



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS
MESTRADO EM BIOSSEGURANÇA EM SAÚDE

DANIELE RACHIDI ARAUJO DA ROCHA

**CRITÉRIOS PARA AVALIAÇÃO DO RISCO DO
FEIJÃO TRANSGÊNICO (*Phaseolus vulgaris* L.)
RESISTENTE AO VÍRUS DO MOSAICO DOURADO**

Rio de Janeiro
2011

CRITÉRIOS PARA AVALIAÇÃO DO RISCO DO FEIJÃO
TRANSGÊNICO (*Phaseolus vulgaris* L.)
RESISTENTE AO VÍRUS DO MOSAICO DOURADO

DANIELE RACHIDI ARAUJO DA ROCHA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, área de concentração em Biossegurança em Saúde, no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de Mestre em Ciências.
Orientador: Dr. Victor Augustus Marin

Rio de Janeiro
2011

DANIELE RACHIDI ARAUJO DA ROCHA

**CRITÉRIOS PARA AVALIAÇÃO DO RISCO DO FEIJÃO
TRANSGÊNICO (*Phaseolus vulgaris* L.)
RESISTENTE AO VÍRUS DO MOSAICO DOURADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas – Biossegurança em Saúde do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Dr Victor Augustus Marin

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Telma Abdalla de Oliveira Cardoso – Presidente (ENSP/FIOCRUZ)

Dr. Bodo Wanke (IPEC/FIOCRUZ)

Dr^a. Edna Maria Morais Oliveira (CTAA-EMBRAPA)

Dr^a. Marli Brito Moreira de Albuquerque Navarro (ENSP/FIOCRUZ)

A Deus pela Fé.
A meu marido e filho pelo apoio.
A minha família pelo carinho.

Aos amigos pelo companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo que tem realizado em minha Vida.

Agradeço ao meu filho Rafael pela inspiração e motivo para qualquer ação em minha vida.

Agradeço a minha mãe Fatima Rachidi pela perseverança na construção da minha trajetória pessoal e profissional.

Agradeço ao meu marido Renato Feijó da Rocha pelo apoio, incentivo e paciência.

As amigas Dora Cardoso, Luciana Hugue e Isabelle Geofroy pela convivência e parceria neste período peculiar em nossas vidas.

Aos pesquisadores da EMBRAPA-CTAA que sempre estiveram disponíveis e acessíveis quando precisei.

Ao meu orientador Victor Augustus Marin pela confiança, incentivo e conhecimento disponibilizado à construção do meu saber e redação deste trabalho.

A Marinete – Secretaria Vice Direção Ensino INCQS pelo apoio e positividade.

A Priscilla Sá – Secretaria Acadêmica IPEC, pela ajuda em todos os momentos que precisei.

Ao Programa de Pós Graduação em Pesquisa Clínica – Biossegurança em Saúde.

Rocha, D.R.A. **Crêterios para Avalia o de Risco do feijão transgênico (*Phaseolus vulgaris L.*) resistente ao vírus do mosaico dourado**. Rio de Janeiro, 2011. 91f. Disserta o [Mestrado em Biossegurança em Saúde] - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

RESUMO

A avalia o de risco de risco   um elemento chave em assegurar o uso do conhecimento científico para estabelecer padrões, diretrizes e recomenda es para a segurança dos alimentos a fim de garantir prote o ao consumidor e facilitar o comércio internacional. O processo de avalia o do risco tem que incluir informa es quantitativas e amplas da estimativa de risco   saúde humana, com análises realizadas caso a caso. As inova es científicas vêm sempre acompanhadas de riscos. Em algumas a es científicas, o conhecimento disponível não permite que existam conclusões finais acerca do caráter dos riscos, sua significância e a probabilidade de que causem sérios danos. Neste contexto, o Princípio da Precau o recomenda que, antes de implementar as inova es tecnocientíficas, sejam tomadas precau es especiais e que a pesquisa seja conduzida de forma detalhada e de largo alcance sobre os riscos potenciais dessas inova es. O feijão (*Phaseolus vulgaris L.*)   uma cultura de extrema importância para o Brasil, de grande impacto social e também por ser uma fonte fundamental de proteína além da relevância cultural. O Brasil   o maior produtor, com uma produ o anual de dois milhões de toneladas, o que equivale a 20% da produ o mundial. A cultura do feijoeiro ocupa uma área de 12 milhões de hectares e constitui-se na leguminosa mais importante para a alimenta o de mais de 500 milhões de pessoas na América Latina e África. Portanto neste trabalho serão avaliados os critérios preliminares para avalia o do risco do feijão a fim de garantir ao máximo a segurança alimentar deste produto.

Palavras chave: 1. avalia o de risco, 2. feijão, 3. feijão modificado geneticamente, 4. segurança, 5. Princípio da Precau o

Rocha, D.R.A. **Criteria for Risk Assessment of transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) resistant to bean golden mosaic virus**. Rio de Janeiro, 2011. 91f. Master [Science Dissertation in Biosafety in Health] - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

ABSTRACT

The evaluation of risk is the key element to ensure the use of scientific knowledge to establish standards, directions and recommendations to the aliment's security, in order to protect the consumer and make the international commerce easier. The process of risk's evaluation shall include quantitative and wide information of estimation of risk to human's health, with the analysis of each case. The scientific innovations always come with risks. In some scientific actions the knowledge available does not allow the existence of final conclusions regarding the risks' nature, meaning and its possibility of causing serious damages. In this regard the Principle of Precaution warns that, before the implementation of the technological and scientific innovations, all the special precautions must be taken and the research must be conducted in a detailed way and with large reach of the potential risks of these innovations. The bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a farming of major importance to Brazil and of great social impact, since it is a essential source of protein as well as a product of cultural prominence. Brazil is the bigger producer of beans with a annual production of 2 millions of tons, which is equivalent to 20% of the world-wide production. The farming of beans occupies an area of 12 millions ha and they are the most important leguminous plant to the nourishment of more than 500 millions of people in Latin America and Africa. Therefore, in the present essay will be evaluated the preliminary discretions to the evaluations of beans' risk in such a way to assure the maximum alimentary security of this product.

Keywords: 1. risk management, 2. bean, 3. genetically modified bean, 4. safety, 5. Principle of Precaution

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 – Possíveis Desenvolvimentos Biotecnológicos na Agricultura 2010-2015	21
Tabela 2 – Eventos já aprovados	28
Tabela 3 – Eventos em pauta	30
Tabela 4 – Classificação da família <i>Germiniviridae</i>	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OGM	Organismo Geneticamente Modificado
DNA	Ácido Desoxorribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico

	INTRODUÇÃO	01
2 -	HISTÓRICO DA BIOTECNOLOGIA	07
3 -	OGM – ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS.....	11
3.1 -	TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DAS PLANTAS.....	11
3.1.1 -	INFECÇÃO POR <i>AGROBACTERIUM TUMEFASCIENS</i>	12
3.1.2 -	BIOBALÍSTICA (GUN).....	14
3.1.3 -	ELETROPORAÇÃO EM PROTOPLASTOS.....	18
3.2 -	SITUAÇÃO GLOBAL DAS LAVOURAS.....	19
4 -	A LEGISLAÇÃO BRASILEIRA PARA ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS (OGM).....	22
5 -	OGM NO BRASIL.....	26
5.1 -	COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA – CTNBIO.....	26
5.2 -	APROVAÇÕES COMERCIAIS DE OGM NO BRASIL.....	28
6 -	A CULTURA DO FEIJÃO.....	31
6.1 -	HISTÓRICO.....	31
6.2 -	O FEIJÃO NO BRASIL.....	33
6.3 -	DOENÇAS COMUNS AO FEIJOEIRO.....	35
6.3.1 -	DOENÇAS BACTERIANAS DO FEIJÃO.....	37
6.3.2 -	DOENÇAS FÚNGICAS DO FEIJÃO.....	39
6.3.3 -	DOENÇAS DO FEIJÃO CAUSADAS POR VÍRUS.....	46
7 -	AVALIAÇÃO DE RISCO DE ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS – TRANSGÊNICOS.....	50
8 -	OBJETIVOS.....	58
8.1 -	OBJETIVO GERAL.....	58
8.2 -	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	58
9 -	MÉTODO.....	59
10 -	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
11 -	CONCLUSÃO.....	77
12 -	REFERÊNCIAS.....	79

GUN	Bombardeamento de Partículas
CIFEIJÃO	Centro Inteligência do Feijão
CNPAF	Centro Nacional Pesquisa Arroz e Feijão
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
MCT	Ministério Ciência e Tecnologia
CTNBio	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
AgBios/CERA	Center for Environmental Risk Assessment
ISAAA	Internacional Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications
PCR	Reação em cadeia pela Polimerase
FAO	Food and Agriculture Organization
CIB	Conselho sobre Informações em Biossegurança
OMS/WHO	Organização Mundial de Saúde / World Health Organization
EC	European Commission
CODEX	Codex Alimentarius Commission
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
CTAA	Centro Tecnologia Agroindústria e Alimentos
CERNARGEN	Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia
BGMV	Bean Golden Mosaic Virus
PADCT	Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico
RHAE	Programa de Capacitação de Recursos Humanos para Atividades Estratégicas
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development

1. INTRODUÇÃO

Apesar de pontuarmos o século XIX e o início do século XX por um escasso e lento acúmulo de informações, podemos considerar que nas últimas décadas houve um progresso notável na área das ciências biológicas. O funcionamento dos seres vivos, a universalização dos princípios básicos da estrutura humana e a decodificação do código genético promoveram um crescimento de conhecimento e uma interseção das disciplinas biológicas. O homem buscou na ciência algumas respostas ao seu desejo de conseguir explicar, saber, prever e até mesmo compreender mais sobre os fenômenos da natureza.

O resultado desse acúmulo repercutiu diretamente na área biotecnológica. A biotecnologia é qualificada como um conjunto de tecnologias que utiliza para seu desenvolvimento organismos vivos, sistemas biológicos ou derivados destes para produzir ou modificar produtos e processos para uso específico, como também pode gerar novos serviços de alto impacto para diversos segmentos industriais (BRASIL, 2008). A biologia molecular, associada ao melhoramento e à genética, almeja descobrir e entender os mecanismos biológicos envolvidos na transmissão de características de uma geração para outra. Durante anos as plantas cultivadas vêm sendo manipuladas geneticamente pelo homem, através de cruzamentos controlados, modificando por seleção a constituição genética de indivíduos ou de populações, objetivando obter genótipos superiores. Este é o método conhecido como melhoramento clássico ou tradicional (MONQUERO, 2005).

Os organismos geneticamente modificados (OGM) ou comumente conhecidos como transgênicos podem ser plantas, animais ou microorganismos que tiveram introduzido no seu material genético DNA oriundo do mesmo ou de outros organismos.

De acordo com a Lei 11.105 de 24/03/2005, o art 3º dispõe que: “organismo geneticamente modificado – OGM: organismo cujo material genético – ADN/RNA tenha sido modificado por qualquer técnica de engenharia genética” (BRASIL, 2005).

O uso das novas tecnologias vem contribuindo para a qualidade de vida e também gerado novos caminhos e oportunidades para o desenvolvimento econômico (BRASIL, 2008).

Defensores do uso de OGM atribuem o aumento da produtividade assim como a redução do uso de agrotóxicos; porém nem sempre é o que ocorre.

Os estudos sobre OGM na agricultura iniciaram nos anos 80, mas a comercialização só teve início nos anos 90, exclusivamente nos Estados Unidos. Desde 1996 verificou-se um rápido crescimento das culturas utilizando OGM a nível mundial e, em 2008 a área cultivada atingiu 120 milhões de hectares, onde o crescimento real correspondeu a 15% ou 22 milhões de hectares no período de 2007 a 2008 (ISAAA, 2009).

No Brasil, em 2003, três produtos transgênicos desenvolvidos pela Empresa Brasileira Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) foram liberados para testes em campo: o mamão transgênico resistente ao vírus da mancha anelar; o feijão transgênico resistente ao vírus do mosaico dourado e a batata resistente ao vírus "Y" (LAJOLO e NUTTI, 2003).

O feijão (*Phaseolus vulgaris L.*) é uma cultura de extrema importância para o país, de grande impacto social e por ser uma fonte fundamental de proteína além da relevância cultural. O Brasil é o maior produtor, com uma produção anual de dois milhões de toneladas, o que equivale a 20 % da produção mundial. A cultura do feijoeiro ocupa uma área de 12 milhões de hectares e constitui-se na leguminosa mais importante para a alimentação de mais de 500 milhões de pessoas na América Latina e África (ARAGÃO, 2005).

Já a safra nacional de produção 2009/2010 atingiu 3,3 milhões de toneladas (CONAB, 2010).

No Brasil, o feijão é produzido basicamente por pequenos produtores (propriedades menores que 100 hectares). O feijão é suscetível a várias doenças e tem baixa tolerância a seca. O plantio e o desenvolvimento do cultivo, em muitas situações, é feito em condições de alto risco em função das condições climáticas. Nestas condições há a possibilidade de colocar em risco a segurança alimentar das comunidades que cultivam a leguminosa (ARAGÃO, 2004).

Uma das doenças que acometem o feijoeiro é o mosaico dourado que tem dificultado e até mesmo inviabilizado a produção do feijão em várias regiões do Brasil. Considera-se a obtenção da imunidade ao vírus através do melhoramento para resistência varietal como a medida de controle mais eficaz e a única verdadeiramente eficiente. Fontes de imunidade ou elevados graus de resistência têm sido buscados nos bancos de germoplasma de feijão. Em quase 15000 acessos

de germoplasma de *Phaseolus vulgaris L.* e de algumas outras espécies em países da América Latina, América Central encontrou-se níveis baixos e moderados de resistência ou tolerância à doença (ARAGÃO, 2004).

Em função da inexistência de imunidade e o baixo grau de resistência a esta virose, foram utilizados os métodos de biologia celular e molecular para introduzir a resistência ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro (BGMV) em feijão (*Phaseolus vulgaris L.*). Almeja-se que esta iniciativa minimize as grandes perdas de produção do feijão além de aumentar a segurança alimentar das comunidades que têm a cultura do feijão como fonte direta ou indireta de sustento (ARAGÃO, 2004).

Em relação ao uso da biotecnologia o Brasil estabelece em seu artigo nº 225 da Constituição Federal, que o Estado tem o dever de defender o meio ambiente e o equilíbrio ecológico, de modo a preservá-lo para as presentes e futuras gerações, incumbindo o Poder Público de:

- a) preservar a diversidade e a integridade do patrimônio genético do país;
- b) fiscalizar as entidades dedicadas à pesquisa e manipulação de material genético;
- c) exigir estudo prévio de impacto ambiental para instalação de obra ou atividade potencialmente causadora de degradação do meio ambiente; e
- d) controlar a produção, a comercialização e o emprego de técnicas, métodos e substâncias que comportem risco para vida, a qualidade de vida e o meio ambiente (Brasil, 1988).

Ressalta-se que dentro do artigo 225 da Constituição Federal, o Estado possui obrigações no que diz a respeito a engenharia genética - que é uma aplicação do conhecimento tecnocientífico. Ao Estado cabe:

- a) preservar a diversidade e a integridade do patrimônio genético nacional;
- b) fiscalizar os sujeitos públicos e privados que pesquisam e manipulam material genético;
- c) controlar as atividades de produção com fins lucrativos ou não, comercialização e emprego de qualquer técnica, método ou substância que possam causar risco para vida, a qualidade de vida ou o meio ambiente (PESSANHA, 2004).

O artigo nº 225 nos mostra a necessidade de que as tecnologias, novas e/ou aprimoradas sejam analisadas a fim de que não haja riscos a vida de todo e qualquer ser humano. Dessa forma, o Princípio da Precaução deve ser adotado sem restrições: ele tem como objetivo a proteção da vida. A precaução está relacionada com a associação respeitosa e funcional do homem com a natureza; abrange as ações antecipatórias para proteger a saúde das pessoas e dos ecossistemas (NODARI, 2003).

O princípio da precaução é de extrema importância e vale ressaltar sua disposição no artigo 12, item 8 do Protocolo de Cartagena sobre Biodiversidade:

A falta de certeza científica devido à insuficiência de informação e conhecimento científicos relevantes relativos à extensão dos efeitos potenciais adversos de um organismo vivo modificado sobre a conservação e uso sustentável da diversidade biológica em um país que Parte do Protocolo, levando em consideração também os riscos para saúde humana, não deve impedir aquela Parte de tomar uma decisão, quando apropriada, com relação à importação daquele organismo modificado vivo com a intenção de uso direto como alimento ou ração, ou para processamento, de modo a evitar ou minimizar tais efeitos adversos potenciais (CARTAGENA, 2002).

A CTNBio (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança) na Resolução Normativa nº 5 de 12 de março de 2008, revoga a Instrução Normativa nº 20 de 20 de dezembro de 2001. A resolução em vigor atribui a necessidade de avaliação e identificar os riscos, os efeitos adversos potenciais do OGM e seus derivados na saúde humana e animal assim como no ambiente e nos vegetais, mantendo a transparência, o método científico e o princípio da precaução (BRASIL, 2008).

O Princípio da Precaução incorpora vários valores éticos concernentes aos direitos humanos, equidade intrageracional e intergeracional, responsabilidade ambiental, desenvolvimento sustentável e democracia deliberativa. Esses valores informam avaliações da seriedade dos riscos e, portanto, de qual deve ser o nível de confiança de que um dano potencial pode ser adequadamente evitado ou regulado (LACEY, 2006).

A biotecnologia, se suficientemente apoiada e aplicada com cautela e segurança, pode aprimorar a agricultura promovendo aumento de produtividade, garantindo o mínimo impacto ambiental e sendo acessível a todos os produtores, incluindo os pequenos. Assim a Biotecnologia enquanto ciência representará um imenso potencial de ação para o bem estar de toda a Humanidade (ARAGÃO,

2004).

O desenvolvimento do feijão geneticamente modificado (GM), de acordo com as bases de dados da EMBRAPA, será avaliado conforme os ensaios de Biossegurança que são compostas de 04 fases:

- a) Caracterização molecular;
- b) Caracterização agrônômica;
- c) Análise de segurança alimentar - análise de diferenças na composição das variedades (transgênica e não transgênica) e seus fatores nutricionais. Experimentos com animais para verificar possíveis efeitos negativos, checando seus genes e,
- d) Análise de segurança ambiental - análise do fluxo gênico e os efeitos sobre organismos não alvos (microorganismos e insetos benéficos) (ARAGÃO, 2008).

O impacto de um OGM deve ser criteriosamente avaliado seguindo a análise de risco.

“Risco é tecnicamente a probabilidade de um evento danoso multiplicado pelo dano causado” (NODARI, 2003, p. 107).

O risco estabelece uma condição particular de exposição, um perigo intrínseco que possa representar uma ameaça à saúde humana (COSTA, 2007).

A análise de risco é assim definida como um processo de base científica que consiste na identificação e caracterização do perigo, da avaliação da exposição e da caracterização dos efeitos do risco (COSTA, 2007).

A análise de risco é de extrema importância no caso dos OGM. O uso de novas tecnologias devem ser avaliados. O posicionamento da Academia Brasileira de Ciências (2000) em relação às novas tecnologias diz que:

A possibilidade de efeitos adversos de longo prazo deve ser lembrada quando tais sistemas são implementados. A informação deve estar disponível ao público com referência aos seus suplementos de alimentos, como eles são regulamentados e sua segurança garantida.

Não existem dados sobre a ausência de riscos em OGM (DOMINGO, 2007). Poucos foram os testes realizados, pouco existe na literatura sobre os efeitos tóxicos e os riscos à saúde. O que são apresentados são experimentos avaliando o aspecto nutricional, com informações toxicológicas muito limitadas. Existem 28 experimentos que avaliaram a administração de OGM em várias espécies animais, porém todas

avaliaram um curto espaço de tempo e, na maioria os aspectos avaliados são de caráter nutricional com pouca informação toxicológica (DOMINGO, 2007).

Inicialmente, em uma avaliação de risco estaremos identificando o perigo de uma substância, pelo estabelecimento de uma relação de causa-efeito entre o perigo e o produto ou processo, utilizando experimentos, modelos toxicológicos e/ou métodos epidemiológicos (COSTA, 2007).

A caracterização do perigo tem como objetivo avaliar em termos quantitativo e/ou qualitativo a natureza do perigo intrínseco identificado (COSTA, 2007).

No caso da exposição, serão utilizadas medições e estimativas de seres humanos expostos a um determinado agente (químico, físico, biológico) durante um determinado período. Esta avaliação da exposição envolve a determinação ou estimativa da magnitude, da frequência, da duração, da quantidade de pessoas expostas e a identificação das vias de exposição (COSTA, 2007).

A caracterização do risco é definida como a estimativa qualitativa e/ou quantitativa, incluindo as incertezas, da probabilidade da ocorrência da severidade de um potencial ou conhecido efeito adverso à saúde em uma população, baseada na identificação e caracterização do perigo e avaliação da exposição (COSTA, 2007).

O desenvolvimento crescente da área biotecnológica, a utilização da biologia molecular e celular, embasando os processos de inserção de novas construções no genoma de um organismo pressupõe a melhoria em suas propriedades, úteis ao ser humano; úteis também à economia: aumenta a produção e reduz os custos inerentes a ela. Vale ressaltar que, ao adquirir as novas características, os organismos também adquirem um conjunto de novas qualidades devido às atividades pleiotrópicas da nova proteína e as propriedades da própria construção, incluindo instabilidade e seus efeitos regulatórios sobre os genes vizinhos. As novas características conferidas ao OGM podem agregar fenômenos e eventos indesejáveis que se classificam em três grupos de risco: alimentares, ecológicos e o agro-tecnológico (COSTA, 2007).

No entanto, estas novas características são pouco avaliadas quanto ao seu impacto e não existe uma base de conhecimento suficiente e adequada o bastante para abordar responsabilmente este assunto (NODARI, 2003).

2. HISTÓRICO DA BIOTECNOLOGIA

A descoberta da agricultura vem contribuindo para a sobrevivência da espécie humana na terra. O homem ao abandonar o estilo de vida nômade, a domesticar as plantas e animais vem garantindo a sua permanência, eliminando o risco de sua extinção. Até os dias atuais, a agricultura representa o único processo eficiente de produção de alimentos para garantir a sobrevivência de milhões de pessoas em todo mundo. Atribui-se, inclusive, à agricultura a modificação das relações sociais, econômicas, políticas e culturais que remontam aos primórdios da humanidade (COSTA, 2007).

Na agricultura, inicialmente, os produtores faziam melhorias nas gerações futuras das plantas, replantando as melhores sementes e as estocando para o próximo plantio, conscientes de que haveria melhora gradual as suas culturas pelo replantio de sementes das melhores plantas.

De acordo com Costa (2007), a alteração de genes de plantas e animais para melhor satisfazer as necessidades humanas não é um acontecimento recente. Desde a mais remota antiguidade, os genes têm sido permutados entre indivíduos da mesma espécie, no processo de reprodução sexual e, mesmo entre representantes de diferentes espécies com algumas restrições. As seleções das sementes objetivavam características como crescimento rápido, alto rendimento, resistência à doenças, sementes maiores e até modificações drásticas em frutas visando torná-las mais doces.

O milho é um exemplo clássico desta seleção. A colheita inicial do milho nas Américas do Sul e do Norte e apresentaram espigas menores que um dedo; hoje existem centenas de variedades de milho que produzem espigas tão grandes quanto o antebraço! Ao longo dos séculos o processo de seleção artificial (com interferência humana) criou uma diversidade de alimentos com uma grande variedade de características (ARAGÃO, 2004).

Outro exemplo é o feijão que é consumido completamente diferente daquele que nossos antepassados utilizavam. Os feijões silvestres domesticados pelo homem nos últimos 12.000 anos, e que hoje ainda existem no México e em alguns países andinos é diferente dos feijões carioca e preto hoje disponíveis. Com

sementes menores que as sementes de mamão, de difícil cocção, baixa digestibilidade e com sabor adstringente, o feijão silvestre foi geneticamente modificado pelos agricultores primitivos, ao longo de sua domesticação, de forma que atualmente dispomos de variedades com grãos grandes, de fácil cocção e com boa digestibilidade (BOREM, 2006).

A primeira grande descoberta que influenciou a maneira de se modificar as plantas em benefício da sociedade aconteceu em 1865, por Gregor Mendel, considerado o pai da Genética. As descobertas de Mendel, ignoradas na época e inutilizadas por 35 anos, quando redescobertas em 1900, foram reconhecidos cientificamente.

Os pesquisadores Hugo de Vries, Karl Correns e Erich Tschermak von Seysenegg deram continuidade aos trabalhos de Mendel. A redescoberta no início do século passado proporcionou ao melhoramento uma sistematização. A hibridização entre espécies diferentes pode ocorrer, naturalmente, sendo maior a probabilidade de acontecer entre espécies "próximas", sobretudo entre as que pertencem ao mesmo gênero (o que indica uma separação mais recente de "caminhos evolutivos"). Mas, para ter êxito, grande parte dos cruzamentos entre espécies requer a intervenção humana originando então o melhoramento genético das plantas, como ciência (BENEDITO e FIGUEIRA, 2004).

Dentro do histórico da biotecnologia, muito antes de o homem entender a biologia, ele já usava técnicas biotecnológicas na produção de vinhos, queijos e pães, muito embora o conceito que se tem hoje de biotecnologia, envolvendo o DNA recombinante, esteja muito à frente dessa noção inicial. Mesmo modernamente, a biotecnologia difere de outros ramos que também envolvem a genética como princípio, a exemplo do melhoramento vegetal, devido à técnica utilizada: enquanto o melhoramento genético convencional utiliza-se de conhecimentos clássicos de cruzamentos, enxertia etc., a biotecnologia atua em nível molecular, ou seja, a biotecnologia moderna opera na manipulação da estrutura básica que compõe todos os seres vivos: o DNA (BOREM, 2006).

Costa (2007), cita que com a descoberta da estrutura do ácido desoxirribonucléico (ADN, ou DNA em inglês), em 1953 - por Francis Harry Compton Crick, James Dewey Watson e Maurice Hugh Frederick Wilkins, os cientistas têm feito enormes progressos para a compreensão do funcionamento dos genes. Os genes são segmentos de DNA com longas sequências, dispostos em cromossomos,

presentes na maioria das células, quer vegetal, animal ou humana. Os genes produzem, ou expressam milhares de proteínas responsáveis por praticamente toda a atividade dos processos dos seres vivos. Em geral, cada gene dirige a produção de uma proteína específica que tem uma função específica. A expressão do gene é regulada por diferentes segmentos de DNA que causam a ativação ou inativação, a iniciação ou o término de produção de proteínas.

Guerrante (2003) descreve que na década de 70, com a descoberta das enzimas de restrição houve o desenvolvimento da engenharia genética e a consequente descoberta da tecnologia do DNA recombinante o que permitiu modificar diretamente o genoma de um determinado organismo, seja pela produção intencional de genes exógenos que possuem função conhecida, seja pela eliminação de genes do genoma do organismo manipulado, ou até mesmo pelo remanejamento dos próprios genes do organismo alvo. E, ainda cita que, com as técnicas de engenharia genética, qualquer gene de qualquer organismo pode ser isolado e transferido para o genoma de qualquer outro ser vivo, por mais divergente ou distante que esteja na escala evolucionária. Esta possibilidade amplia consideravelmente os recursos genéticos para o melhoramento de plantas e animais.

Constatinov (2007) descreve que as modernas técnicas de transformação genética são consideradas uma evolução dos métodos tradicionais de melhoramento de plantas, como a indução de mutações, a hibridação entre espécies, a duplicação cromossômica, a cultura de tecidos, a fusão de células, etc. Para o autor, o processo de modificação genética é tão somente uma nova versão para uma prática que já vem sendo usada há tempos para aumentar a produtividade na agricultura, melhorar a segurança alimentar e produzir alimentos melhores e mais nutritivos.

A expectativa é que com a evolução do conhecimento científico, que teve seu início com Mendel e as novas ferramentas, recursos mais modernos atrelados a genética clássica proporcionaram o desenvolvimento da genética molecular, hoje uma ciência nova dentro da biotecnologia.

Costa (2007) enfatiza que se caso a engenharia genética melhore tanto a tecnologia de reprodução quanto o desenvolvimento de novas variedades de plantas de alta qualidade e rendimento, como as tolerantes a pestes, a doenças e ao estresse ambiental, entre outros proporcionaria ao homem benefícios passíveis de

serem avaliados.

3. ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS

Os organismos geneticamente modificados (OGM) ou comumente conhecidos como transgênicos podem ser plantas, animais ou microrganismos que tiveram introduzido no seu material genético DNA oriundo do mesmo ou de outros organismos.

A definição legal de *Organismo Geneticamente Modificado (OGM)* está presente no artigo 3º, inciso V, da Lei nº 11.105: “organismo cujo material genético – ADN/ARN tenha sido modificado por qualquer técnica de engenharia genética”.

O Protocolo de Cartagena, previsto na Convenção sobre Diversidade Biológica – Rio 1992, discutido em Cartagena (Colômbia) e aprovado no Canadá em 2000, em seu artigo 3º, item “g” conceituou Organismo Vivo Modificado como “qualquer organismo vivo que tenha uma combinação de material genético inédita obtida por meio do uso da biotecnologia moderna”.

O conhecimento da estrutura básica de um OGM é importante para compreender o princípio de alguns métodos utilizados em sua detecção.

Um típico inserto de um OGM é composto por três elementos: região promotora, que funciona como um ativador/inibidor para a leitura do gene inserido/alterado; o gene de interesse, que foi inserido/alterado o qual codifica a característica específica desejada; e o elemento terminador, responsável pelo término da expressão. Além destas, outras sequências exógenas de DNA, responsáveis principalmente pela regulação e estabilização do gene inserido, podem estar eventualmente presentes com a função de controlar e estabilizar a função do gene, demonstrar a presença da expressão no OGM ou facilitar a combinação de vários elementos de construção. A combinação de todos estes elementos caracteriza um evento, ou seja, a construção gênica característica de um OGM (COSTA, 2007).

3.1. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DAS PLANTAS

Aragão (2006) define de forma objetiva e didática as bases da engenharia genética na transformação das plantas, ou seja, na criação de um OGM:

A transformação genética consiste na integração de um gene no genoma (nuclear, mitocondrial ou cloroplasmático) de uma célula vegetal. O objetivo da introdução dessa seqüência de DNA exógeno (ou transgene) pode ser bastante variado, desde a geração de um novo polipeptídeo até a determinação da função gênica, pela mutação ou silenciamento de um gene presente originariamente no genoma da planta hospedeira. O gene introduzido pode ser oriundo de qualquer organismo: planta, animal, bactéria, vírus, fungo, etc., além disso, é possível sintetizar seqüências de DNA com informação genética para síntese de novos RNA's e proteínas. Uma vez incorporado no genoma e expresso de maneira estável, o transgene passa a fazer parte do patrimônio genético da planta, sendo transmitido para a progênie de forma Mendeliana.

É essencial que se tenha disponibilidade de um sistema de cultura de tecidos que permita a regeneração de plantas e de um sistema de transformação genética que possibilite a introdução de genes com eficiência para o desenvolvimento de plantas transgênicas. A transferência de genes na transformação genética pode ser direta ou indireta. A transferência indireta é aquela que utiliza um vetor para intermediar a transformação, como *Agrobacterium tumefaciens* ou *Agrobacterium rhizogenes*. A transferência direta é baseada em métodos físicos ou químicos, onde se destacam a eletroporação e a aceleração de partículas (biobalística).

3.1.1. Infecção por *Agrobacterium tumefaciens*

As agrobactérias são microorganismos tipicamente do solo, aeróbias e Gram negativas que não formam esporos em forma de bacilo, medindo 0,6-1,0 x 1,5-3,0 µm, movendo-se no solo por meio de 6 flagelos peritríquos.

Em geral, as agrobactérias são aeróbias, apresentando o oxigênio comoceptor final de elétrons. Alguns isolados de microorganismos podem ter respiração anaeróbia, em presença de nitrato, outros podem sobreviver em ambientes com baixa tensão de oxigênio, como no interior dos tecidos de plantas hospedeiras. A temperatura ótima de crescimento está na faixa de 25 a 28°C, e as culturas geralmente apresentam colônias convexas, circulares, lisas, apigmentadas ou de coloração levemente creme (COSTA, 2007).

O gênero *Agrobacterium* está subdividido em cinco espécies que diferem entre si pela patogenicidade e pelo modo de infecção em diferentes plantas. Dessa forma, *A. tumefaciens* é o agente etiológico da galha da coroa; *A. rhizogenes* causa

a raiz em cabeleira; *A. vitis*, induz tumores especificamente em uvas (*Vitis* spp); *A. rubi* induz tumores especificamente em amora (*Rubus* spp) e *A. radiobacter* é saprófita, não patogênica. (MONQUERO *et al.*, 2005).

As agrobactérias ocorrem em todos os tipos de solo, cultivados ou não, onde são geralmente encontradas nas galhas ou em estreita associação ou no solo adjacente à planta. As diferentes espécies do gênero *Agrobacterium* ocorrem em todo o mundo, mas são mais facilmente encontradas em regiões de clima temperado. Temperaturas acima de 34°C ou solos ácidos reduzem drasticamente suas chances de sobrevivência, enquanto em solos arenosos sob certas condições podem favorecer a sobrevivência (LIPPINCOTT *et al*, 1981).

A bactéria *A. tumefaciens* é capaz de infectar células vegetais, causando uma doença conhecida como galha da coroa caracterizada pelo desenvolvimento de um tumor no local da infecção. A doença está associada à presença, na *Agrobacterium*, de um plasmídeo de alto peso molecular, o plasmídeo Ti (*tumor inducing*). Durante o processo de infecção, uma sequência específica presente no plasmídeo Ti, o T-DNA (*transferred DNA*), é transferida da *Agrobacterium* para a célula vegetal. A expressão de genes presente no T-DNA, os oncogenes, interfere na biossíntese de hormônios vegetais (citocininas e auxinas), levando à formação das galhas. Embora os oncogenes sejam responsáveis pela formação do tumor, as únicas regiões do T-DNA essenciais para sua transferência são as seqüências de cerca de 25 pares de base localizadas nas extremidades. Assim, os genes presentes no T-DNA podem ser deletados (obtenção de linhagens “desarmadas”) e substituídos por genes de interesse, sem alterar o processo de transferência (MONQUERO, 2005).

A primeira demonstração de que esta interação bactéria-planta poderia resultar em sistemas eficientes de transformação de plantas foi a introdução do gene que confere resistência ao antibiótico canamicina em plantas de fumo, em 1983, confirmando a possibilidade de manipulação do plasmídeo de *Agrobacterium*, permitindo assim, a passagem de uma informação genética desejada para o interior de uma célula hospedeira (BARBOSA, 2002).

A técnica de transformação por *Agrobacterium* tem sido aprimorada desde 1988, quando foi relatado o uso de *A. tumefaciens* modificada geneticamente para introdução de genes exógenos em plantas. Na transformação utilizando esse vetor, vários parâmetros são considerados, entre eles, a presença de substâncias fenólicas para indução da transferência do T-DNA, o pH, a temperatura, os açúcares que

compõem o meio de cultura, o período de co-cultivo e os antibióticos para controle do crescimento da bactéria (COSTA, 2007).

Outro aprimoramento proposto foi o uso de pulsos de ultra-som para ferir e modificar o tecido alvo, visando o aumento da infecção por *Agrobacterium*. Essa técnica foi denominada de Transformação mediada por *Agrobacterium* e Ultra-som – SAAT, e tem gerado expectativas quanto a maior eficiência na transferência de genes usando *Agrobacterium* (COSTA, 2007).

A infecção de uma planta por *Agrobacterium* inicia-se pela penetração da bactéria no tecido vegetal através de uma lesão sofrida pela planta por tratos culturais, geadas, insetos, etc. As bactérias são atraídas pelas moléculas-sinal que são exsudadas pela célula lesada, em resposta ao ferimento, como, por exemplo, compostos fenólicos, açúcares e aminoácidos (BAZONI, 2006).

A preparação de uma linhagem de *A. tumefaciens* para ser utilizada como vetor para a transformação de plantas inclui duas etapas distintas.

Na primeira é preciso obter as linhagens “desarmadas”, linhagens nas quais o T-DNA original, com os oncogenes, foi deletado por meio de um processo de dupla recombinação (ZAMBRYSKI *et al.*, 1983).

A segunda etapa envolve a preparação de um vetor contendo o T-DNA com os genes de interesse. Por causa do seu tamanho (~200 Kb), o plasmídeo Ti não pode ser manipulado diretamente. Dessa forma, plasmídeos menores (vetores) são utilizados, pois são mais fáceis de manipular. Esses vetores para transformação contêm as extremidades do T-DNA, entre as quais os genes de interesse são clonados. Graças a ele, foram obtidas plantas de batata resistentes a viroses (LAWSON *et al.*, 1990), algodoeiros resistentes a insetos (PERLAK *et al.*, 1990), tomates de amadurecimento tardio (HAMILTON *et al.*, 1990) plantas de canola macho estéreis (MARIANI *et al.*, 1992), entre outros exemplos.

3.1.2. Biobalística (GUN)

A biobalística é uma técnica que tem como objetivo introduzir material genético no genoma das plantas superiores.

Esta técnica, também conhecida como balística biológica, utiliza microprojéteis de ouro ou tungstênio acelerados a altas velocidades (superiores a

1.500km/h) para carrear e introduzir ácidos nucléicos e outras moléculas em células e tecidos *in vivo*. As micropartículas aceleradas penetram na parede e membrana celular de maneira não-letal, localizando-se aleatoriamente nas organelas celulares. Em seguida, o DNA é dissociado das micropartículas pela ação do líquido celular, ocorrendo o processo de integração do gene exógeno no genoma do organismo a ser modificado. Uma das vantagens do sistema de transformação através do processo de biobalística é que este permite a introdução e expressão gênica em qualquer tipo celular (SANTAREM, 2000).

O material genético utilizado necessita ser clonado em um vetor, amplificado e purificado de maneira cuidadosa, para render DNA concentrado de alta qualidade. Geralmente, são utilizados plasmídeos bacterianos como vetores na clonagem do gene de interesse (SANTAREM, 2000).

Os plasmídeos bacterianos são independentes do DNA cromossômico, capazes de autorreplicação; por isso, são facilmente manipulados no processo de transformação genética. É necessário ter um gene “de interesse” que pode estar relacionado com a resistência ou maior tolerância a algum tipo de estresse biótico ou abiótico, com a melhoria da qualidade nutricional, acoplado a um promotor que controle sua expressão temporal e espacial. Há a necessidade de um gene marcador de seleção, quando a característica de interesse não é auto-selecionável, e um gene-repórter durante o período de otimização do protocolo de transformação genética (MONQUERO, 2005; SANTAREM, 2000).

Os genes marcadores são utilizados na seleção e são responsáveis por codificar uma proteína com atividade enzimática ou um produto que irá conferir às células transformadas da planta resistência a um determinado substrato. Esses genes marcadores permitem que apenas as células transformadas cresçam, em detrimento das células não-transformadas. Depois da transformação, as células transgênicas estão em número muito reduzido, quando comparadas com as não-transgênicas, sendo necessária uma metodologia de seleção para proporcionar o crescimento preferencial das células transformadas (SANTAREM, 2000).

Os genes-repórteres são aqueles que codificam para uma proteína não tóxica, cujo produto é facilmente detectável e não é produzido normalmente pelas plantas. Possibilitam a identificação ou marcação das células transformadas, sem eliminar as células não-transformadas. Funcionam como gene complementar ao gene de seleção. Geralmente, sua expressão transiente é utilizada na fase de otimização dos

processos de transformação genética. São também muito utilizados em estudos de regulação e função gênica (BONFIM, 2008).

O método baseia-se no uso de um equipamento que produz uma força propulsora, usando propulsão a ar, pólvora, gás hélio ou eletricidade, para acelerar micropartículas inertes em direção às células alvo, sendo que, os sistemas que utilizam gás hélio são, atualmente, os mais utilizados.

No processo a onda de choque é gerada pela rápida liberação de uma descarga de alta pressão de gás hélio (1000-1200 psi) que é responsável por impulsionar o macrocarregador, no qual os microprojéteis foram previamente depositados. Ao atingir a tela de retenção, a membrana é retida e as micropartículas contendo o DNA continuam em direção às células-alvo, penetrando na parede celular e membrana plasmática. Finalizando o bombardeamento, uma proporção de células atingidas permanece viável; o DNA é integrado no genoma vegetal e incorporado aos processos celulares de transcrição e tradução, resultando na expressão estável do gene introduzido.

Diversos parâmetros físicos e biológicos devem ser levados em consideração para se estabelecer um protocolo de transformação utilizando-se esse método, tais como a espécie vegetal e seu estado fisiológico, o tipo de explante, tipo e tamanho da partícula, método de precipitação, velocidade das partículas e tipo de equipamento (SANFORD, SMITH e RUSSEL, 1993).

Variações da pressão do gás hélio, o nível do vácuo gerado, o tamanho e o tipo das partículas utilizadas e a posição do tecido-alvo dentro da câmara de bombardeamento são parâmetros físicos importantes no transporte do conjunto micropartícula/DNA para dentro do tecido-alvo. Esses processos devem favorecer a penetração do DNA dentro das células e, ao mesmo tempo, minimizar as injúrias ou estresses que o tecido vegetal possa sofrer (SANTAREM, 2000; GUTIERREZ, 2003; FERREIRA *et al*, 2004).

As variações quanto aos microprojéteis primam por características importantes. As partículas fabricadas usando metais de alta densidade, como tungstênio e ouro; são mais ou menos esféricas e medem cerca de 0,4 μm de diâmetro. As partículas de tungstênio possuem um custo menor, podem ser obtidas de vários tamanhos e apresentam-se muito irregulares. Já as partículas de ouro apresentam mais alta densidade, penetrando no tecido até as camadas celulares mais profundas, ao passo que a maioria das partículas de tungstênio não penetra

além das camadas superficiais. Sendo de extrema importância avaliar a relação entre o tipo de microprojéteis usado para o bombardeamento e a expressão temporária ou estável do gene introduzido para cada espécie e tecido estudados (SANFORD, 1990; SANTAREM, 2000).

O uso do processo biolístico é bastante amplo e, quando comparado com a maioria dos métodos diretos de introdução de DNA em plantas, o bombardeamento de microprojéteis apresenta várias vantagens. É uma técnica altamente versátil e de fácil adaptação, podendo ser aplicada a grande variedade de células e tecidos, incluindo suspensões, calos, tecidos meristemáticos, embriões imaturos, e embriões somáticos. Essa técnica tem permitido a regeneração de plantas transgênicas de maneira reproduzível e com menos variabilidade entre os experimentos. As metodologias empregadas são simples, eficientes e essencialmente idênticas, independentemente do tecido vegetal e do DNA exógeno empregado (COSTA, 2007).

Além do seu uso para obtenção de organismos geneticamente transformados, o processo de bombardeamento de microprojéteis tem contribuído para os estudos dos mecanismos de expressão e regulação gênica (COSTA, 2007).

Algumas adaptações da biobalística têm sido propostas associando o bombardeamento ao método de infecção por *Agrobacterium*. Os microferimentos produzidos pela penetração das partículas nos tecidos bombardeados ampliam a área de infecção pela bactéria, aumentando a eficiência da transformação. Essa técnica, denominada “agrolística”, permite a transferência do gene de interesse para o genoma da planta, sem que haja a integração das sequências dos vetores. Isso ocorre em virtude da co-transformação de dois dos genes de virulência, juntamente com um marcador de seleção flanqueado pelas seqüências de bordas do T-DNA (COSTA, 2007).

Após a transformação através de qualquer um dos métodos, o passo seguinte é a obtenção de plantas e sementes das células que incorporaram o gene de interesse através de cultura de tecido. Durante essa fase, várias análises são realizadas para selecionar plântulas que incorporaram o gene escolhido. O uso de um bom marcador de seleção é fundamental para a recuperação “in vitro” eficiente de plantas transgênicas. O marcador de seleção confere caráter dominante às células transformadas, resultantes da incorporação de nova característica, que não está presente nas células não transformadas. Essa nova característica permite a

sobrevivência da célula vegetal na presença de um agente de seleção que é, geralmente, um antibiótico ou um herbicida (MONQUERO, 2005).

Os genes marcadores mais utilizados são: o gene *gus*, que codifica a enzima β -glucuronidase (GUS); o gene *lucA* da luciferase; o gene *nptII*, ou *neo* da neomicina fosfotransferase II (NPT II) e o gene *cat*, da cloranfenicol acetiltransferase (CAT). Ao contrário dos ensaios para a detecção da atividade na NPTII e CAT, que utilizam radioisótopos, e do utilizado para luciferase, que utiliza um luminômetro, o ensaio da GUS não requer radioatividade nem equipamentos específicos, embora seja destrutivo (MONQUERO, 2005).

Após algum tempo de desenvolvimento, as plantas são transferidas para vasos e se desenvolvem em casa de vegetação com condições controladas, para a obtenção de sementes. Inicia-se então a fase de teste em campo, que tem por objetivo verificar o comportamento dessas plantas em condições normais de cultivo, sua eficiência agrônômica e sua capacidade de transferir o gene para outras plantas da mesma espécie (MONQUERO, 2005).

3.1.3. Eletroporação em Protoplastos

Protoplastos são definidos como células desprovidas de paredes celulares. Para a introdução de DNA usando a eletroporação, os protoplastos são expostos a pulsos curtos de corrente contínua e alta voltagem, em presença do DNA exógeno. Esse tratamento induz uma alteração reversível da permeabilidade da membrana plasmática e poros temporários são formados, permitindo a entrada do DNA nas células. A extensão da formação de poros é determinada pela intensidade e duração do pulso elétrico e pela concentração iônica do tampão de eletroporação. Os poros aumentam em tamanho e número com o aumento da duração e intensidade dos pulsos. Parâmetros como tipo e duração dos pulsos elétricos, intensidade do campo elétrico, concentração e forma do DNA, presença ou ausência de DNA carreador, composição do tampão de eletroporação e temperatura de incubação dos protoplastos devem ser determinados. A transformação genética de plantas por eletroporação de protoplastos oferece a vantagem de não necessitar de um vetor biológico e de não haver barreira física para a introdução de DNA. É uma técnica rápida, simples e realizada sem agentes tóxicos às células, embora os pulsos

elétricos possam ter efeito deletério na sobrevivência dos protoplastos e subsequente regeneração de plantas. Algumas plantas transgênicas foram obtidas utilizando essa técnica. A técnica foi utilizada para vegetais importantes comercialmente como a canola (*Brassica napus*), o milho (*Zea mays*) e o arroz (*Oryza sativa*) (BATES, 1994; QUENCINI e VIEIRA, 2001; SANTAREM, 2000).

O maior obstáculo do método está na dificuldade de regeneração de plantas a partir de protoplastos transformados. Mesmo quando a regeneração é obtida, as plantas podem apresentar problemas de redução de fertilidade, além de várias espécies ainda serem consideradas recalcitrante para essa tecnologia (SANTAREM, 2000).

3.2 - SITUAÇÃO GLOBAL DAS LAVOURAS

Os estudos sobre OGM na agricultura iniciaram nos anos 80, mas a comercialização só teve início nos anos 90, exclusivamente nos Estados Unidos. Desde 1996 verificou-se um rápido crescimento das culturas utilizando OGM a nível mundial e, em 2008 a área cultivada atingiu 120 milhões de hectares, onde o crescimento real correspondeu a 15% ou 22 milhões de hectares no período de 2007 a 2008 (ROCHA, 2009).

As primeiras culturas geneticamente modificadas comercializadas foram as de tomate (1994), Já 1996 foi o primeiro ano em que uma área significativa (1,66 milhões de hectares), contendo características geneticamente modificadas foi plantada. O crescimento desde então, é visto de forma avançada e no final de 2009, a área mundial plantada atingiu a marca de 134 milhões de hectares (CLIVE, 2009).

Este número considerado um recorde, com 14 milhões de fazendas em 25 cidades plantando 330 milhões de acres em 2009, o que corresponde a um aumento de 7% ou 9 milhões de hectares (22 milhões de acres) a mais que 2008 (CLIVE, 2009).

O crescimento no período de 1996 a 2009 é considerado um evento extraordinário fazendo com que as sementes manipuladas geneticamente sejam a tecnologia mais adotada na recente história da agricultura, o que reflete a confiança

de milhões de produtores/fazendeiros em todo o mundo que vêm plantando a cada ano mais e mais sementes manipuladas geneticamente em função dos múltiplos e significantes benefícios oferecidos por esta biotecnologia (CLIVE, 2009).

Quase 50 % dos hectares plantados foi cultivado em países desenvolvidos, a expectativa é que alcance a escala industrial antes de 2015, ano em que a sociedade global estipulou como meta a redução pela metade da fome e da pobreza no mundo. As sementes manipuladas geneticamente já contribuem para esta meta e possui um enorme potencial para o futuro (CLIVE, 2009).

Em 2008, a ISAAA previu que a nova onda de sementes manipuladas geneticamente tornar-se-ia disponível e já em 2009 a disponibilidade destas sementes tornou-se visível. Em uma decisão considerada de extrema importância, no dia 27 de novembro de 2009, a China editou certificados de Biossegurança para o desenvolvimento nacional do arroz Bt (*Bacillus thuringiensis*) e do milho com fitase, abrindo caminho para o registro das sementes, o que levará de 2 a 3 anos antes de sua comercialização. O significado desta decisão é de que este arroz é um dos mais importantes alimentos no mundo, tem o potencial de beneficiar 110 milhões de famílias produtoras (440 milhões de beneficiários se levar em consideração que cada família possui 04 membros), somente na China este número aumenta ao avaliar a Ásia: 250 milhões de famílias produtoras, equivalendo a 1 bilhão de beneficiários em potencial. Os fazendeiros de arroz, considerados como pessoas muito pobres, que sobrevivem com, em média, 1/3 de 1 hectare de arroz veem no arroz Bt uma alternativa, que poderá contribuir no aumento da produção e também aliviar a condição de pobreza em que vivem e coincidentemente reduzir a quantidade de pesticida utilizada além de contribuir para um meio ambiente melhor e mais sustentável frente às mudanças climáticas.

A relação da China na área das sementes manipuladas geneticamente pode servir de modelo para outras cidades desenvolvidas para contribuir para auto-suficiência alimentar e também a uma agricultura sustentável menos dependente de pesticidas, aliviando a fome e a pobreza.

O Brasil no contexto das sementes modificadas geneticamente, em 2009 tomou o posto de 2º lugar da Argentina. O país apresentou um aumento de 5,6 milhões de hectares de plantações foi o maior crescimento absoluto em hectares no mundo, o equivalente a 35% de crescimento entre os anos de 2008-2009; dados que asseguraram ao país como um dos líderes no segmento, um motor em propulsão

para o futuro (CLIVE, 2009).

O valor mundial para o mercado das sementes modificadas geneticamente é de aproximadamente U\$\$ 10,5 bilhões em 2009. A projeção para o crescimento econômica está na ordem de 10 – 15% por ano (CLIVE, 2009).

Em 2009, mundialmente, 25 cidades plantavam e comercializavam sementes, alimentos oriundos de manipulação genética, mais 32 cidades, no total de 57, conseguiram concessão para importar, autorizando o uso na alimentação e também para liberação no meio ambiente desde 1996. Num total de 762 aprovações, foram concedidas para 155 eventos em 24 sementes; incluindo o evento do desenvolvimento da “rosa azul” no Japão em 2009 (CLIVE, 2009).

As perspectivas para o futuro das sementes modificadas geneticamente entre os anos de 2010 e 2015 são incentivadoras: a prioridade deve ser atribuída a um programa onde o processo seja apropriado e responsável, avaliando o custo benefício, com sistemas reguladores oportunos e consistentes. Assim, a base será construída sob uma política com suporte financeiro e científico para o desenvolvimento, aprovação e adoção das plantações de sementes geneticamente modificadas (ISAAA, 2009).

A expansão da comercialização é real e mensurável. O processo de desenvolvimento de novos eventos deve ser avaliado quanto à necessidade de cada país, especialmente as necessidades em particular dos países da Ásia, América Latina e África (CLIVE, 2009).

A tabela abaixo aponta os possíveis desenvolvimentos biotecnológicos na agricultura esperados para o período de 2010-2015.

Tabela 1: Possíveis Desenvolvimentos Biotecnológicos na Agricultura

Nome	Alimento	País	Ano * (estimativa)
Smart Stax TM	Milho	Canadá / USA	2010
Bt brinjal (eggplant)	Berinjela	Índia	2010
Golden rice	Arroz	Filipinas / Bangladesh / Índia / Indonésia / Vietnam	2012
Biotech rice	Arroz	Não informado	±2013
Maize phytase	Milho	China	Não informado
Milho tolerante a seca	Milho	USA / Sub Sahara (África)	2012 2017
NUE wheat (uso eficiência de nitrogênio)	Trigo	Não informado	2015 ou mais

FONTE: CLIVE, 2009.

4. A LEGISLAÇÃO BRASILEIRA PARA ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS

A conformidade com a legislação constitui a principal garantia que uma organização possui para o desenvolvimento e o gerenciamento de suas atividades de forma consciente e responsável (HIRATA e MANCINI, 2002).

O tema da biotecnologia associada à biologia molecular e à engenharia genética apareceu na agenda de debates públicos do Brasil nos anos 70, a partir de discussões entre governo e academia, representada pela criação do Programa Integrado de Engenharia Genética (PIEG), em 1978 e do Programa Integrado de Doenças Endêmicas (PIDE), no período de 1973 a 1985. Estes programas foram responsáveis pelo desenvolvimento das áreas básicas de Imunologia, Bioquímica, Biologia Molecular, Genética e Biologia Celular (CALDAS, 2000).

De acordo com o Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT) o primeiro programa a estimular a aplicação industrial baseada na engenharia genética foi o Programa Nacional de Biotecnologia (PRONAB), em 1981. O Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT), em 1984, e o Programa de Capacitação de Recursos Humanos para Atividades Estratégicas (RHAE) também merecem destaque nessa trajetória por permitir a formação e capacitação de pessoal e implementação de uma infra estrutura laboratorial em biotecnologia no país, a exemplo do Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos, criado em 1986, hoje Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) considerado responsável por importantes coleções de recursos genéticos, insumo básico para a Pesquisa e Desenvolvimento em cultivares; e dos Centros de Biotecnologia em algumas instituições de ensino e pesquisa, tais como na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS); na Universidade Federal de Viçosa (UFV) e na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), da Universidade de São Paulo (USP), fortalecida com a criação do subprograma de Biotecnologia (SBIO), no âmbito do PADCT, e dos programas estaduais de biotecnologia coordenados por lideranças acadêmicas e empresariais, a exemplo dos programas BioMinas; BioRio; do Estado do Paraná e do Rio Grande do Sul, sendo este último fortemente apoiado pelo Banco de Desenvolvimento do Estado do Rio Grande do Sul (BADESUL)

(CALDAS, 2000).

Os anos 90 trouxeram a evolução das ações iniciadas na década anterior. A criação de projetos cooperativos e as iniciativas da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) na área do genoma através da atividade de Ciência e Tecnologia em rede resultaram no seqüenciamento do genoma da *Xylella fastidiosa*, bactéria responsável pela doença clorose variegada dos citros (CVC), também conhecida como “amarelinho” (FUNDECITRUS, 2009).

Essas e outras ações proporcionaram ao país a realização de projetos bem sucedidos como o desenvolvimento institucional e o financiamento de inúmeros projetos como a descoberta do Platinil, primeiro medicamento para uso oncológico totalmente fabricado no Brasil; do Biohulin, insulina desenvolvida utilizando técnicas de engenharia genética; do Biofill, pele artificial que revolucionou o tratamento de queimados; entre outros (FINEP, 2009).

A Constituição Federal Brasileira de 1988 (BRASIL, 1988) em seu artigo nº 225 § 1º dispõe que “todos têm direito ao meio ambiente ecologicamente equilibrado, bem de uso comum do povo e essencial à sadia qualidade de vida, impondo-se ao Poder Público e à coletividade o dever de defendê-lo e preservá-lo para as presentes e futuras gerações”, e para assegurar a efetividade desse direito, incumbe ao Poder Público, através dos incisos:

II - preservar a diversidade e a integridade do patrimônio genético do País e fiscalizar as entidades dedicadas à pesquisa e manipulação de material genético;

IV - exigir, na forma da lei, para instalação de obra ou atividade potencialmente causadora de significativa degradação do meio ambiente, estudo prévio de impacto ambiental, a que se dará publicidade;

V - controlar a produção, a comercialização e o emprego de técnicas, métodos e substâncias que comportem risco para a vida, a qualidade de vida e o meio ambiente.

VI - controlar a produção, a comercialização e o emprego de técnicas, métodos e substâncias que comportem risco para a vida, a qualidade de vida e o meio ambiente.

A Lei nº 11.105 de 24 de março de 2005 (BRASIL, 2005) revoga a Lei nº 8.974 de 05 de janeiro de 1995 (BRASIL, 1995) e estabelece normas de segurança

e mecanismos de fiscalização sobre a construção, cultivo, produção, manipulação, transporte, a transferência, a importação, a exportação, o armazenamento, a pesquisa, comercialização, consumo, liberação no meio ambiente e descarte de OGM e seus derivados, tendo como diretrizes o estímulo ao avanço científico na área de biossegurança e biotecnologia, a proteção à vida e à saúde humana, animal e vegetal, e a observância do princípio da precaução para proteção do meio ambiente. Além disso, a Lei nº 11.105 cria o Conselho Nacional de Biossegurança (CNBS), órgão de assessoramento superior do Presidente da República para formulação e implementação da Política Nacional de Biossegurança (PNB) (BRASIL, 2005).

A Lei nº 11.105, na visão de Fiorillo (2007), viabiliza no plano infraconstitucional o apoio e estímulo às empresas que invistam em pesquisa e criação de tecnologias adequadas ao Brasil, em consonância com o artigo nº 218, § 4º, da Constituição Federal Brasileira, visando proporcionar a solução de problemas brasileiros, assim como desenvolver o sistema produtivo nacional e regional, nos termos do artigo nº 3º e 218, §2º, da Constituição Federal Brasileira.

A liberação de OGM vem sendo condicionada à observância da Lei nº 11.105/2005, que exige além do conhecimento científico acerca das características, riscos e propriedades de tais produtos, a observância de todo o procedimento previsto e avaliação prévia da CTNBio, isto é, a realização do Estudo Prévio do Impacto Ambiental (EPIA) e apresentação de Relatório do Impacto no Meio Ambiente (RIMA) visando desta maneira regulamentar o disposto no artigo nº 225 § 1º da Constituição Federal Brasileira. Com a ratificação pelo Brasil da Convenção da Biodiversidade, a observância do Princípio da Precaução deve ser plena, pois não deveria haver outro caminho na ausência de segurança em relação ao meio ambiente senão ser cauteloso (COSTA, 2007).

A Resolução nº 17 de 30 de abril de 1999, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), estabelece as diretrizes básicas para a avaliação do risco e segurança dos alimentos, para o controle sanitário dos alimentos, visando proteger a saúde da população (BRASIL, 1999).

O desenvolvimento das atividades com OGM as organizações públicas, privadas, nacionais, estrangeiras ou internacionais, bem como órgãos financiadores ou patrocinadores de atividades ou projetos devem submeter-se à Lei, certificando-

se da idoneidade técnica científica com a apresentação do Certificado de Qualidade em Biossegurança, sob pena de se tornarem co responsáveis pelos eventuais efeitos oriundos de seu cumprimento (HIRATA e MANCINI, 2002).

Em 2000, o Ministério da Ciência e Tecnologia lançou o Projeto Genoma Brasileiro que contou com a participação de 25 laboratórios de biologia molecular, distribuídos nas diversas regiões do país, e dos Laboratórios de Bioinformática (LABINFO) e do Laboratório Nacional de Computação Científica, do Ministério da Ciência e Tecnologia (LNCC/MCT), para a análise das seqüências de nucleotídeos e de proteínas. De acordo com o MCT (2009):

busca-se com esse consórcio a ampliação da competência, em âmbito nacional, nas atividades de pesquisa e manipulação de genoma, com o apoio financeiro para infraestrutura laboratorial, formação de recursos humanos especializados e desenvolvimento de trabalhos multi-institucionais”

O Programa Nacional de Biotecnologia e Recursos Genéticos, criado em 2002 e com duração de 10 anos (2002-2012), tem o objetivo geral de elevar o nível de competitividade científica e tecnológica do País a patamares equiparáveis aos dos países desenvolvidos, acelerando os mecanismos de transferência de tecnologia entre o setor produtivo e instituições de pesquisa e desenvolvimento, com vistas à inovação e à melhoria de produtos, processos e serviços biotecnológicos de interesse social e econômico (MCT, 2002).

5. ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS NO BRASIL

5.1. COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA – CTNBIO

A CTNBio, órgão criado pela Medida Provisória nº 2.191-9, de 23 de agosto de 2001, e re-estruturado pela nova Lei nº 11.105/2005, tem por função prestar apoio técnico consultivo e de assessoramento ao Governo Federal na formulação, atualização e implementação da Política Nacional de Biossegurança (PNB), bem como estabelecer normas técnicas de segurança e de pareceres técnicos referentes à autorização para atividades que envolvam pesquisa e uso comercial de OGM e seus derivados, como base na avaliação de seu risco zoonossanitário, à saúde humana e ao meio ambiente (BRASIL, 2001).

A CTNBio está vinculada ao Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia do Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT). A CTNBio integra o Capítulo III da Lei nº 11.105/2005 (BRASIL, 2005a, artigos 10 a 15) e o Capítulo II do Decreto regulamentador desta Lei (BRASIL, 2005b, artigos 4º a 47). É definida como instância colegiada multidisciplinar de caráter consultivo e deliberativo, incumbida de prestar apoio técnico e de assessoramento ao Governo Federal na formulação, atualização e implementação da Política Nacional de Biossegurança de Organismos Geneticamente Modificados (e seus derivados), bem como estabelecer normas técnicas de segurança e pareceres referentes à autorização para atividade pesquisa e uso comercial de OGM, com base na avaliação do risco aos animais, às plantas, à saúde humana e ao meio ambiente de modo geral (BRASIL, 2005a; BRASIL, 2005b).

O Decreto nº 5.591 de 22 de novembro de 2005 dispõe em seu artigo 4º, parágrafo único que:

A CTNBio deverá acompanhar o desenvolvimento e o progresso técnico e científico nas áreas de biossegurança, biotecnologia, bioética e afins, com o objetivo de aumentar sua capacitação para a proteção da saúde humana, dos animais e das plantas e do meio ambiente.

O Decreto nº 5.591 de 22/11/2005, dispõe através de seus incisos sobre a composição e as competências da CTNBio, além de:

III - estabelecer, no âmbito de suas competências, critérios de avaliação e monitoramento de risco de OGM e seus derivados;

IV - proceder à análise da avaliação de risco, caso a caso, relativamente a atividades e projetos que envolvam OGM e seus derivados;

VI - estabelecer requisitos relativos a biossegurança para autorização de funcionamento de laboratório, instituição ou empresa que desenvolverá atividades relacionadas a OGM e seus derivados;

VIII - autorizar, cadastrar e acompanhar as atividades de pesquisa com OGM e seus derivados, nos termos da legislação em vigor;

IX - autorizar a importação de OGM e seus derivados para atividade de pesquisa;

X - prestar apoio técnico consultivo e de assessoramento ao Conselho Nacional de Biossegurança - CNBS na formulação da Política Nacional de Biossegurança de OGM e seus derivados;

XI - emitir Certificado de Qualidade em Biossegurança - CQB para o desenvolvimento de atividades com OGM e seus derivados em laboratório, instituição ou empresa e enviar cópia do processo aos órgãos de registro e fiscalização;

XII - emitir decisão técnica, caso a caso, sobre a biossegurança de OGM e seus derivados, no âmbito das atividades de pesquisa e de uso comercial de OGM e seus derivados, inclusive a classificação quanto ao grau de risco e nível de biossegurança exigido, bem como medidas de segurança exigidas e restrições ao uso;

XIV - classificar os OGM segundo a classe de risco, observados os critérios estabelecidos neste Decreto;

XVIII - apoiar tecnicamente os órgãos e entidades de registro e fiscalização, no exercício de suas atividades relacionadas a OGM e seus derivados (BRASIL, 2005).

5.2. APROVAÇÕES COMERCIAIS DE OGM NO BRASIL

No sentido de reforçar o embasamento técnico e científico, necessário à avaliação e à aprovação dos eventos transgênicos que aguardam os pareceres conclusivos da CTNBio, o Conselho de Informações sobre Biotecnologia (CIB) protocolou na secretaria da CTNBio um conjunto de avaliações técnicas - realizadas por conselheiros e colaboradores da entidade e pesquisadores de importantes universidades nacionais, - a respeito de estudos científicos recentes publicados na literatura acadêmica mundial. A iniciativa tem como finalidade reforçar o embasamento técnico e científico necessário à avaliação e à aprovação dos eventos transgênicos que aguardam os pareceres conclusivos do órgão federal.

Os estudos protocolados foram desenvolvidos por renomadas instituições da Europa e dos Estados Unidos e comprovam, em particular, a segurança alimentar, ambiental e de coexistência entre plantas convencionais e transgênicas de milho.

A tabela a seguir expõe todos os eventos submetidos ao CTNBIO desde 1998, suas aprovações e eventos que estão previstos em pauta.

Tabela 2: Eventos já aprovados

Cultivo/Produto	Evento	Características	Aprovação pela CTNBio
soja	GT-40-3-2	RR (Roundup Ready – tolerância ao herbicida glifosato)	Setembro / 98
soja	Cultivance (BRCV)	Tolerância a herbicidas do grupo químico imidazolinonas	Dezembro / 09
soja	Liberty Link (a-2704-12)	Tolerância glufosinato de amônio	Fevereiro/10
soja	A 5547-127	Tolerância glufosinato de amônio	Fevereiro/10
soja	BtRR2Y	Resistência a insetos e ao herbicida glifosato	Agosto/10
milho	T25	Tolerância glufosinato de amônio	Maior / 07
milho	MON810 YieldGuard	Resistência a insetos da ordem Lepidóptera	Agosto / 07
milho	BT11	Resistência a insetos da ordem Lepidóptera e tolerância glufosinato de amônio	Setembro / 07
milho	NK603	RR2 (Roundup Ready2) – tolerância ao herbicida glifosato	Setembro / 08
milho	GA21	Tolerância ao herbicida glifosato	Setembro / 08
milho	TC1507 HERCULEX	Resistência a insetos da ordem Lepidóptera e tolerância glufosinato de amônio	Dezembro / 08
milho	MIR 162	Resistência a insetos da ordem Lepidóptera	Setembro / 09
milho	MON 810 x NK 603	Resistência a insetos da ordem Lepidóptera e tolerância ao herbicida glifosato	Setembro / 09

milho	BT11 x GA21	Resistência a insetos da ordem Lepidóptera e tolerância ao herbicida glifosato e ao glufosinato de amônio	Setembro / 09
milho	MON89034	Resistência a insetos da ordem Lepidóptera	Outubro / 09
milho	TC1507 x NK603	Resistência a insetos da ordem Lepidóptera e tolerância ao herbicida glifosato e ao glufosinato de amônio	Outubro / 09
milho	MON89034 x NK603	Resistência a insetos e tolerante ao herbicida glifosato	Novembro/10
milho	Bt11 x MIR 162 x GA 21	Resistência a insetos e tolerante ao herbicida glifosato e glufosinato	Novembro/10
milho	MON 88017	Resistência a insetos e tolerante ao herbicida glifosato	Dezembro/10
milho	MON 89034 x TC1507 x NK603	Resistência a insetos e tolerante ao herbicida glifosato e glufosinato de amônio	Dezembro/10
algodão	MON 531 – BOLGARD I	Resistência a insetos da ordem Lepidóptera	Março / 05
algodão	LLCOTTON 25	LL (LibertyLink) tolerância a glufosinato de amônio	Setembro / 08
algodão	MON1445	RR (Roundup Ready) tolerância ao herbicida glifosato	Setembro / 08
algodão	281-24-236/3006-210-23 (widestrike)	Widestrike resistência a insetos da ordem Lepidóptera e tolerância a glufosinato de amônio	Março / 09
algodão	MON 15985 BOLGARD II	Resistência a insetos da ordem Lepidóptera	Mai / 09
algodão	MON 531 x MON 1445	Resistência a insetos da ordem Lepidóptera e tolerância ao herbicida glifosato	Outubro / 09
algodão	GHB 614	Tolerância ao herbicida glifosato	Dezembro/10
algodão	GHB139 x T304-40	TwinLink – resistência a insetos e tolerante ao herbicida glufosinato de amônio	Fevereiro/11
vacina	VAXXITEK MD/IBD	Vacina contra doença de Marek e doença de Gumboro	Mai / 04
vacina	RECOMBITEK	Vacina contra cinomose, hepatite, parvovirose, parainfluenza, coronavirose, leptospirose caninas	Mai / 04
vacina	SUVAXYN PCV2 ONE DOSE	Vacina inativada contra circovirose suína	Março / 08
vacina	PORCILIS CIRCUMVENT	Vacina inativada contra circovirose suína	Junho / 08
vacina	IGELVAC CIRCUFLEX	Vacina inativada contra circovirose suína	Setembro / 08
vacina	POULVAC ECOLI	Vacina para uso animal contra bactéria <i>E.coli</i>	Outubro / 09
vacina	VECTORMUNE FP-MG+AE	Vacina viva liofilizada contra a Boubá aviária e <i>Mycoplasma gallisepticum</i> e Encefalomielite aviária	Dezembro / 09
vacina	VECTORMUNE FP-MG	Vacina viva liofilizada contra a Boubá aviária e <i>Mycoplasma gallisepticum</i>	Dezembro / 09
vacina	VECTORMUNE HVT-NDV	Vacina viva congelada contra doença de Marek e doença de New Castle	Fevereiro/10
vacina	VECTORMUNE HVT-IBD	Vacina viva congelada contra doença de Marek e Gumboro	Fevereiro/10
vacina	POULVAC ST	Vacina viva contra <i>Salmonella typhimurium</i>	Novembro/10
levedura	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> – CEPA Y1979	Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para produção de farneseno	Fevereiro/10

Fonte: CIB (2011)

Tabela 3: Eventos em pauta

Eventos em Pauta		
Cultivo /Produto	Evento	Características
Arroz	LLRICE62	LL (LibertyLink) tolerância a glufosinato de amônio
Soja	MON 87701 x MON 89788	Resistência a insetos e tolerância ao herbicida glifosato
milho	MON89034 x NK603	Resistência a insetos e tolerância ao herbicida glifosato

Fonte: CIB (2011)

6. A CULTURA DO FEIJÃO

6.1. HISTÓRICO

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris L.*) é uma planta cultivada há milhares de anos pelo homem. Sua origem até hoje, constitui fonte de divergência entre os pesquisadores. Diversas hipóteses tentam explicar não somente a origem da planta, mas também de quando teria o homem começado a utilizá-la como uma cultura doméstica. Algumas evidências levam à hipótese de que o centro de origem da planta e sua domesticação como cultura teriam ocorrido na região da Mesoamérica, por volta de 7000 anos a.C., uma vez que cultivares selvagens, similares a variedades crioulas, foram encontrados nessa região, mais especificamente no México. Supõe-se que a partir dessa região, a cultura teria posteriormente disseminado para toda a América do Sul (ARAGÃO, 2004).

Há uma outra corrente de pesquisadores que, baseada em achados arqueológicos que remontam a 10.000 a.C., sustentam a hipótese de que a origem da planta e sua domesticação seria a América do Sul, mais especificamente o Peru. Dali sua cultura teria sido disseminada para a parte norte do continente (BOREM, 2006; VENZON, 2007).

A importância do feijão na alimentação humana é comprovada em relatos que remontam aos primeiros registros históricos de que se tem notícia. O feijoeiro era cultivado no Antigo Egito e na Grécia, onde recebiam cultos em sua homenagem, por serem considerados símbolos da vida. Já os antigos romanos usavam o feijão em suas festas e até mesmo como forma de pagamento para apostas (BOREM, 2006; VENZON, 2007).

Dados mais recentes, com base em padrões eletroforéticos de faseolina, sugerem a existência de três centros primários de diversidade genética, tanto para espécies silvestres como cultivadas: o mesoamericano, que se estende desde o sudeste dos Estados Unidos até o Panamá, tendo como zonas principais o México e a Guatemala; o sul dos Andes, que abrange desde o norte do Peru até as províncias do noroeste da Argentina; e o norte dos Andes, que abrange desde a Colômbia e

Venezuela até o norte do Peru. Além destes três centros americanos primários, podem ser identificados vários outros centros secundários em algumas regiões da Europa, Ásia e África, onde foram introduzidos genótipos americanos (CNPAF, 2010).

O gênero *Phaseolus* compreende aproximadamente 55 espécies, das quais apenas cinco, são cultivados: o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*); o feijão de lima (*P. lunatus*); o feijão Ayocote (*P. coccineus*); o feijão tepari (*P. acutifolius*); e o petaco (*P. Polyanthus*) (ARAGÃO, 2004; CARNEIRO, 2005; CNPAF, 2010).

Foram encontradas referências aos feijões na Idade do Bronze, na Suíça, e entre os hebraicos, cerca de 1.000 a.C. As ruínas da antiga Tróia revelam evidências de que os feijões eram o prato favorito dos robustos guerreiros troianos. A maioria dos historiadores atribui a disseminação dos feijões no mundo em decorrência das guerras, uma vez que esse alimento fazia parte essencial da dieta dos guerreiros em marcha. Os grandes exploradores ajudaram a difundir o uso e o cultivo de feijão para as mais remotas regiões do planeta (CNPAF, 2010).

O feijão tem grande importância econômica, social e cultural no Brasil, maior produtor e consumidor mundial deste grão (FAO, 2005). Como principal constituinte protéico da dieta dos brasileiros, o feijão faz parte da culinária do país, onde é cultivado o ano todo, em pequenas e grandes propriedades, com uso de diferentes níveis de tecnologia.

No Brasil, o cultivo do feijoeiro data de mais de 2000 anos atrás. Sementes de feijão escondidas em cavernas desse período são as mais fortes evidências disso (CNPAF, 2010).

São cultivados no Brasil o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e a fava (*P. lunatus* L.). Não há registros de espécies silvestres destes gêneros no Brasil, uma vez que não se trata de um centro de origem como Mexico, Região Andina e Colômbia (DEBOUCK, 1988).

A cultura do feijoeiro ocupa uma área de 12 milhões de hectares e constitui-se na leguminosa mais importante para alimentação de mais de 500 milhões de pessoas na África e América Latina. O Brasil é o maior produtor e consumidor desta leguminosa, seguido pela Índia, China e México. No período agrícola de 2006/2007, a produção foi de 3.350 toneladas e a previsão para o período agrícola de 2007/2008 foi de 1.255 toneladas (CONAB, 2008). Contudo, a produção nacional ainda é inferior ao seu potencial, apresentando produtividade média equivalente a

800 kg/ha (MAPA, 2006). Essa baixa produtividade ocorre devido a vários fatores, dentre os quais, a incidência de doenças é considerada uma das maiores causas, e atualmente as ocorrências de estiagem têm contribuído para acentuar este fator. Como o rendimento desta cultura ainda é consideravelmente baixo, buscam-se alternativas para a obtenção de cultivares mais produtivas através da melhoria do desempenho produtivo da cultura, associado ao conhecimento e exploração da variabilidade genética. (CIFEIJÃO, 2010; CNPAF, 2010).

O Brasil é um dos maiores produtores e consumidores de feijão no mundo, e o feijão constitui a principal fonte de proteína vegetal do brasileiro, além de possuir bom conteúdo de carboidrato e ferro. Nos últimos cinco anos a produção de feijão no Brasil variou de 3,0 a 3,6 milhões de toneladas, em uma área que tem se mantido entre 4,0 e 4,3 milhões de hectares (MAPA, 2007).

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) possui teores significativos de proteínas, carboidratos, vitaminas, minerais e fibra, baixo conteúdo de gordura e de colesterol (HOSFIELD, 1991; MORROW, 1991), por isso é considerado de alta qualidade nutricional e funcional. Além disso, por razões culturais e econômicas, é amplamente utilizado na alimentação, independentemente da classe social (ANTUNES *et al.*, 1995).

6.2. O FEIJÃO NO BRASIL

No Brasil, há ainda outras espécies de feijão plantadas no país, como feijão-azuki (*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi e Ohashi), cultivados mais por colonos japoneses; feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis* (L.) DC.), usado como adubo verde; feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.), consumido como grãos verdes e o caupi ou feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), que no Nordeste do Brasil constitui a alimentação básica da população. Nessa página, contudo a ênfase será dada ao *Phaseolus vulgaris* L..

O Brasil destaca-se como o maior produtor mundial de feijão, principalmente o tipo carioca que atinge 71% de produção. O Estado de Minas Gerais é o segundo maior produtor nacional, com aproximadamente 15% da produção total. O país é

também o maior consumidor mundial de feijão-comum, com um consumo estimado em aproximadamente 16 kg/ano (CIFEIJÃO, 2010).

Alguns fatores como época de plantio, pragas e doenças, preço pouco atrativo, afastam os grandes agricultores de praticarem essa cultura, que, ainda hoje, é de predomínio dos pequenos produtores.

Além disso, o Brasil também é um importador, uma vez que devido a condições de mercados e doenças que afetam a produção, principalmente o mosaico dourado e mofo branco. O consumo anual *per capita* é de 16 quilogramas. Em regiões mais pobres o consumo de feijão tende a ser maior, como no Nordeste brasileiro que chega a 18,5 quilogramas *per capita* por ano (ARAGÃO, 2004).

Entretanto, a produtividade média nacional é de 817 kg ha⁻¹ e no Estado do Rio Grande Sul, 1223 kg ha⁻¹ (CONAB, 2009). Apesar de ser o maior produtor de feijão, o Brasil apresenta variações na colheita em função do baixo nível tecnológico e da diversidade de condições ambientais em que o feijão é cultivado. Assim, diferenças entre locais, anos e épocas de avaliação têm sido observadas em diversas regiões do país (RIBEIRO *et al*, 2009).

Atividades de pesquisa com o feijoeiro no país são recentes, datam da década de 1950. Nesse período, de acordo com o censo, a população brasileira teve um aumento significativo, e o mesmo não ocorreu com a produção do grão. Com isso, ocorreu a escassez temporária de feijão no mercado. Tal fato despertou a atenção de pesquisadores para a cultura que, então, procuraram desenvolver variedades mais produtivas e técnicas que aumentassem mais rapidamente a produção (BOREM, 2006; VENZON, 2007).

Aproximadamente 80% da produção e da área cultivada encontram-se em propriedades menores que 100 ha. Entretanto, nos últimos anos a agricultura empresarial tem fortalecido as suas lavouras, investindo mais em tecnologias modernas, abastecendo períodos denominados entre safras. Um exemplo é o número de produtores brasileiros que utilizam irrigação e colheita semi-mecanizada, que embora tenha aumentado, estão desestimulados pelo risco econômico, devido à alta susceptibilidade às doenças, principalmente o mosaico dourado, e pouca tolerância à seca. O feijão é produzido em todas as regiões do país. A Região Nordeste detém a maior área plantada (45%), seguida das Regiões Sul (26%) e Sudeste (21%). A Região Nordeste detém o mais baixo índice de produtividade,

decorrente da baixa utilização de insumos agrícolas e problemas com a seca. Os maiores Estados produtores são Paraná, Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Goiás. Suprir a crescente demanda alimentar sem destruir novas áreas naturais tem sido um dos maiores desafios da atualidade (ARAGÃO, 2004).

Por predominar o cultivo em pequenas propriedades, o feijão apresenta destaque na absorção de mão de obra agrícola, especialmente a familiar. Estima-se que esta cultura utilize cerca de 40 milhões de homem/dia por ciclo de produção. No Brasil, nas últimas décadas a produção e a área ocupada com a cultura do feijoeiro aumentaram, entretanto a produtividade vem decrescendo. Vários são os fatores que contribuem para este fato: sócio-econômico, fitossanitário e agroecológico. Diante dos problemas que esta cultura possui e da sua grande importância para as regiões onde está estabelecida, há um grande interesse no desenvolvimento de tecnologias que possam acelerar o processo de melhoramento. Frente às tendências atuais de crescimento da população e de consumo de feijão, pode ser esperado um aumento da demanda para a América Latina e África. Este aumento de demanda será suprido somente se novos cultivares de feijão com rendimentos mais altos, resistência múltipla a doenças, maior tolerância à seca e baixa fertilidade do solo, forem desenvolvidos, pois, isto permitirá aumentar a produtividade do feijão, alcançando maior estabilidade de rendimento (ARAGÃO, 2004).

A produção mundial de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é da ordem de 18,9 milhões de toneladas. A produtividade da cultura é grandemente afetada por doenças, e aquelas causadas por vírus representam um dos principais fatores associados às perdas na América Latina e no Brasil, tanto pela redução da produtividade e qualidade, quanto pela dificuldade de seu controle (GASPARÍN *et al*, 2004).

6.3. DOENÇAS COMUNS AO FEIJOEIRO

O feijoeiro comum é afetado por inúmeras doenças as quais, além de diminuir a produtividade da cultura, depreciam a qualidade do produto. Devido a sua

suscetibilidade a várias doenças e baixa tolerância à seca, o cultivo do feijão em determinadas épocas do ano é realizado em condições de alto risco. Além disso, a necessidade de utilização de agrotóxicos no combate às pragas produz um impacto ambiental negativo e um aumento do custo de produção, que pode até mesmo inviabilizar seu cultivo devido às variações de mercado (ARAGÃO, 2004).

Estas doenças podem ser de origem fúngicas, bacteriana, virótica assim como as incitadas por nematóides. Entre as principais doenças fúngicas encontra-se a mancha angular, a antracnose, a ferrugem, o oídio, o mofo branco, as podridões radiculares de *Fusarium* e *Rhizoctonia*, a murcha de *Fusarium*, a podridão do colo e, mais recentemente o carvão e a sarna. Entre as doenças bacterianas merecem destaque, por sua importância, o crestamento bacteriano comum e a murcha-de-*Curtobacterium*, recentemente identificada em feijoads no Estado de São Paulo. Várias são as doenças incitadas por vírus, entre as quais, o mosaico comum (BCMV) e o mosaico dourado (BGMV), as mais importantes. Finalmente, entre os nematóides, aquele conhecido como nematóide das galhas é, sem dúvida, o que merece maior consideração (CNPAP, 2010).

O mosaico dourado do feijoeiro é uma das principais doenças dessa cultura, que tem dificultado, ou mesmo inviabilizado a produção de feijão em várias regiões do Brasil (CNPAP, 2010).

As pragas que atacam a cultura do feijoeiro podem atuar tanto no campo como na pós colheita, sendo toda a planta atacada. Em números as perdas podem oscilar entre 30 e 90% da produção, dependendo do período do ano, da idade da cultura, dentre outros fatores. O controle de pragas da cultura visa evitar o incremento da população dos vetores e que se alcance o chamado nível de dano econômico, que é o ponto em que o ataque da praga ao feijoeiro começa a causar prejuízos econômicos ao produtor (CIFEIÃO, 2010).

Existem várias estratégias de controle, porém a mais empregada atualmente é o manejo integrado, que consiste em um conjunto de práticas de combate à praga. Dentre essas medidas incluem-se o controle cultural, (que é a utilização de algumas práticas como atraso ou antecipação no plantio), a rotação de cultura, e outras que visam fugir do período propício à praga, ou matar a praga por falta de alimento, por exemplo (CNPAP, 2010).

Outra possibilidade é uso do controle biológico, ou seja, o emprego de insetos inimigos naturais de pragas, fungos, bactérias e vírus capazes de matar a população

de pragas. Utilizam-se também barreiras fitossanitárias que impediriam o livre trânsito de material no país, evitando assim, a disseminação das pragas de um local onde já existem para um local onde ainda não ocorram (CIFEIJÃO, 2010).

Há, também, o uso de produtos químicos como inseticidas, com várias formulações para o controle das mais diversas pragas. Porém, o uso de qualquer uma das técnicas de manejo integrado deve ser indicado somente por um agrônomo, devidamente credenciado e após o correto diagnóstico da praga que acomete a cultura, uma vez que sem essa correta diagnose, a medida de manejo adotada pode ser ineficiente e causar maiores prejuízos ao produtor. Vale salientar que, no caso do uso de produtos de origem química ou biológica, o mesmo deve estar devidamente registrado para o uso na cultura no Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento (VIEIRA, 1988; VIEIRA, 2006; VENZON, 2007).

6.3.1. Doenças Bacterianas do Feijão

Crestamento bacteriano comum incitado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, é uma das mais importantes doenças de origem bacteriana. Atualmente, a enfermidade tem sido encontrada na maioria das regiões produtoras de feijoeiro comum (CNPAP, 2010).

Os sintomas do crestamento bacteriano comum manifestam-se em toda a parte aérea da planta, afetando folhas, caules, vagens e sementes. Nas folhas, caracteriza-se por pequenas áreas encharcadas, podendo ou não ser circundada por estreito bordo amarelo, que ao evoluírem tornam os tecidos secos e quebradiços. Nos caules de plantas novas, as lesões são às vezes deprimidas e na forma de manchas aquosas. Posteriormente, tomam a aparência de riscos vermelhos que se estendem ao longo do caule, cuja superfície frequentemente racha, podendo o exsudato bacteriano acumular-se na lesão. Nas vagens surgem pequenas manchas aquosas, que aumentam progressivamente de tamanho. À medida que as lesões envelhecem, o tecido afetado perde sua aparência aquosa, tornando-se seco, deprimido e avermelhado. A infecção ocorre frequentemente nos elementos vasculares da sutura dorsal da vagem, penetrando na semente através do funículo. As sementes podem apodrecer, enrugarem-se ou apresentar descoloração

na região do hilo. Estudos epidemiológicos constataram que um nível de infecção nas sementes de 0,5% pode ocasionar séria epidemia na cultura resultante. Por isto é importante que, para diminuir as perdas devidas à doença, o controle seja feito de forma integrada utilizando-se as práticas culturais, os produtos químicos e a resistência genética. Dentre estas medidas preconizam-se: o isolamento da cultura por pelo menos 30 m de outra cultura que possa constituir-se em fonte de inóculo, o uso de sementes de qualidade produzidas em período seco por instituições idôneas, a rotação de culturas com gramíneas, o bom preparo do solo com pré-incorporação dos restos da cultura anterior, o uso de herbicidas pré e pós emergentes, o uso de cultivares resistentes disponíveis e recomendadas pela pesquisa desenvolvida e, finalmente, evitar o trânsito dentro da cultura enquanto as plantas estiverem úmidas. Embora com resultados contraditórios e com baixa eficiência de controle, quando necessário, recomendam-se pulverizações da parte aérea da planta com fungicidas à base de cobre (CNPAP, 2010).

A doença é fortemente favorecida por condições de alta temperatura e umidade. A umidade é vital à bactéria, pois é sua principal forma de locomoção. Sua disseminação e sobrevivência se dão através da semente, onde as bactérias podem permanecer vivas por até 15 anos. É importante evitar o plantio, sempre que possível, em campos que já tenham ocorrido a doença. O controle deve ter mais o aspecto preventivo, pois não existe nenhum produto químico de eficiência comprovada para o controle da doença. A primeira medida a ser adotada é o uso de sementes livres do patógeno em alguns países, o nível de tolerância é zero para a incidência de *X. axonopodis* pv. *Phaseoli* em sementes de feijão (CIFEIJÃO, 2010).

Uso de cultivares resistentes é uma medida, embora a grande maioria dos cultivares comerciais seja suscetível, e os resistentes apresentam apenas resistência parcial (CIFEIJÃO, 2010).

A **murcha-de-curto-bacterium** foi inicialmente identificada no Estado de São Paulo e, hoje, encontra-se distribuída em várias áreas produtoras de feijão, principalmente nas Regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (CNPAP, 2010).

Por ser uma doença observada recentemente na cultura, não se conhecem as perdas na produção por ela ocasionadas (CNPAP, 2010).

Curtobacterium flaccumfasciens pv. *flaccumfasciens* (Hedges) Collins & Jones é um parasita vascular que infecta as plantas através da semente contaminada ou ferimentos/aberturas naturais (CNPAP, 2010).

Os sintomas iniciais correspondem à presença nas plantas de folhas murchas (flácidas) que ocorrem durante a hora mais quente do dia. As folhas podem voltar à turgescência normal durante os períodos de alta umidade e baixa temperatura, mas, normalmente, tornar-se-ão castanhas com a conseqüente murcha e morte da planta. A murcha é o resultado da obstrução dos feixes vasculares, os quais ficam repletos de células da bactéria. O sistema vascular da planta pode apresentar-se enegrecido (CNPAP, 2010).

A doença é disseminada a curta distância pela água de irrigação e pela chuva e, a longa distância, pelas sementes contaminadas. O inóculo primário é constituído pelas sementes infectadas e restos de cultura contaminados. Dentre os fatores de ambiente que favorecem a doença encontram-se as temperaturas altas (32°C), o alta concentração de umidade e as chuvas (CNPAP, 2010).

O controle pode ser realizado através do plantio de sementes de boa qualidade e através de cultivares resistentes (CNPAP, 2010).

6.3.2. Doenças Fúngicas do Feijão

A **antracnose** do feijoeiro comum, cujo agente causal é o fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc.) Scrib., é uma das doenças de maior importância desta cultura afetando, em todo o mundo, as cultivares suscetíveis em locais com temperaturas de moderadas a frias e alta umidade relativa (CNPAP, 2010).

Quanto mais precoce for o aparecimento da doença, maiores poderão ser as perdas, as quais podem atingir a 100% quando são utilizadas sementes de baixa qualidade em condições de ambiente favoráveis ao desenvolvimento da doença (CNPAP, 2010).

O fungo que pode aparecer em toda a parte aérea da planta, além de diminuir o rendimento da cultura, deprecia a qualidade do produto, tornando-o impróprio para o consumo. A antracnose é mais fácil de ser reconhecida nas vagens onde as lesões, que caracterizam os sintomas, se apresentam de forma arredondada, deprimida, de tamanho variável e com o centro claro sendo delimitadas por um anel negro, um pouco saliente, rodeado por um borde de cor café avermelhada. Quando

as condições de umidade e temperatura são favoráveis, forma-se no centro das lesões uma massa de esporos de coloração rosada (CNPAP, 2010).

O controle da antracnose do feijoeiro comum pode ser realizado através do emprego de práticas culturais, do uso de produtos químicos e da utilização de cultivares resistentes. Dentre as práticas culturais, a que tem apresentado melhor resultado tem sido o emprego de sementes de boa qualidade, produzidas em condições de clima semi-árido. Vários fungicidas e cultivares resistentes têm sido recomendados no controle da antracnose. Conseqüentemente, para diminuir as perdas causadas pela doença, recomenda-se a prática integrada das seguintes ações: isolamento da cultura, utilização de semente de qualidade, tratamento químico da semente, rotação de culturas, incorporação de restos culturais, uso de herbicidas, aplicação de fungicidas e semeadura de genótipos resistentes (CNPAP, 2010).

A **mancha angular** do feijoeiro comum, cujo agente causal é o fungo *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferr., encontra-se amplamente distribuída, abrangendo todas as regiões onde se cultiva esta leguminosa. Afeta com maior ou menor intensidade, as diversas cultivares de feijoeiro. Apesar de ser uma das primeiras doenças do feijoeiro a ser investigada no Brasil, a sua importância econômica até há pouco tempo era desconsiderada devido a sua ocorrência só no fim do ciclo da cultura. Entretanto, na última década passou a ser considerada uma das principais doenças desta cultura, causando perdas que podem variar de 7 a 70 % dependendo, entre outros fatores, da suscetibilidade da cultivar, do momento da sua ocorrência, das condições de ambiente e da patogenicidade dos isolados (CNPAP, 2010).

A mancha angular, além das folhas, ocorre nas vagens, caules e ramos. Nas folhas primárias as lesões são mais ou menos circulares com halos concêntricos de cor castanho-escuro e nas folhas trifoliadas, as lesões têm formato angular, característica que deu o nome à doença. Nos caules e ramos, as lesões são alongadas, de coloração castanho-escuro. Nas vagens, as lesões são inicialmente superficiais, quase circulares, de coloração castanho-avermelhada com bordos escuros (CNPAP, 2010).

O controle da mancha angular pode ser realizado pela integração de práticas culturais, pelo emprego de fungicidas tanto no tratamento da semente como em aplicação na parte aérea e pela utilização de genótipos resistentes. Entre as práticas

culturais, recomenda-se a utilização de sementes de boa qualidade, produzidas em regiões de inverno ameno e seco, rotação de culturas com gramíneas, preparo do solo com a incorporação profunda de restos de cultura e a manutenção da cultura no limpo. O tratamento químico pode ser realizado tanto nas sementes como em pulverizações foliares de forma preventiva e com os fungicidas recomendados. Deve-se utilizar cultivares resistentes sempre que possível; entretanto, o desenvolvimento de tais genótipos é dificultado pela grande variabilidade genética que o patógeno apresenta (CNPAF, 2010).

A **ferrugem** do feijoeiro, incitada pelo fungo *Uromyces appendiculatus* (Pers) Unger, está presente em todas as regiões onde se cultiva esta leguminosa (CNPAF, 2010).

No Brasil e em outros países da América, a doença é considerada como um dos mais importantes problemas fitopatológicos relacionados à cultura do feijoeiro. As plantas são mais vulneráveis à doença nos estádios de pré-floração e floração, o que acontece normalmente dos 30 aos 45 dias após a germinação, período no qual as perdas podem atingir até 68 % (CNPAF, 2010).

O fungo infecta, principalmente, as folhas onde forma, inicialmente, pequenas lesões amarelo-esbranquiçadas na face inferior, as quais se expandem até formarem pústulas de cor marrom-avermelhada em ambas as faces da folha (CNPAF, 2010).

No controle eficiente da ferrugem recomenda-se o emprego de práticas culturais tais como a rotação de culturas, a redução na densidade de plantio, a remoção de resíduos e as épocas de plantio diferenciadas para cada região. O controle químico deve ser realizado de maneira preventiva com fungicidas de contato e/ou sistêmicos. Deve-se utilizar cultivares resistentes sempre que possível; entretanto, da mesma forma que para a mancha angular, o desenvolvimento de tais genótipos é dificultado pela grande variabilidade genética que o patógeno apresenta (CNPAF, 2010).

O **oidio**, cujo agente causal é o fungo *Erysiphe polygoni* DC, é considerado uma doença de importância secundária (CNPAF, 2010).

As perdas no rendimento podem atingir até 70%. Ocorre com maior frequência durante e após o florescimento da cultura (CNPAF, 2010).

A doença normalmente é observada em toda a parte aérea da planta, sendo mais severa nas cultivares de hábito determinado (CNPAF, 2010).

A baixa temperatura e a falta de umidade no solo favorecem o

desenvolvimento da doença (CNPAF, 2010).

Os primeiros sintomas aparecem na parte superior das folhas como manchas verde-escuras que se desenvolvem em pequenas massas branco acinzentadas, de aspecto pulverulento, que podem cobrir todas a superfície foliar. Em infecções severas, as folhas podem ficar amareladas e retorcidas e as plantas apresentam desfolhamento precoce. Das folhas, a doença dissemina-se para os caules, ramos e vagens, as quais podem atrofiar-se e cair antes de atingir a maturação (CNPAF, 2010).

O controle desta doença inclui o emprego de cultivares resistentes e a aplicação de produtos químicos. Embora, as práticas culturais, para o controle da doença, não sejam muito eficientes, a sua utilização pode contribuir para a diminuição do inóculo inicial. O controle químico pode ser realizado tanto com fungicidas protetores como sistêmicos aplicados pelo método convencional ou através da água de irrigação, via pivô central. O controle desta doença pelo uso de cultivares resistentes, ainda que recomendado, não tem sido satisfatório devido ao grande variabilidade genética que o patógeno apresenta (CNPAF, 2010).

A **sarna** do feijoeiro comum, cujo agente causal é o fungo *Colletotrichum dematium* f. *truncata* (Schw.) v. Arx. é uma doença que foi identificada recentemente na cultura, podendo causar perdas de até 100% da lavoura (CNPAF, 2010).

Encontra-se distribuída principalmente nos Estados de Goiás e Minas Gerais (CNPAF, 2010).

Os primeiros sintomas da sarna podem iniciar-se ainda no estágio de plântula com a formação de uma zona de tecido mais claro pouco acima da região do colo da planta. À medida que a doença se desenvolve, este tecido torna-se necrosado apresentando uma coloração castanha. Estas lesões crescem no sentido longitudinal do caule e aumentam de tamanho podendo tomar todo o seu diâmetro. Posteriormente, nas áreas necrosadas pode ser observado um grande número de acérvulos, que são estruturas de reprodução assexual do patógeno. Quando estes sintomas ocorrem, as plantas murcham e morrem. Nas vagens surgem pequenas manchas negras, as quais contém os acérvulos do fungo (CNPAF, 2010).

As condições de ambiente que favorecem a doença incluem temperaturas altas (28°C), alta umidade relativa e o plantio do feijão após a cultura do milho e/ou sorgo. O inóculo primário consiste de sementes infectadas e de restos de cultura (CNPAF, 2010).

Os principais agentes de disseminação da doença a longa distância são as sementes e, a curta distância, a chuva acompanhada de vento e os implementos agrícolas (CNPAF, 2010).

É uma doença que surgiu recentemente na cultura do feijoeiro comum, ainda não são conhecidas as medidas de controle. Entretanto, como o fungo pode ser transmitido pelas sementes, recomenda-se o emprego de sementes de boa qualidade fitossanitária (CNPAF, 2010).

O **carvão**, incitado pelo fungo *Microbotryum phaseoli* n. sp., é uma das doenças recentemente identificadas na cultura do feijoeiro comum (CNPAF, 2010).

Encontra-se distribuído, principalmente, nas Regiões Centro-Oeste e Sudeste, onde normalmente aparece em feijão cultivado no sistema de plantio direto. As perdas na produção podem ser altas, mas até o momento, seu potencial não é conhecido (CNPAF, 2010).

Esta doença inicia-se pelo aparecimento de pequenas manchas na base do caule, perto da região do colo da planta. À medida que os sintomas evoluem, toda a base da planta fica tomada pelo patógeno, apresentando uma coloração negra onde o patógeno esporula abundantemente. As vagens também são infectadas pelo fungo (CNPAF, 2010).

As condições de ambiente que favorecem a doença incluem as temperaturas altas (28-33°C) e alta umidade relativa (CNPAF, 2010).

O inóculo primário compreende as sementes infestadas e os restos de cultura (CNPAF, 2010).

O **mofo branco**, incitado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary, é uma doença bastante difundida nas regiões produtoras desta leguminosa, principalmente, no plantio do outono-inverno (CNPAF, 2010).

As perdas no rendimento atingem em média 50% podendo, entretanto, serem mais elevadas (CNPAF, 2010).

Com a introdução da terceira época de plantio (feijão de inverno) na Região Centro-Oeste e outras regiões do País, implicando no uso da irrigação por aspersão, a doença encontrou condições favoráveis para seu desenvolvimento, tornando-se um problema para os produtores de feijão (CNPAF, 2010).

Os sintomas iniciais são lesões encharcadas que se espalham rapidamente para as hastes, ramos e vagens. Nos tecidos infectados, aparece uma eflorescência que lembra algodão, constituindo os sinais característicos da doença (CNPAF, 2010).

O fungo tem como hospedeiros mais de 300 espécies pertencentes a aproximadamente 200 gêneros botânicos. Ademais, na ausência de hospedeiro suscetível, a persistência dos escleródios, no solo, pode atingir até oito anos (CNPAF, 2010).

O controle da doença em áreas ainda não infestadas deve ser realizado pelo emprego de semente de boa qualidade sanitária, pelo controle do tráfego de pessoas e equipamentos provenientes de áreas infestadas e pela inspeção rigorosa da lavoura na fase reprodutiva para a erradicação imediata de qualquer foco da doença. Em solos infestados são recomendadas medidas integradas de controle, pois devido à rapidez de desenvolvimento da doença, em condições de ambiente favoráveis, medidas isoladas tem se mostrado ineficientes. Portanto, recomenda-se a utilização de fungicidas e de práticas culturais tais como, rotação de culturas, eliminação de resíduos culturais e controle da irrigação. O controle da doença através do uso de fungicidas vai depender da densidade de escleródios no solo. A resistência genética do hospedeiro está restrita a algumas cultivares de feijão branco obtidas no Canadá as quais, embora com potencial de uso nos programas de melhoramento, não apresentam possibilidades de utilização direta pelos produtores (CNPAF, 2010).

As **podridões radiculares** do feijoeiro comum constituem um complexo etiológico caracterizado pelas perdas de estande e vigor das plântulas. Desta forma, compromete a produtividade da cultura, principalmente, nas áreas irrigadas do Sudeste e Centro-Oeste, onde a sua incidência tem aumentado nos últimos anos de forma considerável (CNPAF, 2010).

As podridões mais comumente encontradas nessas regiões são incitadas por *Rhizoctonia solani* e *Fusarium solani*, as quais ocorrem tanto isoladas como em associação (CNPAF, 2010).

Os primeiros sintomas da podridão radicular de *Rhizoctonia* são caracterizados pela maceração dos tecidos localizados abaixo do nível do solo. Este estágio dificilmente é observado em condições de campo devido à rapidez do processo, que ocorre quase concomitantemente à emergência (CNPAF, 2010).

O sintoma característico desta doença compreende a formação de lesões necróticas de coloração pardo avermelhada com bordos definidos, que eventualmente coalescem. Na podridão radicular de *Fusarium* toda a raiz é afetada, tomando uma coloração semelhante àquela da podridão radicular de *Rhizoctonia*.

Estas doenças podem, também, ocorrer nas vagens em contacto com o solo, infectando as sementes (CNPAP, 2010).

Uma vez estabelecidos em uma determinada área, estes patógenos são difíceis de serem controlados. Entretanto para diminuir o inóculo no solo sugerem-se as seguintes recomendações: rotação de culturas, pré-incorporação dos resíduos culturais, através de aração profunda, calagem e adubação profundo, semente de boa qualidade, tratamento da semente com fungicidas, plantio direto e superficial, controle da água de irrigação, eliminação dos resíduos culturais e evitar o plantio sucessivo do feijão na mesma área. Antes do retorno do plantio de feijoeiro a uma área infestada, deve-se monitorar a densidade do inóculo no solo durante o número de safras que forem necessárias (CNPAP, 2010).

A **murcha ou amarelecimento de *Fusarium***, incitada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, é comum em praticamente todas as regiões onde se cultiva esta leguminosa (CNPAP, 2010).

Foi observada pela primeira vez em 1928 na Califórnia e, desde então, a sua ocorrência e severidade vêm aumentando devido os poucos cuidados nos seus métodos preventivos de controle (CNPAP, 2010).

As perdas no rendimento têm sido pouco estudadas; entretanto, sabe-se que são muito variáveis, podendo afetar apenas algumas plantas ou até 80% da lavoura (CNPAP, 2010).

A doença manifesta-se por perda da turgescência, amarelecimento, seca e queda progressiva das folhas, começando pelas inferiores, podendo afetar toda a planta o apenas parte dela. Quando a infecção ocorre no estágio de plântula, estas não apresentam um desenvolvimento normal e, quando adultas, tornam-se raquíticas. Nas vagens, pode produzir lesões aquosas e contaminar as sementes externamente (CNPAP, 2010).

O controle da murcha de *Fusarium* pode ser feito, através de práticas culturais, resistência genética das plantas e uso de fungicidas. O método de controle mais eficaz é o de resistência genética, para o qual é direcionado com maior ênfase o trabalho de pesquisa. O controle químico deve ser utilizado preferencialmente no tratamento de sementes a fim de proteger a plântula no seu estágio inicial. O controle integrado, o mais recomendável, baseia-se na utilização de sementes de boa qualidade, no tratamento de sementes com fungicidas, na limpeza das máquinas e implementos quando suspeitos de estarem contaminados com o

patógeno, no bom preparo do solo, na manutenção da cultura no limpo e no emprego da rotação de culturas, durante longos períodos, incluindo principalmente gramíneas (CNPAP, 2010).

A **podridão do colo**, cujo agente causal é o fungo *Sclerotium rolfsii* Sacc., ocorre com frequência em todas as regiões produtoras do feijoeiro comum no País (CNPAP, 2010).

A infecção das plantas pelo fungo ocorre em qualquer estágio do seu desenvolvimento e compromete seriamente a produção (CNPAP, 2010).

Na Região Centro-Oeste, este fungo participa eventualmente do complexo de podridões radiculares sendo sua presença mais notória no final do ciclo deste complexo (CNPAP, 2010).

Os sintomas iniciais aparecem no colo, ao nível do solo, como manchas escuras, encharcadas, estendendo-se, posteriormente pela raiz principal e produzindo uma podridão cortical freqüentemente recoberta por um micélio branco, no qual se desenvolvem numerosos escleródios pardos, do tamanho de um grão de mostarda. A parte aérea das plantas apresenta-se amarelecida com desfolhação dos ramos superiores e uma murcha repentina que conduz à seca total. Nas vagens próximas ou em contato com o solo, o micélio do fungo desenvolve-se rapidamente ocasionando a podridão das mesmas. O controle eficiente deste fungo é bastante difícil devido ao grande número de hospedeiros, à sua capacidade de competição saprofítica e ao elevado número de escleródios. Como medidas de controle integrado recomenda-se o emprego de sementes de boa qualidade, o tratamento da semente com fungicidas, a destruição dos resíduos de colheitas anteriores, aração profunda, adubação com fontes amoniacais de nitrogênio e nitrato de cálcio (CNPAP, 2010).

6.3.3. Doenças do Feijão causadas por Vírus

No Brasil, foram descritas mais de dez viroses em feijoeiro (BIANCHINI et al., 1997). Um dos problemas clássicos é o mosaico comum, causado pelo *Bean common mosaic virus* (BCMV) pertencente à família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*, podendo causar perdas de 35 a 98% da produção, dependendo do estágio da planta

na época da infecção (FARIA *et al.*, 1996). O mosaico dourado é a virose mais importante, causada pelo *Bean golden mosaic virus* (BGMV), família *Geminiviridae*, gênero *Begomovirus*. No Estado do Paraná têm sido observadas infecções simples do BGMV, ou infecções mistas, tanto com espécies de outros geminivirus, como com vírus isométricos, destacando-se o *Bean rugose mosaic virus* (BRMV) família *Comoviridae*, gênero *Comovirus*. As infecções mistas ocorrem principalmente na safra da seca, quando se observa maior incidência do BGMV (BIANCHINI *et al.*, 1997).

Os danos provocados nestes casos são mais severos que aqueles causados pelas infecções individuais por qualquer um dos vírus. Um outro fator agravante é que nas cultivares com resistência ao BGMV, a mesma é perdida quando ocorre a infecção mista do BGMV com vírus isométricos de outros gêneros (BIANCHINI *et al.*, 1997).

O **Mosaico Comum**, incitado pelo vírus do mosaico comum do feijoeiro (BCMV), foi uma das primeiras doenças de plantas causadas por vírus descritas no mundo. Apresenta distribuição mundial devido a sua disseminação ser feita através das sementes. As perdas na produção, devidas à doença, variaram de 35 a 98%, dependendo da idade da planta na época da infecção. Existe um grande número de espécies hospedeiras do vírus do mosaico comum do feijoeiro o que dificulta, ainda mais, o seu controle. A transmissão do BCMV pode ser feita mecanicamente, através do pólen, por sementes infectadas e por insetos vetores. Os sintomas da doença dependem da cultura do feijoeiro, da estirpe do vírus e das condições de ambiente (CNPAP, 2010).

Existe a possibilidade de se encontrar três tipos de sintomas: mosaico, lesões locais e necrose sistêmica. O sintoma característico, em cultivares suscetíveis, manifesta-se, nas folhas trifolioladas, na forma de áreas verde-claras com áreas verde-escuras ao longo das nervuras. Outros sintomas incluem o enrolamento, a formação de bolhas e o encrespamento das folhas. As vagens, provenientes de plantas originadas de sementes doentes, são de tamanho reduzido, com menor número de sementes. Devido a inexistência de tratamento químico efetivo contra as partículas virais, as medidas de controle, ao BCMV, incluem o uso de sementes de boa qualidade, procurando-se evitar o emprego contínuo de sementes produzidas na propriedade, o controle dos insetos vetores com inseticidas e a semeadura de cultivares resistentes. Atualmente, a maioria das cultivares recomendadas pelo

Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária (SNPA) são resistentes a esta enfermidade (CNPAF, 2010).

O vírus do **Mosaico Dourado**, na natureza é transmitido ao feijoeiro comum, pelo seu vetor, as moscas branca *Bemisia tabaci* e *Bemisia argentifolii* que tem como hospedeiras 506 espécies em 74 famílias, entre monocotiledôneas e dicotiledôneas. Estes insetos pertencem à família *Aleyrodidae*, com cerca de 126 gêneros e 1156 espécies (CNPAF, 2010).

No Brasil, a *B. tabaci* teve a sua presença relatada em lavouras de algodão, em 1968 no Estado do Paraná. A partir de 1972/73, surgiram enormes populações desta mosca no norte do Estado do Paraná e sul do Estado de São Paulo, além de outras regiões do País. Na década de 80, um novo biótipo, adquiriu enorme importância nos Estados Unidos, Caribe e América Central. Após estudos biológicos e através da caracterização eletroforética, concluiu-se pela existência de uma nova espécie, denominada de *B. argentifolii* Bellows & Perring. No Brasil, esse novo biótipo foi constatado em 1990/91, no Estado de São Paulo, atacando plantas cultivadas, ornamentais e daninhas. Atualmente, o mosaico dourado é encontrado em praticamente todas as regiões onde se cultiva feijão (CNPAF, 2010).

As perdas devidas à doença podem atingir 100% sob alta incidência da enfermidade. Os sintomas, numa descrição mais recente da doença, são caracterizados pelo aparecimento, nas primeiras folhas trifolioladas, cerca de 14 dias após a sementeira, de amarelecimento foliar intenso induzindo nanismo das plantas e severa deformação das vagens com redução do número, tamanho e peso médio das sementes (CNPAF, 2010).

Os principais fatores que contribuem para o desenvolvimento da mosca branca são: condições climáticas e disponibilidade de plantas hospedeiras, durante o ano inteiro. Cultivos extensivos de soja e algodão e o plantio escalonado de culturas como tomate e feijão, tem propiciado a manutenção de elevada população da mosca branca (CNPAF, 2010).

Esta doença ocorre com maior intensidade no feijão "da seca", quando a população da mosca branca, vetor do vírus, é maior. A responsável pelo aumento em importância do vírus do mosaico dourado do feijoeiro é a cultura da soja, excelente hospedeira para alimentação e reprodução da mosca branca. (ARQUIVO DO AGRÔNOMO, 1994)

Diversas estratégias de controle tem sido pesquisadas no Brasil e nos demais

países, tanto do vetor quanto da virose (CNPAP, 2010).

No controle da mosca branca os seguintes fatores devem ser considerados: a região de cultivo; a época de plantio e a população da praga. Normalmente na safra das águas, observa-se uma baixa população de mosca branca. Nas áreas onde a população é baixa, o seu controle pode ser realizado através da pulverização com inseticidas de contato ou sistêmico ou através do tratamento de sementes. Em regiões com alta população do vetor, a proteção do feijoeiro deve ser preventiva, com a utilização de produtos sistêmicos de longo efeito residual, via tratamentos de sementes. Em casos de ocorrência de população migrante de mosca branca para a cultura logo após a emergência das plantas, mesmo com o tratamento de sementes, recomenda-se a aplicação de produtos de ação sistêmica ou de contato de alta eficiência, visando diminuir o tempo de permanência da praga nas plantas e consequentemente reduzindo o risco de transmissão da virose. Se o fluxo migratório da mosca branca para a cultura do feijoeiro ocorrer continuamente, o controle químico deve se estender até o período de frutificação ou de enchimento das vagens. Diversas estratégias de controle tem sido pesquisadas no Brasil e nos demais países, tanto do vetor quanto da virose (CNPAP, 2010) .

7. AVALIAÇÃO DE RISCO DE ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS

A inserção de novas construções no genoma de um organismo supõe a melhoria de suas propriedades, úteis ao ser humano e a redução de custos da produção. No entanto, junto com as novas características, os organismos adquirem um conjunto de novas qualidades devido às atividades pleiotrópicas da nova proteína e as propriedades da construção, incluindo instabilidade e seus efeitos regulatórios sobre os genes vizinhos. Todos os fenômenos e eventos indesejáveis resultantes do crescimento e consumo dos OGM podem ser classificados em três grupos de risco: alimentares, ecológicos e agrotecnológicos (KULIKOV, 2005).

Riscos alimentares

- a) Efeitos imediatos de proteínas tóxicas ou alergênicas do OGM;
- b) Riscos causados por efeitos pleiotrópicos das proteínas transgênicas no metabolismo da planta;
- c) Riscos mediados pela acumulação de herbicidas e seus metabólitos nas variedades e espécies resistentes;
- d) Risco de transferência horizontal das construções transgênicas, tanto para o genoma de bactérias simbióticas de humanos e animais.

Riscos ecológicos

- a) Erosão da diversidade das variedades de culturas devido à ampla introdução de plantas GM derivadas de um grupo limitado de variedades parentais;
- b) Transferência não controlada de construções, especialmente daquelas que conferem resistência à pesticidas, pragas e doenças, devido a polinização cruzada com plantas selvagens de ancestrais e espécies relacionadas. Os possíveis resultados são o declínio na biodiversidade das formas selvagem do ancestral;

- c) Risco de transferência horizontal não controlada das construções para a microbiota da rizosfera;
- d) Efeitos adversos na biodiversidade devido a proteínas transgênicas tóxicas, afetando insetos não alvo assim como a microbiota do solo, rompendo desta forma a cadeia trófica;
- e) Risco de rápido desenvolvimento de resistência às toxinas implantadas no transgênico por insetos fitofagos, bactérias, fungos, e outras pragas devido à pesada pressão seletiva;
- f) Riscos de cepas altamente patogênicas de fitovírus emergirem devido às interações do vírus com as construções transgênicas que são instáveis no genoma dos organismos receptores e, portanto são alvos mais prováveis para recombinação com DNA viral.

Riscos Agrotecnológicos

- a) Riscos de mudanças imprevisíveis em propriedades e características não alvo das variedades GM, e a efeitos pleiotrópicos de um gene introduzido;
- b) Riscos de mudanças transferidas nas propriedades de variedade GM que deveriam emergir depois de muitas gerações devido à adaptação do novo gene ao genoma, com manifestação da nova propriedade pleiotrópica e as mudanças já citadas;
- c) Perda da eficiência do transgênico resistente a pragas devido ao cultivo extensivo das variedades GM por muitos anos;
- d) Possível manipulação da produção de sementes pelos donos da tecnologia “terminator”.

A liberação de lavouras geneticamente modificadas (GM) no ambiente e no mercado levantou diversas questões a respeito da segurança desses produtos. A complexidade das discussões é decorrente de dois fatores principais: por um lado, a base de conhecimentos científicos sobre as implicações e impactos da liberação em larga escala de plantas transgênicas para o cultivo comercial é ainda insuficiente; por outro lado, a questão das plantas transgênicas enseja uma abordagem inter e multidisciplinar, uma vez que os impactos são diferenciados, os conflitos de interesses são múltiplos e o diálogo que apenas recentemente vem se tornando

público (NODARI e GUERRA, 2001; MAZZA *et al.*, 2005).

A avaliação de risco é um elemento chave em assegurar o uso do conhecimento científico para estabelecer padrões, diretrizes e recomendações para a segurança dos alimentos a fim de garantir a proteção ao consumidor e facilitar o comércio internacional. O processo da avaliação do risco tem que incluir informações quantitativas e da forma mais completa possível para estimar o risco à saúde humana, com análises realizadas caso a caso (FAO, 1998).

A grande questão que vem sendo levantada é o quão seguras são essas tecnologias e se estão de acordo com o Guia Internacional para Segurança em Biotecnologia (IGSB), aceito pelo Programa Ambiental das Nações Unidas. Atualmente os argumentos dos partidários do Princípio da Precaução forçam os governos de muitos países na União Européia, Ásia e África a modificar suas políticas e desistir da produção de variedades GM (KULIKOV, 2005).

As inovações científicas vêm sempre acompanhadas de riscos. Em algumas ações científicas, o conhecimento disponível não permite que existam conclusões finais acerca do caráter dos riscos, sua significância e a probabilidade de que causem sérios danos. Neste contexto, o Princípio da Precaução recomenda que, antes de implementar as inovações tecnocientíficas, sejam tomadas precauções especiais e que a pesquisa seja conduzida de forma detalhada e de largo alcance sobre os riscos potenciais dessas inovações (LACEY, 2006). Convém ressaltar que não existe risco zero no consumo de alimentos.

De acordo com a OECD (1993) para que a segurança alimentar seja alcançada deve-se ter: certeza de que o uso intencional do alimento, nas condições previstas para consumo, não causará nenhum dano à saúde do consumidor. Avaliando sobre a mesma vertente a WHO (1996) dispõe que o alcance da segurança alimentar está na: garantia de que o alimento não causará nenhum dano à saúde do consumidor quando preparado e/ou consumido de acordo com seu uso intencional.

Torna-se necessária uma avaliação de riscos alimentares com base científica para que os alimentos GM ou derivados possam ser utilizados como alimento convencional. Os perigos potenciais dos OGM podem estar associados à toxicidade, alergenicidade, alterações nutricionais e efeitos antinutrientes e a possibilidade remota de transferência horizontal de genes (RHEE *et al.*, 2005)

Nas duas últimas décadas, organizações governamentais e intergovernamentais têm planejado estratégias e protocolos para o estudo da segurança de alimentos derivados de cultivos geneticamente modificados. Os testes de segurança são conduzidos caso a caso e modelados para as características específicas das culturas modificadas, e às mudanças que foram introduzidas através de técnicas de engenharia genética (KÖNIG *et al.*, 2004).

O maior problema na análise de risco de OGM é que seus efeitos não podem ser previstos na totalidade. Os riscos à saúde humana incluem aqueles inesperados, alergias, toxicidade e intolerância. No ambiente, as conseqüências são a transferência lateral (horizontal) de genes, a poluição genética e os efeitos prejudiciais aos organismos não alvo (NODARI e GUERRA, 2003).

Os efeitos provocados por alimentos geneticamente modificados sobre a saúde são geralmente comparáveis aos riscos conhecidos associados aos alimentos convencionais, e incluem, por exemplo, o potencial de alergenicidade e toxicidade de componentes presentes, a qualidade nutricional e segurança microbiológica do alimento, e os possíveis efeitos secundários da expressão do gene ou o rompimento do material genético do receptor ou de suas vias metabólicas, incluindo composição de macronutrientes, micronutrientes, antinutrientes, toxinas endógenas, alérgenos e substâncias fisiologicamente ativas. Qualquer alteração inesperada nos níveis de substâncias detectadas durante a análise composicional requer identificação, caracterização e avaliação de risco. Em todos os casos, os níveis de expressão precisam ser estabelecidos para assegurar que os níveis de exposição não sejam prejudiciais à saúde. Além disso, as avaliações de toxicidade devem ser feitas caso a caso, dependendo da substância a ser avaliada, verificando a exposição humana à substância ou à similares bem como o histórico de uso seguro. Em caso de novas proteínas ou se os dados disponíveis sugerem a existência de qualquer causa para preocupação, um estudo deve ser feito utilizando animais de laboratório (COSTA, 2007).

A avaliação de novos alimentos, incluindo os OGM, é realizada através da comparação destes com seu análogo convencional com histórico de uso seguro num estudo denominado de equivalência substancial (CODEX, 2003). A aplicação desse estudo é feita através da observação de características agronômicas, morfológicas e de composição química, incluindo macro e micro nutrientes, toxinas, antinutrientes,

permitindo a identificação de diferenças entre as cultivares GM e os análogos convencionais, que são normalmente as cultivares parentais das GM. Além disso, é verificado se há alterações nos parâmetros composicionais e também as principais etapas do processo metabólico. Mudanças significativas nesses parâmetros são indicativas de alterações na cultivar, que precisam ser avaliadas devido ao potencial em produzir efeitos adversos à saúde humana. Entretanto, as novas variedades de plantas normalmente não são submetidas a extensivos testes de segurança alimentar como estudos em animais, que são típicos em estudos de aditivos químicos e resíduos de pesticidas em alimentos (CODEX, 2003; KÖNIG *et al.*, 2004).

A avaliação da segurança deve ser baseada nos riscos potenciais impostos pelo produto obtido. Assim, a avaliação deve levar em consideração as características do doador, ou, quando apropriado, do organismo parental. Devem ainda ser avaliadas as características e a utilização pretendida do OGM, incluindo a escala e a frequência das introduções e considerações ambientais e de saúde (NODARI e GUERRA, 2001).

Conforme o *Codex Alimentarius*, para os alimentos derivados de plantas geneticamente modificadas, a avaliação de risco deve seguir os seguintes critérios (CODEX, 2003):

- a) Descrição da planta geneticamente modificada;
- b) Descrição da planta hospedeira e seu histórico de uso seguro;
- c) Descrição do organismo doador do gene de interesse;
- d) Descrição da modificação genética;
- e) Caracterização da modificação genética;
- f) Avaliação da segurança: substâncias expressas, análise dos componentes, avaliação dos metabólitos, modificações nutricionais e processamento do alimento.

a) Descrição da planta geneticamente modificada:

Esta etapa visa identificar a cultivar, os eventos de transformação, o tipo e o propósito da modificação. A descrição deve ser suficiente para esclarecer a natureza do alimento que será submetida à avaliação de segurança (CODEX, 2003).

b) Descrição da planta parental e seu histórico de uso seguro:

A descrição da cultivar parental deve incluir informações sobre a origem, genótipo, fenótipo, diversidade, e histórico de uso seguro da parental. A caracterização da cultivar parental, que normalmente não é geneticamente modificada, serve de guia para a escolha dos parâmetros a serem analisados por comparação com a cultivar GM. Os parâmetros testados devem incluir indicadores do desenvolvimento da cultivar, fenótipo, performance agrônômica, bem como seus nutrientes endógenos e seus potenciais antinutrientes ou substâncias biologicamente ativas, toxinas e alérgenos alimentares. Um entendimento da variação natural das principais características agrônômicas e composicionais da cultivar em diferentes regiões geográficas e sob diferentes condições de cultivo é essencial para interpretar a comparação da cultivar GM com a cultivar de comparação (CODEX, 2003; KÖNIG *et al.*, 2004).

c) Descrição do organismo doador do gene de interesse

A descrição do organismo doador deve incluir a classificação e a taxonomia nos padrões internacionais e deve também remeter qualquer evidência de potencial de toxicidade, de alergenicidade ou de patogenicidade. Uma lista de toxinas, alérgenos, substâncias bioativas e antinutrientes de origem natural contidas no organismo doador devem ser descritas (KÖNIG *et al.*, 2004).

A documentação sobre o histórico de uso seguro e exposição ao organismo doador deve ser citada, quando possível. Essa informação, juntamente com o entendimento da função de qualquer sequência de DNA recombinante usada no processo de transformação, facilita a identificação do perigo de “novos elementos” que são transferidos para a cultivar. O DNA introduzido deveria mostrar-se não prejudicial à saúde humana. Se o doador for alergênico conhecido, supõe-se que os genes transferidos codificam alérgenos até que o contrário seja provado (KÖNIG *et al.*, 2004).

d) Descrição da modificação genética

A descrição do processo de transformação deve incluir informação sobre o método de transformação; sobre o DNA utilizado para modificar a planta, incluindo a fonte (bactéria, vírus, planta, etc.), a identidade e a função; sobre organismos hospedeiros intermediários utilizados para produzir ou processar o DNA para a transformação do organismo receptor. Além disso, devem ser fornecidas

informações sobre o DNA a ser introduzido, incluindo a caracterização de todos os componentes genéticos como genes marcadores, regulatórios, e outros elementos que afetem a função do DNA; tamanho e identidade, localização e orientação da seqüência no vetor e na construção final, e a função (CODEX, 2003).

Uma descrição passo a passo da construção do vetor deve fornecer detalhes sobre todos os organismos utilizados para a amplificação do DNA vetor. Deve também fornecer informações sobre a função de todos os elementos genéticos dos vetores de transformação, incluindo a seqüência codificadora, sinais promotores e de terminação. Um mapa de restrição com as enzimas mais relevantes deve também estar disponível. Provas de ausência de fragmentos não intencionais no vetor devem ser solicitadas (KÖNIG *et al.*, 2004).

Normalmente a transformação é feita por infecção por *A. tumefaciens*, ou pela biobalística. Na utilização da bactéria *Agrobacterium*, o risco de transferência do fragmento desejado ser ao acaso, é relativamente baixo, mas deve ser descrita a cepa doadora assim como os plasmídeos da cepa, além de se avaliar o risco da presença de outras seqüências. Na utilização de transformação direta como a biobalística, a preparação do DNA usado para a transformação deve ser verificada quanto a seqüências contaminantes de DNA cromossômicos e plasmidiais de bactérias (KÖNIG *et al.*, 2004).

e) Caracterização da modificação genética

A caracterização molecular do DNA recombinante em cultivares GM normalmente é feita de acordo com as normas internacionais sobre a avaliação de segurança. As informações e dados devem ser fornecidos para haver a identificação e caracterização do perigo potencial resultante da transformação da planta (KÖNIG *et al.*, 2004).

Para a caracterização da modificação genética, deve ser determinado o número de inserções e de cópias das seqüências de DNA introduzidas, além de se pesquisar quais os sítios de inserção dos transgenes, utilizando técnicas de biologia molecular como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), *Southern blot*, *Northern blot*, entre outros. A estabilidade da inserção deve ser verificada por mais de 5 gerações (KÖNIG *et al.*, 2004).

Além disso, devem ser obtidas informações sobre a seqüência de DNA da junção entre o genoma da planta e o inserto, quando existem “open reading frames”

(ORFs) ou promotores incompletos dentro do DNA inserido que pode provocar o aparecimento de proteínas fundidas (CODEX, 2003).

f) Avaliação da segurança: substâncias expressas, análise dos componentes, avaliação dos metabólitos, modificações nutricionais e processamento do alimento:

Qualquer alteração inesperada nos níveis de substâncias detectadas durante a análise composicional requer identificação, caracterização e avaliação de risco. Em todos os casos, os níveis de expressão precisam ser estabelecidos para assegurar que não sejam prejudiciais à saúde. Além disso, as avaliações de toxicidade devem ser feitas caso a caso, dependendo da substância a ser avaliada, verificando a exposição humana à substância ou aos similares bem como o histórico de uso seguro. Em caso de novas proteínas ou se os dados disponíveis sugerem a existência de qualquer causa para preocupação, um estudo deve ser feito utilizando animais de laboratórios (KÖNIG *et al.*, 2004).

8. OBJETIVOS

8.1. OBJETIVO GERAL

Analisar os critérios utilizados no processo de avaliação do risco do feijão transgênico (*Phaseolus vulgaris L.*) resistente ao vírus do mosaico dourado quanto a segurança alimentar.

8.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Buscar na literatura avaliações de risco já elaboradas para alimentos geneticamente modificados;

Analisar os relatos existentes quanto a avaliação de risco com enfoque na segurança alimentar do feijão transgênico;

Obter critérios preliminares para uma avaliação de risco do feijão transgênico visando a segurança alimentar.

9. MÉTODO

A pesquisa foi descritiva utilizando as ferramentas de busca Scirus, Scopus, Periódicos Capes e Google Scholar além da utilização de documentos disponíveis pela Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD), World Health Organization (WHO), International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications (ISAAA), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e Center for Environmental Risk Assessment (CERA) que abordam a avaliação do risco.

A busca foi feita pelos unitermos: feijão transgênico, feijão transgênico resistente ao vírus do mosaico dourado, vírus do mosaico dourado, avaliação de risco do feijão transgênico, avaliação de risco de OGM; nos idiomas português, inglês e espanhol.

Como, até o momento, não existe avaliação de risco disponível para *Phaseolus vulgaris L.*, também iremos utilizar as avaliações de risco para as outras leguminosas já efetuadas: alfafa (*Medicago sativa*), lentilha (*Lens culinaris*) e soja (*Glycine max*) onde a maioria dos documentos estão disponibilizados no banco de dados do CERA (CERA, 2008).

Neste trabalho foram avaliados os critérios para avaliação de risco para o feijão transgênico resistente ao vírus do mosaico dourado obtido pela EMBRAPA CENARGEN e EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO e abrangerá, no mínimo, os parâmetros relacionados na Resolução Normativa nº5 de 12/03/2008 (CTNBio, 2008).

10. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os critérios de busca utilizados resultaram em média, 80 artigos, que abordam o assunto de forma ampla. O assunto avaliação de risco para feijão geneticamente modificado resistente ao vírus do mosaico dourado é peculiar, já que é de responsabilidade de um único órgão, a EMBRAPA, única a desenvolver o projeto.

O feijão, devido a sua suscetibilidade a várias doenças e baixa tolerância á seca, tem o cultivo realizados em determinadas épocas do ano em condições de alto risco.

O Brasil é o maior produtor de feijão com 16,3% da produção mundial, e produziu aproximadamente 4 milhões de toneladas em lavouras temporárias e permanentes (CONAB safra 2006/2007). Mesmo com este montante produzido pelo país, o Brasil ainda assim, importa já que muitas vezes as condições de mercado e doenças afetam consideravelmente a produção, principalmente o mosaico dourado e o mofo branco.

A produção de feijão no Brasil é feita por pequenos agricultores sem capital para melhorias, com baixo uso de insumos externos, em sua maioria visando a subsistência familiar. Desde os anos 80 percebe-se o crescente interesse de produtores de outras classes econômicas, utilizando tecnologias avançadas na cultura do feijoeiro que abastece os períodos de entressafra.

Enumerando os principais problemas relacionados a baixa produção de feijão no Brasil cita-se: a competição com plantas daninhas, estresse hídrico e o ataque de pragas e doenças como o mosaico dourado do feijoeiro causado pelo “bean mosaic golden vírus” (BGMV).

O mosaico dourado do feijoeiro é uma das principais doenças dessa cultura, que tem dificultado, ou mesmo inviabilizado a produção de feijão em várias regiões do Brasil. A obtenção de imunidade ao vírus através do melhoramento para resistência varietal seria a medida de controle mais adequada e a única mensurável

e eficiente. Fontes de imunidade ou elevados graus de resistência têm sido buscadas nos bancos de germoplasma de feijão. Em cerca de 15.000 acessos de germoplasma de *Phaseolus vulgaris* e alguns de *P. lunatus*, *P. acutifolius* e *P. coccineus*, em El Salvador, Costa Rica, Guatemala, México e Brasil, encontrou-se apenas níveis baixos e moderados de resistência ou tolerância à doença. Assim, devido à inexistência de imunidade e nem mesmo alto grau de resistência a essa virose em germoplasma de *Phaseolus spp.*, os laboratórios da Embrapa Arroz e Feijão e Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, objetivaram por introduzir resistência ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro (BGMV) em feijão (*Phaseolus vulgaris*), através de métodos de biologia celular e molecular.

Durante vários anos, desde o início dos anos 1990, a EMBRAPA desenvolveu um sistema de cultura de tecidos e transformação genética de feijão, ao mesmo tempo em que realizava o estudo do vírus e propuseram estratégias biotecnológicas para obtenção de plantas resistentes.

O projeto desenvolvido pela EMPRAPA mostra a obtenção de plantas geneticamente modificadas resistentes à doença, expressando a proteína viral modificada Rep, que deve ter um grande impacto para a cultura do feijão, tanto àquela produzida em sistemas tecnificados quanto àquela de agricultura familiar e de subsistência (ARAGÃO, 2004).

A EMBRAPA destaca-se pelo eminente avanço na pesquisa em transgenia evidenciada pela geração de um evento elite de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) resistente ao “Bean golden mosaic vírus” (BGMV ou VMDF), denominado de Embrapa 5.1 (FGM).

O mosaico dourado do feijoeiro é a principal doença de origem viral desta leguminosa e podem causar perdas totais das lavouras, especialmente aquelas do plantio das secas, realizadas em fevereiro/março.

Os esforços para controlar a doença esbarraram na ausência de germoplasma que apresentasse imunidade ao agente causal. Vários genótipos foram descritos como resistentes a virose por diversos pesquisadores, mas nunca chegaram aos produtores em escala suficiente para conter a doença.

O cultivar desenvolvido pela Embrapa é o feijoeiro comum geneticamente modificado (GM) com resistência ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro (BGMV/VMDF), uma das doenças que mais tem prejudicado essa cultura. A modificação genética foi obtida por um mecanismo conhecido como resistência

derivada do patógeno, que utilizou seqüências genômicas do próprio vírus e transdominância letal, envolvendo a proteína viral Rep modificada, com a função de interferir na ligação normal da proteína produzida pelo vírus ao sítio de iniciação da replicação. As plantas transgênicas de feijoeiro estão no momento na décima geração apresentando o mesmo comportamento de resistência à doença (ARAGÃO e FARIA, 2004). Este evento foi denominado como Embrapa 5.1 (FGM). A planta – evento elite obtida – apresenta alto nível de resistência ao mosaico dourado em casa de vegetação sob forte de inoculação, incidência muito acima do padrão encontrado no campo.

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) é um membro da família das leguminosas da tribo *Phaseolae*, subfamília *Papilionoideae*, é uma planta predominantemente autógama, domesticada pelo homem há mais de 7 mil anos em dois centros geográficos: Mesoamérica – Mexico e América Central e a Região Andina. Assim como o milho e a abóbora, acredita-se que o feijão tenha sua origem na América Central como planta daninha no cultivo de batata doce e mandioca. Os agricultores, durante milênios, cultivaram misturas complexas de tipos de feijão como cerca viva na tentativa de combater a seca, doenças e ataques de pragas. Esta ação produziu uma variabilidade genética muito grande, com uma ampla variedade de cores, textura, tamanho de grãos, acompanhando as condições de plantio e preferência de sabor, nas diferentes regiões.

O feijão é um excelente alimento, fornecendo nutrientes essenciais ao ser humano, como proteínas, ferro, cálcio, magnésio, zinco, vitaminas (principalmente do complexo B), carboidratos e fibras. Representa a principal fonte de proteínas das populações de baixa renda e constitui um produto de destacada importância nutricional, econômica e social. Além de ser um dos alimentos mais tradicionais na dieta alimentar do brasileiro. Portanto, a sua contribuição como fonte de proteína e caloria é bastante significativa. Quanto ao aporte de calorias, o feijão ocupa o terceiro lugar entre os alimentos consumidos, totalizando 11,2% das calorias ingeridas por dia (MESQUITA, 2006).

A cultura do feijão é a base alimentar da população brasileira, uma vez que o feijão representa uma importante senão a mais importante fonte protéica humana, assim como de carboidratos complexos, fibra, vitaminas e minerais (CÁRDENAS, 2006) nos países em desenvolvimento das regiões tropicais e subtropicais. Além de fonte protéica o feijão é também fonte de ferro (5,3-8,5%/100mg), tiamina,

riboflavina, niacina e vitamina K. Quando cozido o feijão contém de 3% a 7% em fibras (FAO, 2007). O feijão comum é amplamente consumido no México, América Central, América do Sul e nos países africanos (CÁRDENAS, 2006).

As leguminosas também possuem fatores antinutricionais como inibidores de proteases, lectinas, saponinas, polifenóis e fitatos, que reduzem seu valor nutricional diminuindo a digestibilidade e biodisponibilidade dos nutrientes (SANDBERG, 2002).

O feijão, dada a sua composição, proporciona vários benefícios à saúde, sendo indicada na manipulação dietética de várias doenças como distúrbios cardíacos, diabetes, obesidade e câncer. Os feijões constituem uma boa fonte de fibra alimentar especialmente fibra solúvel. O consumo de alimentos ricos em fibra solúvel tem sido eficaz na redução dos níveis séricos de colesterol total e, conseqüentemente, na redução de doenças cardiovasculares da população em geral (CÁRDENAS, 2006).

O feijão tem uma ampla adaptação edafoclimática o que permite seu cultivo, durante todo o ano, em quase todos os estados da federação, possibilitando constante oferta do produto no mercado. Outra característica desta leguminosa é possibilitar a sua produção em diversos ecossistemas tropicais e temperados, em monocultivo e/ou consorciado nos mais variados arranjos de plantas inter e intraespecíficos, o que favorece a diversificação na produção, mas limita uma maior integração na sua cadeia produtiva. A comercialização do feijão no mercado interno é muito instável devido a sua rápida perda de qualidade e à grande influência que exercem os "atravessadores" na formação do preço final do produto (CNPAF, 2010).

Considerando a diversidade fisiográfica do país e a adaptação do feijoeiro a diversas condições de clima e solo, é possível explorar a cultura em três épocas diferentes, no mesmo ano. A safra "das águas", cujo plantio é feito de agosto a novembro, com predominância na Região Sul; o plantio "da seca" realizado de janeiro a março, abrangendo a maioria dos estados produtores e "de inverno" de abril a julho realizada nas Regiões Centro-Oeste e Sudeste. As duas primeiras safras são responsáveis por 90% da produção nacional que provém de 2,9 milhões de hectares de lavouras de pequenos e médios produtores que utilizam, na sua maioria, mão-de-obra familiar com baixo nível tecnológico, o que reflete como consequência uma produtividade média de 776 kg/ha, considerada baixa. A safra de inverno, de aproximadamente 156.000 hectares, garante os 10% restantes da produção e tem como origem lavouras com alto nível tecnológico, onde a irrigação é

essencial para alcançar produtividades médias de 1.584 kg/ha, sendo possível, em lavouras administradas na forma de empresas agrícolas, alcançar rendimentos acima de 3.000 kg/ha. Desta maneira ficam bem caracterizadas três safras, de produção de feijão, cujos ciclos de desenvolvimento devem coincidir com o maior número de fatores de ambiente que propiciem o máximo rendimento (CNPAP, 2010).

Os programas de melhoramento genético do feijoeiro visam obter variedades que apresentem alta produtividade, aliada a resistência às doenças, com produção de sementes possuindo forma, tamanho, cor e brilho aceitáveis no mercado. Além disso, os grãos de feijão devem possuir características culinárias e nutricionais desejáveis, como facilidade de cocção, boa palatabilidade, textura macia do tegumento, capacidade de produzir caldo claro e denso após o cozimento, maior teor de proteínas e minerais (MESQUITA, 2006). O conhecimento dos fatores nutricionais e antinutricionais, funcionais é de extrema importância no desenvolvimento dos novos cultivares para que sejam obtidos alimentos favoráveis ao consumo e que cumpram com as exigências de qualidade e segurança.

O vírus do mosaico dourado do feijoeiro comum tem como agente transmissor a mosca branca (*Bemisia tabaci Gennadius*). Quando analisados os sintomas da doença no feijoeiro, identificou-se um vírus de partículas geminadas representado por sintomas de mosaico. O vírus do mosaico dourado faz parte de um grupo de vírus de plantas de grande importância econômica em todos os continentes e em diversas culturas: os geminivírus.

Na década de 60, Flores e Sibers Schmidt (1962) e Costa (1965), reconheceram as doenças causadas por vírus que pertencem à família *Germiniviridae*, no Brasil. Alguns problemas como: restrição parcial ao floema, ausência de transmissão mecânica para os primeiros geminivírus estudados e a baixa estabilidade das partículas virais, contribuíram para uma longa demora até o reconhecimento oficial do grupo de vírus pelo "International Committee on Taxonomy Virus" (ICTV).

O vírus do mosaico dourado (BGMV) consiste de uma partícula icosaédrica, que contém DNA de fita simples, circular (ssDNA), como material genético, que se replica no núcleo das células infectadas via DNA intermediário de fita dupla.

Trata-se de vírus com genoma dividido em dois componentes, denominado A e B. O DNA viral replica-se no núcleo de células do floema, através de um mecanismo conhecido como círculo rolante, tendo DNA de fita dupla como intermediário de replicação. O DNA A contém os genes necessários para replicação

e encapsidação da progênie viral, enquanto o DNA B contém os genes requeridos para o movimento célula-a-célula e a longa distância. Tanto o DNA A quanto o DNA B são necessários para a infecção sistêmica de plantas. Exceto por uma sequência de aproximadamente 200 nucleotídeos, denominada de região comum, os componentes DNA A e DNA B, não apresentam similaridade significativa em suas sequências de nucleotídeos. O DNA A contém o gene da capa protetora (CP), o gene *rep* que codifica o gene para uma proteína associada à replicação, o gene *trap* que é o fator de transcrição que atua *in trans* no promotor de genes virais e o gene *ren* que é o fator de amplificação da replicação viral que embora não seja essencial para que a replicação ocorra, provoca um acúmulo de DNA viral muito maior quando está presente. Já no DNA B encontram-se os genes *ns* – proteína *ns* – “nuclear shuttle” necessária para o tráfico intracelular de DNA viral do núcleo para o citoplasma, enquanto que a *mp* – proteína *mp* – “movement protein” está envolvida no movimento do DNA viral célula-a-célula, via plasmodesmas. A única proteína essencial à replicação é a proteína Rep (ARAGÃO, 2007).

Os geminivírus além da importância econômica apresentam-se como modelos ideais para o estudo de replicação e expressão gênica nas plantas em função de realizarem a replicação no núcleo da célula hospedeira.

A família *Germiniviridae* divide-se em 4 gêneros classificados de acordo com o hospedeiro, organização genômica e espécie vetora (PALMER e RYBICKI, 1998; FAUQUET *et al.* 2000).

A tabela 4 dispõe sobre a família *Germiniviridae*.

Tabela 4: Família *Germiniviridae*

GÊNERO	GENOMA	TRANSMISSÃO
<i>Mastrevirus</i>	Monopartido	por cigarrinhas – infectam principalmente monocotiledôneas
<i>Curtovirus</i>	Monopartido	por cigarrinhas – infectam dicotiledôneas. Possuem ampla gama natural de hospedeiros.
<i>Topocuvirus</i> (<i>Tomato pseudo-curly top virus</i>)	Monopartido	por cigarrinhas a dicotiledôneas.
<i>Begomovirus</i>	Bipartido	por moscas brancas – infectam plantas dicotiledoneas.

Fonte: PALMER e RYBICKI, 1998; FAUQUET *et al.* 2000

Devido ao grande número de doenças – mais severas e de maior incidência - causadas pelos geminivírus nas últimas décadas eles passaram a ser um grupo

emergente de fitovírus (BROWN e BIRD, 1992).

Os geminivírus são encontrados com facilidade nas regiões dos trópicos e subtropicais, afetando espécies como mandioca, feijão, milho; extremamente importantes à alimentação humana (TIMMERMANS *et al.*, 1994).

A incidência da doença depende de alguns fatores: população do vetor, condições ambientais, períodos de chuva e até o estágio de desenvolvimento da planta quando ocorre a transmissão do vírus.

O DNA de vários isolados de BGMV foram completamente sequenciados. O sequenciamento do BGMV do Brasil foi realizado pelo grupo de pesquisadores da EMBRAPA que hoje desenvolvem o projeto do feijão transgênico resistente ao vírus do mosaico dourado e está depositado no GenBank – código de acesso M88686 e M88687.

O vírus do mosaico dourado do feijoeiro – VMDF – BGMV (“Bean Golden Mosaic Vírus”) pertence ao gênero *Begomovirus*, da família *Germiniviridae*, o qual agrega vírus com partículas geminadas de aproximadamente 18 nm, encapsidando DNA circular de fita simples como material genético. O gênero *Begomovirus* contém espécies com genoma monopartido e bipartido, sendo todos transmitidos pela mosca branca *Bemisia tabaci gen.*

A transformação genética do feijoeiro foi considerada por muitos anos um diferencial. O feijão foi caracterizado como uma planta recalcitrante à manipulação pela tecnologia de DNA recombinante já que até então não tinha sido possível regenerar plantas de feijão a partir de células e tecidos em cultivo. O desenvolvimento do projeto do feijão transgênico EMBRAPA alcançou, utilizando um sistema de multiorganogênese induzido em regiões meristemáticas apicais de embriões de feijão em cultivo de alto teor de reguladores de crescimento vegetais (citocininas). Simultaneamente foi desenvolvido um sistema de introdução direta de genes nas células apicais, utilizando um equipamento específico, construído pelo laboratório EMBRAPA – CERNAGEN, chamado de acelerador de partículas ou arma de genes (“gene gun”). Utilizando então, este equipamento foi possível utilizar a biobalística (biobalística biológica) para obter plantas de feijoeiro contendo os genes de resistência a vírus (ARAGÃO, 2005).

Assim, um fragmento de um gene derivado do próprio vírus, e essencial à sua replicação, foi colocado na planta para conferir resistência a doença incitada pelo mesmo vírus, um método conhecido como “resistência derivada do patógeno”.

Em 1985, Sanford e Johnson foram os primeiros a desenvolver o conceito de resistência derivada do patógeno em plantas geneticamente modificadas, pela utilização de sequências genômicas dos próprios patógenos. Este conceito permitiu transformar o feijoeiro, obtendo plantas geneticamente modificadas, contendo sequências do BGMV, especificamente desenhadas para resistência ao mosaico dourado.

Os Begomovirus possuem um genoma bipartido ou monopartido constituído por moléculas de DNA fita simples com aproximadamente 2,6kb cada, chamadas de DNA-A e DNA-B, para os begomovirus bipartidos.

O DNA-A contém de 4 a 6 ORFs: AC1 que codifica a proteína associada à replicação (Rep) essencial para a replicação do DNA e associação com a DNA polimerase do hospedeiro; AC2 que codifica para a proteína ativadora da transcrição (TrAP) responsável pela regulação da expressão gênica; AC3 que codifica para a proteína associada com a maior eficiência da replicação (Ren); AV1 e AV2 codificam as proteínas capsidiais e AC4 que codifica para a proteína relacionada com a multiplicação viral. O DNA-B possui 2 ORFs: BV1, que codifica a proteína NSP (“nuclear shuttle protein”) que está envolvida no movimento intercelular e BC1 que codifica para a proteína de movimento (MP, “movement protein”) relacionada ao movimento de uma célula para a outra e a longa distância na planta, que são determinantes dos hospedeiros e aos sintomas da doença (HANLEY BOWDOIN *et al.*, 1999).

O vetor utilizado para transformação do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) foi construído a partir do alinhamento das sequências do gene AC1 das espécies de geminivírus: BDMV, BGYMV-[DO], BGYMV-[GT], BGYMV-[Mex], BGYMV-[PR] e BGYMV-[JP], e na análise *in silico* para verificar qual melhor fragmento para obter uma estrutura secundária de DNA satisfatória com mínima energia livre de formação de estruturas secundárias (ZUCKER, 2003). A análise do alinhamento mostrou uma região de maior similaridade na região entre os nucleotídeos 1836 e 2247. Uma sequência do isolado brasileiro do BGMV (BGMV-[BZ], acesso GenBank 88686) foi escolhido para ser clonado. Foram utilizados dois pares de iniciadores: HPBGMVXBA (5'-GTCTAGATAGTGGGGTGCGAT-3') e HPBGMVCLA (5'-GATCGATGCGGCATCCGAAGC-3') que contém respectivamente um sítio de XbaI e ClaI (na região 5' da sequência – região sublinhada) para amplificar um fragmento de 421pb de parte do genoma do BGMV e HPBGMVXHO (5'-

CCTCGAGATAGTGCGGTGCGA-3') e HPBGMVKPN (5'-AGGTACCATGCGGCTCCGAAGC-3') que contém um sítio de XhoI e KpnI (na região 5' da sequência, região sublinhada) respectivamente para amplificar um fragmento de 424pb de parte do genoma BGMV (BONFIM, 2007a).

O sítio de replicação do geminivírus está confinado ao núcleo de células infectadas e tem total dependência da maquinaria do hospedeiro, o que faz com que eles sejam modelos ideais para o estudo de replicação e expressão gênica em plantas, o que contribuiu e muito para o conhecimento genético destes vírus. As partículas do vírus acumulam no núcleo, exclusivamente, na forma de agregados irregulares ou arranjos cristalinos hexagonais (BONFIM, 2007a).

O begomovírus, causador do mosaico dourado do feijão, é a mais importante doença em feijão comum e sementes de vegetais produzidos nas áreas tropicais da América Latina (BONFIM, 2007b). As medidas de controle nas regiões afetadas pela doença são baseadas nos controles químicos da população dos vetores, com eficácia parcial, efeito negativo ao meio ambiente devido a eliminação dos inimigos naturais e aparecimento de mosca branca resistente a pesticidas. Assim, o melhor caminho para controlar a doença no campo é (conseguir) definir como a planta terá a tolerância ou a resistência ao vírus.

A pesquisa desenvolvida pela EMBRAPA para o feijão modificado geneticamente foi embasada na hipótese de que o silenciamento da expressão viral do gene AC1 pela degradação da sequência específica do mRNA alvo impediria a replicação do vírus que teria a ação de reduzir ou impedir o acúmulo de DNA e, conseqüentemente, o aparecimento dos sintomas virais.

O evento Embrapa 5.1 alcançou o objetivo no que diz respeito à resistência ao vírus e também ao herbicida utilizado para selecionar os transformantes – o imazapir. O imazapir é uma molécula capaz de se translocar pelos tecidos vegetais e de se concentrar na região apical do meristema do embrião da planta. Na pesquisa do feijão modificado geneticamente, o imazapir teve caráter peculiar, pois a partir do seu uso pode-se perceber o aumento do número de linhagens transgênicas, o que aumentou a probabilidade dos eventos imunes ao vírus.

Os herbicidas derivados das imidazolinonas controlam plantas daninhas pela inibição da enzima acetohidroxiácido sintase (AHAS), importante para biossíntese dos aminoácidos de cadeia ramificada isoleucina, leucina e valina. As imidazolinonas estão entre os cinco grupos que inibem a enzima AHAS; os outros quatro são:

sulfonilureas, triazolepirimidinas, pirimidiniltiobenzoatos e sulfonilamino-carboniltriazolinonas (STUART, 2006). As imidazolinonas incluem imazapir, imazapic, imazethapir, imazamox, imazamethabenz e imazaquin (TAN *et al*, 2005).

De acordo com a metodologia deste trabalho, as avaliações de risco disponíveis para as outras leguminosas serão disponibilizadas para que os critérios de avaliação de risco possuam parâmetros embasados cientificamente.

A lentilha, outra leguminosa modificada geneticamente, utilizou um herbicida da mesma classe química das imidazolinonas, o imazethapir. No caso da lentilha o imazethapir atuou como uma opção no controle das daninhas na produção de lentilha não modificada geneticamente (CERA, 2010).

O tratamento utilizado na lentilha, descrito pelo CERA (2010), foi desenvolvido utilizando indução química por mutagênese. Esta linha que expressa uma forma mutada da enzima acetohidroxiácido sintase, garante à planta ser tolerante aos níveis de imazethapir utilizados no controle das pragas na lavoura.

Neste evento o AHAS catalisa no primeiro passo da biossíntese os aminoácidos isoleucina, leucina e valina e ativa a ação glicolítica do metabolismo da planta. Quando as lentilhas convencionais foram tratadas com o imazethapir, o herbicida se liga a um lugar específico na enzima e assim inibe a sua atividade. O resultado da inibição da enzima, neste caso, é o decréscimo na síntese destes aminoácidos e um acúmulo a níveis tóxicos de alfa cetoglutarato, resultados que acarretam a morte da planta (CERA, 2010).

A lentilha (*L. Culinaris*) é auto polinizante, menos de 1% da espécie faz polinização cruzada. Deste modo uma distância de isolamento de 3 metros é requerida para esta linhagem de sementes no Canadá (CERA, 2010).

Já a alfafa (*Medicago sativa L.*) foi transformada a fim de ser tolerante ao herbicida glifosato. O evento foi desenvolvido pela “Monsanto Company” e a “Forage Genetics International” (CERA, 2010).

Os eventos de transformação da alfafa J101 e J163, foram desenvolvidos para permitir o uso do glifosato, o ingrediente ativo presente no herbicida Roundup® usado com uma opção no controle das pragas na produção de alfafa, tanto a utilizada para ração quanto a utilizada na alimentação. A alfafa geneticamente modificada contém tolerância a glifosato na planta através da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), isolado da bactéria do solo *Agrobacterium tumefaciens* linhagem/cepa CP4 (CERA, 2010).

A enzima EPSPS faz parte da rota do chiquimato envolvida na produção de aminoácidos e outros compostos aromáticos na plantas. Quando as plantas tradicionais são tratadas com glifosato, o herbicida se liga a EPSPS, prevenindo a síntese dos aminoácidos aromáticos necessários ao crescimento da planta. A enzima CP4 EPSPS nos eventos J101 e J163 reduz a finidade pelo glifosato, a atividade enzimática não é então impedida pelo herbicida (CERA, 2010).

EPSPS está presente em todas as plantas, bactérias e fungos, porém em nenhum animal, que não sintetizam aminoácidos aromáticos. Em função de não haver um ciclo de biossíntese de aminoácidos aromáticos em mamíferos, aves, peixes; o glifosato possui uma mínima toxicidade para estes organismos (U.S, EPA, 1993; WHO, 1994; WILLIAMS *et al.*, 2000).

Os eventos J101 e J163 foram desenvolvidos para introduzir os códigos de sequenciamento da CP4 EPSPS na alfafa clone “R2336” utilizando a transformação mediada por *Agrobacterium* (CERA, 2010).

A Constituição Federal, em seu artigo 225 torna ativo o Princípio da Precaução, que deve ser adotado sem restrições, pois ele tem como objetivo a proteção da vida. A precaução está relacionada com a associação respeitosa e funcional do homem com a natureza; abrange as ações antecipatórias para proteger a saúde das pessoas e dos ecossistemas (NODARI e GUERRA, 2003).

O Princípio da Precaução tem como uma das preocupações subjacentes a de permitir a introdução da ciência no âmbito da decisão da esfera pública. O rigor científico consubstancia o Princípio da Precaução, em nenhum momento o Princípio por si afasta, minimiza a necessidade do procedimento científico, ele sim, ratifica. As autoridades competentes podem adotar medidas denominadas “provisórias” caso sejam necessários dados científicos complementares e assim decidir provisoriamente quanto às medidas preventivas de proteção. As medidas tomadas devem ser flexíveis e sujeitas à atualização, visto que novos dados científicos podem surgir e alicerçar ou não as medidas tomadas (NOIVILLE, 2003).

Em relação aos testes realizados para avaliar os riscos o certo é que não existem dados sobre a ausência de riscos em OGM. Poucos testes foram realizados, pouco existe na literatura sobre os efeitos tóxicos e os riscos à saúde. O que são apresentados são experimentos avaliando o aspecto nutricional, com informações toxicológicas muito limitadas, avaliando quase sempre a equivalência nutricional. Existem 28 experimentos, no mundo, que avaliaram a administração de OGM em

várias espécies animais, porém todas avaliaram um curto espaço de tempo e, na maioria os aspectos avaliados são de caráter nutricional com pouca informação toxicológica (DOMINGO, 2007).

O Brasil dispõe sobre a avaliação do risco de organismos geneticamente modificados e seus derivados na Resolução Normativa nº 05 de 12 de março de 2008. A avaliação de risco regulamentada pela CTNBio deve identificar e avaliar os efeitos adversos potenciais do OGM e seus derivados na saúde humana e animal, no ambiente e nos vegetais, mantendo assim a transparência, o método científico e o Princípio da Precaução.

O capítulo III desta resolução abrange o que é preciso para que a avaliação de risco seja eficiente, englobando os anexos I (Monitoramento Pós Liberação Comercial), II (Informações Relativas ao OGM), III (Avaliação de Risco à Saúde Humana e Animal) e IV (Avaliação do Risco ao Meio Ambiente) da Resolução que compõe todas as informações relevantes a CTNBio para avaliar o pedido de liberação do OGM.

Esta é a etapa completa que compete ao responsável pelo desenvolvimento e liberação do feijão modificado geneticamente. Estas são as análises que compõem a avaliação de risco necessárias como alicerce para liberação pela CTNBio.

O desenvolvimento de alimentos oriundos de plantas geneticamente modificadas tem sido amplamente questionado no que diz respeito a avaliação de risco nutricional e à saúde.

A União Européia (EC, 2003), a FAO/WHO (FAO/WHO, 1996; 2000; 2001), o *Codex Alimentarius* (2003) e a OECD (1993, 1997, 2002) estabeleceram uma análise de risco estruturada a fim de garantir a segurança de todo alimento derivado de plantas geneticamente modificadas.

A avaliação de risco de alimentos derivados de plantas geneticamente modificadas segue a equivalência substancial, isto é, o alimento derivado deve ser comparado ao seu semelhante não modificado geneticamente a fim de que sejam avaliados os impactos ao meio ambiente, segurança aos animais e humanos e a qualidade nutricional – Conceito de Equivalência Substancial ou Avaliação Comparativa de Segurança (OECD, 1993).

O feijão modificado geneticamente – resistente ao vírus do mosaico dourado e também resistente ao herbicida foi avaliado quanto ao seu equivalente não modificado – feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.).

As análises foram realizadas averiguando cinzas, gordura, nitrogênio total e proteína, minerais – macro e microminerais, oligossacarídeos - aminoácidos incluindo estáveis a ácidos, sulfurados e triptofano, fibra bruta, vitamina B1, vitamina B2, detecção de DNA por PCR (AOAC; BONFIM, 2007b). No caso do feijão modificado geneticamente pela Embrapa foi realizado via PCR.

No documento Avaliação de Segurança Alimentar e Ambiental de Feijoeiro Geneticamente Modificado para Resistência ao *Bean golden mosaic vírus* (BGMV) - EMBRAPA, afirma a realização dos testes necessários para avaliação de risco do feijão transgênico, porém os resultados não foram disponibilizados.

Bonfim (2007b) relata que a geração R1 foi cultivada em casa de vegetação e apresentou fenótipos normais. A análise por PCR revelou uma segregação não mendeliana, de quinze plantas sendo que apenas três mostraram a presença dos transgenes, as três plantas modificadas geneticamente apresentaram resistência ao BGMV quando inoculadas com o vírus, Estas plantas foram consideradas como sub linhagens e suas progênies (R2) avaliadas.

Excetuando três plantas, todas as plantas modificadas geneticamente se revelaram imunes ao BGMV e a análise de PCR revelou a ausência do DNA viral nas plantas sem sintomas. As três plantas infectadas mostraram crescimento normal e sintomas brandos, que apareceram primeiramente nas folhas do alto das plantas 30 dias após a inoculação do vírus. Todas as segregantes não modificadas e plantas controle negativas - não modificadas geneticamente - revelaram sintomas severos característicos da doença do mosaico dourado (mosaico verde-amarelado, parada de crescimento e vagens distorcidas) duas semanas após a inoculação com vírus (BONFIM, 2007a).

De 58 da geração R2, 42 revelaram a presença dos genes *ahas* e $\Delta AC1$ quando analisadas por PCR, apresentando um teste padrão de segregação mendeliana de 3:1. Ao utilizar o PCR foi possível identificar duas linhagens homozigotas na geração R2 (BONFIM, 2007b).

A análise por PCR possibilitou a identificação de duas linhagens geração R3H homozigotas. Quatorze plantas modificadas geneticamente homozigotas e vinte não modificadas geneticamente foram inoculadas com vírus através da exposição com moscas brancas virulentas. O resultado mostrou que todas as plantas não transgênicas apresentaram sintomas severos enquanto que as plantas modificadas geneticamente apresentaram total resistência. Nesta análise trinta e duas plantas

transgênicas da geração R3H e vinte plantas não modificadas geneticamente (controle negativo) foram expostas a uma alta pressão de inoculação, usando moscas brancas virulíferas por 6 dias. Os resultados mostraram que 94,1% e 100% das plantas modificadas geneticamente não apresentaram sintomas, enquanto que todas as plantas não modificadas geneticamente apresentaram sintomas severos 29 dias após a inoculação. A análise por PCR demonstrou a ausência de DNA viral nas plantas modificadas geneticamente (BONFIM, 2007).

Bonfim (2007) analisou com a técnica de “Southern blot” a linhagem Embrapa 5.1 a fim de avaliar o cassete $\Delta AC1$, revelou que todas as plantas modificadas geneticamente analisadas apresentaram o mesmo padrão, comprovando, assim a integração das sequências exógenas e sugerindo que as cópias do transgene não estão segregando independentemente na geração R2 de plantas autopolinizadas. Nesta análise identificou que os transgenes estão integrados em um único *locus*, ratificando a forma observada de segregação.

Já a análise de “Northern blot”, revelou a presença de siRNA apenas nas plantas modificadas geneticamente, sugerindo assim, que a resistência é devido ao mecanismo de silenciamento induzido pela expressão de $\Delta AC1$.

De acordo com o documento: Avaliação de Segurança Alimentar e Ambiental do Feijoeiro Geneticamente Modificado para Resistência ao “Bean Golden Mosaic Virus” (BGMV) (EMBRAPA, 2007); os dados obtidos para avaliar a segurança alimentar necessários para o processo de regulamentação seguiram a aplicação do princípio da equivalência substancial, ou seja, as análises foram realizadas de forma comparativa ao feijão convencional e, assim avaliado quanto a sua segurança.

Ainda no intuito de avaliar comparativamente a qualidade nutricional do feijão geneticamente modificado e o feijão convencional, foram seguidas as especificações estabelecidas pela CTNBio em 2008: determinar a concentração de nutrientes e fitatos totais do evento EMBRAPA 5.1, desenvolvido pela EMBRAPA e o feijão comum (*P. vulgaris L.*) cv Olathe Pinto; comparar o efeito nutricional dos tratamentos com feijão modificado geneticamente e o não modificado geneticamente, no crescimento e desenvolvimento dos animais, ratos Wistar machos (24) e fêmeas (18), submetidos a tratamento experimental após desmame, analisando a curva de crescimento e ganho de peso ponderal; comparar a qualidade proteica do feijão geneticamente modificado e o não modificado através dos índices biológicos de balanço nitrogenado (BN), quociente de eficiência protéica (PER), quociente de

eficiência líquida da proteína (NPR), digestibilidade aparente (DA), valor biológico aparente (Vba), utilização líquida da proteína (NPU) e quociente de eficiência alimentar (QEA); verificar a integridade tissular do fígado, rins, estômago, intestinos, timo, baço e linfonodos mesentéricos utilizando estudos morfológicos, histológicos e bioquímicos dos animais sacrificados após a finalização dos ensaios biológicos; comparar o efeito nutricional dos tratamentos com feijão modificado geneticamente e o não modificado geneticamente, no crescimento e desenvolvimento dos animais da segunda geração de ratos Wistar, machos e fêmeas, submetidos ao tratamento experimental por 30 dias após desmame, analisando a curva de crescimento, ganho de peso ponderal, índices biológicos de balanço e qualidade proteica e estudos morfológicos, histológicos e bioquímicos dos órgãos fígado, rins, estômago, intestinos, timo, baço e linfonodos mesentéricos (EMBRAPA, 2007).

As análises realizadas utilizaram-se de 42 ratos Wistar, separados e distribuídos, aleatoriamente em quatro grupos diferentes identificados pela dieta administrada: grupos utilizando o feijão modificado geneticamente e grupos utilizando o feijão não modificado, além dos controles positivo e negativo.

Durante os primeiros 07 dias de dieta eles foram avaliados com relação ao consumo alimentar, controle de crescimento, ganho de peso, coleta de fezes e urina, balanço nitrogenado, nos 13 dias subsequentes foram avaliados quanto a qualidade nutricional da fonte protéica das leguminosas e também quanto ao consumo alimentar, controle de crescimento e ganho de peso. Neste período foi realizado o cruzamento entre os indivíduos do mesmo grupo experimental e no dia 32 os indivíduos machos de cada grupo experimental foi sacrificado após o cruzamento. Os animais sacrificados tiveram seus órgãos fígado, rins, estômago, intestinos, timo, baço e linfonodos mesentéricos retirados para os estudos morfológicos, histológicos e bioquímicos. Todos os indivíduos fêmeas dos grupos foram acompanhadas durante o processo gestacional, num total de 18 indivíduos. Estas nutrízes foram sacrificadas após o desmame da 2^o geração e também tiveram os órgãos fígado, rins, estômago, intestinos, timo, baço e linfonodos mesentéricos retirados para os estudos morfológicos, histológicos e bioquímicos.

A 2^o geração foi dividida em 3 grupos de análise, onde o número de indivíduos não está disponível. Os indivíduos desta geração foram analisados nos 07 primeiros dias quanto ao consumo alimentar, controle de crescimento, ganho de peso, coleta de fezes e urina e nos 13 dias subsequentes foram avaliados quanto à

qualidade nutricional da fonte protéica das leguminosas, já no dia 21 eles foram sacrificados e tiveram seus órgãos fígado, rins, estômago, intestinos, timo, baço e linfonodos mesentéricos retirados para os estudos morfológicos, histológicos e bioquímicos, além da coleta de sangue (EMBRAPA, 2007).

A EFSA (2006) solicita que o programa de testes com ratos perdure por 90 dias, assim como é também sinalizado pela SCF (1996) e FAO/WHO (2000). Revisando a literatura a fim de avaliar a parte toxicológica, há um indicativo de que a análise por 90 dias pode apontar os compostos essenciais que caracterizem a toxicidade, além de ratificar a análise do alimento quando comparado ao seu análogo não modificado geneticamente e também por ser relevante na elaboração da análise de risco do alimento modificado geneticamente (EFSA, 2008).

As pesquisas realizadas por Malatesta *et al.* (2002, 2002a, 2003, 2008) abordam a necessidade de que haja um período de análise maior quando nos referimos à utilização, ao consumo de um alimento modificado geneticamente. O desenvolvimento do trabalho realizado por um período maior, 8 meses e posteriormente 24 meses, demonstraram que algumas modificações ocorrem quando administrados alimentos modificados geneticamente aos ratos como: alterações em células acinares do pâncreas (redução de fatores de “splicing” do núcleo e do nucléolo e acúmulo de grânulos de pericromatina); em testículos de ratos (aumento do número de grânulos de pericromatina, diminuição da densidade de poros nucleares, alargamento do retículo endoplasmático liso das células de Sertoli), havendo a possibilidade de tais efeitos estarem relacionados ao acúmulo de herbicida presente na soja resistente, além de alterações em hepatócitos (modificações na forma do núcleo, aumento do número de poros na membrana nuclear, alterações na forma arredondada do nucléolo, indicando aumento do metabolismo) sendo potencialmente reversíveis neste último grupo de células. Os estudos realizados utilizaram a soja geneticamente modificada resistente ao glifosato e que foi tratada com o herbicida Roundup® (VECCHIO, 2004; MALLATESTA, 2008).

O estudo realizado por Malatesta em 2008, onde são acompanhadas ratos fêmeas por um período de 24 meses, administrando uma dieta com 14% de soja geneticamente modificada é o mais longo período de acompanhamento para avaliação de um alimento modificado geneticamente até hoje.

Malatesta (2008) conclui que o uso da soja modificada geneticamente na dieta

administrada a ratos fêmeas no período de 24 meses pode influenciar a morfologia e também o processo fisiológico do fígado embora este mecanismo ainda seja desconhecido e alguns dados ainda estão em discussão, o que ratifica a importância de que investigações em longo prazo ocorram a fim de avaliar o uso de alimentos geneticamente modificados nas dietas humana e/ou animal e seus efeitos sinérgicos durante o envelhecimento, xenobiótico e/ou condições de stress.

Os testes realizados para a avaliação da soja relatados nos artigos acima demonstram que os estudos devem ser monitorados por um período de tempo mais amplo, que garanta resultados eficazes e confiáveis.

11. CONCLUSÃO

De acordo com os objetivos do trabalho verificou-se que:

1. As avaliações de risco disponíveis para outras leguminosas, elucidaram a necessidade de que sejam feitos estudos contínuos a fim de garantir que o benefício à produção não gere dano à saúde;
2. Os dados disponíveis nos bancos de dados utilizados não apresentaram nenhuma avaliação de risco para o feijão geneticamente modificado desenvolvido pela EMBRAPA. De acordo com os relatórios da própria instituição, as análises realizadas foram baseadas pela equivalência substancial e de acordo com os parâmetros da Resolução Normativa nº 05 de 12/03/2008.
3. Tendo como base os artigos de revisão que avaliaram outros alimentos geneticamente modificados, com tolerância a herbicida, é pertinente que as análises perdurem por um período maior e dentro das reais condições de uso.

A avaliação de risco de um alimento geneticamente modificado visa não só a garantia de sua comercialização, mas embasa a construção de um poder maior: garantia de saúde ao ser humano ou ao animal que fará uso deste produto.

O Princípio da Precaução nos conduz ao cunho jurídico administrado em conjunto com a Ciência, junto a decisões políticas mais fortes no que diz respeito a ser um princípio ativo: torna pública a necessidade de garantir o respaldo à população no que diz respeito a evitar as catástrofes e riscos. Entretanto, não há a garantia do risco zero.

O desenvolvimento do feijão modificado geneticamente é um evento científico de grande valor ao mercado nacional e à população. É visto como um evento inovador que auxiliará na produção, reduzindo os gastos com as perdas e garantindo que haja disponibilidade para todo cidadão. O evento Embrapa 5.1 é correspondente ao *Phaseolus vulgaris* L. cv. Olathe Pinto, e todas as análises

realizadas são específicas a este evento. Porém, existe um programa de melhoramento clássico para que as características adquiridas (resistência ao vírus e tolerância ao herbicida) sejam transferidas para as duas cultivares brasileiras mais comercializadas do tipo Carioca.

Encontra-se em fase de consulta pública na CTNBio o feijão transgênico, no entanto são necessários mais parâmetros para uma melhor avaliação do risco.

Os estudos são efetuados sem a pulverização do herbicida imazapir, portanto é importante que as análises ocorram após a aplicação do herbicida já que será uma rotina no campo o uso do mesmo.

De acordo com que foi analisado e discutido neste trabalho verifica-se que se faz necessário o acompanhamento em longo prazo do feijão modificado geneticamente resistente ao vírus do mosaico dourado já que, além de possuir resistência ao vírus ainda apresenta tolerância ao herbicida imazapir.

O fato de vários parâmetros serem avaliados, não extingue a necessidade de garantir total segurança no consumo do feijão, mesmo que seja claro a inexistência do “risco zero”. O feijão transgênico deve ser analisado de acordo com o seu uso, avaliando a sua toxicidade, alergenicidade e segurança sem deixar lacunas no que diz respeito à proteção da saúde.

12. REFERÊNCIAS

Academia Brasileira de Ciências. Plantas Transgênicas na Agricultura. 2000. Disponível em: www.abc.org.br. Acesso em 16 jun 2008.

Agbios, 2009. Search the GM Crop Database. Disponível em: <<http://www.agbios.com/dbase.php?action=ShowForm>> Acesso em 16 jun 2009.

Antunes L, Bihalva AB, Elias MC, Soares GJD. Valor nutricional de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): cultivares Rico 23, Carioca, Piratã-1 e Rosinha-G2. Revista Brasileira de Agrociência 1995;1(1):12-18.

AOAC. Maryland (USA) Association of Official Analytical Chemists AOAC Official methods of analytical chemists. Disponível em: www.aoac.org. Acesso em 10 out 2010

Aragão FJL, Vianna GR, Rech EL. Feijão transgênico: um produto da engenharia genética. Biotecnologia Ciência&Desenvolvimento. 1998;1(5):46-49.

Aragão FJL, Faria J. Obtenção de feijoeiro resistente ao vírus do mosaico dourado. Disponível em <www.anbio.org.br>. Acesso em 10 nov 2008.

Aragão FJL, Bonfim K, Faria J, *et al.*, RNAi-Mediated Resistance to *Bean golden mosaic virus* in Genetically Engineered Common Bean (*Phaseolus vulgaris*). Disponível em <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/MPMI-20-6-0717>>. Acesso em 17 nov 2008.

Aragão FJL, Faria JC. Avanços no desenvolvimento de plantas transgênicas com resistência a doenças no Brasil. Revisão Anual de Patologia de Plantas 2007;15

Arquivo do Agrônomo, Encarte de Informações Agronômicas. 1994,68(7):8-11.

Banzoni OM. Clonagem, Caracterização do gene *vip3A* de *Bacillus thuringiensis* e transformação de *Agrobacterium tumefaciens* [dissertação] São Paulo:UNESP; 2006

Barbosa JM. Estudo de fatores que influenciam o processo de transformação genética em critos via *Agrobacterium tumefaciens*. [dissertação] Piracicaba: USP; 2002.

Bates GW. Genetic transformation of plants by protoplast electroporation. Molecular Biology. 1994; 2:135-144.

Benedito VA, Visser PB, Angenent GC, Krens FA. The potential of virus-induced gene silencing for speeding up functional characterization of plant genes. *Genet Mol Res* 2004; 3:323-341.

Bianchini A. Resistance to Bean Golden Mosaic Virus in Bean Genotypes. *Plant Disease* 1999; 83:615-619.

Bonfim K. Partial resistance to Bean Golden Mosaic Virus in a transgenic common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) line expression a mutated rep gene *Plant Science* 2006;171:565-571

Bonfim K. Resistência ao Bean Golden Mosaic Virus mediada por RNA interferente em plantas de feijoeiros (*Phaseolus vulgaris*). [tese] Brasília: UNB; 2007a.

Bonfim K *et al.* RNAi-Mediated Resistance to *Bean golden mosaic virus* in Genetically Engineered Common Bean (*Phaseolus vulgaris*). *MPMI* 2007(b);20:717–726.

Brasil. Constituição(1988). Constituição da República Federativa do Brasil. Brasília, DF: Senado Federal; 1988.

Brasil. Casa Civil. Decreto nº6041 8 de fevereiro de 2007. Dispõe sobre a Política de Desenvolvimento da Biotecnologia, cria o Comitê Nacional de Biotecnologia e dá outras providências. Disponível em http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/ato2007-2010/2007/decreto/d6041.htm. Acesso em 14 jun 2009.

Brown JK, Bird J. Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the America and the Caribbean Basin. *Plant Disease* 1992; 76:220-225.

Caldas RA. O setor e a política de biotecnologia na Coréia. In: Samuel Pinheiro Guimarães, organizador. Coréia -Visões Brasileiras. 1º ed. Brasília: IPRI-CAPES;2002. v 1.

Cárdenas RAL. Biodisponibilidade de zinco e de ferro, valor nutricional e funcional de diferentes cultivares de feijão comum submetidos a tratamento doméstico [tese]. Minas Gerais: Universidade de Viçosa, 2006.

Carneiro HS. Comida e Sociedade: significados sociais na história da alimentação. *História: Questões e Debates*. 2005;42:71-80.

Cartagena Protocol on biodiversity of the convention on biological diversity, 2002. Disponível em <<http://www.biodiv.org>>. Acesso em 18 nov 2008.

Cavalli S. Segurança alimentar: a abordagem dos alimentos transgênicos. *Rev Nutr* 2001; 14:41-46.

Center for Environmental Risk Assessment. Disponível em: <http://cera-gmc.org/>. Acesso em 17 nov 2009.

Centro de Inteligência do Feijão. Disponível em www.cifeijao.com.br. Acesso em 12 mai 2010.

Clive J Situação Global da Comercialização das Lavouras GM – 2009. Sumário Executivo 41 International Service for the Acquisition of Agro-Biotech Applications (ISAAA). 2009. Disponível em: www.isaaa.org. Acesso em 27 nov 2010.

CNPAF. Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão. Disponível em: <http://www.embrapa.br>. Acesso em 20 mai 2010.

Codex Alimentarius, 2003. Codex principles and guidelines on foods derived from biotechnology. Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Food and Agriculture Organisation, Rome.

Codex Alimentarius Commission. Principles for the risk analysis of food derived from modern biotechnology. Disponível em: www.who.int/foodsafety/en/codex_biotech_principles.pdf. Acesso em 20 ago 2009.

Codex Alimentarius Commission. Guideline for the conduct of food safety assessment of foods derived from recombinant-DNA plants. Disponível em: www.who.int/foodsafety/biotech/en/codex_guidelines_plants.pdf. Acesso em: 20 ago 2009.

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. Legislação. Acesso em 09 nov 2008. Disponível em: www.ctnbio.gov.br.

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (Brasil). Resolução Normativa nº 05, de 12 de março de 2008. Dispõe sobre normas para liberação comercial de Organismos Geneticamente Modificados e seus derivados. Diário Oficial da União 13 mar 2008; seção 1.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira: grãos: levantamento Brasília: CONAB, 2010. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em 25 NOV 2010

Conselho de Informação sobre Biotecnologia. Disponível em: <http://www.cib.org.br/>. Acesso em 28 fev 2011.

Constantinov GN. Biossegurança e Patrimônio Genético Juruá Santa Catarina, 2007.

Costa TEMM, Dias APM, Scheidegger EMD, Marin VA. Avaliação de Risco dos Organismos Geneticamente Modificados. Ciência e Saúde Coletiva 2011; 16(1):327-336.

Costa Rocha RW. Normatização das Pesquisas com Transgênicos no Brasil: o caso Embrapa Algodão [dissertação]. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba; 2007.

Costa AS. Three whitefly transmitted virus diseases of beans in São Paulo, Brazil. *FAO Plant Protection Bulletin Rome* 1965;13:121-130.

Costa TEMM. Detecção de Transgênicos em Alimentos Utilizando a Técnica Multiplex-PCR [dissertação]. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; 2008.

Debouck DG. Systematics and morphology. In: Schoonhoven A, Voysest O, editores. *Common beans: research for crop improvement*. Wallingford: CAB International; Cali: CIAT, 1991. p. 55-118.

Debouck DG. *Phaseolus* germplasm exploration. In: Gepts P, editores. *Genetic resources of Phaseolus beans*. Dordrecht: Kluwer, 1988. p. 3-29.

Domingo JL. Toxicity Studies of Genetically Modified Plants: A Review of Published Literature. *Crit Rev Food Science Nutr* 2007; 47:721-733.

EC, 2003. Regulation (EC) 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed. *Off. J. Eur. Communities*, L268, 1–23.

European Union. Regulation (EC) n° 258/97 of the European Parliament and of the Council of 27 January 1997 concerning novel foods and novel food ingredients. *Off. J. Eur. Commun*, 1997. Disponível em: <http://europa.eu.int/eur-lex/en/lif/dat/1997/en_397R0258.htm>. Acesso em: 28 jul. 2009

EFSA, 2006a. Guidance document of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed. *EFSA J.* 99, 1-100. Disponível em: www.efsa.europa.eu/science/gmo/gmo_guidance/660_en.html. Acesso em: 10 jan 2011.

EFSA, 2006b. Guidance document of the Scientific Panel on genetically modified organisms for the risk assessment of genetically modified microorganisms and their derived products intended for food and feed use. *EFSA J.* 374, 1–115. disponível em: http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178620775770.htm. Acesso em 10 jan 2011.

EFSA, 2008. Safety and Nutritional Assessment of GM plants and derived food and feed: the role of animal feeding trials. Disponível em: www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/11504.html. Acesso em 10 jan 2011.

Embrapa Avaliação de Segurança Alimentar e Ambiental de Feijoeiro Geneticamente Modificado para Resistência ao *Bean golden mosaic virus* (BGMV) Pré Projeto. 2007.

FAO/WHO, 1996. Biotechnology and Food Safety. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. *FAO Food and Nutrition*, Paper 61.

FAO/WHO, 2000. Safety aspects of genetically modified foods of plant origin. Report of a joint FAO/WHO Expert Consultation on foods derived from biotechnology. FAO Food and Nutrition, Paper 29.

FAO/WHO, 2001. Evaluation of Allergenicity of Genetically Modified Foods. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology, 22–25 January 2001. Disponível em: http://www.who.int/foodsafety/publications/biotech/en/ec_jan2001.pdf. Acesso em 27 nov 2010.

Faria JC *et al.*, Doenças causadas por vírus e seu controle In: Lemos LB, Filho DF, Silva TRB, Soratto RP. organizadores. Susceptibilidade de genótipos de feijão ao vírus do mosaico dourado. Pesquisa Agropecuária Brasileira 1996; 38: 575-581.

Faria JC. Bezerra IC. Zerbini FM, Ribeiro SG, Lima MF. Situação atual das geminivirose no Brasil. Fitopatologia Brasileira. 2000; 25 (2):125-137.

Fauquet CM, Maxwell DP, Gronenborn B, Stanley J. Revised proposal for naming geminiviruses. Arch Virol 2000; 145:1743–1761.

Fauquet CM *et al.*, Geminivirus strain demarcation and nomenclature. Arch Virol 2008; 153:783–821

Ferreira PAA. Inoculação com cepas de rizóbio na cultura do feijoeiro. Ciência Rural. 2009;39(7):2210-2212.

FINEP. Financiadora de Estudos e Projetos. Disponível em <http://www.finep.gov.br>. Acesso em 10 jun 2010.

Fiorillo CAP. Curso de Direito Ambiental Brasileiro. 8^oed. São Paulo. Saraiva 2007.

Flores e Silberschmidt K, Observations on a mosaic disease of *Leonurus sibiricus* occurring spontaneously in São Paulo. Phytopathological 1962; 43:221-233.

Food Safety Department/World Health Organization. Modern Food Biotechnology, Human Health and Development: an evidence based study. 2005. Disponível em www.who.int/foodsafety. Acesso em 10 jul 2010.

Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. Safety Assessment of Food derived from Genetically modified Animals, including fish, a joint FAO/WHO Expert Consultation on Food derived from Biotechnology. 2003. Disponível em: www.who.int/foodsafety/biotech/meetings/EC_NOV2003/EN. Acesso em: 12 jul 2010.

Fundo de Defesa Citrucultura. Disponível em: www.fundecitrus.com.br. Acesso em 15 mai 2010.

Gasparín MDG *et al.*, Detecção do Southern bean mosaic virus no Paraná e Separação do Bean rugose mosaic virus em Feijoeiro. Fitopatol. Bras. 2005;

30(1):75-78.

Guerra MP, Nodari RO, Impactos ambientais das plantas transgênicas: as evidências e incertezas. *Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável*. 2001; 2(3):30-41.

Guerrante RS. *Transgênicos: uma visão estratégica*. Rio de Janeiro: Interciência, 2003.

Guivant J. Transgênicos e percepção pública da ciência no Brasil. *Ambiente&Sociedade* 2006;9(1).

Gutiérrez AM *et al.* Mejoramiento genético vegetal *in vitro*. 2002. Disponível em: <http://www.e-gnosis.udg.mx/poeUDG/servlet/poe.GUIproducto/EGNOSIS/ES/1/4>. Acesso em: 13 abr 2009.

Hanley-Bowdoin L. *et al.*, Germinoviruses: Models for plant DNA replication, transcription and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Plant Sciences* 1999; 18:71-106.

Hirata MH, Mancini J. *Manual de biossegurança*. Barueri. Manole, 2002.

International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications – ISAAA. Disponível em: <http://www.isaaa.org/>. Acesso 18 jun 2009.

Hosfield GL. Genetic control of production and food quality factors in dry bean. *Food Technology*, 1991; 45 (9):98-103.

Kulikov AM. Genetically Modified Organisms and Risk of their introduction. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2005; 52 (1):99-111.

König A *et al.*, Assessment of Safety of foods derived from GM crops. *Food and Chemical Toxicology* 2004; 42:1047-1088.

Lacey H., O princípio da precaução e a autonomia da ciência. São Paulo: *Scientle Studia*; 2006; 4(3):373-392.

Lajolo FM, Nutti, MR. *Transgênicos: bases científicas da sua segurança*. São Paulo: SBAN, 2003. 110 p.

Lawson C. *et al.*, Engineering resistance to mixed virus infection in a commercial potato cultivar: resistance to potato virus X and potato virus Y in transgenic Russet Burbank. *Biotechnology*. 1990; 8:127-134.

Lippincott JA, Lippincott BB, Starr MP. The genus *Agrobacterium*. In: Starr MP *et al.*, editores. *The prokaryotes: a handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria*. Berlin: Springer-Verlag, 1981. p. 842-855.

Malatesta, M *et al.*, Ultrastructural analysis of pancreatic acinar cells from mice fed on genetically modified soybean. *Journal of Anatomy*, 2002a; 201:409-415.

Malatesta, M *et al.*, Ultrastructural Morphometrical and Immunocytochemical analysis of hepatocyte nuclei from mice fed on genetically modified soybean. *Cell Structure and Function*. 2002B; 27:173-180

Malatesta M. *et al.*, Fine structural analyses of pancreatic acinar cell nuclei from mice fed on genetically modified soybean. *European Journal of Histochemistry*. 2003; 47(4):385-388.

Malatesta M. *et al.*, Reversibility of hepatocyte nuclear modifications in mice fed on genetically modified soybean.. *European Journal of Histochemistry*. 2005; 49(3):237-242.

Malatesta M *et al* A long term study on female mice fed on a genetically modified soybean: effects on liver ageing. *Histochem Cell Biology* 2008; 130:967-977.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2007. Disponível em www.agricultura.gov.br. Acesso em 10 abr 2010.

Mariani C. *et al.*, A chimeric ribonuclease inhibitor gene restores fertility to male sterile plants. *Nature* 1992; 357:384-387.

Mazza R *et al.*, Assessing the transfer of genetically modified DNA from feed to animal tissues. *Transgenic Res* 2005; 14:775-784

Mesquita RF. *et al.*, Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): composição química e digestibilidade proteica. *Ciência Agrotecnica* 2007; 31(4):1114-1121.

Ministério da Ciência e da Tecnologia. Ciência, tecnologia e inovação: qualidade de vida. Disponível em: www.mct.gov.br/upd_blob/0004/4755.pdf. Acesso em 17 out 2010.

Monquero PA. Plantas transgênicas resistentes aos herbicidas: situação e perspectivas. *Bragantia* 2005; 64(4): 517-531.

Morrow B. The rebirth of legumes. *Food Technology*, 1991; 45(9):96-121.

Nodari RO, Guerra MP., Avaliação dos riscos ambientais de plantas transgênicas. *CC&T*. 2001;18(1):81-116.

Nodari RO, Guerra MP. Plantas Transgênicas e seus produtos: impactos, riscos e segurança alimentar. *Rev Nutr* 2003; 16 (1):105-116.

Noiville C., Ciência, Decisão, Ação: três observações em torno do Princípio da Precaução Governo dos Riscos 2005; Ed Pallotti Brasília.

Oliveira EMM, Watanabe E, Marin VA. Revisão: segurança alimentar de produtos derivados da biotecnologia moderna. *Braz J Food Technol* 2004; 7 (2):201-213.

Ometto RSV, Toledo SS. Transgênicos e Embrapa Anais Conpedi 2006. Disponível em conpedi.org.br. Acesso em 10 out 2009.

Palmer KE, Rybicki EP. The Molecular Biology of Mastreviruses. *Advances in Virus Research*. 1998; 50:183-234.

Pelaez V. Biopoder & regulação da tecnologia: o caráter normativo da análise de risco dos OGMs. *Ambiente&Sociedade* 2004; 7(2).

Perlak FJ *et al.*, Insect resistat cotton plants. *Biotechnology*. 1990; 8:939-943.

Pessanha L. Transgênicos, recursos genéticos e segurança alimentar: uma análise da judicialização do conflito sobre a liberação da soja rr no Brasil. In: XIV Encontro Nacional de Estudos Populacionais – ABEP – 2004; Minas Gerais, Brasil.

Prudente A. Transgênicos, Biossegurança e o Princípio da Precaução. *Revista CEJ* 2004; 25:77-79.

Quecini VM, Vieira MLC. Plantas Transgênicas. In: Serafini LA, Barros NM, Azevedo JL. editores. *Biotecnologia – Avanços na Agricultura e na Agroindústria*. 1ªed. Caxias do Sul: Editora da Universidade de Caxias do Sul; 2001; v.2. p. 279-331.

Rhee GS *et al.*, Multigeneration Reproductive and Developmental Toxicity Study of bar gene inserted into genetically modified potato on rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 2005; 68:2263-2276.

Ribeiro *et al.*, Estabilidade de Produção de Cultivares de Feijão de Diferentes Grupos Comerciais no Estado do Rio Grande do Sul *Bragantia* 2009; 68(2): 339-346.

Rocha DRA, Marin VA. Transgênicos: Plantas Produtoras de Fármacos. *Rev Ciência&Saúde Coletiva*. Disponível em: http://www.cienciaesaudecoletiva.com.br/artigos/artigo_int.php?id_artigo=4726. Acesso em 25 nov 2010.

Sanford JC, Smith FD, Russel JA. Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods in Enzimology* 1993;217:483-510.

Santarem ER. Métodos eficientes para a transformação genética de plantas. *Rev Ciência & Tecnologia* 2000; 15:81-90.

Silva LHP. Ciências Biológicas e Biotecnologia: realidades e virtualidades. *São Paulo em Perspectiva* 2000; 14(3).

Sjöberg L. Principles of risk perception applied to gene technology. Disponível em <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1299214>. Acesso em 20 out 2008.

Stuart R. Comunidade de fungos endofíticos associada à cana de açúcar

convencional e geneticamente modificada [dissertação]. São Paulo: USP ESALQ; 2006.

Tan *et al.*, Imidazolinone tolerant crops: history, current status and future. *Pest Management Science* 2005; 61:246-257.

Teixeira AR. Capacitação em Melhoramento Genético de Plantas no Brasil: situação atual e perspectivas [dissertação]. São Paulo: UNICAMP; 2008.

Timmermans MCP, Das OP, Messing J. Germinivirus and their use as extrachromosomal replicons. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 1994; 45:79-112.

Valle S. Transgênicos sem Maniqueísmos. Disponível em <www.scielo.br> . Acesso em 16 nov 2008.

Vecchio L *et al.*, Ultrastructural analysis of testes from mice fed on genetically modified soybean. *European Journal of Histochemistry* 2004; 48(4):449-454.

Venzon M *et al.*, Feijão. In: Paula Junior TJ, Venzon M. editores. 101 culturas Manual de Tecnologias Agrícolas. pag 331-342.

Vieira C. Sobre a hibridação natural em *Phaseolus vulgaris* L. *Revista Ceres*. 1960; 11(63):103-107.

Vieira EHN, Rava C A. Características botânicas e fisiológicas da semente. In: Vieira EHN, Rava CA. editores. Sementes de feijão: produção e tecnologia. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão; 2000. p. 25-38.

Williams GM, Kroes R, Munro IC. Avaliação de segurança e de risco do herbicida Roundup® e seu componente ativo, glifosato, para humanos. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2000; 31:117-165.

Zambryski P, Hoos H, Genetello C *et al.*, Ti Plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO Journal*. 1983; 2:2143-2150.