandarin	27	17,7 ± 4,4	54,5 a	1,5	0,7
'Pera' não GM x citrandarin	35	17,8 ± 4,2	49,5 ab	0,0	0,0
Citrandarin	21	16,5 ± 4,8	48,0 b	0,0	0,0
Genótipo receptor: laranja doce 'Pera'					
'Pera' GM1 x citrandarin	26	10,0 ± 3,0	11,8 a	1,6	3,8
'Pera' GM2 x citrandarin	23	9,8 ± 2,9	16,9 a	2,0	8,7
'Pineapple' não GM x citrandarin	22	9,7 ± 3,8	14,6 a	0,0	0,0
Citrandarin	15	10,5 ± 2,5	19,0 a	0,0	0,0

(a) Média de sementes por fruto.

(b) Percentual de progênes positivas para o transgene em relação ao total de plântulas avaliadas no tratamento.

Médias seguidas pela mesma letra entre linhas não diferem estatisticamente entre si para os quatro tratamentos de cada genótipo receptor pelo teste de Tukey (p = 0,05). Citrandarin acesso H3 Instituto Valenciano de Investigações Agrárias.

Fonte: elaborada pelo Autor (2024).

3.5 DISCUSSÃO

3.5.1 Potencial de polinização do citrandarin em polinização aberta

Em progênes de Clemenules de bordadura dos experimentos 1, 2 e 3, a média de trifoliolados em progênes de plantas da bordadura interna (mais próximas à linha de plantas de citrandarin; 6,5 m entre linhas de plantio) foi superior ao verificado em plantas da bordadura externa (13,0 m entre linhas de plantio). Além disso, no experimento 1, a porcentagem de progênes trifolioladas em plantas controle foi maior na rua mais próxima às plantas de citrandarin 1600 (rua 22; 6,5 entre linhas de plantio) em comparação à rua mais distante (rua 20; 19,5 m entre linhas de plantio). Face aos resultados observados, a distância entre plantas exerce influência no potencial de polinização também do citrandarin, cujas chances de polinização por este genótipo aumentam em plantas receptoras localizadas mais próximas à fonte de pólen.

Ademais, a ocorrência de progênes trifolioladas de plantas de bordadura apresentou uma tendência de superioridade nos experimentos cujo acesso de citrandarin presente é o H3 (experimentos 2 e 3) em comparação ao experimento 1,

cujas plantas de citrandarin correspondem ao acesso 1600. Este resultado aponta para uma provável superioridade de fertilização do citrandarin acesso H3 em comparação ao 1660, fato importante para a contenção do FG.

Além da avaliação fenotípica, a utilização de marcadores moleculares permitiu a identificação do citrandarin 1600 como parental das progênes de plantas do experimento 1, contribuindo para a identificação do parental citrandarin nas progênes monofoliadas. A importância da avaliação por marcadores moleculares para atribuição de paternidade ao citrandarin em adição à análise fenotípica, foi previamente reportada, que elevou a paternidade atribuída ao citrandarin 1600 em polinização controlada exclusivamente com pólen de citrandarin, de 35,2% obtido por fenotipagem para 98,9%, somatório da avaliação fenotípica e da avaliação por marcadores moleculares microssatélites (Sanches 2014).

No presente trabalho, um alto grau de associação linear entre os dados fenotípicos e o percentual de paternidade final do citrandarin (somatório análises fenotípicas e genotípica) por planta foi identificado. É possível inferir que, quanto maior é a identificação do parental citrandarin em análise visual das progênes, maior é, em média, o percentual final de paternidade atribuída ao citrandarin para progênes de uma mesma planta. A correlação positiva é esperada, visto que características fenotípicas são amplamente determinadas pelo genótipo dos organismos. Ademais, a possibilidade de melhor inferir o percentual de paternidade do citrandarin a partir da avaliação fenotípica possibilita o incremento experimental, visto ser de custo menor do que a avaliação por múltiplos marcadores microssatélites.

A frequente identificação do citrandarin como parental de progênes em condição de polinização aberta reforça a superioridade de fertilização do citrandarin, especialmente do acesso H3, observada anteriormente (Pons et al. 2011).

A competição da fertilização pelo pólen de citrandarin frente ao pólen de espécies cítricas transgênicas representa uma importante barreira reprodutiva entre espécies compatíveis e uma ferramenta para mitigação de escape de pólen transgênico de áreas de LPMA de citros GM. De acordo com a RN Nº 10 da CTNBio, sob a qual estão implementados os experimentos deste trabalho, duas linhas de plantas de citrandarin devem ser dispostas ao redor da área de plantas GM, como bordaduras para contenção do pólen GM (BRASIL 2013).

A RN Nº 10 (CTNBio) foi revogada pela vigente RN Nº 30 de 16/09/20 que, dentre outras diretrizes, estabelece o plantio de uma linha adicional de plantas

poliembriônicas na bordadura, preferencialmente o citrandarin (BRASIL 2020). Dessa forma, três linhas de plantas poliembriônicas constituirão a bordadura de biossegurança. Embora o sistema de bordadura estabelecido pela RN N° 30 composto por plantas de citrandarin possa ser igualmente eficaz na contenção do FG entre citros GM e não GM frente ao estabelecido na normativa revogada (RN N° 10), cabe destacar que não há estudos que demonstrem o potencial de polinização dos demais genótipos referidos na RN N° 30 que podem ser utilizados como bordadura (citrange e *P. trifoliata*). Ademais, a superior geração de progênies trifolioladas de citrandarin H3 em comparação ao citrandarin 1600 pode indicar que o primeiro genótipo (H3) é o mais adequado para constituir o sistema de bordaduras de LPMAs de citros GM.

3.5.2 Potencial de polinização do citrandarin em polinização controlada

3.5.2.1 Germinação e viabilidade de pólen *in vitro*

A viabilidade *in vitro* do pólen de citrandarin H3 foi a maior entre os genótipos avaliados, em relação aos grãos de pólen de laranjeiras GM e não GM, o que pode ser um fator que reflete e/ou contribui para a alta capacidade de competição do pólen de citrandarin frente a outros genótipos observada em condições de polinização controlada com o pólen de citrandarin 1600 (Sanches 2014). Ademais, o pólen de citrandarin H3 apresentou a maior média de germinação *in vitro* entre os genótipos avaliados, sendo estatisticamente igual à taxa de germinação *in vitro* do pólen de laranja doce 'Pineapple' não GM.

Além disso, a baixa viabilidade do pólen de laranja doce verificada foi anteriormente relatada para as variedades 'Pera' e 'Valencia', as quais apresentaram viabilidade predominantemente baixa dentre as 44 variedades de laranja avaliadas (Domingues et al. 1999).

Entre os genótipos de laranja doce GM e os respectivos controles não GM, houve semelhança nos resultados de viabilidade dos grãos de pólen *in vitro*, o que pode suportar a hipótese de que os eventos GM não são fundamentalmente diferentes dos controles convencionais neste aspecto. Em citros, as taxas de germinação do pólen das plantas transgênicas não diferiram das taxas dos controles correspondentes (Pons et al. 2011), bem como em *Festuca arundinacea* (Wang et al. 2004) e em soja, milho e algodão (Soares et al. 2023).

3.5.2.2 Polinização controlada

A média de SPF nos frutos das polinizações controladas foi maior em comparação aos dados de polinização aberta (vide seção 2.4.1.1 *FLUXO DO TRANSGENE PARA TANGERINEIRA CLEMENULES DE BORDADURA*), o que pode ser consequência da alta concentração de grãos de pólen depositado no estigma das flores nas polinizações controladas, bem da eliminação da competição com outros pólenes e ausência de polinizadores ineficientes, que podem ocorrer em condições de polinização aberta.

O genótipo receptor de pólen influenciou o número de SPF dos frutos de polinização controlada, sendo verificada maior média de SPF nos frutos de plantas receptoras Clemenules em comparação aos frutos de plantas receptoras laranjeira doce 'Pera'. Por outro lado, não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos para essa variável.

A média de SPF e a taxa de fixação de frutos (FF) são fatores utilizados para prever, indiretamente, o êxito de cruzamentos intervarietais (Spiegel-Roy e Goldschmidt 1996; Ascari et al. 2020). De Lange e colaboradores (1974) verificaram uma baixa compatibilidade reprodutiva de laranjeiras doces a partir dos resultados de SPF e FF em polinizações controladas. Na planta receptora tangor 'Ortanique', a polinização com pólen de cultivares de laranjeira doce induziu um nível relativamente baixo de sementes por fruto (3,0) e menor taxa de fixação de frutos (17,5%) em comparação com pomelos e tangores, que atingiram valores próximos a 70% de fixação de frutos (De Lange et al. 1974).

Apesar de polinizações controladas exclusivamente com pólen de laranjeira doce não GM não terem sido realizadas no presente trabalho, outros autores relataram médias de SPF em polinização controlada exclusivamente com pólen de laranjeira doce em plantas receptoras Clemenules de 16,51 com pólen de 'Pera' (Azevedo et al. 2013) e de 7,2 com pólen de 'Pineapple' (Pons et al. 2011).

Além disso, os dados de polinizações mistas com pólen de citrandarin H3 e laranjeiras doces apontam para uma tendência a maior geração de sementes nos tratamentos com pólen de citrandarin H3 e laranjeiras doces GM (de 18,8 a 27,7 no presente trabalho e de 13,5 em Pons et al., 2011) e de citrandarin e laranjeira doce não GM (18,1 no presente trabalho) do que apenas o pólen de laranjeira doce, conforme dados de outros estudos mencionados no parágrafo anterior.

Com relação à identificação de trifoliolados, as progênies de plantas receptoras *Clemenules* apresentaram maior percentual de trifoliolados em comparação a progênies de plantas receptoras laranjeira doce 'Pera'. Além disso, os tratamentos com pólen misto de citrandarin H3 e laranjeiras doces GM apresentaram maior percentual de progênies trifolioladas em comparação à polinização apenas com pólen de citrandarin H3. De forma contrastante, Sanches (2014) verificou 31,6% de trifoliolados em polinização exclusiva com pólen de citrandarin 1600 e de 19,8% a 26,5% para os tratamentos compostos por mistura de pólen de citrandarin 1600 e de laranjeira doce não GM (Sanches 2014).

Embora não tenham sido identificadas diferenças significativas para a variável FG entre os genótipos de plantas receptoras e entre os tratamentos de pólen, os resultados foram discutidos de maneira descritiva. Em polinizações mistas com pólen laranjeira doce GM e pólen de citrandarin H3, o percentual de detecção de progênies GM registrado no presente trabalho foi similar ao verificado por Pons e colaboradores (2011) em polinizações controladas, de 5%.

O citrandarin H3 reduziu o sucesso de reprodução do pólen GM em polinizações controladas mistas em comparação a polinizações apenas com pólen de laranjeira doce GM, nas quais 86% das progênies continham o transgene. De forma contrastante aos 5% de progênies GM observado em polinizações mistas com pólen laranjeira doce GM e citrandarin H3, o percentual de progênies GM esperado seria de 43,75%, caso a capacidade de competição polínica dos dois doadores de pólen fosse semelhante (Pons et al. 2011). Entretanto, não foram realizadas polinizações controladas exclusivamente com pólen de laranjeira doce GM ou não GM, cujos resultados poderiam subsidiar a comparação da capacidade reprodutiva das laranjeiras doces e da herança do transgene em situação de polinização controlada.

Considerando que a forte relação linear verificada entre os dados de paternidade atribuída ao citrandarin via análise fenotípica e da combinação dos resultados das análises fenotípica e genotípica (via análise de marcadores moleculares microssatélites), disposta na seção 3.4.1 *POTENCIAL DE POLINIZAÇÃO DO CITRANDARIN EM POLINIZAÇÃO ABERTA*, é válida para condição de polinização controlada, a paternidade total estimada para o citrandarin H3 em progênies de plantas receptoras *Clemenules* varia de 78,41% a 87,92% e de 25,46% a 35,99% para as progênies de laranjeiras doce 'Pera'.

3.6 CONCLUSÕES

A superior capacidade competitiva do pólen de citrandarin, especialmente do acesso H3, em relação ao pólen de laranjeiras doces GM e não GM foi evidenciada *in vitro*, a partir da superior viabilidade do pólen em comparação a outros pólenes de espécies cítricas e também *in vivo*, face à atribuição de paternidade ao citrandarin via análises fenotípica e de marcadores moleculares. Adicionalmente, a combinação de análises genéticas e fenotípicas possibilitou uma identificação mais precisa da paternidade atribuída ao citrandarin, cujos resultados de regressão lineares constituíram uma ferramenta adicional para estimativa de paternidade do citrandarin nos casos em que a avaliação por marcadores moleculares não é viável.

Além disso, a distância entre as plantas receptoras de pólen e as plantas de citrandarin também influenciou o sucesso da competição por fertilização e, consequentemente, o FG. A tendência de plantas receptoras mais próximas às bordaduras de citrandarin apresentarem maior frequência de progênies trifolioladas em comparação às mais distantes indicou que a proximidade física entre plantas favoreceu a polinização cruzada com o pólen de citrandarin em detrimento ao pólen GM. Os dados obtidos neste estudo contribuem para a validação e desenvolvimento de estratégias que subsidiem futuras liberações comerciais de citros GM com efetiva contenção do FG.

REFERÊNCIAS

- Abud S, Souza PIMD, Moreira CT, Andrade SRM, Ulbrich AV, Vianna GR, et al. Dispersão de pólen em soja transgênica na região do Cerrado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 2003;38(10):1229–35.
- AL-Anbari A, Barusrux S, Pornpongrungrueng P, Theerakulpisut P. Pollen grain morphology of Citrus (Rutaceae) in Iraq. Em: *International Conference on Plant, Marine and Environmental Sciences (PMES-2015)* Jan 1-2, 2015 Kuala Lumpur (Malaysia). International Institute of Chemical, Biological & Environmental Engineering; 2015.
- Aleza P, Juárez J, Ollitrault P, Navarro L. Polyembryony in non-apomictic citrus genotypes. *Annals of Botany*. 2010;106(4):533–45.
- Ali S, Khan A, Raza S, Rehman R. Innovative breeding methods to develop seedless citrus cultivars. *International Journal of Biosciences (IJB)*. agosto de 2013;3(8):191–201.
- Ascari L, Novara C, Dusio V, Oddi L, Siniscalco C. Quantitative methods in microscopy to assess pollen viability in different plant taxa. *Plant Reproduction*. 2020;33(3–4):205–19.
- Azevedo FAD, Borges RDS, Fávero MAB, Giorgi Neto RO, Schinor EH, Bastianel M. A polinização cruzada determina a formação de sementes em frutos de clementina Nules. *Pesquisa Agropecuária Tropical*. 2013;43(1):88–92.
- Barbieri HB, Fernandes LS, Pontes JGDM, Pereira AK, Fill TP. An overview of the most threatening diseases that affect worldwide citriculture: Main features, diagnose, and current control strategies. *Frontiers in Natural Products*. 2023;2:1045364.
- Barry GH, Caruso M, Gmitter FG. Commercial scion varieties. Em: *The Genus Citrus* [Internet]. Elsevier; 2020 [citado 29 de setembro de 2024]. p. 83–104. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012812163400005X>
- Bassanezi RB, Lopes SA, De Miranda MP, Wulff NA, Volpe HXL, Ayres AJ. Overview of citrus huanglongbing spread and management strategies in Brazil. *Tropical Plant Pathology*. 2020;45(3):251–64.
- Beckie HJ, Warwick SI. Persistence of an oilseed rape transgene in the environment. *Crop Protection*. 2010;29(5):509–12.
- BRASIL. Presidência da República Casa Civil. Decreto nº5.591 de 22 de novembro de 2005. Regulamenta dispositivos da Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005, que regulamenta os incisos II, IV e V do § 1º do art. 225 da Constituição, e dá outras providências. 2005.
- BRASIL. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. Resolução Normativa nº 10, de 2 de outubro de 2013. Estabelece condições de isolamento para a liberação planejada no meio ambiente de laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck)

geneticamente modificada. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 03 de outubro de 2013. no 192, seção 1. 2013.

BRASIL. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. Resolução Normativa Nº 30, De 16 de Setembro De 2020. Estabelece condições de isolamento para a liberação planejada no meio ambiente (LPMA) de citros e afins geneticamente modificados. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 22 de setembro de 2020. no 182, seção 1. 2020.

Cameron JW, Soost RK, Frost HB. The Horticultural Significance of the Nucellar Embryony in Citrus. International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010) [Internet]. 1957 [citado 23 de novembro de 2024];1(1). Disponível em: <https://escholarship.org/uc/item/3rz69171>

Campbell DR, Waser NM. Variation in pollen flow within and among populations of *ipomopsis aggregata*. Evolution. 1989;43(7):1444–55.

Chen LJ. Gene Flow from Cultivated Rice (*Oryza sativa*) to its Weedy and Wild Relatives. Annals of Botany. 2004;93(1):67–73.

Comissão Técnica Nacional em Biossegurança. Processo de OGM [Internet]. 2024 [citado 15 de fevereiro de 2024]. Disponível em: <http://ctnbio.mctic.gov.br/processo-de-ogm>

Convention on Biological Diversity C. The Cartagena Protocol: About the Protocol [Internet]. 2024 [citado 22 de setembro de 2024]. Disponível em: <https://bch.cbd.int/protocol/background>

Crestana S, Foschini MM, Ferreira MD. EMBRAPA. Desafios da Produção de Frutas e Hortaliças Frente aos Extremos Climáticos - Estudo de Caso da Citricultura Paulista. 2018.

Da Silva PHM, Abrahão OS. Gene flow and spontaneous seedling establishment around genetically modified eucalypt plantations. New Forests. 2021;52(3):349–61.

De Jong TJ, Batenburg JC, Klinkhamer PGL. Distance-dependent pollen limitation of seed set in some insect-pollinated dioecious plants. Acta Oecologica. 2005;28(3):331–5.

De Lange JH, Skarup O, Vincent AP. The influence of cross-pollination and girdling on fruit set and seed content of citrus 'Ortanique'. Scientia Horticulturae. 1974;2(3):285–92.

Degani C, Goldring A, Adato I, El-Batsri R, Gazit S. Pollen Parent Effect on Outcrossing Rate, Yield, and Fruit Characteristics of 'Fuerte' Avocado. HortScience. 1990;25(4):471–3.

Degani C, Stern RA, El-Batsri R, Gazit S. Pollen Parent Effect on the Selective Abscission of 'Mauritius' and 'Floridian' Lychee Fruitlets. Journal of the American Society for Horticultural Science. 1995;120(3):523–6.

- Domingues ET, Tulmann Neto A, Teófilo Sobrinho J. Viabilidade do pólen em variedades de laranja doce. *Scientia Agricola*. 1999;56(2):265–72.
- EFSA Panel. Guidance on the risk assessment of genetically modified microorganisms and their products intended for food and feed use. *EFSA Journal* [Internet]. 2011 [citado 26 de outubro de 2024];6(6). Disponível em: <https://data.europa.eu/doi/10.2903/j.efsa.2011.2193>
- Ellstrand NC. Current knowledge of gene flow in plants: implications for transgene flow. Dickinson HG, Hiscock SJ, Crane PR, organizadores. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*. 2003;358(1434):1163–70.
- Ellstrand NC. Is gene flow the most important evolutionary force in plants? *American Journal of Botany*. 2014;101(5):737–53.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Citrus: Commodity in focus [Internet]. 2024 [citado 22 de setembro de 2024]. Disponível em: <https://www.fao.org/markets-and-trade/commodities/citrus/en/#:~:text=Citrus%20is%20one%20of%20the,%2C%20juice%2C%20or%20as%20concentrate.>
- Faria JC, Carneiro GES, Aragão FJL. Gene flow from transgenic common beans expressing the bar gene. *GM Crops*. 2010;1(2):94–8.
- Firmage DH, Dafni A. Field Tests For Pollen Viability; A Comparative Approach. *Acta Horticulturae*. 2001;(561):87–94.
- Free JB. The Behaviour of Honeybees Visiting Flowers of Fruit Trees. *The Journal of Animal Ecology*. 1960;29(2):385.
- Fundecitrus. ESTIMATIVA DA SAFRA DE LARANJA 2024/25 DO CINTURÃO CITRÍCOLA DE SÃO PAULO E TRIÂNGULO/SUDOESTE MINEIRO – CENÁRIO EM MAIO/2024. 2024.
- Fundecitrus, Embrapa, Fundação Coopercitrus Credicitrus, Centro de Citricultura Silvio Moreira. Características de porta-enxertos com uso comercial e potencial no cinturão citrícola de SP E MG. [Internet]. 2021 [citado 25 de outubro de 2024]. Disponível em: https://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/manual_detalhes/poster-de-porta-enxertos/92
- Galeano P, Debat CM, Ruibal F, Fraguas LF, Galván GA. Cross-fertilization between genetically modified and non-genetically modified maize crops in Uruguay. *Environmental Biosafety Research*. 2010;9(3):147–54.
- García C, Arroy JM, Godoy JA, Jordano P. Mating patterns, pollen dispersal, and the ecological maternal neighbourhood in a *Prunus mahaleb* L. population. *Molecular Ecology*. 2005;14(6):1821–30.
- Gaudinier A, Blackman BK. Evolutionary processes from the perspective of flowering time diversity. *New Phytologist*. 2020;225(5):1883–98.

- Germanà MA, Aleza P, Grosser JW, Dutt M, Wang N, Cuenca J, et al. Citrus biotechnology. Em: The Genus Citrus [Internet]. Elsevier; 2020 [citado 29 de setembro de 2024]. p. 171–92. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128121634000097>
- Gonsalves D, Gonsalves C, Carr J, Tripathi S, Matsumoto T, Suzuki J, et al. Assaying for Pollen Drift from Transgenic ‘Rainbow’ to Nontransgenic ‘Kapoho’ Papaya under Commercial and Experimental Field Conditions in Hawaii. *Tropical Plant Biology*. 2012;5(2):153–60.
- Grupo Cultivar de Publicações. *Revista Cultivar: Hortaliças e Frutas*. 2023;142(XXI).
- Guimarães RA, Pérez-Maluf R, Castellani EMA. Abelhas (Hymenoptera: Apoidea) Visitantes Das Flores Da Goiaba Em Pomar Comercial De Salinas, MG. *Bragantia*. 2009;16(1):23–7.
- Gurung S, Chettri A. Threat to *Citrus* in a Global Pollinator Decline Scenario: Current Understanding of Its Pollination Requirements and Future Directions. Em: Rustagi A, Chaudhry B, organizadores. *Plant Reproductive Ecology - Recent Advances* [Internet]. IntechOpen; 2022 [citado 29 de setembro de 2024]. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/79341>
- Handel SN. Contrasting Gene Flow Patterns and Genetic Subdivision in Adjacent Populations of *Cucumis sativus* (Cucurbitaceae). *Evolution*. julho de 1983;37(4):760.
- Herrero M. Male and female synchrony and the regulation of mating in flowering plants. Dickinson HG, Hiscock SJ, Crane PR, organizadores. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*. 2003;358(1434):1019–24.
- Hüsken A, Prescher S, Schiemann J. Evaluating biological containment strategies for pollen-mediated gene flow. *Environmental Biosafety Research*. 2010;9(2):67–73.
- IBGE. *Bioma Predominante por Município para Fins Estatísticos (2024)*. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2024.
- Jackson LK, Futch SH. Pollination And Fruit Set: Pollination Requirement. 1997;25–32.
- Jhala AJ, Bhatt H, Topinka K, Hall LM. Pollen-mediated gene flow in flax (*Linum usitatissimum* L.): can genetically engineered and organic flax coexist? *Heredity*. 2011;106(4):557–66.
- Karbassioon A, Yearlsey J, Dirilgen T, Hodge S, Stout JC, Stanley DA. Responses in honeybee and bumblebee activity to changes in weather conditions. *Oecologia*. 2023;201(3):689–701.
- Kavanagh VB, Hills MJ, Eudes F, Topinka K, Yang R, Hall LM. Pollen-Mediated Gene Flow in Triticale. *Crop Science*. 2012;52(5):2293–303.

- Kim CG, Park KW, Lee B, Kim DI, Park JY, Kim HJ, et al. Gene flow from genetically modified to conventional chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Science*. 2009;176(3):406–12.
- Kim YJ, Nam KH, Pack IS, Park JH, Jeong SC, Harn CH, et al. Gene Flow from GM Cabbage to Non-GM Control. *Korean Journal of Agricultural Science*. 2014;41(3):157–61.
- Koltunow AM, Hidaka T, Robinson SP. Polyembryony in Citrus (Accumulation of Seed Storage Proteins in Seeds and in Embryos Cultured *in vitro*). *Plant Physiology*. 1996;110(2):599–609.
- Kundu M, Dubey A, Malik SK. Effect of gamma ray irradiation doses on pollen viability and in-vitro germination in Citrus. *The Indian Journal of Agricultural Sciences*. 2016;86(10).
- Loureiro I, García-Ruiz E, Gutiérrez E, Gómez P, Escorial MC, Chueca MC. Pollen-mediated gene flow in the cultivation of transgenic cotton under experimental field conditions in Spain. *Industrial Crops and Products*. 2016;85:22–8.
- Lu BR. Transgene Escape from GM Crops and Potential Biosafety Consequences: An Environmental Perspective. 2008;4:66–141.
- Malerbo-Souza D. "Visitantes florais na cultura do limoeiro (*Citrus aurantifolia*), var. 'Taiti'. *Ciência e Cultura*. 2010;6(1):53–8.
- Malerbo-Souza DT. Effect of bee-flower interaction on fruit production in orange sweet crop (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Zootecnia Trop*. 2013;31(1):78–93.
- Malerbo-Souza DT, Nogueira-Couto RH, Couto LA. Polinização em cultura de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck, var. Pera-Rio). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 2003;40(4).
- Malerbo-Souza DT, Nogueira-Couto RH, Couto LA. Características das colônias de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.), coletadas de alojamentos naturais em Jaboticabal, Estado de São Paulo. *Acta Scientiarum Animal Sciences*. 2008;24(0):863.
- Manshardt R, Bishaw D, Pitz K, Stewart CN. Gene flow from commercial transgenic papaya fields into feral populations in Hawaii. *Acta Horticulturae*. 2016;(1124):33–40.
- Matus-Cádiz MA, Hucl P, Dupuis B. Pollen-Mediated Gene Flow in Wheat at the Commercial Scale. *Crop Science*. 2007;47(2):573–9.
- Matus-Cádiz MA, Hucl P, Horak MJ, Blomquist LK. Gene Flow in Wheat at the Field Scale. *Crop Science*. 2004;44(3):718–27.
- McPherson MA, Yang RC, Good AG, Nielson RL, Hall LM. Potential for seed-mediated gene flow in agroecosystems from transgenic safflower (*Carthamus tinctorius* L.) intended for plant molecular farming. *Transgenic Research*. 2009;18(2):281–99.

- Messeguer J, Fogher C, Guiderdoni E, Marfà V, Català MM, Baldi G, et al. Field assessments of gene flow from transgenic to cultivated rice (*Oryza sativa* L.) using a herbicide resistance gene as tracer marker: Theoretical and Applied Genetics. 2001;103(8):1151–9.
- Microsoft Corporation. Microsoft Excel for Windows (Microsoft® Excel® for Microsoft 365 MSO (Version 2410 Build 16.0.18129.20158) 64-bit). 2024.
- Millwood RJ. Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) pollen-mediated gene flow and transgene bioconfinement strategies. [Knoxville]: The University of Tennessee, Knoxville; 2019.
- Moffett JO, Rodney DR. Honey Bee Visits to Citrus Flowers. Journal of the Arizona Academy of Science. 1971;6(4):254.
- Morris WF. Predicting the Consequence of Plant Spacing and Biased Movement for Pollen Dispersal by Honey Bees. Ecology. 1993;74(2):493–500.
- Nascimento ETD, Pérez-Maluf R, Guimarães RA, Castellani MA. Diversidade de abelhas visitantes das flores de Citrus em pomares de laranja e tangerina. Revista Brasileira de Fruticultura. 2011;33(1):111–7.
- Pacini E, Franchi GG. Pollen biodiversity – why are pollen grains different despite having the same function? A review. Botanical Journal of the Linnean Society. 2020;193(2):141–64.
- Peris JE, Malara TM, Borges R, Falconi JR, Peña L, Fedriani JM. Reunion overseas: introduced wild boars and cultivated orange trees interact in the Brazilian Atlantic Forest. Revista de Biologia Tropical. 2019;67(4):901–12.
- Pompeu Junior J, Blumer S. Híbridos de trifoliata como porta-enxertos para a laranja “Valência”. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 2009;44(7):701–5.
- Pons E, Navarro A, Ollitrault P, Peña L. Pollen Competition as a Reproductive Isolation Barrier Represses Transgene Flow between Compatible and Co-Flowering Citrus Genotypes. Fuller DQ, organizador. PLoS ONE. 2011;6(10):e25810.
- Poppy GM, Wilkinson MJ, organizadores. Gene flow from GM plants. Oxford ; Ames, Iowa: Blackwell Pub; 2005. (Biological sciences series).
- R Core Team. A language and environment for statistical computing. [Internet]. 2021. Disponível em: <https://www.R-project.org/>
- Rahmé J, Widmer A, Karrenberg S. Pollen competition as an asymmetric reproductive barrier between two closely related *Silene* species. Journal of Evolutionary Biology. setembro de 2009;22(9):1937–43.
- Reuther W. The citrus industry. Vol. IV. UCANR Publications; 1978.
- Rieben S, Kalinina O, Schmid B, Zeller SL. Gene Flow in Genetically Modified Wheat. Newbiggin E, organizador. PLoS ONE. 2011;6(12):e29730.

- Rieseberg LH, Desrochers AM, Youn SJ. Interspecific pollen competition as a reproductive barrier between sympatric species of *Helianthus* (Asteraceae). *American Journal of Botany*. 1995;82(4):515–9.
- Sambrook J, Russell DW. Purification of Nucleic Acids by Extraction with Phenol:Chloroform. *Cold Spring Harb Protoc*. 2006;2006(1):pdb.prot4455.
- Sanches A. Capacidade competitiva entre pólenes de citrandarin [*Citrus reshni* hort. ex Tanaka x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] e laranjas doces. [PhD Thesis]. Fundo De Defesa Da Citricultura. Mestrado Profissional Em Controle De Doenças E Pragas Dos Citros.; 2014.
- Sandhu S, Blount AR, Quesenberry KH, Altpeter F. Apomixis and ploidy barrier suppress pollen-mediated gene flow in field grown transgenic turf and forage grass (*Paspalum notatum* Flügge). *Theoretical and Applied Genetics*. 2010;121(5):919–29.
- Santos MDA. Produção e emissão de β -Cariofileno em Laranjeiras e *Arabidopsis Thaliana* pela superexpressão de terpeno sintases e avaliação da expressão gênica nas vias biossintéticas para produção de terpenos [PhD Thesis]. [Araraquara]: Universidade Estadual Paulista (UNESP); 2019.
- Schinor EH, Arakaki M, Cristofani-Yaly M. Agronomic characterization of citrandarin fruits and seeds. *Comunicata Scientiae*. 2020;11:e3416.
- Scorza R, Kriss AB, Callahan AM, Webb K, Demuth M, Gottwald T. Spatial and Temporal Assessment of Pollen- and Seed-Mediated Gene Flow from Genetically Engineered Plum *Prunus domestica*. *PLoS ONE*. 2013;8(10):e75291.
- Slatkin M. Gene Flow in Natural Populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 1985;1:393–430.
- Soares D, Vertuan H, Bacalhau F, José M, Crivellari A, Belchior GG, et al. Genetically modified crops do not present variations in pollen viability and morphology when compared to their conventional counterparts. Adhimoolam K, organizador. *PLOS ONE*. 2023;18(5):e0285079.
- Soares Filho WDS, Moreira CDS, Cunha MAPD, Cunha Sobrinho APD, Passos OS. Poliembrionia e frequência de híbridos em *Citrus* spp. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 2000;35(4):857–64.
- Spiegel-Roy P, Goldschmidt EE. *The Biology of Citrus* [Internet]. 1º ed. Cambridge University Press; 1996 [citado 29 de setembro de 2024]. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/product/identifier/9780511600548/type/book>
- Szabo TI. Effect of Weather Factors on Honeybee Flight Activity and Colony Weight Gain. *Journal of Apicultural Research*. 1980;19(3):164–71.
- Talon M, Caruso M, Gmitter FG. *The genus citrus*. Duxford, United Kingdom: Woodhead publishing, an imprint of Elsevier; 2020.

- Tan Y -Y., Xu H -H., Tao W -J., Hoffmann MH, Wang X -F., Lu Y -T. Transgenic GFP as a Molecular Marker for Approaches to Quantify Pollination Mechanism and Gene Flow in *Arabidopsis thaliana*. Plant Biology. 2005;7(4):405–10.
- Tiwari S, Mann RS, Rogers ME, Stelinski LL. Insecticide resistance in field populations of Asian citrus psyllid in Florida. Pest Management Science. 2011;67(10):1258–68.
- USDA. United States Department of Agriculture Foreign Agricultural Service. Citrus: World Markets and Trade. 2018.
- USDA. United States Department of Agriculture Foreign Agricultural Service. Citrus: World Markets and Trade. 2020.
- USDA. United States Department of Agriculture. Citrus Fruits 2023 Summary 08/31/2023. 2023.
- USDA. United States Department of Agriculture Foreign Agricultural Service. Citrus: World Markets and Trade. 2024.
- USDA-APHIS. Regulation of Biotech Plants [Internet]. 2024 [citado 22 de setembro de 2024]. Disponível em: <https://www.usda.gov/topics/biotechnology/how-federal-government-regulates-biotech-plants>
- Van Deynze AE, Sundstrom FJ, Bradford KJ. Pollen-Mediated Gene Flow in California Cotton Depends on Pollinator Activity. Crop Science. 2005;45(4):1565–70.
- Vansell G, Watkins W. Orange Nectar and Pollen in Relation to Bee Activity. Journal of Economic Entomology. 1942;35(3):321–3.
- Wallace HM, King BJ, Lee LS. Pollen Flow and the Effect on Fruit Size in an “Imperial” Mandarin Orchard. HortScience. 2002;37(1):84–6.
- Wang XJ, Dong YF, Jin X, Yang JT, Wang ZX. The application of gene splitting technique for controlling transgene flow in rice. Transgenic Research. 2020;29(1):69–80.
- Wang XJ, Jin X, Dun BQ, Kong N, Jia SR, Tang QL, et al. Gene-Splitting Technology: A Novel Approach for the Containment of Transgene Flow in *Nicotiana tabacum*. Soberón M, organizador. PLoS ONE. 2014;9(6):e99651.
- Wang Z, Ge Y, Scott M, Spangenberg G. Viability and longevity of pollen from transgenic and nontransgenic tall fescue (*Festuca arundinacea*) (Poaceae) plants. American Journal of Botany. 2004;91(4):523–30.
- Ward M, Dick C, Grib R, Lowe A. To self, or not to selfy A review of outcrossing and pollen-mediated gene flow in neotropical trees. Heredity. 2005;95:246–54.
- Watrud LS, Lee EH, Fairbrother A, Burdick C, Reichman JR, Bollman M, et al. Evidence for landscape-level, pollen-mediated gene flow from genetically modified creeping bentgrass with CP4 EPSPS as a marker. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2004;101(40):14533–8.

- Wilcock C, Neiland R. Pollination failure in plants: why it happens and when it matters. *Trends in Plant Science*. 2002;7(6):270–7.
- Yamamoto M. Progress on studies for seedless breeding of citrus in Japan. *Advances in Horticulture Science*. 2014;28(2):64–72.
- Yan S, Zhu J, Zhu W, Li Z, Shelton AM, Luo J, et al. Pollen-mediated gene flow from transgenic cotton under greenhouse conditions is dependent on different pollinators. *Scientific Reports*. 2015;5(1):15917.
- Zapiola ML, Mallory-Smith CA. Pollen-mediated gene flow from transgenic perennial creeping bentgrass and hybridization at the landscape level. Olsen KM, organizador. *PLOS ONE*. 2017;12(3):e0173308.
- Zhang BH, Pan XP, Guo TL, Wang QL, Anderson TA. Measuring Gene Flow in the Cultivation of Transgenic Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Molecular Biotechnology*. 2005;31(1):011–20.

APÊNDICE A

Apêndice A - 1. Características e número de plantas dos eventos GM nas áreas de LPMA de citros GM (experimento 1, 2, 3 e 6).

Variedade	Evento	Característica ¹	Núm. Plantas
Experimento 1 (plantio em 10 de dezembro de 2013)			
Navelina	AS1	Decréscimo drástico de limoneno	65
Navelina	AS3	Decréscimo drástico de limoneno	65
Navelina	AS5	Decréscimo drástico de limoneno	65
Navelina	AS7	Decréscimo drástico de limoneno	65
Navelina	S8	Decréscimo leve de limoneno	65
Pineapple	AS10	Decréscimo leve de limoneno	65
Pineapple	AS11	Decréscimo drástico de limoneno	65
Pineapple	S12	Sem alteração de limoneno	65
Pineapple	S13	Aumento de limoneno	65
Pineapple	S14	Sem alteração de limoneno	65
Pineapple CPI	-	Controle não GM	65
Navelina CNA	-	Controle não GM	65
Natal	-	Suscetível a MPC	65
Laranja azeda	-	Resistente a MPC	50
Lima ácida Tahiti	-	Resistente a MPC	50
Experimento 3 (plantio em 07 de janeiro de 2016)			
Pineapple	CHX-RNAi 1	Aumento de β -caroteno	26
Pineapple	CGUS 1	Controle GM	26
Pineapple	Pineapple	Controle não GM	26
Pera	P-FTA 2	Aumento sesquiterpenos	13
Pera	P-FTA 4	Aumento sesquiterpenos	13
Pera	P-FTA 20	Aumento sesquiterpenos	13
Pera	P-TA 1	Aumento sesquiterpenos	13
Pera	P-TA 5	Aumento sesquiterpenos	13
Pera	P-TA 10	Aumento sesquiterpenos	13
Pera	P-MFA 4	Aumento sesquiterpenos	13
Pera	P-MFA 12	Aumento sesquiterpenos	13
Pera	P-MFA 15	Aumento sesquiterpenos	13
Pera	P-MA 12	Aumento sesquiterpenos	13
Pera	P-MA 50	Aumento sesquiterpenos	13
Pera	P-MA 52	Aumento sesquiterpenos	13
Pera	P-FA(2) 11	Aumento sesquiterpenos	13
Pera	P-FA(2) 45	Aumento sesquiterpenos	13
Pera	P-FA(2) 47	Aumento sesquiterpenos	13
Pera	P-A(2) 15	Aumento sesquiterpenos	13
Pera	P-A(2) 17	Aumento sesquiterpenos	13
Pera	P-A(2) 27	Aumento sesquiterpenos	13
Pera	P-C(2) 1	Controle GM	13
Pera	-	Controle não GM	13
Valencia	V-FTA(2) 7	Aumento sesquiterpenos	13

Variedade	Evento	Característica ¹	Núm. Plantas
Experimento 3 (plantio em 07 de janeiro de 2016)			
Valencia	V-FTA(2) 10	Aumento sesquiterpenos	13
Valencia	V-FTA(2) 11	Aumento sesquiterpenos	13
Valencia	V-TA 1	Aumento sesquiterpenos	13
Valencia	V-TA 5	Aumento sesquiterpenos	13
Valencia	V-TA 8	Aumento sesquiterpenos	13
Valencia	V-MFA 4	Aumento sesquiterpenos	13
Valencia	V-MFA 18	Aumento sesquiterpenos	13
Valencia	V-MFA 35	Aumento sesquiterpenos	13
Valencia	V-MA 41	Aumento sesquiterpenos	13
Valencia	V-MA 54	Aumento sesquiterpenos	13
Valencia	V-MA 56	Aumento sesquiterpenos	13
Valencia	V-FA(2) 3	Aumento sesquiterpenos	13
Valencia	V-FA(2) 38	Aumento sesquiterpenos	13
Valencia	V-FA(2) 41	Aumento sesquiterpenos	13
Valencia	V-A(2) 3	Aumento sesquiterpenos	13
Valencia	V-A(2) 5	Aumento sesquiterpenos	13
Valencia	V-A(2) 8	Aumento sesquiterpenos	13
Valencia	V-C(2) 1	Controle GM	13
Valencia	-	Controle não GM	13
Experimento 3 (plantio em 18 de dezembro de 2016)			
Pera	-	Controle não GM	20
Valencia	-	Controle não GM	20
Valencia	V-HB21 02	Aumento sesquiterpenos	10
Valencia	V-HB21 05	Aumento sesquiterpenos	10
Valencia	V-HB21 06	Aumento sesquiterpenos	10
Valencia	V-HB21 14	Aumento sesquiterpenos	10
Valencia	V-HB21 15	Aumento sesquiterpenos	10
Valencia	V-HB21 16	Aumento sesquiterpenos	10
Valencia	V-HB21 17	Aumento sesquiterpenos	10
Valencia	V-HB21 27	Aumento sesquiterpenos	10
Valencia	V-HB21 30	Aumento sesquiterpenos	10
Valencia	V-HB21 31	Aumento sesquiterpenos	10
Valencia	V- Pbim 19 3	GM; Plasmideo	10
Valencia	V-CRTS 8	Aumento carotenóides	10
Valencia	V-CRTS 10	Aumento carotenóides	10
Valencia	V-CRTS 11	Aumento carotenóides	10
Valencia	V-CRTS 12	Aumento carotenóides	10
Valencia	V- CHX+HRP+CRTS 8	Aumento licopeno	10
Valencia	V- CHX+HRP+CRTS 17	Aumento licopeno	10
Valencia	V- CHX+HRP+CRTS 21	Aumento licopeno	10
Valencia	V- CHX+HRP+CRTS 35	Aumento licopeno	10

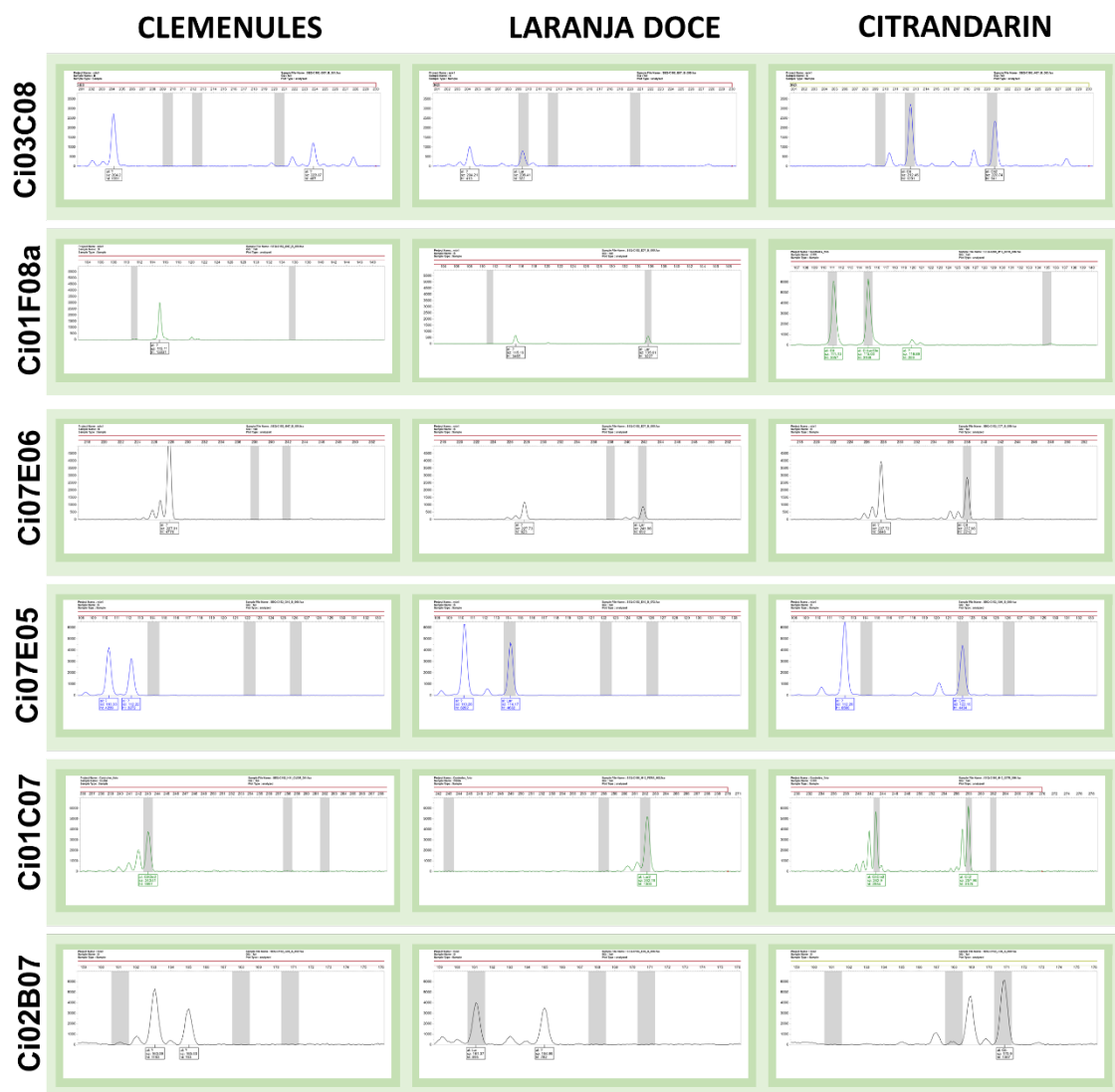
Variedade	Evento	Característica ¹	Núm. Plantas
Experimento 3 (plântio em 18 de dezembro de 2016)			
Valencia	V- K 11	Aumento antocianinas	10
Valencia	V- K 12	Aumento antocianinas	10
Valencia	V- K 13	Aumento antocianinas	10
Valencia	V- K 17	Aumento antocianinas	10
Valencia	V- K 19	Aumento antocianinas	10
Valencia	V- K 20	Aumento antocianinas	10
Valencia	V- K 23	Aumento antocianinas	10
Valencia	V- K 26	Aumento antocianinas	10
Valencia	V- K 29	Aumento antocianinas	10
Valencia	V- K 31	Aumento antocianinas	10
Valencia	V-271 3	Aumento antocianinas	10
Valencia	V-271 6	Aumento antocianinas	10
Valencia	V-271 10	Aumento antocianinas	10
Valencia	V-271 16	Aumento antocianinas	10
Valencia	V-271 17	Aumento antocianinas	10
Valencia	V-271 19	Aumento antocianinas	10
Valencia	V-271 20	Aumento antocianinas	10
Valencia	V-271 23	Aumento antocianinas	10
Pera	P-CRTS 25	Aumento carotenóides	10
Pera	P-CRTS 27	Aumento carotenóides	10
Pera	P-CRTS 32	Aumento carotenóides	10
Pera	P- CHX+HRP+CRTS 2	Aumento licopeno	10
Pera	P- K 1	Aumento antocianinas	10
Pera	P- K 3	Aumento antocianinas	10
Pera	P- K 4	Aumento antocianinas	10
Pera	P- K 7	Aumento antocianinas	10
Pera	P- K 11	Aumento antocianinas	10
Pera	P- K 20	Aumento antocianinas	10
Pera	P- K 24	Aumento antocianinas	10
Pera	P- K 36	Aumento antocianinas	10
Pera	P- Pbim19 11	GM; Plasmideo	20
Pera	P-HB21 2	Aumento sesquiterpenos	10
Pera	P-HB21 4	Aumento sesquiterpenos	10
Pera	P-HB21 12	Aumento sesquiterpenos	10
Pera	P-HB21 13	Aumento sesquiterpenos	10
Pera	P-HB21 15	Aumento sesquiterpenos	10
Pera	P-HB21 13	GM; Incremento sesquiterpeno	10
Pera	P-HB21 15	GM; Incremento sesquiterpeno	10
Pera	P-HB21 16	GM; Incremento sesquiterpeno	10
Pera	P-HB21 19	GM; Incremento sesquiterpeno	10
Pera	P-HB21 20	GM; Incremento sesquiterpeno	10
Pera	P-HB21 23	GM; Incremento sesquiterpeno	10
Pera	P-HB21 24	GM; Incremento sesquiterpeno	10

Variedade	Evento	Característica ¹	Núm. Plantas
Experimento 3 (plântio em 18 de dezembro de 2016)			
Pera	P- Pbim19 11	GM; Plasmideo	10
Pera	P-HB21 16	Aumento sesquiterpenos	10
Pera	P-HB21 19	Aumento sesquiterpenos	10
Pera	P-HB21 20	Aumento sesquiterpenos	10
Pera	P-HB21 23	Aumento sesquiterpenos	10
Pera	P-HB21 24	Aumento sesquiterpenos	10
Experimento 6 (plântio em 27 de novembro de 2019)			
Pera	P-LSAS 7	Redução de limoneno no fruto	15
Pera	P-LSAS 21	Redução de limoneno no fruto	15
Valencia	V-LSAS 18	Redução de limoneno no fruto	15
Valencia	V-LSAS 19	Redução de limoneno no fruto	15
Valencia	V-LSAS 23	Redução de limoneno no fruto	15
Pera	P-3UTR 7	Redução de limoneno no fruto	15
Pera	P-3UTR 8	Redução de limoneno no fruto	15
Pera	P-3UTR 28	Redução de limoneno no fruto	15
Pera	P-3UTR 34	Redução de limoneno no fruto	15
Pera	P-C	GM; Plasmideo	15
Valencia	V-C	GM; Plasmideo	15
Pera	-	Controle não GM	15
Valencia	-	Controle não GM	15
Experimento 2 (plântio em 13 de novembro de 2014)			
Navelina	AS1	Decréscimo drástico de limoneno	65
Navelina	AS3	Decréscimo drástico de limoneno	65
Navelina	AS5	Decréscimo drástico de limoneno	65
Navelina	AS7	Decréscimo drástico de limoneno	65
Navelina	S8	Decréscimo leve de limoneno	65
Pineapple	AS10	Decréscimo leve de limoneno	65
Pineapple	AS11	Decréscimo drástico de limoneno	65
Pineapple	S12	Sem alteração de limoneno	65
Pineapple	S13	Aumento de limoneno	65
Pineapple	S14	Sem alteração de limoneno	65
Pineapple	CPI	Controle não GM	65
Navelina	CNA	Controle não GM	65
Natal	-	Suscetível a MPC	50
Laranja Azeda	-	Resistente a MPC	45
Lima Ácida	-	Resistente a MPC	45
Clemenules	-	Monoembrônica auto-incompatível	60
Pera	-	Monitoramento de pólen GM	10
Pineapple	AS10	GM; decréscimo drástico de limoneno	50
Pineapple	AS10	GM; decréscimo drástico de limoneno	50
Pineapple	AS10	GM; decréscimo drástico de limoneno	50
Pineapple	AS10	GM; decréscimo drástico de limoneno	50
Pineapple	CPI	Sem alteração de limoneno	50
Pineapple	CPI	Se alteração de limoneno	50

Pineapple	CPI	Sem alteração de limoneno	50
Pineapple	CPI	Sem alteração de limoneno	50
Variedade	Característica		Núm. Plantas
Bordadura de Biossegurança (Experimentos 1, 3 e 6)			
Pera	Monitoramento do fluxo de pólen GM		872
Clemenules	Monoembriônica auto-incompatível		840
Citrandarin	Superpolinizador		808
Bordadura de Biossegurança (Experimento 2)			
Pera	Monitoramento do fluxo de pólen GM		790
Clemenules	Monoembriônica auto-incompatível		380
Citrandarin	Superpolinizador		348

LS: Limoneno sintase; VV: vetor vazio; CHX: β -caroteno hidroxilase para interferência com RNA; GUS: β -glucuronidase; FTA: Sesquiterpeno sintase (SQS) + Farnesil difosfato sintase (FPPS) para cloroplasto; TA: SQS para cloroplasto; MFA: SQS + FPPS para mitocôndria; MA: SQS para mitocôndria; FA: SQS + FPPS para citosol; A: SQS para citosol; SQS: Sesquiterpeno sintase; CrtB: Fitoeno sintase; CrtI: Fitoeno desaturase; bCHX: beta-caroteno hidroxilase; RUBY: Fator de transcrição do tipo MYB; bHLH: Factor de transcrição da família bHLH; nptII: resistência canamicina; GM: geneticamente modificado.

Fonte: elaborada pelo Autor (2024).



Apêndice A - 2. Alelos (pb) esperados para os marcadores moleculares microsatélites em genótipos de citros potencialmente doadores de pólen das LPMAs de citros GM.

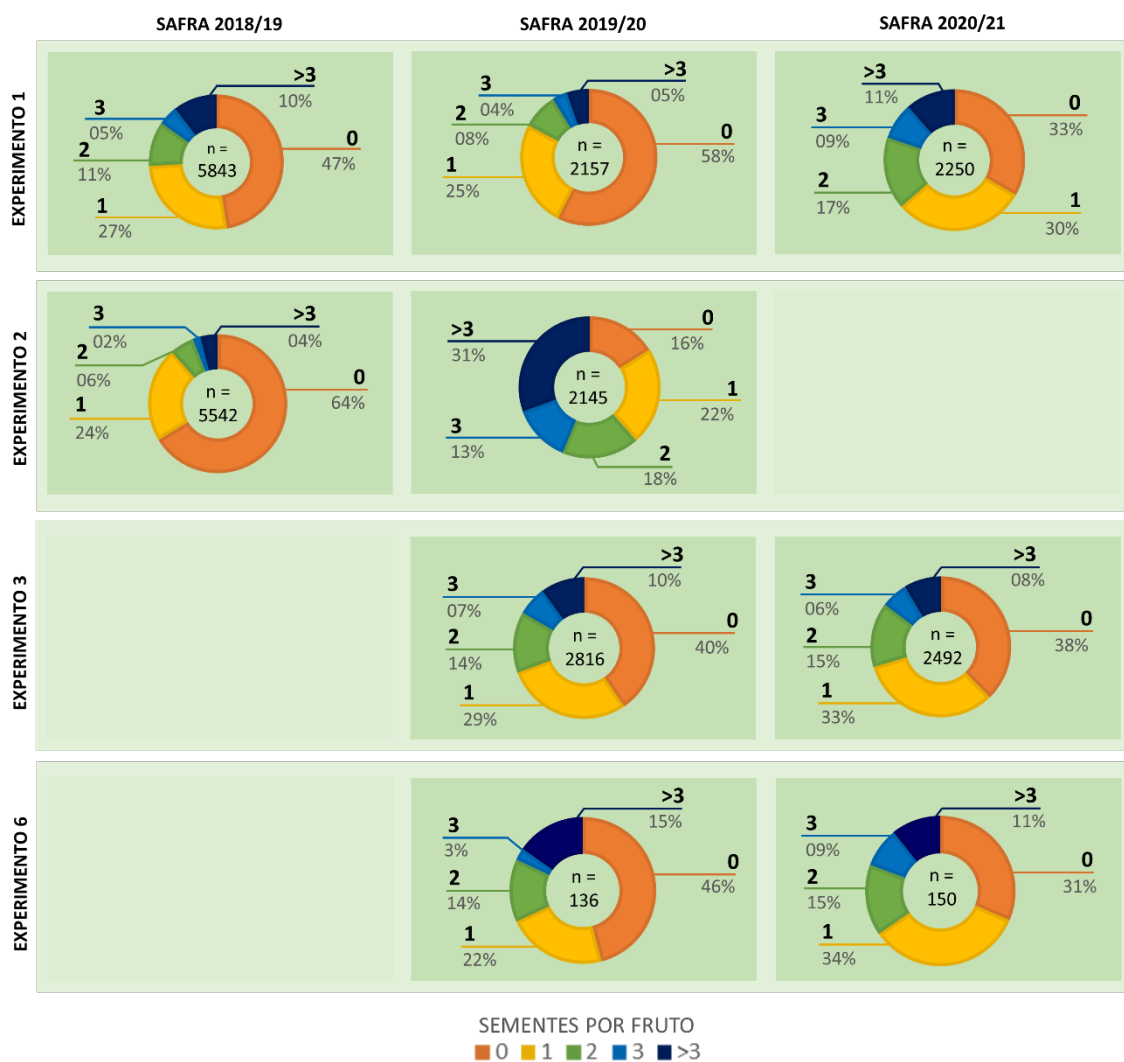
Fonte: elaborada pelo Autor (2024).

Apêndice A - 3. Média mensal de temperatura do ar (°C; em vermelho), umidade relativa (%; em rosa) e precipitação (mm; em azul) em estação meteorológica localizada a) no experimento 2 (período: Julho/2018 a Julho/2020) e b) próxima aos experimentos 1, 3 e 6 (período: Julho/2019 a Julho/2023).

Ano/mês	Temperatura do Ar (°C)			Umidade Relativa do Ar (%)			Precipitação (mm)
	méd	máx	mín	méd	máx	mín	soma
Estação Meteorológica próxima ao experimento 1 (aproximadamente 5 km de distância)							
2023/07	18,66	32,88	3,79	76,06	100	19,63	1,0
2023/06	17,24	31,48	4,57	82,91	100	26,24	87,6
2023/05	19,14	32,79	4,96	81,78	100	21,85	57,4
2023/04	21,62	34,01	10,3	87,08	100	30,15	75,2
2023/03	24,05	35,7	16,7	86,81	100	33,12	141,6
2023/02	24,17	36,15	17,74	89,09	100	38,25	193,2
2023/01	23,48	36,67	17,27	90,83	100	32,83	325,0
2022/12	23,57	36,96	15,2	87,5	100	20,59	302,2
2022/11	22,46	36,4	10,92	72,69	100	21,07	162,2
2022/10	23,48	37	12,49	77,64	100	21,68	103,6
2022/09	20,58	35,98	7,62	76,12	100	21	96,8
2022/08	19,84	34,92	6,49	68,31	100	19,12	28,0
2022/07	19,82	33,29	6,63	70,36	100	19,84	0,0
2022/06	18,17	30,96	2,99	82,77	100	21,71	14,0
2022/05	18,2	33,59	2,14	82,15	100	27,38	60,2
2022/04	22,62	35,18	8,75	83,75	100	30,75	58,8
2022/03	24,8	36,56	15,32	84,66	100	34,12	182,8
2022/02	24,42	37,49	15,91	85,65	100	34,99	111,8
2022/01	23,96	37,43	16,37	89,23	100	30,21	381,8
2021/12	23,86	36,09	12,21	81,09	100	24,22	244,6
2021/11	24	37,77	12,18	73,79	100	14,48	130,6
2021/10	22,84	36,69	12,51	81,27	100	20,77	152,6
2021/09	24,97	40,42	11,95	58,99	100	16,86	4,4
2021/08	21,07	36,91	6,53	61,49	100	17	5,0
2021/07	16,63	32,06	-2,69	64,95	100	13,8	11,4
2021/06	18,37	32,3	-1,15	79,92	100	20,71	32,6
2021/05	19,4	32,73	4,94	78,05	100	17,65	17,2
2021/04	21,45	33,82	10,82	78,63	100	27,48	23,6
2021/03	24,41	36,31	13,84	83,33	100	31,94	106,8
2021/02	23,99	36,63	15	84,52	100	29,31	122,0
2021/01	24,85	36,83	15,75	86,22	100	29,87	94,6
2020/12	24,31	36,09	16,39	87,17	100	34,05	249,4
2020/11	23,93	38,05	9,42	71,85	100	18,1	127,8
2020/10	24,94	41,93	12,26	68,41	100	17,41	62,0
2020/09	24,48	41,09	10,55	59,46	100	15,97	8,2
2020/08	19,71	35,22	7,73	68,35	100	20	20,6
2020/07	19,21	32,08	2,45	75,4	100	25,16	6,6
2020/06	19,74	32,51	5,64	82,22	100	30,69	26,8
2020/05	17,73	32,59	1,59	78,94	100	22,17	30,8
2020/04	21,16	35,2	10,2	80,44	100	26,29	25,6
2020/03	23,62	36,6	13,54	81,24	100	30,69	74,6
2020/02	23,64	35,67	16,98	90,7	100	42,17	405,4
2020/01	24,48	36,7	12,05	86,17	100	30,85	318,2
2019/12	24,42	37,73	15,65	84,22	100	31,01	178,0

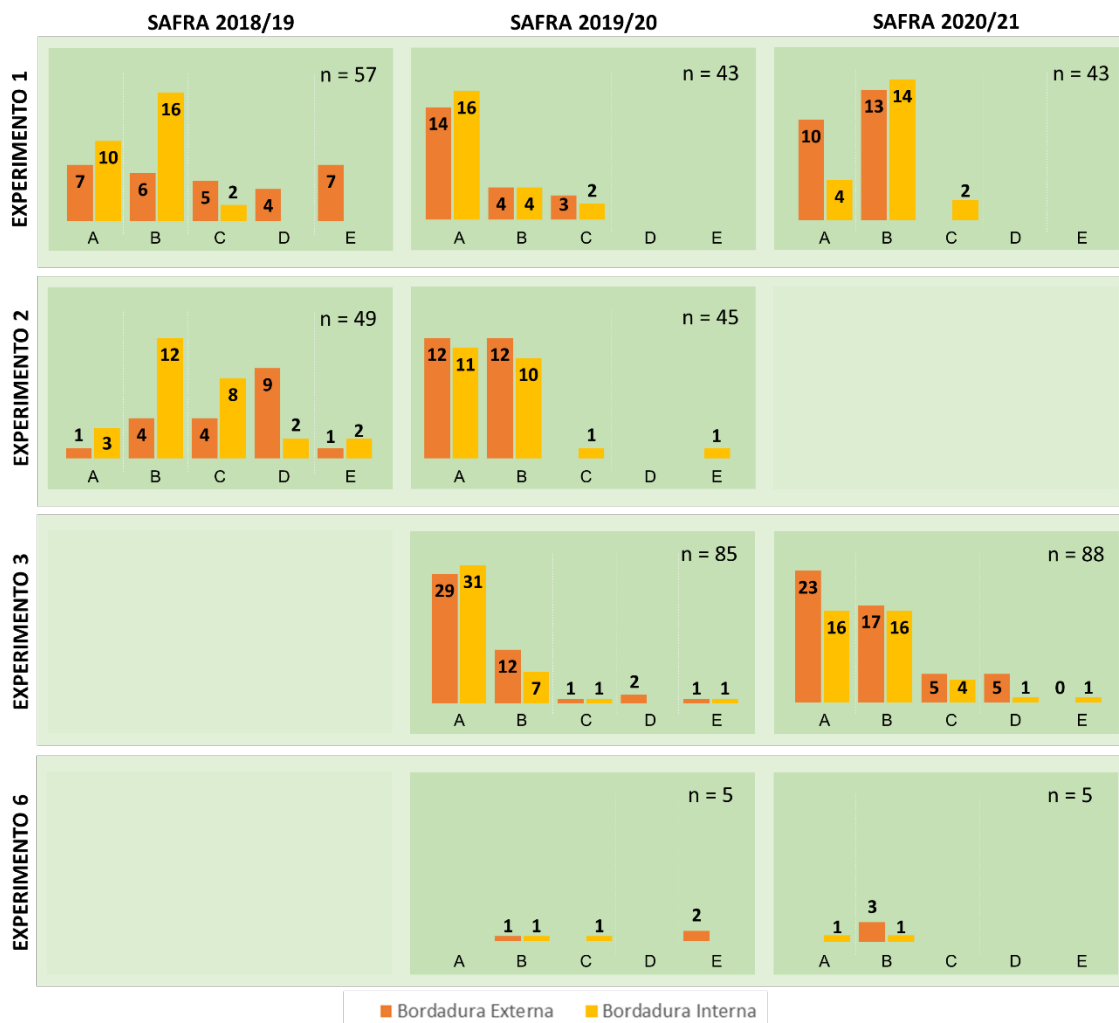
Ano/mês	Temperatura do Ar (°C)			Umidade Relativa do Ar (%)			Precipitação (mm)
	méd	máx	mín	méd	máx	mín	soma
Estação Meteorológica próxima ao experimento 1 (aproximadamente 5 km de distância)							
2019/11	24,45	37,76	14,57	78,86	100	22,7	149,0
2019/10	25,11	38,35	14,03	67,19	100	17,1	98,4
2019/09	23,51	39,27	11,57	66,27	100	15,22	46,8
2019/08	20,07	34,7	8,18	66,9	100	18,84	14,4
Estação Meteorológica do experimento 2							
2020/07	17,32	29,81	2,49	82,25	99,53	26,32	12,6
2020/06	18,44	30,25	5,8	87,47	99,54	39,6	147,0
2020/05	16,71	31,74	2,05	80,36	99,49	26,85	38,2
2020/04	20,34	34,7	5,15	78,9	99,44	21,15	8,0
2020/03	22,73	34,02	13,39	81,53	99,43	24,8	0,0
2020/02	22,82	33,99	15,61	91,95	99,41	44,23	0,0
2020/01	23,67	34,72	14,77	88,44	99,4	31,89	109,4
2019/12	23,55	34,5	15,15	86,38	99,4	32,88	195,4
2019/11	23,41	37,61	13,08	82,15	99,4	26,7	62,6
2019/10	24,06	37,25	13,84	72,87	99,38	26,68	21,8
2019/09	21,39	37,36	10,29	78,19	99,4	21,49	39,0
2019/08	18,36	35,08	8,7	76,73	99,38	23,28	18,6
2019/07	16,27	29,31	1,33	80,75	99,38	29,68	70,8
2019/06	18,06	29,95	7,57	83,78	99,37	34,55	13,0
2019/05	20,11	31,05	7,1	89,19	99,37	33,68	40,2
2019/04	22,28	32,29	11,81	86,58	99,36	37,18	3,8
2019/03	23,44	33,48	15,37	86,84	99,34	37,85	0,2
2019/02	23,58	37,87	16,36	85,67	99,33	25,3	10,0
2019/01	25,19	38,24	17,18	83,57	99,33	32,51	138,8
2018/12	24,48	37,14	12,2	78,69	99,34	31,97	86,0
2018/11	22,67	34,64	14,99	82,24	99,33	41,11	361,2
2018/10	21,81	33,76	12,72	85,77	99,34	39,49	200,6
2018/09	20,05	35,24	8,36	80,72	99,34	21,57	84,6
2018/08	16,88	31,72	2,96	84,03	99,34	22,26	170,2
2018/07	17,99	31,43	5,03	73,19	99,34	17,02	10,0

Fonte: elaborada pelo Autor (2024).



Apêndice A - 4. Distribuição do número de sementes por fruto e número de frutos avaliados (n) de polinização aberta de tangerineiras Clemenules nas safras 2018/2019 a 2020/2021, nos experimentos 1, 2, 3 e 6, áreas de LPMA sob a RN Nº 10.

Fonte: elaborada pelo Autor (2024).



Apêndice A - 5. Número de plantas de Clemenules dispostas em grupos de acordo com o percentual de detecção de progênies GM nos exps 1, 2, 3 e 6 das áreas de LPMA sob a RN N° 10, nas safras, 2018/19, 2019/20 e 2020/21. Em alaranjado: plantas localizadas na bordadura externa (a 13,0 m das plantas de citrandarin); em amarelo: plantas localizadas na bordadura interna (a 6,5 m das plantas de citrandarin). Percentual de progênies GM por planta: A) 0%, B) 0 - 10%, C) 10 - 20%, D) 20 - 30% e E) ≥ 30%.

Fonte: elaborada pelo Autor (2024).

Apêndice A - 6. Percentual médio de progênies positivas para o transgene (GM) em frutos de plantas de laranja doce controle do experimento 3, área de liberação planejada no meio ambiente.

Variedade de laranja doce	Localização da planta no experimento (rua/linha)	Progênies GM (%)	
		2019/20	2020/21
'Pera'	10/25	0,7	77,2
'Pera'	12/25	1,5	84,3
'Pera'	13/25	0	97,4
'Pera'	14/25	0	97,1
'Pera'	15/25	0	33,3
'Pera'	16/25	1,6	3,8
'Pera'	17/25	0	3,0
'Pera'	18/25	0	0,0
'Pera'	19/25	0	0,0
'Pera'	21/25	0	0,0
'Pera'	22/25	0	0,0
'Pera'	22/86	na ^a	0,0
'Pera'	22/87	na	0,0
'Pera'	22/88	na	0,0
'Pera'	22/89	na	0,0
'Pera'	22/90	na	8,3
'Pera'	22/91	na	0,0
'Pera'	22/92	na	0,0
'Pera'	22/93	na	0,0
'Valencia'	10/45	0,0	0,0
'Valencia'	11/45	0,0	na
'Valencia'	12/45	0,0	10,9
'Valencia'	13/45	0,0	0,0
'Valencia'	14/45	0,0	0,0
'Valencia'	15/45	0,0	0,0
'Valencia'	17/45	0,0	0,0
'Valencia'	18/45	0,0	2,1
'Valencia'	19/45	0,0	0,0
'Valencia'	20/45	0,0	0,0
'Valencia'	22/45	0,0	0,0
Pineapple	10/3	0,0	0,0
Pineapple	11/3	0,0	0,0
Pineapple	12/3	0,0	0,0
Pineapple	14/3	0,0	0,0
Pineapple	15/3	0,0	0,0
Pineapple	16/3	0,0	0,0
Pineapple	17/3	0,0	0,0
Pineapple	18/3	0,0	0,0
Pineapple	19/3	0,0	0,0
Pineapple	21/3	0,0	2,0
Pineapple	22/3	0,0	5,0

(a) Não avaliado

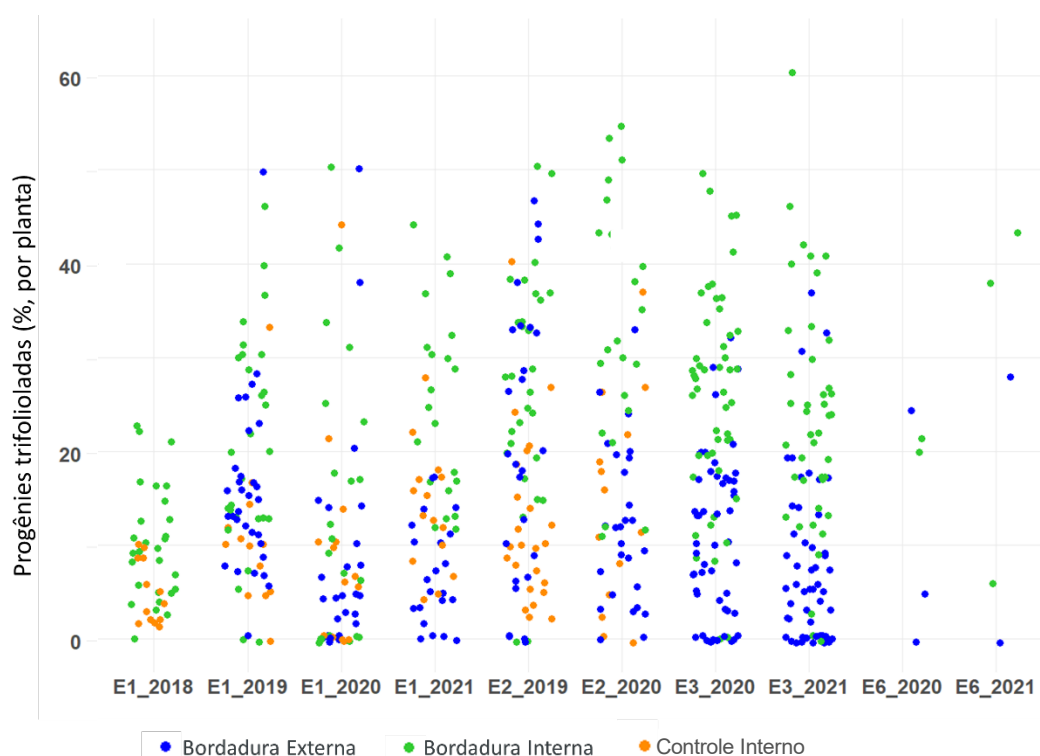
Fonte: elaborada pelo Autor (2024).

Apêndice A - 7. Dados de erradicação de plantas nos experimentos 1, 2, 3 e 6: total de plantas erradicadas na data de finalização das coletas de frutos (2023), áreas de LPMA sob RN N° 10.

Localização	Genótipo	Plantas na data de plantio (n)	Plantas erradicadas	
			n ^a	%
Experimento 1				
Bordadura	Citrandarin	334	1	0,3
	Clemenules	350	58	16,6
	‘Pera’	366	201	54,9
	Total	1050	260	24,8
Área interna	Clemenules	15	3	20,0
	L. azeda	50	2	4,0
	Lima ácida	50	18	36,0
	Navelina	65	48	73,8
	‘Natal’	65	17	26,2
	‘Pera’	15	7	46,7
	‘Pineapple’	390	78	20,0
	Total	650	173	26,6
Experimento 2				
Bordadura	Citrandarin	348	4	1,1
	Clemenules	380	80	21,1
	‘Pera’	412	108	26,2
	Total	1140	192	16,8
Área interna	Clemenules	60	8	13,3
	L. azeda	40	3	7,5
	Lima ácida	70	21	30,0
	Navelina	390	72	18,5
	‘Natal’	65	11	16,9
	‘Valencia’	100	0	0,0
	‘Pera’	160	3	1,9
	‘Pineapple’	790	85	10,8
	Total	1675	203	12,1
Experimento 3				
Bordadura	Citrandarin	414	3	0,7
	Clemenules	430	61	14,2
	‘Pera’	446	207	46,4
	Total	1290	271	21,0
Área interna	‘Pera’	520	51	9,8
	‘Pineapple’	65	11	16,9
	‘Valencia’	650	141	21,7
	Total	1235	203	16,4
Experimento 6				
Bordadura	Citrandarin	60	0	0,0
	Clemenules	60	9	15,0
	‘Pera’	60	8	13,3
	Total	180	17	9,4
Área interna	‘Pera’	120	5	4,2
	‘Valencia’	75	3	4,0
	Total	195	8	4,1

(a) Número de plantas erradicadas

Fonte: elaborada pelo autor (2024).



Apêndice A – 8. Trifoliolados (% por planta) em progênes de Clemenules de bordadura e controle. Cada ponto representa o percentual de trifoliolados identificados em plântulas de sementes de uma mesma planta, nos experimentos 1 (E1), 2 (E2), 3 (E3) e 6 (E6) das áreas de LPMA sob RN N° 10. Em azul: plantas localizadas na bordadura externa (a 13,0 m das plantas de citrandarin); em verde: plantas localizadas na bordadura interna (a 6,5 m das plantas de citrandarin); em alaranjado: plantas controle. No experimento 1: citrandarin acesso 1660 do Centro de Citricultura Sylvio Moreira. Nos experimentos 2, 3 e 6: citrandarin acesso H3 do Instituto Valenciano de Investigações Agrárias.
Fonte: elaborada pelo Autor (2024).