



Avaliação dos Riscos de Escape Gênico

Por cerca de um século, o melhoramento convencional tem desenvolvido e liberado novas variedades sem riscos, ou com mínimos riscos, para o meio ambiente. As evidências e os resultados até então encontrados sugerem que a maioria dos OGM não apresentam riscos para o ambiente.

Três tipos de riscos podem ser distinguidos:

- *riscos diretamente perceptíveis*: andar de bicicleta em um trânsito caótico.
- *riscos perceptíveis com auxílio de métodos científicos*: exposição a patógenos.
- *riscos virtuais*: quando os conhecimentos existentes não permitem consenso: baixo nível de radiação, resíduos de defensivos agrícolas.

Esses três tipos de riscos são ilustrados na Figura 1 por três círculos, que apresentam áreas de sobreposição indicando que os limites deles são, em determinados casos, indistinguíveis.



Figura 1 Três tipos de riscos

Os riscos diretamente perceptíveis são controlados intuitiva e intuitivamente. Não são necessários métodos científicos para se saber dos riscos de andar de bicicleta, por exemplo. Intuitivamente já se conhece esses riscos. Outros riscos só são detectados por meios científicos. Com um microscópio, por exemplo, pode-se ver e medir objetivamente o nível de contaminação de um alimento com microorganismos patogênicos. Existem ainda muitos riscos sobre os quais os cientistas ainda discordam. Muitos desses riscos relacionam-se com a saúde.

Os críticos aos transgênicos têm elaborado uma longa lista de possíveis riscos de um eventual escape de um transgene para espécies silvestres, sugerindo conseqüências com implicações ecológicas, sociais, culturais, religiosas, econômicas e éticas. Entretanto, até a presente data, nenhum desses riscos foi cientificamente confirmado entre as milhares de liberações de transgênicos já realizadas. Muitos cientistas vêem esses riscos como possibilidades muito remotas (Schuster 1991), enquanto os críticos mantêm sua opinião de que, devido ao incompleto conhecimento da ação do transgene, o risco dessa tecnologia não pode ser acuradamente estimado (Breyer, 1991).

Aluizio Borém
Eng.-Agrônomo, MS, Ph.D.,
Pós-doutor, Professor do
Departamento de Fitotecnia da
Universidade Federal de Viçosa
borem@mail.ufv.br

Mackenzie e Henry (1990) argumentam que risco é função da *exposição* e do *perigo*. No contexto dos transgênicos, a *exposição* é medida pela capacidade de escape do transgene da variedade transgênica. conseqüentemente, há necessidade de se estimar a probabilidade de o escape persistir, aumentar e se espalhar no ambiente, colonizando-o. O *perigo* é inerente à característica e refere-se ao impacto que o transgene poderia ter no ambiente.

Para quantificar a *exposição*, é necessário estimar a probabilidade do escape em função da distância entre indivíduos/populações, bem como do tamanho da população fonte do escape e sua persistência.

A quantificação do *perigo* ou do impacto do escape no ecossistema não tem sido o principal alvo dos estudos de fluxo gênico. A quantificação do *perigo* deve envolver aspectos biológicos e sócio-econômicos.

Visando a identificar e a medir os riscos em potencial no uso de variedades transgênicas, muitos projetos de pesquisa estão sendo conduzidos em laboratórios, casa de vegetação e em campo (Woohrmann et al. 1993). Muitos desses projetos são direcionados para o entendimento: I) do modo de reprodução das plantas, especialmente os sistemas de incompatibilidade e os mecanismos de dispersão de pólen; II) da hibridação e a introgressão gênica; III) da colonização; IV) da especiação e V) da evolução, associados ao uso comercial das variedades transgênicas.

A falta de estudos abrangentes, que envolvam simultaneamente, genética de populações e ecologia, tem sido alvo de crítica dos ecólogos (Gabriel, 1993).

Mecanismos Evolucionários

Em genética de população, as forças evolucionárias são estudadas por meio dos seus efeitos sobre as frequências gênicas. Observando uma população em equilíbrio, de Hardy-Weinberg, os fenômenos que podem afetar as frequências gênicas são: I) mutação; II) seleção; III) sistemas de acasalamento; IV) migração; V) deriva genética; VI) competição entre

populações; VII) co-evolução.

Mutação

Mutação, no sentido amplo, significa o aparecimento de novos tipos hereditários. Ao nível do DNA, a maioria das mutações é de simples substituição de nucleotídeos, deleções, inserções e inversões. As tentativas de induzir alterações genéticas nas espécies cultivadas por meio de mutação, em geral, resultaram em mudanças detrimenais. A transformação gênica é uma forma de introduzir alterações genéticas nas plantas, de forma direcionada e não aleatória. Ela não é direcionada no sentido da região de inserção do transgene no genoma receptor ou do número de cópias introduzidas, mas o é no sentido de resultar em uma função pré-estabelecida.

Seleção

A seleção natural é o mecanismo pelo qual a população se adapta ao ambiente. O coeficiente de seleção é definido como o desvio da adaptação relativa ideal. Talvez a seleção natural seja a força evolucionária menos entendida, uma vez que: I) a adaptabilidade do indivíduo depende de inúmeros genes e da interação entre eles e deles com o ambiente; II) a maioria das mutações são neutras para a adaptação e sujeitas somente à deriva genética; III) mutações favoráveis não são selecionadas e fixadas em curto prazo; IV) alterações profundas no fenótipo normalmente reduzem a capacidade de adaptação, uma vez que o organismo é um sistema integrado.

Para avaliar os riscos dos transgênicos, deve-se analisar o efeito do transgene no fenótipo do indivíduo receptor. O estabelecimento e a colonização por um OGM dependerá da natureza do gene introduzido, da sua interação com outros genes do receptor e com o meio ambiente. Variedades transgênicas tendem a ser mais fracas competidoras do que seus correspondentes não transgênicos, uma vez que os genes introduzidos estabelecem um novo dreno metabólico, além de resultarem em novas intera-

ções epistáticas no indivíduo. Adicionalmente, o ambiente em que eles eventualmente manifestem superioridade competitiva tende a ser menor do que aquele onde seus correspondentes não transgênicos possuem maior habilidade de sobrevivência.

Modo de Reprodução

O isolamento reprodutivo entre diferentes populações fundamentais em barreiras geográficas e genéticas estabelecidas no processo evolucionário. Em uma população panmítica em equilíbrio de Hardy-Weinberg, o isolamento não é observado, uma vez que todos os indivíduos se cruzam livremente. Alterações no sistema de acasalamento na população podem levar a um forte isolamento, com conseqüente risco de extinção dos indivíduos transgênicos com baixa capacidade de competição. No caso do escape de transgênicos devido ao menor tamanho da população desses indivíduos em relação à população nativa, a influência da deriva genética aumenta as probabilidades de desaparecimento da população com o transgene.

Deriva Genética

Deriva genética é a alteração na frequência gênica devido ao acasalamento tendencioso decorrente, exclusivamente, do tamanho da população. Se um transgene possui adaptabilidade neutra, a deriva genética altera a sua frequência aleatoriamente, levando-o à fixação ou à eliminação. A deriva genética em pequenas populações pode ter maior força do que a seleção natural e definir sua extinção ou fixação.

Migração

A frequência gênica em um sistema com subpopulações pode ser alterada pela migração de indivíduos entre elas ou pela dispersão do pólen. A migração em sentido amplo incluía troca gênica entre espécies (transferência gênica horizontal), mas o isolamento reprodutivo entre as espécies normalmente exclui esse intercâmbio.

Competição

A persistência de uma planta transgênica no campo depende da sua habilidade de competir no ecossistema. A habilidade de competição ou a agressividade das variedades transgênicas devem ser estimadas para que se possam fazer inferências sobre o seu risco de colonização em um hábitat.

Por cerca de um século, o melhoramento convencional tem desenvolvido e liberado novas variedades sem riscos, ou com mínimos riscos, para o meio ambiente. As evidências e os resultados até então encontrados sugerem que a maioria dos OGM não apresentam riscos para o ambiente (Regal, 1994).

Espécies exóticas, quando introduzidas em novo hábitat, podem causar impacto no ecossistema. O mesmo poderia ocorrer com as variedades transgênicas, mas a maioria dos OGMs não apresentam elevada habilidade de competição, especialmente sem a interferência do homem. Evidências evolucionárias sugerem que, quanto mais domesticada ou melhorada é a espécie, menor habilidade de competição ela apresenta em sistemas silvestres.

Coevolução

O comportamento evolucionário dos indivíduos nativos em uma comunidade com variedades transgênicas deve ser analisado para se estimarem os possíveis impactos do processo coevolucionário no contexto das interações interespecíficas.

Modelos para Avaliar Fluxo Gênico

Vários modelos podem ser adaptados para o estudo do risco em potencial de escape gênico em variedades transgênicas. Entre eles, dois modelos, um derivado da genética de populações e outro, da teoria do melhoramento de plantas, serão discutidos a seguir:

Modelos Derivados da Genética de População

O fluxo gênico pode ser estimado com modelos que consideram as forças evolucionárias: seleção, migração, deriva genética e mutação. Para cada uma dessas forças, uma série de considerações devem ser feitas para validação do modelo: I) somente um transgene é considerado; II) o transgene é dominante sobre a forma alternativa no indivíduo receptor. Deve-se reconhecer, entretanto, que, em muitos casos, o híbrido é hemizigoto, uma vez que o receptor não possui forma para a alternativa do gene.

Seleção e Migração

O fluxo gênico pode ser estimado usando-se o modelo de ilha-continente para a migração, onde o transgene migraria do continente, a partir de uma variedade transgênica, para uma outra espécie da ilha. Nesse caso, a mudança na frequência gênica (Δq) é:

$$\Delta q = [s_1 + (s_2 - 2s_1)q(1-q)] - m(q - Q)$$

onde q e Q são as frequências do alelo A no receptor e nos indivíduos imigrantes, respectivamente; m é a proporção de imigrante a cada geração; s_1 e s_2 são as vantagens seletivas dos genótipos AA e Aa , comparado com aa .

Seleção e Mutação

O fluxo gênico de uma variedade transgênica para um parente silvestre pode ser descrito como um evento de mutação recorrente em uma população. Novamente, as mesmas considerações devem ser assumidas. Nesse caso, o fluxo do transgene depende de três fatores: taxa de mutação, isto é, taxa de escape gênico por cruzamento natural; tamanho efetivo da população; e vantagem seletiva conferida pelo transgene.

Considere que A seja um transgene dominante com frequência q , e a , seu alelo correspondente, não existente no receptor, com as seguintes vantagens seletivas:

$$W_{AA} = W_{Aa} = 1 \text{ e } W_{aa} = 1 - s$$

Adicionalmente, considere n a

taxa de mutação de A para a , isto é, a taxa com a qual o transgene A entra na população receptora. Nesse caso, podem-se também considerar as mutações reversas como nulas ou inexpressivas.

Em uma população finita de tamanho N , a deriva genética é uma das forças evolutivas e Wright (1969) fornece as fórmulas para a taxa de mudança e de distribuição de q ; a frequência do transgene A é:

$$\phi(q) = C_E^{-2Ns(1-q)^2} q^{4Ns-1} (1-q)^{-1}$$

A probabilidade de fixação de um gene com diferentes valores de vantagem seletiva e frequência inicial é ilustrada na Figura 2.

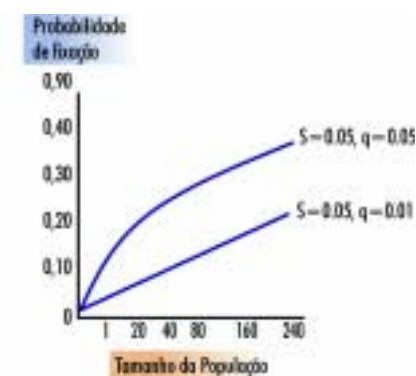


Figura 2. Probabilidade de fixação do transgene para diferentes valores de vantagem seletiva (S) e frequência inicial do alelo (q).

Modelos Derivados da Teoria do Melhoramento

A forma mais provável de um escape gênico, eventualmente, ocorrer a partir de uma variedade transgênica é por meio do cruzamento interespecífico com seus parentes silvestres sexualmente compatíveis. A constituição genética do híbrido formado dependerá do modo de cruzamento. No caso de espécies muito aparentadas, os híbridos formados apresentam pareamento meiótico normal e há permuta genética entre cromossomos homólogos. O cruzamento entre entidades filogeneticamente mais distantes depende de eventos mais complexos como a duplicação cromossômica e a formação de anfidiplóides (Khush e Brar, 1992), o que não só

reduz a taxa de formação do híbrido, como também a de retrocruzamento do híbrido com seus genitores. A poliploidização também afeta a dinâmica das mudanças genéticas (Hekmsen, 1992). Dessa forma, o escape gênico por meio da introgressão é aqui analisado como o caso de híbridos entre entidades filogeneticamente próximas apenas.

As culturas são geralmente consideradas possuir pequena força competitiva ou seletiva, quando em ambiente silvestre. A domesticação e o melhoramento das espécies tem sido direcionados para outras características que não adaptativas. Muitas das características que conferem vantagem competitiva às espécies são indesejáveis para os modelos da agricultura moderna como: a maturação desuniforme, dormência de sementes, deiscência de vagens, crescimento indeterminado, sementes pequenas, etc. Muitas dessas características, relevantes para uma forte vantagem competitiva, são controladas por genes maiores, de forma qualitativa.

Se for confirmado que o híbrido entre uma espécie cultivada e seu parente silvestre apresenta geralmente baixa capacidade de adaptação ao ambiente silvestre quando comparado com o tipo silvestre, então o genótipo que oferece maior risco de colonização é aquele que possui a forma selvagem, e o transgene, e sua capacidade de adaptação, pode ser estimado por

$$W_T = \prod_i W_{T_i}, \quad W_T = \bar{W}_H \cdot W_T$$

onde \bar{W}_H e W_T são a adaptabilidade do híbrido e a adaptabilidade do híbrido com a presença do transgene, respectivamente. $\prod_i W_{T_i}$ representa a adaptabilidade geral do híbrido sem o transgene, expressa como um produto, em que W_{H_i} é a adaptabilidade do híbrido nos seus n locos. Adicionalmente, considere \bar{W}_w a adaptabilidade geral do parente silvestre e W_{w_i} os valores da adaptabilidade dos seus n locos de interesse, de forma que

$$\bar{W}_w = \prod_i W_{w_i}$$

segundo o argumento anterior,

$$\bar{W}_w > W_H$$

dessa forma, o caso que deve ser considerado é:

$$\bar{W}_T = \bar{W}_H \cdot W_T > \bar{W}_w$$

into é, quando a vantagem adaptativa W_T conferida por um alelo do transgene mais do que compensa para a desvantagem adaptativa geral do híbrido, comparado com seu parente silvestre. Esse seria o caso quando o transgene confere elevada resistência a uma praga presente no hábitat. Existe a possibilidade de que o escape do transgene, embora não compense a baixa adaptabilidade geral do híbrido, permaneça na população silvestre devido à deriva genética ou devido ao contínuo escape em gerações sucessivas.

Se a adaptabilidade líquida do híbrido inicial é maior que a adaptabilidade média do parente silvestre, as condições seriam favoráveis para colonização do habitat.

Genes que codificam para tolerância a herbicida somente conferem vantagem adaptativa se os seus portadores são cultivados sob pressão de seleção do herbicida. De forma semelhante, genes que codificam para resistência a doenças ou pragas conferirão vantagem seletiva aos indivíduos somente se estes forem cultivados em habitat com forte pressão pelos patógenos ou pragas.

O conhecimento da dispersão gênica decorrente do movimento de pólen entre indivíduos ou populações é de especial interesse para agrônomos, geneticistas e ambientalistas. A contaminação de campos de produção de sementes por pólen de outras variedades ou outras espécies sexualmente compatíveis desencadeou uma série de estudos com o objetivo de estabelecer distâncias requeridas para a manutenção da pureza genética. Os pesquisadores têm também desenvolvido outros mecanismos para assegurar o isolamento genético: barreiras vegetais, eliminação de faixas de bordadura, controle de polinizadores, assincronia de época de florescimento, entre outras.

Métodos de Análises

A maioria dos métodos para mo-

nitorar o escape gênico descritos na literatura não definem níveis mínimos que podem ser detectados com cada procedimento. Na maioria dos estudos, os indivíduos amostrados constituem apenas um pequeno número dentro da unidade experimental, o que pode justificar as pequenas distâncias sugeridas para o escape de transgênicos (Scheffler et al. 1993).

Ainda, a maioria dos trabalhos nessa área apresentam os resultados em forma de histogramas ao invés de apresentarem uma distribuição espacial do escape gênico. Frequentemente, os dados da frequência do marcador são apresentados como uma percentagem dos genes amostrados, o que não é apropriado, uma vez que a distribuição é dependente da escala (Kareiva et al. 1994).

Métodos de Estimação

Os métodos indiretos envolvem o uso de técnicas desenvolvidas em genética de populações (Raybould et al. 1997). Esses métodos são difíceis de ser aplicados, uma vez que eles requerem populações naturais. Entretanto, nos casos onde o risco envolve a dispersão do transgene para parentes silvestres da espécie cultivada, esses métodos apresentam a vantagem de combinarem os efeitos da taxa de dispersão de ambos.

Os métodos diretos envolvem a estimativa dos parâmetros de campo. Tradicionalmente, consideram-se a dispersão como tendo uma distribuição normal bidimensional (Wright 1943; Haldane, 1948). Entretanto, a dispersão de pólen a partir de plantas é mais complexa e segue uma função exponencial da forma $e^{-\alpha x}$ (Bateman, 1947; Kareiva et al. 1994). Ao invés de usar essa distribuição, Lavigne et al. (1996) e Tufto et al. (1997) sugerem o uso de métodos baseados em movimentos Brownianos em três dimensões. Obviamente, a variação da velocidade do vento e da sua direção, durante o experimento é melhor descrita por funções exponenciais que por funções bidimensionais.

Para as espécies de polinização entomófila, o tipo e a densidade da vegetação vizinha, o estágio de flo-

rescimento de outras espécies, além das condições meteorológicas, devem ter importante papel na dispersão do pólen. O desenho experimental no caso de espécies de polinização entomófila pode ter grande efeito sobre os resultados.

Embora as variedades transgênicas sejam cultivadas nos mesmos ambientes em que as variedades não transgênicas, são plantadas sem problemas, os riscos de impacto ambiental decorrentes do uso dos OGMs têm sido estimados para cada tipo de variedade liberada.

Doebley et al. 1990 analisou a descendência do cruzamento entre milho e seu ancestral teosinto para determinar o número de genes responsáveis pela natureza invasora desse ancestral silvestre do milho. Os resultados sugerem que apenas um pequeno número de genes associados às características morfológicas são suficientes para causar profundas modificações fenotípicas. O teosinto, por exemplo, poderia ser transformado em um biótipo semelhante ao milho cultivado, pela introdução de cinco regiões genômicas do milho. Entretanto, adicionalmente a esses genes que produzem significativa alteração na morfologia da planta, muitos outros genes teriam que ser introduzidos para induzir a natureza invasora no milho cultivado.

A Figura 3 ilustra algumas características morfológicas do milho, do teosinto e do híbrido entre eles. Ambas as espécies possuem $2n=20$ entretanto a espiga do milho possui 8 fileiras de grãos e é facilmente debulhável. A espiga do teosinto possui 2 fileiras de grãos e é protegida por um involuço rígido (não mostrado na Figura 3). A Figura 4 ilustra outros aspectos morfológicos contrastantes entre essas duas espécies.

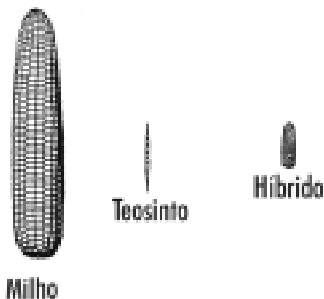


Figura 3. Comparação entre espigas de milho, teosinto e do híbrido entre eles

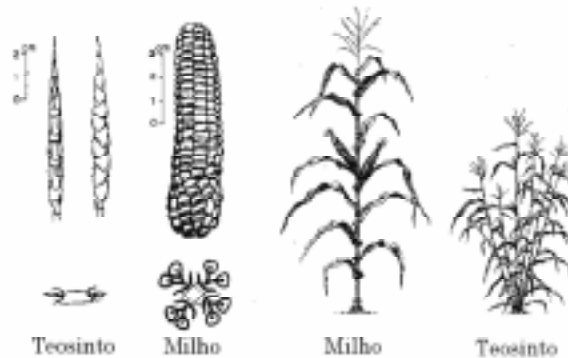


Figura 4. Características morfológicas contrastantes entre o milho e seu ancestral teosinto

Literatura Consultada

Bateman, A.J. 1947. Contamination in seed crops. III. Relation with isolation distance. *Heredity* 1:303-336.

Baulcombe, D.C e English, J.F. 1996. Ectopic pairing of homologous DNA and post transcriptional gene silencing in transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology* 7: 173-180.

Beck, U. 1996. Risk society and the provident state. In: Lash, S. (ed.). *Risk, environment and modernity*. Londres: Sage Press. pp. 27-43.

Brandle, J.E.; McHugh; S.G.; James L.; Labbe, H.; e Miki, B.L. 1995. Instability of transgene expression in field grown tobacco carrying the *crs1-1* gene for sulfonylurea herbicide resistance. *Bio/Technology* 13:994-998.

Broer, I. 1996. Stress inactivation of foreign genes in transgenic plants. *Field Crops Research* 45: 19-25.

Brubaker, C.L; Brown, A.H.D; Stewart, J.M; Kilby, M.J; Grace, J.P. 1999. Production of fertile hybrid germplasm with diploid Australian *Gossypium* species for cotton improvement. *Euphytica* 108: 199-213.

Burrows, P. 1999. Deliberate release of genetically modified organisms: the UK regulatory framework. In: *Gene flow and agriculture: relevance for transgenic crops*. Proceedings of a symposium held at Keele, UK 13-21pp. BCPC Symposium Proceedings No.72. British Crop Protection Council; Farnham; UK.

Carvalho, N.F.; Frendo, P. e Montagu, M.; Cornelissen, M.1995. Post-transcriptional cosuppression of -1, 3-glucanase genes does not affect accumulation of transgene nuclear mRNA. *The Plant Cell* 7: 347-358.

Chevre, A.M.; Eber, F.; Baranger, A.;

Hureau, G.; Barret, P.; Picault, H.; e Renard, M. 1998. Characterisation of backcross generations obtained under field conditions from oilseed rape wild radish F1 interspecific hybrids: an assessment of transgene dispersal. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 90-98.

Daniell H.; Datta, R.; Varma, S.; Gray, S. e Lee S. B. 1998. Containment of herbicide resistance through the genetic engineering of the chloroplast genome. *Nature Biotechnology* 16: 345-348.

Depicker A. e Montagu, M. 1997. Post-transcriptional gene silencing in plants. *Current Opinion in Cell Biology* 9: 373-382.

Desplanque, B.; Boudry, P.; Broomberg, K.; Saumitou; Laprade, P.; Cuguen, J.; Dijk, H. Dijk, H. 1999. Genetic diversity and gene flow between wild, cultivated and weedy forms of *Beta vulgaris* L. (Chenopodiaceae), assessed by RFLP and microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 1194-1201.

Dietz, A. 1993. Risk assessment of genetically modified plants introduced into the environment. In: *Wohrmann, K. e Tomiuk, J. (eds). Transgenic Organisms: Risk Assessment of Deliberate Releases*. Basel: Birkhauser Verlag pp. 209-277.

Dix, P.J. e Kavanagh, T.A. 1995. Transforming the plastome: genetic markers and DNA delivery systems. *Euphytica* 85: 29-34.

Doebley, J.; Stec, A. ; Wendel, J. e Edwards, M. 1990. Genetic and morphological analysis of a maize-teosinto F2 population: implications for the origin of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9888-9892.

Elmayan, T. e Vaucheret, H. 1996. Expression of single copies of a strongly expressed 35S transgene can be silenced post-transcriptionally. *The Plant*

Gabriel, W. 1993. Technologically modified genes in natural populations: some skeptical remarks on risk assessment from the view of population genetics. In: Wohrmann, K. e Tomiuk, J. (eds): *Transgenic Organisms: Risk Assessment of Deliberate Release*. Basel: Birkhauser Verlag. pp. 109-116.

Gatz, C. e Lenk, I. 1998. Promoters that respond to chemical inducers. *Trends in Plant Science* 3: 352-358.

Gliddon, C.; Boudry, P.; Walker, D.S. 1990. Gene flow - a review of experimental evidence. In: Gray, A.J.; Amijes, F. e Gliddon, C.J. (eds.). *Environmental impact of genetically modified crops*. Genetically Modified Organisms Research Report 10-pp 67-81. Londres: DETR.

Gliddon, C.J. 1999. Gene flow and risk assessment. In: *Gene flow and agriculture: relevance for transgenic crops*. Proceedings of a symposium held at Keele, UK 49-56pp. BCPC Symposium Proceedings No.72; British Crop Protection Council.

Greef, W. 1999. A long term perspective on Ag-biotech. In: *Gene flow and agriculture: relevance for transgenic crops*. Proceedings of a symposium held at Keele, 33-37pp. BCPC Symposium Proceedings No.72. British Crop Protection Council.

Haldane, J.B.S. 1948. The theory of a cline *Journal of Genetics* 48: 277-284.

Hersensen, J. G. T. 1992. Introductory considerations on distant hybridization. In: Kalloo, G. e Chowdhury, J. B. (eds.): *Distant Hybridization of Crop Plants*. Berlin: Springer Verlag pp. 1-14.

Kaff, N.S.; Covey S.N.; Kreike M.M.; Pinder R; e Dale P.J. 1998. Transcriptional and postranscriptional plant gene silencing in response to a pathogen. *Science* 279: 2113-2115.

Kareiva, P.; Morris, W. e Jacobi, C. M. 1994. Studying and managing the risk of cross-fertilization between transgenic crops and wild relatives. *Molecular Ecology* 3: 15-21.

Khush, G. S. e Brar, D. S. 1992. Overcoming the barrier of hybridization. In: Kalloo, G. e Chowdhury, J. B. (eds.): *Distant Hybridization of Crop Plants*. Berlin: Springer Verlag pp. 47-61.

Kumapatla, S. P.; Chandrasekharan, M.B.; Iver, L.M.; Li, G e Hall, T.C. 1998.

Genome intruder scanning modulation systems and transgene silencing. *Trends Plant Science* 3:97-104.

Lavigne, C.; Godelle, B.; Reboud, X. e Gonyon, P.H. 1996. A method to determine the mean pollen dispersal of individual plants growing within a large pollen source. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 1319-1326.

Levin, D.A. e Kerster, H. 1974. Gene flow in seed plants. *Evolutionary Biology* 7: 139-220.

Loop, C.B.; Buttell, F.H.; Hoban, T.J.; Gould, F.; Beachy, R.N.; Bendahmane, M.; Nickson, T.E.; McKee, M.J.; Ho, M.W.; Matten, S.R.; Robinson, M; Hardy, R.W.F. 1998. Agricultural biotechnology and environmental quality: gene escape and pest resistance. In: Segelken J.B. (ed.); NABC-Report. No. 10, 165 pp. National Agricultural Biotechnology Council Press.

Mackenzie, D.R. e Henry, S.C. 1990. Towards a consensus. In: *The Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms*. Proceeding of the Kiawah Research Institute Bethesda. 159p.

Matzke, M.A.; Park, Y.D.; Papp, I.; Vaucheret, H. e Matzke, A.J.M. 1996. Features of promoter homology-dependent gene silencing in transgenic plants. In: Grierson, D.; Lycett, G.W. e Tucker, G.A. (eds.). *Mechanisms and applications of gene silencing* Nottingham: Nottingham University Press, pp.33-42.

Matzke, M.A.; Primig, M.; Trnovsky, J. e Matzke, A.J.M. 1989. Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants. *EMBO Journal* 8: 643-649.

Meyer, P. 1995. Understanding and controlling transgene expression. *Tiotech* 13: 332-337.

Meyer, P.; Linn, F.; Heidmann, I.; Meyer, H.; Niedenhof, I. e Saedler, H. 1992. Endogenous and environmental factors influence 35S promoter methylation of a maize A1 gene construct in transgenic *Petunia* and is colour phenotype. *Molecular & General Genetics* 231: 345-352.

Neumann, K.; Droge-Laser, W.; Kohne, S. e Broer, I. 1997. Heat treatment results in loss of transgene encoded activities in several tobacco lines. *Plant Physiology* 115: 939-947.

Pohl, Orf, M; Brand, U.; Driessen, S.; Hesse, P.R.; Lehnen, M.; Morak, C.; Mucher, T.; Saeglitz, C.; Soosten; C,

von.; Bartsch, D.; von, Soosten, C. 1999. Overwintering of genetically modified sugar beet, *Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris*, as a source for dispersal of transgenic pollen. *Euphytica* 108: 181-186.

Regal, P.J. 1994. Scientific principles for ecologically based risk assessment of transgenic organisms. *Mol. Eco.* 3:5-13.

Rieger, M.A.; Preston, C.; Powles, S.B. 1999. Risks of gene flow from transgenic herbicide-resistant canola (*Brassica napus*) to weedy relatives in southern Australian cropping systems. *Australian Journal of Agricultural Research* 50: 115-128.

Sage, G.C.M. 1999. The role of DNA technologies in crop breeding. In: *Gene flow and agriculture: relevance for transgenic crops*. Proceedings of a symposium held at Keele, 23-31pp. BCPC Symposium Proceedings No.72. British Crop Protection Council.

Scheffler, J.A.; Parkinson, R. e Dale, P.J. 1993. Frequency and distance of pollen dispersal from transgenic oilseed rape (*Brassica napus*). *Transgenic Research* 2: 356-364.

Schuster, H. J. 1991. Interview on safety aspects of GMOs. *Ec Magazine* 11:13.

Sikdar, S. R.; Serino, G.; Chaudhuri, S. e Maliga, P. 1998. Plastid transformation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports* 18: 20-24.

Tufto, J.; Engen, S. e Hindar, K. 1997. Stochastic dispersal process in plant population. *Theoretical and Applied Genetics* 28: 114-138.

Vaucheret, H.; Elmayan, T.; Thierry, D.; Geest, A.; Hall, T.; Conner, A.J.; Mlynarova, L. e Nap, J.P. 1998. Flank matrix attachment regions (MARs) from chicken, bean, yeast or tobacco do not prevent homology-dependent trans-silencing in transgenic tobacco plants. *Molecular & General Genetics* 259: 388-392.

Walter, C.; Broer, I.; Hillemann, D. e Puhler, A. 1992. High frequency, heat treatment induced inactivation of the phosphinothricin resistance gene in transgenic single cell suspension cultures of *Medicago sativa*. *Molecular and General Genetics* 235: 189-196.

Wohrmann, K.; Tomiuk, J.; Pollex, C. e Grimm, A. 1993. *Evolutionsbiologische Risiken bei Freisetzungen gentechnisch veränderter Organismen in die Umwelt*. Berlin: Bundesminister für Umwelt. 183p.

Wright, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics* 28: 114-138.

Wright, S. 1969. *Evolution and the Genetics of Populations-Vol.2: The Theory of Gene Frequencies*. Chicago: The University of Chicago Press. 279p.