



**Proposta de Liberação Comercial de Feijoeiro
Geneticamente Modificado Resistente ao Mosaico
Dourado – Evento Embrapa 5.1 (EMB-PVØ51-1)**

Requerentes:

**Embrapa Arroz e Feijão & Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia**

Documento preparado por:

Francisco José Lima Aragão (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)

&

Josias Corrêa de Faria (Embrapa Arroz e Feijão)

Dezembro de 2010



Índice

Lista de Instituições Responsáveis Pela Condução das Análises e Estudos.....	7
Lista de Pesquisadores e Colaboradores.....	8
 Seções	
Seção I - Requerimento de Liberação Comercial.....	10
Solicitação de Confidencialidade.....	11
Seção II - Parecer Técnico das CIBios Sobre a Proposta.....	12
Seção III - Declaração de Veracidade das Informações Fornecidas.....	13
Seção IV - Resumo Executivo.....	14
Lista de Figuras.....	24
Lista de Tabelas e Quadros.....	39



Seção V – Informações Relativas ao OGM.....	46
V.1. Identificação do evento de transformação genética, objetivo e utilização do OGM e seus derivados.....	46
V.2. Classificação taxonômica, a partir de família, até o nível mais detalhado do organismo a ser liberado, incluindo, quando apropriado, subespécie, cultivar, patovar, estirpe e sorotipo.....	97
V.3. Genes introduzidos, organismos de origem e suas funções específicas.....	99
V.4. O vetor utilizado e seu espectro de hospedeiros.....	107
V. 5. O mapa genético utilizado no processo de transformação (transgene/vetor).....	108
V. 6. Resumo das construções para obtenção do OGM.....	115
V. 7. Classificação de risco do organismo geneticamente modificado.....	116
V. 8. Métodos utilizados para a modificação genética.....	116
V. 9. Caracterização molecular do inserto no organismo receptor, fornecendo informações relacionadas a: (1) número de cópias inseridas; (2) localização do inserto no genoma, quando possível; (3) seqüências flanqueadoras do gene; (4) seqüências nucleotídicas do transgene inserido no OGM.....	117
V.10. O produto da expressão do gene inserido no organismo receptor, descrito em detalhes...	125
V. 11. As técnicas de detecção gerais e específicas do OGM, apresentando metodologia pertinente.....	137
V.12. O padrão de herança genética dos genes inseridos.....	139
V. 13 Descrição dos efeitos pleiotrópicos e epistáticos dos genes inseridos, quando observados.....	144
V. 14. O grau de estabilidade genotípica, especificando a metodologia utilizada e o número de gerações avaliadas.....	153



V. 15. A existência de interações com efeitos adversos, quando dois ou mais genes forem introduzidos no mesmo OGM, por técnicas de ADN recombinante e suas possíveis conseqüências.....155

V. 16. As modificações genéticas incluídas no OGM que podem alterar sua capacidade de reprodução, sobrevivência, disseminação ou transferência de genes inseridos para outros organismos.....156

Seção VI. Avaliação de Risco à Saúde Humana e Animal.....157

VI. 1. O histórico de uso na alimentação, no Brasil e em outros países do organismo parental ou doador, indicando o nível de consumo, o processamento anterior ao consumo e as espécies animais que se alimentam destes organismos.157

VI. 2. Possíveis efeitos na cadeia alimentar humana e animal pela ingestão de OGM e seus derivados.....169

VI. 3. Diferenças de composição química e nutricional entre o alimento oriundo do vegetal geneticamente modificado e do vegetal não modificado.....170

VI. 4. Alterações relativas ao desempenho do animal, quando alimentado com organismos geneticamente modificados ou qualquer de suas partes, in natura ou após processamento, fornecendo, inclusive, os resultados da avaliação da nutrição em animais experimentais por duas gerações, indicando as espécies utilizadas nos testes, duração dos experimentos, variações fisiológicas e morfológicas observadas em relação aos grupos-controle e alteração da qualidade nutricional, se houver.....190

VI. 5. Estabilidade à digestão e ao processamento industrial da proteína especificada pelo transgene com base nas propriedades físico-químicas.....193

VI. 6. Os possíveis efeitos deletérios do OGM em animais prenhes e seu potencial teratogênico.....194

VI. 7. Conclusões de análises imunológicas e histológicas de tecidos relevantes, especialmente do trato digestivo.....196

VI. 8. A capacidade do OGM de produzir toxinas ou metabólitos que causem efeitos adversos ao consumidor, animal ou humano, relatando as evidências experimentais.....210



VI. 9. as avaliações toxicológicas e farmacológicas realizadas em animais experimentais, descrevendo os resultados.....216

VI. 10. A similaridade dos produtos de expressão do OGM com alérgenos conhecidos, relatando possíveis reações alérgicas identificadas após ingestão do OGM nas avaliações em animais experimentais, descrevendo os resultados.....220

Seção VII - Avaliação de Risco ao Meio Ambiente.....227

VII.1. Área de ocorrência natural do organismo parental do OGM, seus ancestrais e parentes silvestres – centros de origem e de diversidade genética – e espécies ancestrais ou parentes silvestres, existentes em algum ecossistema brasileiro do mesmo gênero da espécie parental não-modificada.....227

VII.2. A história de cultivo e de uso do organismo parental em termos de segurança para o meio ambiente, para o consumo humano e animal, informando sobre a possibilidade de hibridação introgressiva com as espécies sexualmente compatíveis e sobre a possível vantagem seletiva do transgene.....228

VII.3. Possíveis efeitos em organismos indicadores relevantes (simbiontes, predadores, polinizadores, parasitas ou competidores do OGM) nos ecossistemas onde se pretende efetuar o seu cultivo, em comparação com o organismo parental do OGM em um sistema de produção convencional.....231

VII.4. a capacidade de dispersão das estruturas de propagação e reprodução do OGM além das áreas de cultivo e os mecanismos de sua dispersão no ar, na água e no solo, fornecendo informações sobre a viabilidade do pólen da planta e indicando os agentes polinizadores potenciais e sua distribuição geográfica no Brasil.....359

VII.5. A possibilidade de formação de estruturas de reprodução de longo prazo no organismo parental.....362

VII.6. Frequência com que ocorre o cruzamento do organismo parental do OGM, dentro da mesma espécie e com espécies sexualmente compatíveis, arrolando as espécies avaliadas, as técnicas utilizadas e os efeitos resultantes.....363

VII.7. Efeitos resultantes da transferência horizontal para a microbiota do solo, caso ocorra.....366



VII.8. Impactos negativos e positivos aos organismos alvo e não-alvo que poderão ocorrer com a liberação do OGM, arrolando as espécies avaliadas, as razões da escolha e as técnicas utilizadas para demonstrar os impactos.....370

VII.9. As modificações da capacidade da planta em adicionar ou remover substâncias do solo, em decorrência da introdução de novas características, descrevendo possíveis alterações físicas e químicas no solo e contaminação dos corpos d'água adjacentes resultantes das interações com o OGM, comparativamente aos sistemas convencionais.....371

VII.10. Possíveis modificações da biodegradabilidade da planta GM, comparativamente ao genótipo parental.....376

VII.11. a possível resistência a agentes químicos conferida pela característica introduzida.....379

VII.12. Histórico de uso do OGM e os países onde já foram autorizadas ou recusadas a sua comercialização e plantio apresentando, neste caso, dados de monitoramento ou de estudos pós-liberação comercial, se houver.....381

VII. 13. Alterações na capacidade de sobrevivência do OGM em ambientes distintos daqueles ocupados pelo parental, provocadas pelas novas características introduzidas.382

Seção VIII – Plano de Monitoramento.....387

Anexos

Anexo I – Materiais & Métodos.....395

Anexo II – Seqüência completa do locus de integração do evento Embrapa 5.1.....454

Referências Bibliográficas.....467



Lista de Instituições Responsáveis Pela Condução das Análises e Estudos

A seguir são apresentadas as instituições que conduziram as análises e estudos que compõem essa proposta:

Instituições		CQB
Embrapa Arroz e Feijão	Santo Antônio de Goiás, GO	0008/96
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia	Brasília, DF	0004/96
Embrapa Agroindústria de Alimentos	Guaratiba, RJ	0126/00
Embrapa Agrobiologia	Seropédica, RJ	0010/97
Embrapa Milho e Sorgo	Sete Lagoas, MG	0020/97
Embrapa Soja	Londrina, PR	0002/96
Universidade Estadual Paulista	Botucatu, SP	0164/02
Universidade Federal do Ceará	Fortaleza, CE	0102/99
Universidade de Brasília	Brasília, DF	0034/97
Universidade Estadual de Campinas	Campinas, SP	0086/98



Lista de Pesquisadores e Colaboradores

Segue a relação dos pesquisadores e colaboradores envolvidos efetivamente no desenvolvimento do evento de feijão Embrapa 5.1, assim como aqueles que contribuíram na geração dos dados apresentados nessa proposta:

Instituições	Equipe
Embrapa Arroz e Feijão	Josias Corrêa de Faria, PhD; Eliane Dias Quintela, PhD; José Francisco Arruda e Silva; Edmar Cardoso de Moura; Vanderlino Moreira de Santana; Jaison Pereira de Oliveira, PhD; Murillo Lobo Junior, PhD; Paula Arielle Mendes Ribeiro Valdisser, BS; Maria José Del Peloso, PhD; Rosana Pereira Vianello Brondani, Ph.D.
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia	Francisco José Lima Aragão, PhD; Elsa Oliveira Paranaguá e Lago Nogueira, BS; Kenny Bonfim, PhD; Maria Laine Penha Tinoco, PhD; Antonieta Nassif Salomão, MSc; Solange Carvalho Barrios Roveri José, PhD; Marcelo Porto Bemquerer, PhD; Beatriz Simas Magalhães, PhD; Vera Lucia Perussi Polez, PhD; Guy de Capdeville, PhD.
Embrapa Agroindústria de Alimentos	José Luiz Viana de Carvalho, MSc; Marília Regini Nutti, MSc; Edson Watanabe, PhD; Edna Maria Morais Oliveira, PhD; Ronoel Luiz de Oliveira Godoy, PhD; Sidinea Cordeiro de Freitas, PhD; Sidney Pacheco, MSc; Luzimar da Silva de Mattos, BS; Jeane Santos Rosa de Mello, MSc; Manuela Cristina Pessanha de Araujo, MSc; Adriana Paula da Silva Minguita, BS; Carmine Conte, BS; Epaminondas Silva Simas; Juliana de Oliveira Santos, BS; Tânia dos Santos Silva, BS; Jose Manoel de Oliveira; Paulo Sergio de Souza; Tatiane Correa de Oliveira.
Embrapa Agrobiologia	Bruno José Rodrigues Alves, PhD; Gustavo Ribeiro Xavier, PhD; Segundo Sacramento Urquiaga Caballero, PhD; Altiberto Moreira Baeta; Roberto Gregio de Souza; Maria Elisabeth Fernandes Correia, PhD; Norma Gouvea Rumjanek, PhD; Roberto Silva de Oliveira; Itamar Garcia Ignácio; Orivaldo José Saggin Junior, PhD; João Luiz Bastos;
Embrapa Milho e Sorgo	José Aloísio Alves Moreira, PhD.
Embrapa Soja	Geraldo Estevam de Souza Carneiro, MSc.



Universidade Estadual Paulista	Norka Beatriz Barrueto González, PhD; Renata M. Galvão Campos Cintra, PhD; Luis Fernando Barbisan PhD.; Alaor Aparecido de Almeida, PhD.
Universidade Federal do Ceará	Francisco de Assis de Paiva Campos, PhD.
Universidade de Brasília	Élida Geralda Campos, PhD.; Anna Paula Costa Jesuino; Érica Heringer Machado; Viviane Yllena Vieira de Souza, BS.
Universidade Estadual de Campinas	Jaime Amaya-Farfan, PhD.



SEÇÃO I

Requerimento de Liberação Comercial

Os representantes legais da Embrapa Arroz e Feijão (CQB 008/96) e Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CQB 004/96) vêm em conjunto requerer a liberação comercial do feijoeiro geneticamente modificado resistente ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro (*Bean golden mosaic virus*), evento de transformação Embrapa 5.1.

Para tal, e em conformidade com a Lei de Biossegurança de N. 11.105, de 24 de março de 2005, e com a Resolução Normativa de No. 05, de 12 de março de 2008, a Embrapa Arroz e Feijão e a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia submetem as informações contidas nesta proposta para a apreciação da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio).

Informamos que, no caso de quaisquer dúvidas ou questionamentos referentes a essa proposta de liberação comercial, por parte da CTNBio ou da sociedade civil, as CIBios da Embrapa Arroz e Feijão e Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia deverão ser contatadas.

Santo Antônio de Goiás, GO, 11 de dezembro de 2010

Pedro Luiz Oliveira de Almeida Machado
Chefe Geral da Embrapa Arroz e Feijão

Brasília, DF, 11 de dezembro de 2010

Mauro Carneiro
Chefe Geral da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia



Solicitação de Confidencialidade

A Empresa Brasileira de pesquisa Agropecuária (Embrapa) requer, conforme escabele o Art. 35 §1 do Decreto 5.591 de 22 de novembro de 2005, que parte dessa solicitação (páginas com anotação “Confidencial”) seja tratada como informação comercial confidencial.

As informações para as quais se requer confidencialidade referem-se ao detalhes da estrutura dos transgenes no evento Embrapa 5.1. A justificativa para o resguardo de sigilo das referidas informações se deve ao fato de que 22 eventos de feijoeiro geneticamente modificados foram gerados e apenas dois mostraram resistência ao mosaico dourado, apesar dos demais terem sido transformados com a mesma construção gênica. Ainda não foi determinado o motivo pelo qual essas duas estruturas em particular (como a descrita para o evento Embrapa 5.1 e que é assunto desse documento) conferiram resistência ao geminivírus. A estrutura dos transgenes nesses eventos demanda tempo e deve ser investigada. O estudo desses lócus de integração pode fornecer uma explicação da razão de termos obtido apenas duas plantas resistentes em 22 linhagens contendo o transgene. Essa informação pode ser crucial para o desenvolvimento de tecnologias gerais para resistência a viroses em plantas e poderá ser alvo de proteção intelectual no futuro. A divulgação indevida dessa informação específica poderá resultar em exploração indevida por terceiros.

Sem mais, colocamo-nos à disposição ao mesmo tempo em que pedimos deferimento.

Santo Antônio de Goiás, GO, 11 de dezembro de 2010

Pedro Luiz Oliveira de Almeida Machado
Chefe Geral da Embrapa Arroz e Feijão

Brasília, DF, 11 de dezembro de 2010

Mauro Carneiro
Chefe Geral da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia



SEÇÃO II

Parecer Técnico das CIBios Sobre a Proposta

As Comissões Internas de Biossegurança (CIBios) da Embrapa Arroz e Feijão (CQB 008/96) e Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CQB 004/96), atestam que as informações contidas nessa proposta de liberação comercial do feijoeiro geneticamente modificado resistente ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro (*Bean golden mosaic virus*), evento de transformação Embrapa 5.1, estão em conformidade com a Lei de Biossegurança de N. 11.105, de 24 de março de 2005, e com a Resolução Normativa de N. 05, de 12 de março de 2008.

Santo Antônio de Goiás, GO, 11 de dezembro de 2010

Josias Corrêa de Faria
Presidente da CIBio da Embrapa Arroz e Feijão

Brasília, DF, 11 de dezembro de 2010

Eduardo Romano de Campos Pinto
Presidente da CIBio da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia



SEÇÃO III

Declaração de Veracidade das Informações Fornecidas

Os abaixo assinados, tanto quanto lhes é dado saber, certificam que as informações fornecidas na presente proposta de liberação comercial do evento de feijoeiro Embrapa 5.1 geneticamente modificado, resistente ao mosaico dourado, são no limite de nosso conhecimento, completas, acuradas e verdadeiras.

Santo Antônio de Goiás, GO, 11 de dezembro de 2010

Pedro Luiz Oliveira de Almeida Machado
Chefe Geral da Embrapa Arroz e Feijão

Brasília, DF, 11 de dezembro de 2010

Mauro Carneiro
Chefe Geral da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia



SEÇÃO IV

Resumo Executivo

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) desenvolveu uma linhagem de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) geneticamente modificada (GM) doravante chamada de Embrapa 5.1. O evento de feijoeiro Embrapa 5.1 foi gerado com o uso da estratégia de RNA interferente (RNAi) e é altamente resistente ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro [cujá nomenclatura oficial em língua inglesa é *Bean golden mosaic virus* (BGMV)]. O evento Embrapa 5.1 foi obtido a partir da inserção de transgenes no genoma nuclear com a utilização do método de biobalística descrito por Aragão et al. (1996). Para obtenção de resistência ao vírus foi inserido um gene quimérico para expressão de um RNA contendo um fragmento do gene *rep* (*AC1*) do BGMV, posicionado em senso e antisenso (intercalados por um intron). Esse RNA foi desenhado para formar um grampo com seqüências de RNA de dupla fita (dsRNA) que são reconhecidas pela maquinaria celular para geração de pequenos fragmentos de RNA (siRNA) que interferem na expressão do gene *rep* viral. Como consequência da falta de expressão do gene *rep*, a replicação viral é comprometida e as plantas se tornam resistentes ao vírus. Doravante o cassete de expressão do RNA grampo (dsRNA) será chamado de $\Delta AC1hpRNA$. Para seleção dos brotos geneticamente modificados originados de células apicais de embriões zigóticos de feijão foi inserido o gene *AtAhas* (também chamado de *csr1.2*; *AtAhas* será a nomenclatura doravante utilizada nesse documento) de *Arabidopsis thaliana* com seu promotor e região não traduzida 3' (3'UTR) nativos. O gene *Atahas* codifica a subunidade maior da enzima aceto-hidroxiácido sintase (AtAHAS), também chamada de acetolactato sintase, que confere tolerância aos herbicidas do grupo químico das imidazolinonas. Embora o evento Embrapa 5.1 tenha cópiás íntegras do gene *AtAhas*, verificou-se que as plantas não têm significativa tolerância aos herbicidas. A tolerância é suficiente apenas para que permita a seleção *in vitro* de brotações geradas a partir de células transformadas, originadas a partir do meristema apical de embriões de



feijoeiro. O evento Embrapa 5.1 é a base para o desenvolvimento de variedades comerciais de feijoeiro de diversos grupos para cultivo no Brasil.

O uso das variedades de feijoeiros Embrapa 5.1 GM serão uma importante ferramenta para o controle do mosaico dourado no Brasil e possivelmente em outros países das Américas. Como mencionado anteriormente o mosaico dourado é causado pelo BGMV que é transmitido por moscas brancas (*Bemisia tabaci*, Genn.) presentes em todas as regiões do país onde se cultiva o feijoeiro. Os sintomas da doença são mosaico nas folhas, nanismo e/ou superbrotamento. Além disso, as plantas infectadas precocemente tendem a alongar o ciclo vegetativo, fato relacionado ao excessivo abortamento de flores. As vagens, quando se desenvolvem, mostram-se deformadas e de tamanho reduzidos, com as sementes subdesenvolvidas, afetando a qualidade final dos grãos e o seu valor comercial. Quando ocorre a doença as perdas estimadas da produção de grãos podem variar de 40 a 100% dependendo da incidência, da época de plantio e da cultivar (Costa, 1987). As perdas anuais no Brasil são entre 90 e 280 mil toneladas de grãos, quantidade que seria suficiente para alimentar entre 6 e 20 milhões de brasileiros adultos. Em adição, acredita-se que pelo menos 200.000 hectares estão atualmente inviabilizados para o cultivo do feijoeiro na safra “da seca”, nas Regiões Sudeste, Centro-Oeste, e Sul (Norte do Paraná).

A busca por cultivares resistentes ao mosaico dourado foi iniciada na década de 70 tendo sido encontrados apenas baixos níveis de tolerância à doença. Não existe cultivar com nível adequado de resistência ao mosaico dourado em utilização no Brasil, e também não foi observada imunidade à doença no gênero *Phaseolus*. Há tolerância em cultivares de origem meso-americana, especialmente ao *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV), mas não há imunidade. Como consequência desta falta de alto nível de resistência genética, o controle do mosaico dourado tornou-se dependente de práticas culturais que possam facilitar o manejo da doença e de métodos de controle químico do vetor (mosca branca).

O principal método de controle da mosca branca continua sendo o químico. Um número aproximado de 23 princípios ativos está registrado para o controle da mosca branca no feijoeiro, entretanto, poucos deles têm se mostrado eficientes. Em testes realizados em condições controladas, os princípios ativos do grupo dos organofosforados, piretróides, carbamatos, foram eficientes no controle de adultos da mosca branca *B. tabaci* raça A, mas ineficientes para a B.



tabaci raça B. Os inseticidas do grupo dos neonicotinóides têm sido eficientes no controle de adultos da mosca branca *B. tabaci* raça B. Os princípios ativos thiamethoxan, acetamiprid e imidacloprid foram os mais eficientes no controle de adultos da mosca branca *B. tabaci* raça B. O thiametoxan e o imidacloprid são posicionados em tratamento de sementes e em pulverizações. Atualmente, em testes realizados com os neonicotinóides, em pulverização, tem-se verificado uma redução acentuada na eficiência e no efeito residual para o controle de adultos. Este fato tem como principal causa, a exposição contínua das populações de mosca branca aos neonicotinóides, largamente utilizados no seu controle. No estabelecimento de uma lavoura de feijão, com probabilidade de ser infestada pela mosca branca provenientes de outras culturas em fase de colheita, como a soja, recomenda-se como medida preventiva o tratamento de sementes e pulverizações seqüenciais com adulticidas. Em áreas de cultivo seqüencial de feijoeiro, esta mesma recomendação não terá o efeito esperado, porque ocorre a migração de adultos virulíferos com o vírus do mosaico dourado. O inseticida atua com eficiência no controle de adultos da mosca branca, mas não é capaz de evitar a transmissão da virose. Além disso, a aplicação seqüencial de inseticidas causa elevação dos custos de produção.

As análises genéticas e moleculares mostraram que os transgenes foram inseridos em um único locus do genoma nuclear e se mantiveram estáveis por várias gerações de autofecundação e após cruzamentos e retro-cruzamentos com variedades comerciais não geneticamente modificadas (não-GM). Não foram encontradas seqüências funcionais do gene *bla* de *E. coli* que codifica para uma beta-lactamase (que confere resistência a beta-lactâmicos como a ampicilina e é usado como marcador de seleção). Isso já era esperado uma vez que o vetor pBGMVRNAiAHAS, utilizado na transformação do feijoeiro, foi digerido com a enzima de restrição *FspI*. Uma vez que essa enzima ocorre duas vezes nesse vetor e ocorre dentro da região codificante do gene *bla*, a digestão do vetor levou a inativação funcional desse gene. Os siRNA (pequenos RNA interferentes) foram encontrados em folhas de feijoeiros cultivados em três regiões do Brasil (Londrina, PR; Santo Antônio de Goiás, GO e Sete Lagoas, MG). Esses siRNA são o resultado da expressão do cassete $\Delta AC1hpRNA$, com a formação de um RNA grampo (dsRNA) que não é traduzido e é processado pela célula para formação dos siRNA. Os siRNA foram encontrados em folhas e detectados em quantidades traço em sementes. Em sementes



cozidas não foi possível detectar siRNA. As análises *in silico* e *in planta* não mostraram qualquer sinal de efeito *off-target* (isto é, silenciamento não intencional de outros genes em leguminosas, humanos e animais) ou da possibilidade de alteração bioquímica nas plantas, como pode ser observado pelas análises de caracterização agrônômica e análises de composição nutricional. Além disso, animais alimentados com siRNA isolados de folhas do feijoeiro GM não mostraram qualquer alteração bioquímica ou de desenvolvimento em relação ao controle.

Embora a expressão do gene *AtAhas* tenha sido muito baixa, julgando-se pela dificuldade de se detectar a proteína AtAHAS em tecidos de folhas e sementes do feijoeiro Embrapa 5.1, análises conduzidas *in silico* e *in vitro* mostram que essa proteína não tem qualquer potencial de alergenicidade. Análises *in silico* foram realizadas para a predição de potencial alergênico de proteínas AtAHAS e SEC61 (mesmo com a não detecção de transcritos para essa seqüência) e resultaram nenhuma identidade com alérgenos conhecidos. Além disso, a comparação das proteínas AHAS de *A. thaliana* e de *Phaseolus vulgaris* mostra uma similaridade na seqüência de amino ácidos de 83% e de 98-100% nas regiões catalíticas, encontradas na superfamília das enzimas dependentes de tiamina difosfato (ThDP). Adicionalmente, recentemente a CTNBio aprovou o evento de soja BPS-CV127-geneticamente modificada tolerante aos herbicidas do grupo químico das imidazolinonas, devido à expressão do gene *AtAhas* (mesmo cassete de expressão usado para geração do evento de feijoeiro Embrapa 5.1) (Parecer Técnico nº 2236/2009, Processo nº 01200.000010/2009-06). Neste processo, ficou demonstrado experimentalmente que as proteínas AtAHAS e SEC61 não têm características de proteínas tóxicas e alergênicas. Em adição, essas proteínas estão presentes em plantas (de uma forma geral) e não existe histórico de alergenicidade para o doador do gene (*A. thaliana*).

A caracterização agrônômica do evento Embrapa 5.1 cultivado em três regiões do Brasil por um período de dois anos não mostrou qualquer alteração fenotípica no feijoeiro Embrapa 5.1 quando comparado ao seu parental Olathe. Também não foram observadas diferenças na germinação das sementes, mesmo após um período de envelhecimento, Estudos envolvendo o cultivo das plantas de feijoeiro GM e não-GM em condições de solo com baixa e alta fertilidade não mostraram diferenças significativas em parâmetros agrônômicos, refletindo que não há alteração na absorção de nutrientes nessas condições.



Embora o evento Embrapa 5.1 tenha cópias íntegras do gene *AtAhas*, verificou-se que as plantas não têm significativa tolerância aos herbicidas. A tolerância é suficiente apenas para que permita a seleção *in vitro* de brotações geradas a partir de células transformadas, originadas a partir do meristema apical de embriões de feijoeiro. O evento Embrapa 5.1 não possui tolerância a dosagens equivalentes a 1/10 daquela utilizada comercialmente. Conseqüentemente esse evento não poderá ser utilizado no campo como uma tecnologia para controle de ervas daninhas e invasoras.

A segurança alimentar humana e animal dos transgenes expressos no evento Embrapa 5.1 foi demonstrada por vários estudos que confirmaram que a composição do evento Embrapa 5.1 é substancialmente equivalente ao de seu parental e comparada à de outros feijoeiros cultivados no Brasil. Também foram realizados estudos de alimentação de animais que não mostraram alterações em relação aos animais que foram alimentados com o feijoeiro parental Olathe. O feijão é fonte de fibras, proteína e ferro. Uma análise de composição extensa foi realizada em grãos colhidos de campos cultivados em Londrina (PR), Santo Antônio de Goiás (GO) e Sete Lagoas (MG) no ano de 2008 e em Santo Antônio de Goiás (GO) e Sete Lagoas (MG) no ano de 2009. Os grãos foram colhidos e submetidos a análises de composição para determinação da composição de açúcares, vitaminas (B1 e B2), minerais (alumínio, cálcio, cobre, ferro, fósforo, magnésio, manganês, potássio, zinco), aminoácidos (triptofano, cisteína, metionina, ácido aspártico, serina, ácido glutâmico, glicina, histidina, arginina, treonina, alanina, prolina, tirosina, valina, lisina, isoleucina, leucina, fenilalanina). Além disso, foram realizadas análises físico-químicas para determinação de umidade, cinzas, proteína total, extrato etéreo, ácido fítico e de inibidores de tripsina. Uma vez que não estavam disponíveis dados de composição de fatores nutricionais e anti-nutricionais presentes em grãos de feijão cultivados no Brasil, um banco de dados foi gerado com o cultivo de feijoeiro [variedades BRS Valente, Diamante Negro, Pérola, Timbó e Olathe (parental do evento Embrapa 5.1)] nos anos de 2003, 2004, 2005, 2006 e 2007 nos municípios de Santo Antônio de Goiás (GO), Simão Dias (SE), Lavras (MG), Ponta Grossa (PR), Anápolis (GO), Passo Fundo (RS) em distintas épocas do ano. Esse estudo mostrou que a composição de elementos nutricionais e anti-nutricionais encontrados no evento de feijoeiro



Embrapa 5.1 são compráveis aos níveis encontrados em seu parental (Olathe) e as outras quatro variedades convencionais cultivadas no Brasil.

Adicionalmente foram realizadas análises do perfil protéico em grãos colhidos de campos cultivados com o Evento Embrapa 5.1 e Olathe convencional em Santo Antônio de Goiás (GO), Sete Lagoas (MG) e Londrina (PR). Foram identificadas as principais proteínas presentes em grãos maduros de feijão. Os resultados mostram que os grãos analisados mostram o mesmo padrão nos distintos campos e que não foi observada diferença entre o evento Embrapa 5.1 e genótipo receptor do gene, Olathe.

A segurança do cultivo do evento de feijoeiro Embrapa 5.1 para o meio ambiente foi demonstrada em um grande número de estudos visando identificar possíveis efeitos sobre diversos organismos que interagem com a planta em condições de campo. Os ensaios foram realizados em casa de vegetação e campos cultivados em três regiões do Brasil por um período de dois anos. Foi determinada a flutuação populacional e a estrutura das populações de artrópodes associados ao feijoeiro Embrapa 5.1 e convencional na parte aérea e na superfície do solo. As espécies conhecidas como pragas e inimigos naturais mais comuns nos sistemas de produção do feijoeiro foram identificadas visualmente utilizando manuais de identificação de pragas e inimigos naturais. Nesses estudos foram observadas poucas diferenças na comunidade de artrópodes da superfície do solo entre os dois tratamentos, permitindo concluir que o evento Embrapa 5.1 não causa nenhum efeito sobre a diversidade de artrópodes presentes na superfície do solo. Estudos complementares foram realizados com uma análise quantitativa e qualitativa da macro e mesofauna (espécies mais abundantes foram do solo sob influência do feijoeiro Embrapa 5.1. Os grupos da macrofauna mais abundantes foram: Formicidae, larvas e adultos de Coleoptera, larvas de Diptera, Isoptera e Oligochaeta. A comunidade da mesofauna do solo teve o grupo Acari como o mais representativo. Outros grupos importantes foram: Formicidae, Collembola, larvas de Coleoptera e larvas de Diptera. O número médio de unidades taxonômicas por amostra ou riqueza média de grupos apresentou variação significativa em função da localidade, tanto para a macrofauna quanto para a mesofauna do solo. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre os solos cultivados com feijoeiro convencional e



transgênico Embrapa 5.1 tanto para macrofauna quanto para mesofauna do solo em nenhuma das três localidades estudadas.

Foram realizados estudos para observar possíveis efeitos sobre o *Zabrotes subfasciatus*, que é o principal caruncho de grãos do feijão armazenado nas regiões mais quentes dos trópicos. Foi avaliado o efeito do feijoeiro Embrapa 5.1 sobre o desenvolvimento biológico de 10 gerações do caruncho *Z. subfasciatus*. O experimento foi conduzido no laboratório de Entomologia da Embrapa Arroz e Feijão, em Santo Antônio de Goiás, GO. Os resultados demonstraram que o evento Embrapa 5.1 não interfere nos parâmetros de desenvolvimento biológico do *Z. subfasciatus*.

Estudos para a determinação da produção de matéria seca e acumulação de nitrogênio foram realizados. Concluiu-se que a produção de matéria seca pelas plantas de feijoeiro variou entre os experimentos com solos das diferentes localidades analisadas. Entretanto, a comparação os dois genótipos (evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe) mostram comportamento similar frente às condições de estresse. Esses resultados são condizentes com as análises de mecanismos de defesa antioxidante das enzimas: catalase, ascorbato peroxidase e superóxido dismutase (SOD) bem como as medidas de dano celular (peroxidação lipídica) e dano a proteínas utilizando-se os extratos das folhas de feijão GM (Embrapa 5.1) e o seu parental não-GM (Olathe). Os resultados não mostraram diferenças entre os genótipos.

A nodulação e dependência pela fixação biológica de N_2 pelas plantas de feijoeiro foi também avaliada e os resultados não mostraram alterações significativas entre o evento de feijoeiro Embrapa 5.1 e seu parental.

A Comunidade de fungos micorrízicos arbusculares e sua associação com as raízes das plantas de feijoeiro foram estudadas pela análise da densidade de esporos de FMAs (fungos micorrízicos arbusculares) na rizosfera das plantas, colonização das raízes por FMAs indígenas, número de espécies de FMAs identificadas na rizosfera, composição de espécies na comunidade de FMAs indígenas. De uma maneira geral não se observou diferença significativa entre o feijoeiro Embrapa 5.1 e seu parental não-GM Olathe, sugerindo ausência de alteração da capacidade de micorrização devido a alteração genética inserida no evento de feijoeiro.



Também foi realizada uma análise quantitativa e qualitativa dos microrganismos em solos sob influência do feijoeiro Embrapa 5.1. As análises do perfil de alfaproteobactérias na rizosfera do feijoeiro foram feitas em solos de campos cultivados com o feijoeiro Embrapa 5.1 e seu parental, em Santo Antônio de Goiás (GO), Londrina (PR) e Sete Lagoas (MG). Foi possível notar nos dendrogramas gerados, a partir dos perfis de DGGE, que não foram formados grandes grupamentos, e os que foram formados não foram induzidos pelo cultivo do feijão geneticamente modificado evento Embrapa 5.1. Estudos da atividade enzimática do solo no qual foram cultivados o evento Embrapa 5.1 em distintas regiões do Brasil não permitiram observar diferenças estatísticas entre as amostras do feijoeiro transgênico Embrapa 5.1 e o convencional (Olathe) quanto as atividades das enzimas arilsulfatase (conjunto de enzimas do ciclo do enxofre), fosfatase ácida e β -glucosidase. A rizosfera é a porção do solo que sofre influência direta da planta por ocasião dos exudatos que a planta produz. Alterações nos padrões de atividade enzimática do solo representadas pelo grupo de enzimas denominadas, fosfatase ácida, beta-glucosidase e arilsulfatase, poderiam ocorrer em função da influência da planta sobre a atividade biológica de rizosfera. Atividades de enzimas chaves do solo têm sido utilizadas para investigar a possível integração entre os processos bioquímicos e a qualidade do solo, refletida pelo status biológico do solo. As enzimas do grupo das beta-glicosidases são produzidas por uma variedade de organismos, entre eles, animais, plantas, fungos e bactérias. A beta-glicosidase é uma enzima que atua na etapa final do processo de decomposição da celulose, pela hidrólise dos resíduos de celobiose, e alterações em sua atividade podem ter, portanto, influência sobre a qualidade do solo. Pelos resultados encontrados nos estudos com as variedades de feijoeiro, pode-se concluir que a modificação genética para resistência ao vírus do mosaico dourado não implicou de forma sensível e consistente em alterações na planta capazes de influenciar atividades enzimáticas chaves na dinâmica de C, S e P, na região da rizosfera do feijoeiro.

O feijoeiro GM resistente ao mosaico dourado foi escolhido como modelo do projeto internacional “GMO Environmental Risk Assessment Methodologies” (GMO-ERA) para aplicação de uma metodologia denominada Formulação do Problema e Avaliação das Opções (“*Problem Formulation and Options Assessment*” – PFOA; <http://www.gmoera.umn.edu/public/science/pfoa.html>). O PFOA é uma metodologia para



conduzir uma formulação deliberativa de problemas e uma avaliação comparativa de alternativas futuras relacionadas com a biossegurança de OGMs. Seus pressupostos implicam um questionamento do modelo positivista de ciência e uma orientação para o modelo de consulta (CGEE, 2008; Guivant et al., 2010). A proposta do PFOA tem por base uma visão de governança que envolve diferentes práticas promotoras de uma relação de mão dupla entre governos e cidadãos, através da participação, da transparência e da *accountability* (prestação de contas). Através do PFOA é possível que cientistas e reguladores possam ter meios de avaliarem a compreensão e acessibilidade a informações relevantes a serem abertas à sociedade. O PFOA distingue-se de outras metodologias porque focaliza principalmente na necessidade de delinear uma estratégia que relacione a avaliação de riscos ambientais dos OGMs com as perspectivas de diversos atores sociais envolvidos com estas inovações, incluindo aspectos sociais, econômicos e éticos mais amplos (Capalbo et al., 2006).

O feijoeiro Embrapa 5.1 foi escolhido para esse projeto porque (1) ainda não havia sido submetido à CTNBio para liberação de plantios comerciais, evitando assim conflito de análises; (2) encontrava-se em fase de teste de campo, portanto com informações básicas bastante avançadas; (3) apresenta o desafio de ser direcionado para o consumo humano, o que inclui nas discussões as percepções da segurança alimentar além da ambiental; (4) o feijão representa uma parte importante da alimentação básica no país; e (5) envolve pequenos e grandes produtores rurais em diversas regiões. Para esse ensaio foram convidados membros representantes de supermercados, formadores de opinião em biotecnologia, representante dos produtores, pesquisadores da área de sociologia rural, representantes de empresas de biotecnologia multinacional, da área médica, cooperativas agrícolas, associação de donas de casa, representante dos consumidores, ambientalistas, representante da Confederação Nacional das Indústrias e Associação Brasileira de Agroecologia. Como resultado esse grupo concluiu que o feijoeiro GM (1) é uma alternativa relevante para o controle do mosaico dourado; (2) possui vantagens significativas, pelo menos em curto prazo, no referente à redução do uso de agroquímicos, proteção à saúde dos produtores rurais e à redução do custo de produção; (3) significativos benefícios para os produtores rurais, embora possa implicar em transformações na dinâmica do



mercado de feijão; (4) necessidade de transparência das informações para os consumidores, permitindo o direito de escolha. (CGEE, 2008; Guivant et al., 2010).



Lista de Figuras

Seção V

Figura V.1. Fenologia genérica do feijoeiro comum

Figura V.2. Área colhida de feijão por safra no Brasil, período de 1985 a 2009. Fonte: IBGE (2010b).

Figura V.3. Produtividade média de feijão na primeira, segunda e terceira safras e média geral das três safras no Brasil, período de 1985 a 2009. Fonte: IBGE (2010b).

Figura V.4. Produção de feijão no Brasil considerando as três safras, período de 1985 a 2009. Fonte: IBGE (2010b).

Figura V.5. Participação no abastecimento do mercado brasileiro do feijão da primeira, segunda e terceira safras e das importações de feijão, período de 1998 a 2009. Fonte: CONAB (2010), IBGE (2010b).

Figura V.6. Oscilação dos preços de feijões carioca e preto em US\$ por saca de 60 kg, pagos aos produtores no Estado do Paraná em 1989 e 2006.

Figura V.7. Participação percentual das faixas de participação na produção de feijão no Brasil, média dos triênios 1990-1992 e 2003-2005. Fonte: IBGE (2010d).

Figura V.8. Produções proporcionais da produção de feijão nas microrregiões brasileiras no triênio 1990-1992. Fonte: IBGE (2010d).

Figura V.9. Produções proporcionais da produção de feijão nas microrregiões brasileiras no triênio 2003-2005. Fonte: IBGE (2010d).

Figura V.10. Variação percentual da produção de feijão nas microrregiões brasileiras entre os triênios 1990-1992 e 2003-2005. Fonte: IBGE (2010d).

Figura V.11. Faixas de produtividade de feijão nas microrregiões, considerando a média do triênio 1990-1992. Fonte: IBGE (2010d).

Figura V.12. Faixas de produtividade de feijão nas microrregiões, considerando a média do triênio 2003-2005. Fonte: IBGE (2010d).



Figura V.13. Consumo *per capita* anual de feijão no Brasil. Fonte: FAO (2010), IBGE (2010a, 2010c).

Figura V.14. Faixas de consumo domiciliar *per capita* de feijão nos estados em 2002-2003. Fonte: IBGE (2010c).

Figura V.15. Consumo domiciliar *per capita* de feijão no Brasil por faixa de renda em 2002-2003. Fonte: IBGE (2010c).

Figura V.16. Desenvolvimento do evento Embrapa 5.1. O evento 5.1 foi inicialmente testado em condições de casa de vegetação mostrando alta resistência ao mosaico dourado, mesmo após inoculação mediada por um grande número de moscas brancas virulíferas por planta e durante todo o ciclo de vida da planta. Essas plantas foram testadas em condições de campo e também demonstraram alta resistência em condições de inoculação natural, em que as plantas não-GM mostram cerca de 18% (em 2007) e 90% (em 2008), enquanto as plantas GM não mostraram sintomas.

Figura V.17. Probabilidade de ocorrência dos Begomovirus que infectam feijão (*Bean golden mosaic virus* e *Bean golden yellow mosaic vírus*) (adaptado de Morales & Jones, 2004)

Figura V.18. Sintomas causados pelo *Bean golden mosaic virus*. a) Campo em que praticamente todas as plantas estão infectadas pelo vírus. b) Plantas com sintomas de mosaico e nanismo (embaixo) comparadas com plantas saudáveis (acima). c) Planta mostrando nanismo e deformação nas vagens. (d) Vagens de plantas infectadas (esquerda) comparadas com vagens produzidas em plantas saudáveis (direita).

Figura V.19. Organização genômica de Begomovirus. As setas representam as seções abertas de leitura (ORF). Rep – proteína associada à replicação; cp – capa protéica, TrAP- proteína ativadora da transcrição, REN- proteína amplificadora da replicação, CR- região comum, NSP – proteína de movimento nuclear (*nuclear shuttle*), e MP – proteína de movimento.

Figura V.20. Adultos de mosca branca em soja (esquerda) e feijão (direita).

Figura V.21. Culturas hospedeiras da mosca branca no panorama do sistema agrícola de produção no Centro Oeste.

Figura V.22. Plantio escalonado de feijoeiro contribuindo para o avanço da mosca branca e conseqüentemente do mosaico dourado sob pivô central.

Figura V.23. Um RNA de dupla fita (dsRNA) é expresso na célula (como a construção do transgene, RNA virais, etc.) e é reconhecido e clivado pela Dicer, que é membro da superfamília das RNase III, com a geração de RNA de dupla fita pequenos (siRNA) que são caracterizados por dois nucleotídeos salientes na região 3'. Estes siRNA formam um complexo com

ribonucleoproteínas, chamado de RISC. O complexo inclui uma nuclease chamada de Slicer que promove o relaxamento dos siRNA. O siRNA de fita simples associado a RISC é acoplado ao RNA alvo de uma maneira que é seqüência específica. O RNA alvo é clivado e pode ser reconhecido pela célula como aberrante e é em seguida degradado, impedindo a sua tradução e, conseqüentemente levando ao silenciamento gênico. Em plantas, o RNA aberrante pode também servir como molde para uma RNA polimerase RNA-dependente (RdRP) para fazer uma nova molécula de dsRNA em um processo não mediado por *primer*. O dsRNA resultante é substrato para Dicer, o que gera mais siRNAs. Em plantas e outros organismos, siRNA não associado à RISC se ligam ao mRNA alvo de uma forma específica e serve como um *primer* para uma RdRP polimerase para síntese da fita antisenso, gerando um dsRNA, que também é um substrato para a Dicer (adaptado de Aragão & Figueiredo, 2009).

Figura V.24. Ilustração simplificada mostrando o mecanismo de ação do transgene para obtenção de resistência ao geminivírus BGMV pelo mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS). As plantas transgênicas de feijoeiro foram modificadas para expressar um RNA de dupla fita (dsRNA) com uma seqüência do gene viral *rep* (que codifica para a proteína Rep, essencial para que ocorra a replicação viral). O dsRNA é convertido em siRNA de dupla fita por RNaseIII tipo-Dicers (DCL) que são metilados no terminal 3' por RNA methyltransferase (HEN). Uma das fitas dos siRNA são subseqüentemente incorporados ao RISC. Uma das proteínas que compõe o complexo RISC é Argonaute (AGO1). Guiado pelo siRNA complementar Argonaute cliva o mRNA alvo, levando ao silenciamento gênico. Após a infecção das células vegetais, o BGMV expressa na célula vegetal a proteína Rep que é essencial para que ocorra a replicação viral. No entanto, nas plantas de feijoeiro geneticamente modificadas o gene *rep* é silenciado, levando então à não expressão de Rep, interferindo no ciclo viral. Isso foi capaz de gerar plantas resistentes ao vírus de forma estável e duradoura.

Figura V.25. Mapa do vetor pBGMVRNAiAHAS. *ahas5'*: promotor do gene da acetolactato sintase de *A. thaliana*; *ahas*: região codificante para a acetolactato sintase de *A. thaliana*; *ahas3'*: acetolactato sintase *Arabidopsis thaliana*; 35ScaMV: promotor do RNA 35S do *Cauliflower mosaic virus*; *rep*: fragmento de 411 pb do gene *rep* (*AC1*) do *Bean golden mosaic virus*; *intron pdk*: intron do gene que codifica para a piruvato ortofosfato diquinase de *Flaveria trinervia*; *ocs3'*: terminador do gene da octopina sintase de *Agrobacterium tumefaciens*; *bla*: gene da beta-lactamase de *Escherichia coli*. Para transformação genética pelo processo de biobalística, esse vetor foi previamente clivado com a enzima *FspI*.

Figura V.26. Mapa linear do vetor pBGMVRNAiAHAS utilizado para transformação do evento Embrapa 5.1 (caixa superior) e da estrutura do locus de integração. O vetor pBGMVRNAiAHAS foi digerido com *FspI* antes de ser utilizado na transformação de feijoeiro pelo método de biobalística. Não foram encontradas seqüências do gene *bla* íntegras presentes no locus de integração.

Figura V.27. Análises de Southern para detecção dos transgenes no evento Embrapa 5.1. O DNA genômico foi digerido com *EcoRI* (E), *XbaI* (X), *KpnI* (K), *NcoI* (N) e *SphI* (S), transferido para

uma membrana de nylon e sequencialmente hibridizado com sondas radiativas correspondendo a fragmentos do ahas5'(1), 35SCaMV (2), nos3' (3) e bla (4). Como controles (C) foram usadas plantas não-GM cujo genoma foi digerido com *EcoRI* e *XbaI*. M= marcador de massa molecular (kb) 1 kb Ladder.

Figura V.28. Análise usando RT-PCR para detecção de possível transcrição da ORF 35SPv1 em folhas do evento Embrapa 5.1. Cont+: 15 ng de DNA genômico do evento Embrapa 5.1. Plantas não GM (Olathe foram utilizadas como controle negativo, uma vez que a região de 35SPv1 a jusante de 35SCaMV truncado não é anotada como uma região gênica. O gene de expressão constitutiva *PvEF1a* (fator de alongamento alfa) foi utilizado como controle interno.

Figura V.29. Hibridização fluorescente in situ (*FISH*) de alta resolução para detecção do locus de integração dos transgenes nos *cromossomos* meióticos do evento de feijoeiro Embrapa 5.1. A seta mostra a marcação da detecção de um único locus com presença de sinal gerado pela sonda correspondente aos transgenes inseridos nesse evento de transformação.

Figura V.30. Análise de Northern blot para detecção de siRNA isolados de plantas do evento Embrapa 5.1. As plantas foram mantidas em contato com moscas brancas virulíferas por um período de 6 dias e então removidas. O RNA total foi isolado das folhas 6 e 12 dias após a inoculação (dai) de plantas inoculadas (i) e não-inoculadas (ni) com o BGMV. As membranas foram hibridizadas com sondas correspondentes a fragmentos dos genes virais *AC1* (sonda a), *AC2* (sonda b) e *AC3* (sonda c). Os géis estão mostrados respectivamente em A, B e C. As sondas estão mostradas em E (representação esquemática do componente A do BGMV). C+: 50 ng de oligos contendo seqüências dos genes *AC1* (em A), *AC2* (em B), e *AC3* (em C) do BGMV. Géis mostrando os RNA totais corados com brometo de etídio estão mostrados abaixo de cada membrana. Todas as plantas geneticamente modificadas evento Embrapa 5.1 se mantiveram livres de sintomas enquanto que as plantas não geneticamente modificadas que foram inoculadas apresentaram sintomas severos. D mostra uma análise semi-quantitativa por PCR do DNA viral presente nas amostras. O gene *Pv18SrRNA* foi usado como controle interno.

Figura V.31. Análise de Northern blot para detecção de siRNA isolados de plantas do evento Embrapa 5.1 cultivadas por um período de 5 dias em distintas temperaturas. NT = plantas não geneticamente modificadas; T = plantas geneticamente modificadas evento Embrapa 5.1.

Figura V.32. A) Detecção de siRNA de folhas de plantas cultivadas no campo em Londrina (PR), Santo Antônio de Goiás (GO) e Sete Lagoas (MG). B) Gel mostrando o RNA total isolados de folhas e sementes.

Figura V.33. Análise da presença de siRNA em sementes. A) Vagens colhidas 10 (1), 15 (2), 20 (3) e 25 (4) dias após a polinização, entre os estágios R_8 e R_9 . As sementes dessas vagens foram analisadas para a presença de siRNA específicos decorrentes da expressão do transgene *ΔAC1hpRNA*. Também foram analisadas sementes secas e sementes secas embebidas por 16h. Os



níveis de siRNA detectados em sementes podem ser comparados com aqueles observados em folhas. C) Gel mostrando o RNA total isolados de folhas e sementes.

Figura V.34. Análises de RT-PCR para detecção de transcritos dos genes *AtAhas* e *Atsec61* presentes no genoma do evento Embrapa 5.1. O gene *Pv18SrRNA* foi usado como controle interno.

Figura V.35. Análise da presença da proteína AtAHAS em folhas de *A. thaliana*, Olathe convencional (não GM) e o evento GM Embrapa 5.1 (A, B e C). As análises foram realizadas com anticorpo produzido com os peptídeos PEP. 08/22 (A), PEP 08/24 (B) e PEP 08/25). Resultados de 10 repetições biológicas.

Figura V.36. Análise da presença da proteína AtAHAS em folhas, raízes, flores e sementes em vários estágios de desenvolvimento (Sementes 1 a 4 se referem às vagens segundo Figura V.33, seção V.10). O anticorpo gerado com o peptídeo PEP. 08/22 foi utilizado para analisar a presença de AtAHAS no evento Embrapa 5.1 e o Olathe não-GM. Resultados de 10 repetições biológicas.

Figura V.37. Avaliação da tolerância ao herbicida imazapyr 80 nM in vitro. Os embriões foram cultivados em meio contendo imazapyr e a frequência de sobrevivência foi analisada ao longo de 4 semanas para o evento Embrapa 5.1 comparado à mesma variedade não GM (A) e a linhagem derivada resultante de cruzamentos com a var. BRS Pontal (B).

Figura V.38. Esquema mostrando as várias gerações do evento Embrapa 5.1 e após cruzamentos com a variedade BRS Pontal. Os quadros cinza mostram plantas que foram utilizadas para a detecção de seqüências específicas por PCR. O resultado dessas análises pode ser visto na Figura V.39.

Figura V.39. Análise de PCR para amplificação de fragmentos específicos para o evento Embrapa 5.1. A: DNA do evento Embrapa 5.1 (Olathe); B: Parental Olathe não-GM; C: evento BRS Pontal 5.1 (Carioca). M: marcador 1 kb Ladder (Invitrogen).

Figura V.40. Gráfico dos pontos gerados em análise de componentes principais entre as duas componentes que mais contribuíram para a variância observada (Prin1 e Prin2) para o conjunto dos três locais do ano de 2008.

Figura V.41. Gráfico dos pontos gerados em análise de componentes principais entre as duas componentes que mais contribuíram para a variância observada (Prin1 e Prin2) para o conjunto de dois locais do ano de 2009.

Figura V.42. Análise de Southern para demonstração da estabilidade dos transgenes presentes no evento Embrapa 5.1 (A). As análises foram realizadas nas gerações F_0 (planta mãe ou evento primário, poço 1), F_1 (poço 2), F_2 (poço 3), F_3 (poço 4), F_4 (poço 5) e F_8 (poço 6) após autopolinização e após cruzamento e retro-cruzamentos com a var BRS Pontal não geneticamente



modificada [geração F₁ do retrocruzamento 1 (RC1F₁, poço 7), geração F₂ do retrocruzamento 2 (RC2F₂, poço 8), geração F₂ do retrocruzamento 3 (RC3F₂, poço 9) e geração F₁ do retrocruzamento 4 (RC4F₁, poço 10)]. O poço 11 corresponde a uma planta de feijoeiro não geneticamente modificado. O genoma das plantas foi digerido com a enzima *Xba*I e analisado com a sonda correspondente a um fragmento do 35SCaMV. (B) Esquema para mostrar as diversas gerações em que as plantas foram amostradas (quadros em azul).

Seção VI

Figura VI.1. Consumo médio, em mil toneladas, de feijões desidratados em cada triênio, entre 1993 e 2007, por continente. Fonte: adaptado de FAO (2010).

Figura VI.2. Volume médio de feijões importados em cada triênio (entre 1993-2007) por continente. Fonte: adaptado de FAO (2010).

Figura VI.3. Volume total de feijões desidratados consumidos por continente com destaque para o volume de grãos importados pelos 20 principais importadores mundiais, considerando-se a média do triênio 2005-2007. Fonte: adaptado de FAO (2010).

Figura VI.4. Volume de exportações, em mil toneladas, de Myanmar, China, Estados Unidos, Argentina e Canadá entre 1993 e 2007. Fonte: adaptado de FAO (2010).

Figura VI.5. Comparação entre suprimento, consumo, produção, importação e exportação de feijões (*Phaseolus* e *Vigna*) no Brasil, em mil toneladas, entre 2000 e 2009. Fonte: adaptado da Conab (2010).

Figura VI. 6. Volume de feijões *Phaseolus* exportados, em toneladas, em comparação com volume total de feijões exportado (*Phaseolus* e *Vigna*) no período 1996-2009. Fonte: Adaptado do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (2010)

Figura VI.7. Valores totais negociados na exportação de feijões *Phaseolus*, em mil US\$ FOB, em comparação com totais negociados de feijões (*Phaseolus* e *Vigna*) no período 1996-2009. Fonte: adaptado do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (2010).

Figura VI.8. Variação (valores máximos e mínimos) de nutrientes encontrada no evento Embrapa 5.1 (blocos coloridos), cultivado em campos de Sete Lagoas-MG, Londrina-PR e Santo Antônio de Goiás-GO nos anos de 2008 e 2008, comparada com a variação encontrada em feijoeiro cultivados no Brasil (linhas).

Figura VI.9. Variação (valores máximos e mínimos) de nutrientes e anti-nutrientes encontrada no evento Embrapa 5.1 (blocos coloridos), cultivado em campos de Sete Lagoas-MG, Londrina-PR

e Santo Antônio de Goiás-GO nos anos de 2008 e 2008, comparada com a variação encontrada em feijoeiro cultivados no Brasil (linhas)

Figura VI.11. Análise em 2D-PAGE das principais proteínas abundantes em grãos de feijão (evento GM Embrapa 5.1 e o receptor dos transgenes var. Olathe) cultivados em Santo Antônio de Goiás (GO). O quadrado acima mostra outro 2D-PAGE com detalhamento das proteína entre pH 4,0 e 10,0.

Figura VI.12. Análise em 2D-PAGE das principais proteínas abundantes em grãos de feijão (evento GM Embrapa 5.1 e o receptor dos transgenes var. Olathe) cultivados em Sete Lagoas (MG). O quadrado acima mostra outro 2D-PAGE com detalhamento das proteína entre pH 4,0 e 10,0.

Figura VI.13. Análise em 2D-PAGE das principais proteínas abundantes em grãos de feijão (evento GM Embrapa 5.1 e o receptor dos transgenes var. Olathe) cultivados em Londrina (PR). O quadrado acima mostra outro 2D-PAGE com detalhamento das proteína entre pH 4,0 e 10,0.

Figura VI.14. Peso inicial (P-i) e peso final (P-f) dos animais GC (controle-caseína), GFT (evento Embrapa 5.1), GFC (feijão comum) e GA (aprotéico) submetidos a 45 dias de tratamento com 10% de proteína.

Figura VI.15. Evolução de ganho de peso dos animais GC (controle-caseína), GFT (evento Embrapa 5.1), GFC (feijão comum) e GA (aprotéico) submetidos a 45 dias de tratamento com 10% de proteína.

Figura VI.16. Revestimento do estômago, com ênfase na mucosa e submucosa do corpo do estômago dos animais GC (controle-caseína), GFT (evento Embrapa 5.1), GFC (feijão comum) e GA (aprotéico), submetidos a 45 dias de tratamento com 10% de proteína (lente 10x/0,25).

Figura VI.17. Altura (μm) das mucosas de revestimento do estômago dos animais (ratos Wistar) com 64 dias de idade, submetidos a 45 dias de tratamento: C (controle-caseína), FT (evento Embrapa 5.1), FC (feijão convencional) e A (aprotéico).

Figura VI.18. Intestino delgado, com ênfase nas vilosidades do duodeno dos animais GC (controle-caseína), GFT (evento Embrapa 5.1), GFC (feijão comum) e GA (aprotéico) submetidos a 45 dias de tratamento com 10% de proteína (lente 10x/0,25).

Figura VI.19. Altura (μm) das vilosidades do intestino delgado (duodeno) dos animais (ratos Wistar) com 64 dias de idade, submetidos a 45 dias de tratamento: C (controle-caseína), FT (evento Embrapa 5.1), FC (feijão convencional) e A (aprotéico).



Figura VI.20. Intestino delgado, com ênfase nas vilosidades do jejuno dos animais GC (controle-caseína), GFT (evento Embrapa 5.1), GFC (feijão comum) e GA (aprotéico), submetidos a 45 dias de tratamento com 10% de proteína (lente 10x/0,25).

Figura VI.21. Altura (μm) das vilosidades do intestino delgado (jejuno) dos animais (ratos Wistar) com 64 dias de idade, submetidos a 45 dias de tratamento: C (controle-caseína), FT (evento Embrapa 5.1), FC (feijão convencional) e A (aprotéico).

Figura VI.22. Intestino delgado, com ênfase nas vilosidades do íleo dos animais GC (controle-caseína), GFT (evento Embrapa 5.1), GFC (feijão comum) e GA (aprotéico), submetidos a 45 dias de tratamento com 10% de proteína (lente 10x/0,25)

Figura VI.23. Altura (μm) das vilosidades do intestino delgado (íleo) dos animais (ratos Wistar) com 64 dias de idade, submetidos a 45 dias de tratamento: C-Cas (controle-caseína), FT (evento Embrapa 5.1), FC (feijão convencional) e A (aprotéico).

Figura VI.24. Intestino delgado, com ênfase nas vilosidades do cólon dos animais GC (controle-caseína), GFT (evento Embrapa 5.1), GFC (feijão comum) e GA (aprotéico), submetidos a 45 dias de tratamento com 10% de proteína (lente 10x/0,25).

Figura VI.25. Altura (μm) das vilosidades do intestino grosso (cólon) dos animais (ratos Wistar) com 64 dias de idade, submetidos a 45 dias de tratamento: C (controle-caseína), FT (evento Embrapa 5.1), FC (feijão convencional) e A (aprotéico).

Figura VI.26. Tecido hepático, com ênfase nos hepatócitos dos animais GC (controle-caseína), GFT (evento Embrapa 5.1), GFC (feijão comum) e GA (aprotéico), submetidos a 45 dias de tratamento com 10% de proteína (lente 20x/0,25).

Figura VI.27. Peso (g) do fígado dos animais GC (controle-caseína), GFT (evento Embrapa 5.1), GFC (feijão comum) e GA (aprotéico) submetidos a 45 dias de tratamento com 10% de proteína.

Figura VI.28. Tecido renal (região cortical), com ênfase nas células renais dos animais GC (controle-caseína), GFT (evento Embrapa 5.1), GFC (feijão comum) e GA (aprotéico), submetidos a 45 dias de tratamento com 10% de proteína (lente 20x/0,25).

Figura VI.29. Peso (g) dos rins (RD: rim direito e RE: rim esquerdo) dos animais C (controle-caseína), A (aprotéico), FT (evento Embrapa 5.1) e FC (feijão comum) submetidos a 45 dias de tratamento com 10% de proteína.

Figura VI.30. Busca por moléculas de siRNA possivelmente geradas nas plantas transgênicas do evento 5.1 com potencial de silenciamento de genes do genoma de *Homo sapiens*. (A) Apesar de alguns possíveis siRNA mostrarem similaridades de seqüência (como é esperado de acontecer pelo menos a cada 16.384 bp. Essas seqüências têm um potencial extremamente baixo de



apresentarem um efeito “off-target” (baseado em parâmetros de similaridade de sequência e parâmetros termodinâmicos para 7 nt). (B) Nenhuma sequência foi encontrada com características termodinâmicas para que se pudesse prever algum potencial de efeito “off-target” em células de humanos, camundongos, ratos ou *C. elegans*.

Seção VII

Figura VII.1. Número médio total de artrópodes da superfície do solo capturados em armadilha de queda em parcelas de feijoeiro Olathe transgênico (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional plantados em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

Figura VII.2. Número médio de uma morfoespécie de ácaro (ácaro n° 2) capturado em armadilha de queda em parcelas de feijoeiro Olathe transgênico (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional plantados em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

Figura VII.3. Número médio de morfoespécies de colêmbolos capturado em armadilha de queda em parcelas de feijoeiro Olathe transgênico (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional plantados em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

Figura VII.4. Número médio de *Solenopsis* spp. capturado em armadilha de queda em parcelas de feijoeiro Olathe transgênico (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional plantados em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

Figura VII.5. Número médio total de artrópodes da superfície do solo capturados em armadilhas de queda em parcelas de feijoeiro Olathe transgênico (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional plantados em 2008 e 2009 em Londrina, PR.

Figura VII.6. Número médio de uma morfoespécie de ácaro (ácaro n° 2) capturado em armadilhas de queda em parcelas de feijoeiro Olathe transgênico (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional plantados em 2008 e 2009 em Londrina, PR.

Figura VII.7. Número médio de morfoespécies de colêmbolos capturado em armadilhas de queda em parcelas de feijoeiro Olathe transgênico (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional plantados em 2008 e 2009 em Londrina, PR.

Figura VII.8. Número médio de *Solenopsis* spp. capturado em armadilhas de queda em parcelas de feijoeiro Olathe transgênico (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional plantados em 2008 e 2009 em Londrina, PR.



Figura VII.9. Número médio total de artrópodes da superfície do solo capturados em armadilhas de queda em parcelas de feijoeiro Olathe transgênico (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional plantados em 2008 e 2009 em Sete Lagoas, MG.

Figura VII.10. Número médio de uma morfoespécie de ácaro (ácaro n° 2) capturado em armadilhas de queda em parcelas de feijoeiro Olathe transgênico (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional plantados em 2008 e 2009 em Sete Lagoas, MG.

Figura VII.11. Número médio de morfoespécies de colêmbolos capturado em armadilhas de queda em parcelas de feijoeiro Olathe transgênico (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional plantados em 2008 e 2009 em Sete Lagoas, MG.

Figura VII.12. Número médio de *Solenopsis* spp. capturado em armadilhas de queda em parcelas de feijoeiro Olathe transgênico (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional plantados em 2008 e 2009 em Sete Lagoas, MG.

Figura VII.13. Número médio de adultos da vaquinha, *Cerotoma arcuata*, amostrado na parte aérea em dois metros de plantio do feijoeiro Olathe (convencional) e feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

Figura VII.14. Número médio de adultos da vaquinha *Diabrotica speciosa* amostrado na parte aérea em dois metros de plantio feijoeiro Olathe (convencional) e feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) plantados em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

Figura VII.15. Número médio de orifícios de alimentação de vaquinhas (*Diabrotica speciosa* e *Cerotoma arcuata*) por folha de feijoeiro Olathe (convencional) e feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) plantados em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

Figura VII.16. Comprimento médio menor do orifício de alimentação de vaquinhas (*Diabrotica speciosa* e *Cerotoma arcuata*) em folhas de feijoeiro Olathe (convencional) e feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) plantados em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

Figura VII.17. Comprimento médio maior do orifício de alimentação de vaquinhas (*Diabrotica speciosa* e *Cerotoma arcuata*) em folhas de feijoeiro Olathe (convencional) e feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) plantados em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

Figura VII.18. Número médio de ninfas e adultos da cigarrinha-verde *Empoasca kraemeri* amostrado na parte aérea em dois metros de plantio do feijoeiro Olathe (convencional) e feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) plantados em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

Figura VII.19. Número médio de ninfas e adultos da cigarrinha verde *Empoasca Kraemeri* por folha avaliado com o uso de microscópio estereoscópico em feijoeiro Olathe (convencional) e feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) plantados em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.



Figura VII.20. Número médio de formigas amostrado na parte aérea em dois metros de plantio do feijoeiro Olathe (convencional) e feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

Figura VII.21. Número médio de morfoespécies de aranhas amostrado na parte aérea em dois metros de plantio do feijoeiro Olathe (convencional) e feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

Figura VII.22. Número médio total de predadores amostrado na parte aérea em dois metros de plantio do feijoeiro Olathe (convencional) e feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

Figura VII.23. Número médio total de artrópodes amostrado na parte aérea em dois metros de plantio do feijoeiro Olathe (convencional) e feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

Figura VII.24. Número médio de adultos da mosca-branca *Bemisia tabaci* por folha de feijoeiro Olathe (convencional) e feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) plantados em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO (n= 80).

Figura VII.25. Número médio de ovos de *Bemisia tabaci* por folha amostrado com o uso de microscópio estereoscópico em feijoeiro Olathe (convencional) e feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) plantados em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

Figura VII.26. Número médio de ninfas de *Bemisia tabaci* por folha amostrado com o uso de microscópio estereoscópico em feijoeiro Olathe (convencional) e feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) plantados em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

Figura VII.27. Número médio de ninfas e adultos do trips amarelos por folha amostrado com o uso de microscópio estereoscópico em feijoeiro Olathe (convencional) e feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) plantados em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

Figura VII.28. Número médio de ninfas e adultos do ácaro branco, *Polyphagotarsonemus latus*, por folha amostrado com o uso de microscópio estereoscópico em feijoeiro Olathe (convencional) e feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) plantados em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

Figura VII.29. Número médio total de artrópodes por folha amostrado com o uso de microscópio estereoscópico em feijoeiro Olathe (convencional) e feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) plantados em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

Figura VII.30. Densidade de esporos de fungos micorrízicos arbusculares na rizosfera de plantas de feijão dos genótipos GM (Embrapa 5.1) e não-GM (Olathe=Olathe Pinto) em três localidades



nos anos de 2008 e 2009. Letras iguais nas barras indicam ausência de diferença pelo teste de Tukey 5%.

Figura VII.31. Colonização micorrízica das raízes de plantas de feijão GM (evento Embrapa 5.1) e não-GM (Olathe=Olathe Pinto) em três localidades nos anos de 2009. Letras iguais nas barras indicam ausência de diferença pelo teste de Tukey 5%.

Figura VII.32. Número de espécies de fungos micorrízicos arbusculares identificadas na rizosfera de plantas de feijão GM (Embrapa 5.1=Olathe 5.1) e não-GM (Olathe=Olathe Pinto) em três localidades no ano de 2009. Letras iguais nas barras indicam ausência de diferença pelo teste de Tukey 5%.

Figura VII.33. Análise de componentes principais para a presença e ausência de espécies de fungos micorrízicos arbusculares identificadas na rizosfera de plantas de feijão do evento GM (Embrapa 5.1 = OP 5.1) e seu parental Olathe (OP 5.1) em três localidades no ano de 2009. Pontos de referências em gramados, pastagens, mata e reflorestamentos foram tomados próximos às áreas experimentais como testemunhas.

Figura VII.34. Análise de componentes principais para a presença e ausência de espécies de fungos micorrízicos arbusculares identificadas na rizosfera de plantas de feijão do evento Embrapa 5.1 (OP 5.1) e seu parental Olathe (OP) em cinco experimentos em casa de vegetação.

Figura VII.35. Perfil de DGGE obtido de amostras de solo rizosférico obtidas de plantas cultivadas em sistema protegido sobre solo de Santo Antônio de Goiás. O feijoeiro evento Embrapa 5.1 geneticamente modificado foi identificado no dendrograma como Olathe 5.1, e o convencional, somente como Olathe.

Figura VII.36. Perfil de DGGE a partir de amostras obtidas na rizosfera de plantas cultivadas em Santo Antônio de Goiás. O feijoeiro geneticamente evento Embrapa 5.1 modificado foi identificado no dendrograma como Olathe 5.1, e o convencional, somente como Olathe.

Figura VII.37. Perfil de DGGE obtido de amostras de solo rizosférico obtidas de plantas cultivadas em sistema protegido sobre solo de Londrina (PR). O feijoeiro geneticamente modificado evento Embrapa 5.1 foi identificado no dendrograma como Olathe 5.1, e o convencional, somente como Olathe.

Figura VII.38. Perfil de DGGE rizosférico obtidos de plantas cultivadas em Londrina - PR. O feijoeiro geneticamente modificado evento Embrapa 5.1 foi identificado no dendrograma como Olathe 5.1, e o convencional, somente como Olathe.

Figura VII.39. Perfil de DGGE obtido de amostras de solo rizosférico obtidas de plantas cultivadas em sistema protegido sobre solo de Sete Lagoas – MG. O feijoeiro geneticamente



modificado evento Embrapa 5.1 foi identificado no dendrograma como Olathe 5.1, e o convencional, somente como Olathe.

Figura VII.40. Perfil de DGGE a partir de amostras obtidas na rizosfera de plantas cultivadas na unidade experimental em Sete Lagoas – MG. O feijoeiro geneticamente modificado evento Embrapa 5.1 foi identificado no dendrograma como Olathe 5.1, e o convencional, somente como Olathe.

Figura VII.41. Resultados do teste de atividade enzimática (A) arilsulfatase, (B) beta-glucosidase e (C) fosfatase ácida em solo dos dois experimentos em vasos, em casa-de-vegetação, proveniente de Santo Antônio de Goiás.

Figura VII.42. Resultados do teste de atividade enzimática (A) arilsulfatase, (B) beta-glucosidase e (C) fosfatase ácida em solo dos dois experimentos em vasos, em casa-de-vegetação, proveniente de Londrina. (PR= não GM; PR5.1= evento Embrapa 5.1).

Figura VII.43. Resultados do teste de atividade enzimática (A) arilsulfatase, (B) beta-glucosidase e (C) fosfatase ácida em solo dos dois experimentos em vasos, em casa-de-vegetação, proveniente de Sete Lagoas. . (MG= não GM; MG5.1= evento Embrapa 5.1).

Figura VII.44. Porcentagens de germinação de sementes de feijão do evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe antes (testemunha) e após diferentes tratamentos. EA- envelhecimento acelerado; SG- envelhecimento em sílica gel. Não se observou diferença estatisticamente significativa entre Embrapa 5.1 e seu parental Olathe ($p \leq 0.05$).

Figura VII.45. Crescimento de raízes de plantas do evento Olathe Embrapa 5.1 (Olathe 5.1) e de seu parental Olathe (Olathe Pinto) quando cultivadas em solos de baixa (esquerda) ou alta fertilidade (direita).

Figura VII.46. Avaliação da tolerância ao herbicida imazapyr 80 nM in vitro. Os embriões foram cultivados em meio contendo imazapyr e a frequência de sobrevivência foi analisada ao longo de 4 semanas para o evento Embrapa 5.1 comprado à mesma variedade não GM (A) e a linhagem derivada resultante de cruzamentos com a var. BRS Pontal (B).

Figura VII.47. Plantas do evento Embrapa 5.1 (Olathe 5.1) e seu parental Olathe (Olathe Pinto) mostrando os sintomas de toxidez após pulverização com herbicida do grupo químico das imidazolinonas. Para comparação, na esquerda está um grupo de plantas não pulverizadas com herbicidas (test). Não se observou diferença no fenótipo de plantas do evento Embrapa 5.1 quando comparadas às plantas do parental Olathe, após a aplicação de diversas dosagens de imazapic, imazapyr e imazamox.

Figura VII.48. Medida da atividade específica da enzima antioxidante catalase (resultado dos grupos - duas medidas em dias diferentes).



Figura VII.49. Medida da atividade específica da enzima antioxidante ascorbato peroxidase (resultado dos grupos - duas medidas em dias diferentes).

Figura VII.50. Medida da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em gel nativo de poliacrilamida – resultado representativo de duas amostras (1= parental Olathe não-GM; 151= evento Embrapa 5.1 GM)

Figura VII.51. Medida da peroxidação lipídica pelo método do alaranjado de xilenol – resultado de normal x transgênico (resultado de 06 indivíduos em cada grupo)

Figura VII.52. Investigação do perfil protéico em gel de poliacrilamida não desnaturante corado com Commassie Blue. As amostras 1, 2, 3, 4, 5 e 6 são não-GM (Olathe) e as amostras 151, 251, 351, 451, 551, 651 e 751 são plantas GM (evento Embrapa 5.1)

Figura VII.53. Medida do dano oxidativo a proteína pelo método oxyblot que investiga as proteínas carboniladas por meio de western blot. As amostras 351, 251 e 151 correspondem ao evento Embrapa 5.1 e as amostras 6, 5, 4, 3, 2 e 1 correspondem ao parental não-GM (Olathe).

Seção VIII

Figura VIII.1. Mapa mostrando as áreas com maior produção de feijão no Brasil. Os círculos correspondem às áreas a serem monitoradas com a liberação comercial do feijoeiro Embrapa 5.1

Anexo I

Figura AI.1. Esquema do vetor pBGMVRNAiAHAS mostrando a posição das sondas usadas nas análises de Southern.

Figura AI.2. Análise de detecção de transgenes em sementes por PCR usando DNA de feijão convencional (gel na esquerda em A e B) e evento Embrapa 5.1 (gel na direita em A e B). A) Sementes secas antes de cozimento e B) sementes após o cozimento. 1 a 5: DNA isolado usando o método CTAB; 6 a 10: DNA isolado. B) P: marcadores de massa molecular (*low mass*).

Figura AI.3. Processo de liofilização das amostras de feijão OGM e comum, previamente cozidas e homogeneizadas.

Figura AI.4. Dietas experimentais peletizadas: DFC, DFT, DCas e DA



Figura AI.5. Gaiolas metabólicas

Figura AI.6. Coleta de fezes dos grupos experimentais Controle-caseína, evento Embrapa 5.1 e Feijão Convencional.

Figura AI.7. Câmara de gás e autopsia dos animais sacrificados após 45 dias de tratamento.

Figura AI.8. Gaiolas comuns com tampa.

Figura AI.9. Mensuração de tamanho e peso do fígado e rins (direito e esquerdo)

Figura AI.10. Analisador de imagem histológicas.

Figura AI.11. Obtenção do plasma sanguíneo dos animais.

Figura AI.12. Armadilhas de queda (tipo *pitfalls*) utilizadas para amostragem de artrópodes na superfície do solo



Lista de Tabelas e Quadros

Seção V

Quadro V.1. Similaridade entre as seqüências de PvAHAS (AHAS endógeno de *P. vulgaris*) e AtAHAS (proteína codificada pelo transgene isolado de *A. thaliana*).

Tabela V.1. Classificação de cultivares de feijoeiro segundo seu sub-conjunto gênico (gene pool).

Tabela V.2. Etapas do desenvolvimento da planta do feijoeiro comum.

Tabela V.3. Estados superavitários (oferta – consumo > 0) do feijão no Brasil em 2005.

Tabela V.4. Participação das diferentes espécies na oferta de feijão no Brasil em 2005.

Tabela V.5. Variação da quantidade produzida de feijão nos Estados, considerando as médias de produção dos triênios 1990-1992 e 2003-2005.

Tabela V.6. Participação percentual dos Estados na produção total de feijão, de 1992 a 2005.

Tabela V.7. Número de microrregiões geográficas necessárias para agregar 50, 75 e 95% da produção de feijão no Brasil nos triênios 1990-1992 e 2003-2005.

Tabela V.8. Faixas de produtividade de feijão e o número de microrregiões geográficas, médias dos triênios 1990-1992 e 2003-2005.

Tabela V.9. Estoques iniciais e finais, produção, importação, suprimento, consumo e exportação de feijão (comum + caupi) no Brasil entre as safras 1997/98 e 2005/06.

Tabela V.10. Danos causados e períodos de proteção para reduzir o impacto do mosaico dourado.

Tabela V.11. Avaliação da geração F_1 de RC1= F_1 RC1 com BRS Pontal por PCR para a presença dos transgenes.

Tabela V.12. Avaliação da segregação da geração F_1 RC1 do cruzamento entre Pérola e Embrapa 5.1

Tabela V.13. Segregação do transgene baseado em PCR com primers para o gene *AtAhas* na geração F2RC4 do cruzamento entre BRS Pontal e o evento Embrapa 5.1



Tabela V.14. Segregação da resistência ao mosaico dourado (MD) na geração F2RC4 do cruzamento entre BRS Pontal e Embrapa 5.1 utilizando-se as plantas da Tabela V.13.

Tabela V.15. Segregação do transgene baseado em PCR com primers para o gene ahas na geração F2RC4 do cruzamento entre cultivar Pérola e Embrapa 5.1

Tabela V.16. Segregação da resistência ao mosaico dourado na geração F2RC4 do cruzamento entre cultivar Pérola e Embrapa 5.1 utilizando-se as plantas da Tabela V.15.

Tabela V.17. Segregação do transgene e da resistência ao mosaico dourado na geração F₁

Tabela V.18. Médias das variáveis agronômicas observadas em condições de campo cultivados no ano de 2008. Entre parêntese estão os valores mínimos e máximos observados para cada uma das variáveis analisadas

Tabela V.19. Médias das variáveis agronômicas observadas em condições de campo cultivados no ano de 2009. Entre parêntese estão os valores mínimos e máximos observados para cada uma das variáveis analisadas

Seção VI

Tabela VI.1. Contribuição dos continentes no consumo médio de feijões desidratados e no percentual de crescimento nos triênios 1993-1995 e 2005-2007.

Tabela VI.2. Composição de açúcares e vitaminas (cromatografia líquida) em grãos do evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe cultivados em três regiões do Brasil no ano agrícola de 2008. Os dados entre parênteses correspondem aos valores máximos e mínimos para cada componente analisado.

Tabela VI.3. Composição de aminoácidos (cromatografia líquida) em grãos do evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe cultivados em três regiões do Brasil no ano agrícola de 2008. Os dados entre parênteses correspondem aos valores máximos e mínimos para cada componente analisado.

Tabela VI.4. Análises físico-químicas em grãos do evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe cultivados em três regiões do Brasil no ano agrícola de 2008. Os dados entre parênteses correspondem aos valores máximos e mínimos para cada componente analisado.



Tabela VI.5. Composição de minerais em grãos do evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe cultivados em três regiões do Brasil no ano agrícola de 2008. Os dados entre parênteses correspondem aos valores máximos e mínimos para cada componente analisado.

Tabela VI.6. Composição de açúcares e vitaminas (cromatografia líquida) em grãos do evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe cultivados em três regiões do Brasil no ano agrícola de 2009. Os dados entre parênteses correspondem aos valores máximos e mínimos para cada componente analisado.

Tabela VI.7. Composição de aminoácidos (cromatografia líquida) em grãos do evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe cultivados em duas regiões do Brasil no ano agrícola de 2009. Os dados entre parênteses correspondem aos valores máximos e mínimos para cada componente analisado.

Tabela VI.8. Análises físico-químicas em grãos do evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe cultivados em duas regiões do Brasil no ano agrícola de 2009. Os dados entre parênteses correspondem aos valores máximos e mínimos para cada componente analisado.

Tabela VI.9. Composição de minerais em grãos do evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe cultivados em duas regiões do Brasil no ano agrícola de 2009. Os dados entre parênteses correspondem aos valores máximos e mínimos para cada componente analisado.

Tabela VI.10. Valores médios dos índices bioquímicos do soro para ratos Wistar machos recém-desmamados, submetidos a 45 dias de tratamento com 10% de proteína: GC (controle-caseína), GFT (evento Embrapa 5.1), GFC (feijão comum) e GA (aprotéico).

Seção VII

Tabela VII.1. Número médio, total e frequência (F) (%) de artrópodes da superfície do solo capturados em armadilhas de queda em parcelas de feijoeiro Olathe Pinto 5.1 (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional plantados em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

Tabela VII.2. Valores de $P > F$ para o número médio: do ácaro n° 2, de colêmbolos, de *Solenopsis* sp. e do total dos artrópodes coletados em armadilhas de queda em diferentes datas de amostragem em 2008 e 2009. Santo Antônio de Goiás, GO

Tabela VII.3. Número médio, total e frequência (F %) de artrópodes da superfície do solo capturados em armadilhas de queda em parcelas de feijoeiro Olathe Pinto 5.1 (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional plantados em 2008 e 2009 em Londrina, PR.



Tabela VII.4. Valores de $P > F$ para o número médio: do ácaro n° 2, de colêmbolos, de *Solenopsis* sp. e do total dos artrópodes coletados em armadilhas de queda em diferentes datas de amostragem em 2008 e 2009. Londrina, PR

Tabela VII.5. Número médio, total e frequência de ocorrência (FO, %) de artrópodes da superfície do solo capturados em armadilhas de queda em parcelas de feijoeiro Olathe Pinto 5.1 (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional plantados em 2008 e 2009 em Sete Lagoas, MG.

Tabela VII.6. Valores de $P > F$ para o número médio: do ácaro n° 2, de colêmbolos, de *Solenopsis* sp. e do total dos artrópodes coletados em armadilhas de queda em diferentes datas de amostragem em 2008 e 2009. Sete Lagoas, MG

Tabela VII.6. Número médio, total e frequência (F, %) de artrópodes amostrados na parte aérea em dois metros de plantio do feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) e seu parental não-GM (Olathe) em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

Tabela VII.7. Valores de $P > F$ para o número médio das vaquinhas (*Diabrotica speciosa* e *Cerotoma arcuata*), cigarrinha verde (*Empoasca kraemeri*), morfoespécies de aranhas, formigas, total de artrópodes e de predadores amostrados em dois metros na parte aérea do feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional (Olathe) em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

Tabela VII.8. Valores de $P > F$ para medida do comprimento maior e menor dos orifícios de alimentação de vaquinhas (*Diabrotica speciosa* e *Cerotoma arcuata*) em folhas de feijoeiro geneticamente modificado e convencional em 2008 e 2009. Santo Antônio de Goiás, GO.

Tabela VII.9. Valores de $P > F$ para o número médio de adultos, ovos e ninfas da mosca-branca (*Bemisia tabaci*), ácaro branco (*Polyphagotarsonemus latus*), cigarrinha verde (*Empoasca kraemeri*), tripes amarelos, artrópodes total amostrados com o uso de microscópio estereoscópico (exceto para mosca-branca) em folhas de feijoeiro geneticamente modificado e convencional em 2008 e 2009. Santo Antônio de Goiás, GO.

Tabela VII.10. Número médio, total e frequência (F, %) de artrópodes amostrados em folhas com o uso de microscópio estereoscópico em feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional (Olathe) plantados em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

Tabela VII.11. Número total e médio de insetos amostrados com placas brancas de poliondas (0,5 x 0,5 m) em feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) e seu parental não-GM (Olathe) plantados em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

Tabela VII.12. Número total e médio de insetos amostrados em flores do feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional (Olathe) plantados em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.



Tabela VII.13. Número total e médio de insetos polinizadores amostrados com rede entomológica em feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional (Olathe) plantados em 2008 e 2009. Santo Antônio de Goiás, GO.

Tabela VII.14. Número médio, total e frequência (F, %) de artrópodes amostrados em dois metros na parte aérea do feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional em 2008 e 2009 em Londrina, PR.

Tabela VII.15. Número médio, total e frequência (F, %) de artrópodes amostrados em folhas com o uso de microscópio estereoscópico em feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional plantados em 2008 e 2009 em Londrina, PR.

Tabela VII.16. Número médio, total e frequência (F, %) de artrópodes amostrados em dois metros na parte aérea do feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional em 2008 e 2009 em Sete Lagoas, MG.

Tabela VII.17. Número médio, total e frequência (F, %) de artrópodes amostrados em folhas com o uso de microscópio estereoscópico em feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional plantados em 2008 e 2009 em Sete Lagoas, MG.

Tabela VII.18. Efeito do feijoeiro Embrapa 5.1 geneticamente modificado e outros cultivares sobre parâmetros de desenvolvimento biológico de *Zabrotes subfasciatus*, caruncho do feijão.

Tabela VII.19. Efeito do feijoeiro Embrapa 5.1 geneticamente modificado e outros cultivares sobre o período de desenvolvimento médio (ovo a adulto), massa média (mg) e longevidade média de machos e fêmeas de *Zabrotes subfasciatus*, caruncho do feijão.

Tabela VII.20. Massa média inicial e final dos grãos, consumo dos grãos e porcentagem de consumo dos grãos do feijoeiro Embrapa 5.1 geneticamente modificado e outros cultivares por *Zabrotes subfasciatus*, caruncho do feijão.

Tabela VII.21. Comparação entre as médias de densidade total da macrofauna e mesofauna (indivíduos.m⁻²) do solo cultivado com feijoeiro Olathe (FC) e Embrapa 5.1 (FGM).

Tabela VII.22. Comparação entre as médias de riqueza (número de grupos taxonômicos) da macrofauna e mesofauna do solo cultivado com feijoeiro Olathe (FC) e evento Embrapa 5.1 (FGM).

Tabela VII.23. Comparação entre as médias de densidade da macrofauna do solo, expressas em número de indivíduos por m², provenientes de 8 repetições de amostras de solo cultivado com feijoeiro Olathe (FC) e o evento GM Embrapa 5.1 (FGM), em cada localidade de avaliação.



Tabela VII.24. Comparação entre as médias de densidade da mesofauna do solo, expressas em número de indivíduos por m², provenientes de 8 repetições e amostras de solo cultivado com feijoeiro Olathe (FC) e o evento GM Embrapa 5.1 (FGM), em cada localidade de avaliação.

Tabela VII.25. Comparação entre as médias gerais de densidade da macrofauna e mesofauna do solo, expressas em número de indivíduos por m², no solo cultivado com feijoeiro Olathe (FC) e o evento GM Embrapa 5.1 (FGM), provenientes de 24 dados (8 repetições x 3 locais de avaliação do experimento).

Tabela VII.26. Acumulação de matéria seca e nitrogênio em plantas do evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe, obtidas em cada um dos dois experimentos realizados com solos provenientes de campos de Londrina, Santo Antonio de Goiás e Sete Lagoas.

Tabela VII.27. Peso seco de nódulos em plantas do evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe, obtidas em cada um dos dois experimentos realizados com solos provenientes de campos cultivados em Londrina, Santo Antonio de Goiás e Sete Lagoas.

Tabela VII.28. Dependência pela FBN (%) por plantas do evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe, estimada em cada um dos dois experimentos realizados com solos provenientes de Londrina, Santo Antonio de Goiás e Sete Lagoas, utilizando-se as técnicas de abundância natural de ¹⁵N (Delta ¹⁵N) e diferença de N (Dif. N).

Tabela VII.29. Densidade de esporos de fungos micorrízicos arbusculares na rizosfera de plantas de feijão dos genótipos GM (Embrapa 5.1) e não-GM (Olathe) em cinco experimentos de casa de vegetação conduzidos na Embrapa Agrobiologia entre 2008 e 2010.

Tabela VII.30. Colonização por fungos micorrízicos arbusculares nas raízes de plantas de feijão GM (evento Embrapa 5.1) e não-GM (Olathe) em cinco experimentos de casa de vegetação conduzidos na Embrapa Agrobiologia durante 40 dias.

Tabela VII.31. Número de espécies de fungos micorrízicos arbusculares identificadas na rizosfera de plantas de feijão GM (Embrapa 5.1) e não-GM (Olathe) em cinco

Tabela VII.32. Biomassa microbiana e respiração basal, como referência da atividade microbiana, determinadas em solo rizosférico oriundo de áreas de cultivo com plantas do evento GM (evento Embrapa 5.1) e seu parental Olathe (não-GM), crescidas por cerca de 40 dias, em solos provenientes de Londrina, Santo Antonio de Goiás e Sete Lagoas, em condição de casa-de-vegetação.

Tabela VII.33. Biomassa microbiana e respiração basal, como referência da atividade microbiana, determinadas em solo rizosférico oriundo de áreas de cultivo com plantas do evento GM (evento Embrapa 5.1) e seu parental Olathe (não-GM), crescidas por cerca de 40 dias, em experimentos de campo plantados no ano de 2009, em Londrina, Santo Antonio de Goiás e Sete Lagoas.



Tabela VII.34. Avaliação de plantas da geração F_1 para verificação de fluxo gênico entre feijoeiros GM e seu parental não-GM. Fonte: adaptado de Faria et al. (2010).

Tabela VII.35. Influência da fertilidade do solo sobre o peso seco de brotos, rendimento de grãos e vagem por planta em genótipos de feijoeiro Embrapa 5.1, seu parental Olathe e seus derivados.

Tabela VII.36. influência da fertilidade de solos e genótipos sobre o número de sementes por vagem e pelo de 100 sementes no evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe e suas linhagens derivadas.

Tabela VII.37 Influência da fertilidade do solo e dos genótipos de feijoeiros Olathe Embrapa 5.1 e seus derivados sobre o índice de grãos colhidos e o comprimento máximo das raízes

Tabela VII.38. Influência da fertilidade do solo e dos genótipos de feijoeiros Olathe Embrapa 5.1 e seus derivados sobre o peso seco de raízes e comprimento específico de raízes

Anexo I

Quadro AI. 1. Sequência de AtAHAS e PvAHAS mostrando os peptídeos utilizados para síntese dos anticorpos específicos

Tabela AI.1. Primers utilizados nas análises de RT-PCR para detecção de transcritos dos genes *AtAhas* e *Atsec61γ*.

Tabela AI.2. Grupos de animais e tratamentos.

Tabela AI.3. Composição da dieta DCas, DA, DFT e DFC.

Tabela AI.4. Condições operacionais para calibração do analisador de aminoácidos.

Tabela AI.5. Condições operacionais para determinação de Ca, Mg, Fe, Cu e Zn por espectrofotometria de absorção atômica.



SEÇÃO V

Informações Relativas ao OGM

O evento a que se refere esse pedido de liberação comercial foi chamado de feijoeiro Embrapa 5.1, gerado com o uso da estratégia de RNA interferente (RNAi) e, é resistente ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro [cuja nomenclatura oficial em língua inglesa é *Bean golden mosaic virus* (BGMV)]. Em concordância com a orientação da OECD (2002) para designação de um identificador único para plantas transgênicas, o código único de identificação atribuído ao evento Embrapa 5.1 é EMB-PVØ51-1.

V.1. Identificação do evento de transformação genética, objetivo e utilização do OGM e seus derivados.

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.)

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L), a exemplo de outras importantes plantas alimentícias teve origem no Novo Mundo, tendo sido levado ao Velho Mundo após o descobrimento da América. No século passado, uma obra clássica sobre a origem das plantas cultivadas citava o feijoeiro, como espécie de origem desconhecida (De Candolle, 1983). Entretanto, o método fitogeográfico desenvolvido por Vavilov (1951), dá suporte à hipótese de origem nas Américas para o gênero *Phaseolus*.

Segundo Kaplan (1981), a falta de ocorrências de feijões selvagens entre os achados arqueológicos, a atual distribuição de tipos selvagens que se estende num arco de mais de 5.000 km desde o México até a Argentina, as características da espécie *Phaseolus vulgaris* e as



características morfológicas e fisiológicas das variedades crioulas (*land races*) que ocorrem ao longo do continente, suportam a hipótese de uma origem. Baseado em uma série de dados, supõe-se que o *P. vulgaris* foi domesticado independentemente na Mesoamérica e sul dos Andes (ver revisões em Gepts, 1998; Gepts et al., 2008; McClean et al., 2008; Kwak et al., 2009; Aragão et al., 2011). Gepts (1998) definiu a Mesoamérica como a região que engloba a parte sul do Golfo do México e a metade norte da América Central, enquanto que a região andina foi definida como a região que compreende o sul do Peru, Bolívia e parte da Argentina.

Kaplan (1981) discute três hipóteses relativas à origem das formas cultivadas da espécie, que são:

a) O feijoeiro teria sido domesticado na Mesoamérica e transportado para a América do Sul. As evidências que suportam e/ou contradizem esta hipótese são: *Phaseolus vulgaris* selvagens, parecidos com variedades crioulas simpátricas, são encontrados no México e tipos domesticados datados de cerca de 7.000 a.C. existem na Mesoamérica, porém, remanescentes selvagens de *P. vulgaris* não foram encontrados nos locais onde deveriam ocorrer.

b) O feijoeiro teria sido domesticado na América do Sul e transportado para a América do Norte. As evidências em favor desta hipótese são que os achados arqueológicos de feijões domesticados na América do Sul (Andes, sítio de Guitarrero, Peru) são mais antigos do que os da Mesoamérica (10.000 a.C. no Peru comparado com 7 000 a.C. na Mesoamérica).

c) O feijoeiro teria sofrido domesticações independentes ao longo da área de ocorrência do feijão selvagem (ou pelo menos nos dois pontos onde foram encontrados achados arqueológicos: Peru e México). As evidências em favor desta hipótese são as áreas de ocorrência de feijão selvagem, as características dos tipos domesticados que são diferentes e o fato de que as domesticações ocorreram em períodos anteriores àqueles em que contatos formais entre os continentes fossem conhecidos.

Os padrões eletroforéticos de faseolina. (principal proteína de reserva do feijoeiro), mencionados por Gepts & Debouck (1991) sugerem a existência de dois centros primários de domesticação (Mesoamérica e Sul dos Andes), originando dois principais grupos de cultivares: os de faseolina "S" e "T", respectivamente. Também foi proposto um centro de domesticação adicional (faseolinas B e CH), mais recente, localizado na Colômbia (os diferentes "tipos" de



faseolina são variantes desta proteína detectados como bandas em posições diferentes em gel de eletroforese bi-dimensional).

A existência destes centros de domesticação tem o suporte da constatação não apenas de diferenças morfológicas entre os tipos domesticados, mas também da ocorrência de dois conjuntos gênicos principais dentro da espécie *P. vulgaris*, já que mesmo um certo isolamento reprodutivo existe entre feijões com faseolina "T" e "S", produzindo os casos referidos na literatura como necrose híbrida (Singh & Gutiérrez, 1984): F₁s que são fracos e morrem sem deixar descendentes. Tal fato não ocorre em 100% dos cruzamentos executados entre os dois grupos de faseolina, e híbridos viáveis podem ser obtidos em alguns casos, mas não na maioria destes.

Evans (1973), baseando-se em características morfológicas (principalmente relacionadas a hábito de crescimento/arquitetura de planta e tamanho de sementes), classificou o germoplasma cultivado de *P. vulgaris* em cinco "raças". Em sua classificação, entretanto, vários tipos cultivados em outros continentes foram desconsiderados (Tabela V.1).

Estudos baseados em variações de características morfológicas, agronômicas e padrões de faseolina, sobre um grande número de acessos provenientes de diferentes regiões, levaram Singh (1988, 1989) a propor a subdivisão dos dois conjuntos gênicos primários em doze "sub-conjuntos" e, posteriormente, em seis "raças" (Singh et al., 1991). As "raças" propostas são as seguintes: *Mesoamérica* (conjuntos gênicos de 1 a 4); *Durango* (5); *Jalisco* (6); *Nueva Granada* (7 a 9); *Chile* (10); *Peru* (11 e 12). Esta subdivisão necessita de maiores estudos para ser comprovada ou ajustada. Dados moleculares poderão auxiliar a esclarecer tais divisões.

A domesticação produziu, no gênero *Phaseolus*, hábitos de crescimento mais compactos, eretos, com gigantismo das partes vegetativas, aumento do tamanho de vagens e sementes, perda de sensibilidade ao fotoperíodo e dormência na semente, além da redução na deiscência das vagens (Smartt, 1978a, 1978b).

Com relação ao Brasil, Gepts et al. (1988) sugerem que no mínimo duas, mas possivelmente três rotas distintas devem ser responsáveis pela introdução do feijão: uma para os feijões pequenos, mesoamericanos, seria originária do México, seguindo para o Caribe, Colômbia, Venezuela e daí para o Brasil; uma segunda rota seria para os feijões grandes, com



faseolina "T", como a cultivar Jalo, que deveria ser proveniente dos Andes (Peru); uma terceira rota seria proveniente da Europa, com os feijões sendo trazidos por imigrantes que de lá vieram (introduções mais recentes). Esta última rota é a mais provável para alguns casos como o do feijão Carnaval, preferido por imigrantes italianos.

Os tipos selvagens, sejam estes originários do México ou da Argentina, produzem híbridos viáveis com as formas cultivadas de *Phaseolus vulgaris* e, portanto, são considerados como pertencentes à mesma espécie biológica. As denominações *Phaseolus aborigineus* e *Phaseolus mexicanus*, que foram propostas há algumas décadas, são, no momento, consideradas discutíveis e talvez as denominações *Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus* e *Phaseolus vulgaris* var. *mexicanus*, propostas por Gepts & Debouck (1991), baseados em Baudet (1977), sejam mais adequadas.

Tabela V.1. Classificação de cultivares de feijoeiro segundo seu sub-conjunto gênico (gene pool).

Raça	Semente	Faseolina ¹	Hábito ²	Exemplo de cultivares
Mesoamericanas				
1. Mesoamérica	Pequena Cilíndrica Oval	S,Sb,B	I, II,III e IV	Brasil 2 Jamapa Mulatinho
2. Durango	Média Romboédrica	S,Sb	III	Pinto Bayo
3. Jalisco	Média Oval Cilíndrica Redonda	S	IV	Frijola Flor de mayo
Sulamericanas (Andes)				
4. Nueva Granada	Média Grande Cilíndrica	T	I,II, III	Jalo Bagajó
5. Chile	Média Oval Redonda	C, H	III	Frutilla Tortolas
6. Peru	Média Grande Oval Redonda	T, C,H	IV	Cargamanto Nuñas

¹ Faseolina: S, Sb, B, T, C, H = variantes eletroforéticos desta proteína.

² Hábito: I= determinado arbustivo, com ramificação ereta e fechada; II indeterminado, com ramificação ereta e fechada; III= indeterminado, com ramificação aberta; IV- indeterminado, prostrado ou trepador. Fonte: Singh et al. (1991).

O gênero *Phaseolus*, no qual todas as espécies são diplóides ($2n=22$), compreende muitas espécies das quais apenas quatro são cultivadas: *Phaseolus vulgaris* L., *Phaseolus coccineus* L., *Phaseolus acutifolius* Gray var. *latifolius* Freem e *Phaseolus lunatus* var. *lunatus*.

As relações entre as quatro espécies cultivadas de *Phaseolus* podem ser apresentadas da seguinte forma (Evans, 1976):

- a) Aparentemente todas derivaram de um ancestral comum;

b) *P. vulgaris* foi domesticado na América do Sul ou Central ou em ambas, em áreas temperadas cálidas (10.000 a 7.000 a.C.);

c) *P. acutifolius* foi domesticado na América Central, em regiões semi-áridas;

d) *P. lunatus* foi domesticado na América do Sul ou Central ou em ambas e é subtropical (4.500 a.C. na América do Sul e 1.800 a.C. na América Central).

e) *P. coccineus*, a única cujo sistema de reprodução é por alogamia, foi domesticado em áreas frias e montanhosas dos Andes (2.000 a.C.).

Dentre as quatro espécies cultivadas [cinco espécies foram domesticadas: *P. acutifolius*, *P. coccineus*, *P. lunatus*, *P. polyanthus*, and *P. vulgaris* (Debouck, 1999) entre as mais de 30 espécies], a mais importante é o feijoeiro comum ou *Phaseolus vulgaris*. Sua área de distribuição e adaptação é a mais ampla e, segundo Harlan (1975), é a leguminosa de maior importância para consumo humano direto. O feijoeiro comum é o mais amplamente cultivado dentre as espécies domesticadas ocupando mais que 85% da área cultivada com o gênero *Phaseolus* no mundo (Singh, 2001).

A diferenciação entre as quatro espécies cultivadas do gênero *Phaseolus* pode ser facilmente realizada para os tipos cultivados, mas para os tipos selvagens é mais difícil. A lista dos caracteres que distinguem as espécies é mais ou menos extensa, mas as principais características podem ser sintetizadas nos seguintes pontos (Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1980):

a) Germinação

O comportamento das espécies, na germinação, é geneticamente controlado e pode ser uma característica útil para distinguir algumas das espécies. Assim, *P. vulgaris*, *P. lunatus* e *P. acutifolius* apresentam germinação epígea, ou seja, os cotilédones emergem acima da superfície do solo. A germinação de *P. coccineus* é geralmente hipógea, os cotilédones permanecendo sob a superfície do solo. Entretanto, uma subespécie de *P. coccineus* (*P. coccineus* subespécie *polyandrus*) tem germinação epígea.



b) Características da folhas

As características das folhas podem ser usadas, até certo ponto, para distinguir as quatro espécies. Por exemplo, em *P. acutifolius* o primeiro par de folhas não é trifoliolado e possui a base truncada, relativamente pequena, e o pecíolo muito curto. A variação nas folhas subsequentes é menos discriminatória. Em *P. lunatus* as folhas são geralmente mais escuras quando comparadas com as outras três espécies. *P. acutifolius* tende a ter folhas menores, enquanto *P. coccineus* apresenta folhas maiores.

c) Flores e inflorescências

As características das flores têm sido usadas para distinguir as quatro espécies. Em *P. lunatus* e em *P. acutifolius* a forma das bractéolas, que são pequenas e pontiagudas, distinguem-se facilmente das bractéolas de *P. vulgaris* e *P. coccineus*, cujo tamanho é muito maior.

A posição do estigma também é útil para distinguir *P. coccineus* das outras três espécies. Em *P. coccineus* o estigma sobressai da quilha e situa-se relativamente longe do ovário, em comparação com as anteras. Esta estrutura morfológica facilita, eventualmente, a polinização cruzada, que é o sistema de polinização natural nesta espécie. Em contraste, nas outras três espécies o estigma está situado mais perto do ovário, com as anteras circundando-o totalmente, o que facilita a autopolinização. Até certo ponto, a forma do estigma, o tamanho da flor (em *P. coccineus* é bastante maior que nas demais espécies) e a natureza das inflorescências podem ser usadas para distinguir as espécies. As inflorescências de *P. coccineus* são sempre ráculos longos, com flores aparecendo em posições opostas e alternadas e os pecíolos das flores mais longos. Nas demais espécies os ráculos florais são menos longos, com menos flores e nem sempre opostas.

d) Forma e tamanho da vagem

Em *P. lunatus* as vagens podem ser facilmente distinguidas das outras espécies, pois são bastante comprimidas, de forma geralmente oblonga e recurvada. Possuem duas alturas distintas, ventral e dorsal, e o número de sementes varia de duas a quatro. As vagens de *P. acutifolius* são pequenas, comprimidas e com número de sementes que pode chegar a até sete (usualmente



cinco). As vagens de *P. coccineus* são comprimidas e geralmente bastante grandes, podendo ter até nove sementes por vagem. As vagens de *P. vulgaris* também são geralmente comprimidas, delgadas e graúdas e podem ter de quatro a dez sementes por vagem.

e) Hábito de crescimento

Uma característica morfológica muito importante, que tem uma influência direta no manejo das lavouras de feijoeiros do gênero *Phaseolus*, é o hábito de crescimento. Este pode ser agrupado de forma ampla, como determinado e indeterminado. O tipo determinado ocorre com uma frequência mais baixa que o indeterminado. Nas espécies cultivadas do gênero *Phaseolus*, a ocorrência do tipo determinado está descrita em *P. vulgaris*, *P. lunatus* e *P. coccineus*, sendo este caráter governado por um gene recessivo.

O hábito de crescimento determinado se caracteriza pelo desenvolvimento completo da gema terminal em uma inflorescência. O hábito indeterminado se caracteriza pelo desenvolvimento da gema terminal em uma guia. Assim, a planta pode aparecer como indeterminada arbustiva (se a guia não tem tendência a trepar) ou trepadora (para aquelas com tendência trepadora). Os tipos indeterminados (especialmente os trepadores) estão bem representados nos quatro tipos cultivados do gênero *Phaseolus*, bem como nas espécies silvestres deste mesmo gênero.

f) Ciclo da Cultura

Existem no gênero *Phaseolus* tanto as formas anuais como as perenes. As formas anuais são comuns em *P. vulgaris* e em *P. acutifolius*. Em condições de campo, seu ciclo vegetativo termina com a senescência das folhas e a maturação das vagens.

As formas perenes são muito comuns em *P. lunatus* e em *P. coccineus*. A floração, o rendimento e a maturação das vagens são um processo contínuo e relativamente curto. Por exemplo, em *P. lunatus* as folhas permanecem com um verde escuro mesmo depois que as vagens amadurecem completamente. Isto demonstra que o ciclo de crescimento desta espécie pode estender-se por muito mais tempo.

Em *P. coccineus*, algumas vezes o sistema radicular se desenvolve formando um "tubérculo", que atua como órgão armazenador de reservas nutritivas, o que permite o rebrotamento do vegetal depois de cortado.

Fenologia

Os caracteres morfológicos, utilizados na identificação de cultivares de feijoeiro (*P. vulgaris*), envolvendo a fase vegetativa e reprodutiva, são observados na Figura V.1 e Tabela V.2. O ciclo da cultura é completado em 70 a 110 dias, dependendo da cultivar e das condições climáticas.

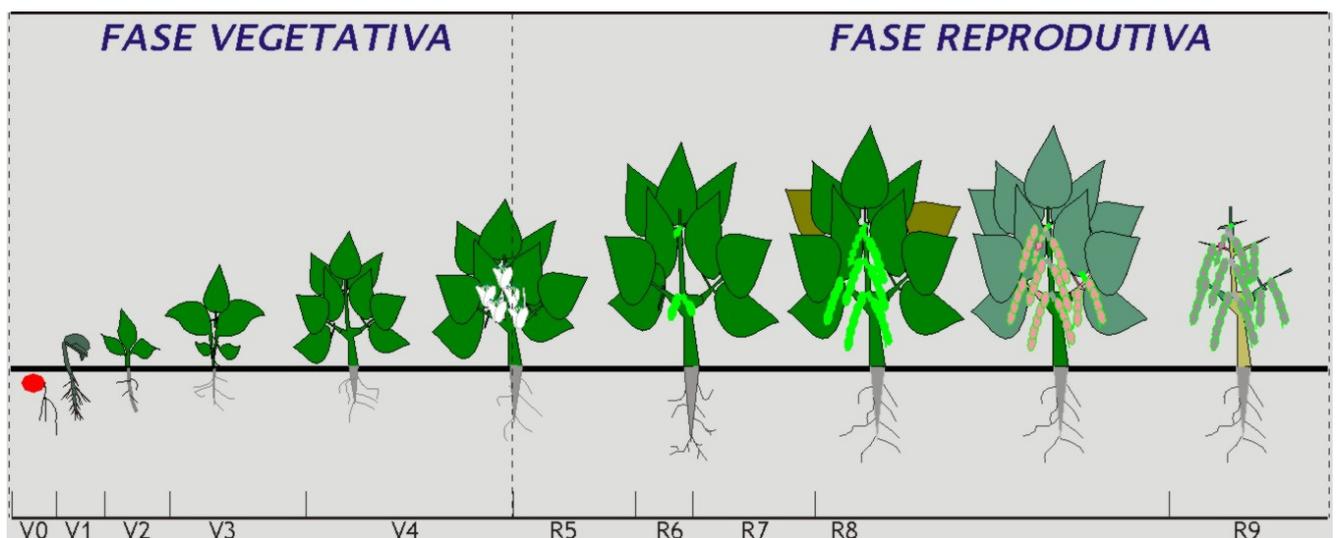


Figura V.1. Fenologia genérica do feijoeiro comum

Tabela V.2. Etapas do desenvolvimento da planta do feijoeiro comum.

Etapas ¹	Descrição ²
V0	Germinação: absorção de água pela semente; emergência da radícula e sua transformação em raiz primária.
V1	Emergência: os cotilédones aparecem ao nível do solo e começam a separar-se. O epicótilo começa o seu desenvolvimento.
V2	Folhas primárias: folhas primárias completamente abertas.
V3	Primeira folha trifoliolada: abertura da primeira folha trifoliolada e o aparecimento da segunda folha trifoliada.
V4	Terceira folha trifoliolada: abertura da terceira folha trifoliolada, as gemas e os nós inferiores produzem ramos.
R5	Pré-floração: aparece o primeiro botão floral e o primeiro rácimo.
R6	Floração: abre-se a primeira flor.
R7	Formação das vagens: aparece a primeira vagem.
R8	Enchimento das vagens: começa o enchimento da primeira vagem (crescimento das sementes). Ao final desta etapa, as sementes perdem a cor verde e começam a mostrar as características da cultivar. Inicia-se o desfolhamento.
R9	Maturação fisiológica: As vagens perdem a pigmentação e começam a secar. As sementes adquirem a coloração típica da cultivar.

¹ V= Vegetativa; R= Reprodutiva

² Cada etapa inicia-se quando 50% das plantas mostram as condições que correspondem à descrição da etapa.

Diversidade genética

A diversidade detectada em espécies do gênero *Phaseolus* em relação ao feijoeiro comum é organizada em “pool” gênicos denominados de primário, secundário, terciário e quaternário (Singh, 2001). As cultivares modernas e antigas, linhagens melhoradas e as crioulas pertencem ao pool gênico primário. Dentro deste pool gênico não há dificuldade de se realizar intercruzamentos. O pool gênico secundário consiste das espécies *P. coccineus*, *P. costaricensis*, and *P. polyanthus* (Broughton et al., 2003). Estas três espécies intercruzam-se facilmente entre si e também com *P. vulgaris* sem requerer o resgate de embriões, especialmente quando o feijoeiro comum é utilizado como parental feminino. (Singh et al., 1991). Entretanto, em alguns cruzamentos esterilidade parcial pode ocorrer em alguns indivíduos, especialmente se *P. vulgaris* for usado como parental masculino. O pool gênico terciário consiste de *P. acutifolius* e *Phaseolus parvifolius*, que são espécies que produzem progênie fértil sem requerer resgate de embriões em



intercruzamento. O resgate de embrião é requerido quando cruzados com *P. vulgaris*. De um a dois retro-cruzamentos a *P. vulgaris* são necessários para restaurar a fertilidade. De novo, o uso de *P. vulgaris* como fêmea tanto no cruzamento como no retro-cruzamento com *P. acutifolius* aumenta a chance de obter indivíduos férteis na população segregante. Progênie férteis não são obtidas de cruzamentos entre espécies do gene pool quaternário e *P. vulgaris*, mesmo utilizando a técnica de resgate de embriões. Este grupo de germoplasma compreende *Phaseolus angustissimus* e *P. lunatus*, espécies para as quais não tem sido demonstrados alelos em comum com *P. vulgaris*. Há aproximadamente 30.300 acessos de *P. vulgaris* no banco de germoplasma do CIAT (International Center for Tropical Agriculture), dos quais aproximadamente 29.000 são cultivados e 1.300 são crioulos. Este banco de germoplasma contém ainda cerca de 1.000 espécies de germoplasma do pool gênico secundário e mais de 350 acessos de germoplasma do pool gênico terciário (Broughton et al., 2003). Há milhares de outros acessos distribuídos dos diferentes pools gênicos distribuídos nos bancos de germoplasmas do mundo. Entretanto, a maioria da variabilidade não tem ainda sido usada diretamente nos programas de melhoramento do feijoeiro comum (Miklas, 2000). A introgressão e piramidamento de alelos favoráveis entre e dentro deste germoplasma poderia ampliar a base genética das populações segregantes, maximizar o ganho pela seleção e aumentar a estabilidade da resistência a doenças incorporada nos novos cultivares.

Os estudos de Vavilov (1951) dão suporte a idéia de que o centro de diversidade genética das espécies de feijão *P. vulgaris*, *P. coccineus*, *P. lunatus*, e *P. acutifolius* está localizado no México e America Central, porque é nestas áreas que as mais diversas formas da espécie foram encontradas. Um centro secundário de diversidade foi encontrado nas áreas montanhosas do Peru. Embora o Centro de diversidade e Centro de origem não tenha o mesmo significado, a descoberta de Vavilov foi uma forte indicação a favor da origem Americana do feijão comum (Vieira et al., 1999). Evidências morfológica mostraram que o tipo selvagem de feijão que deu origem ao feijão comum encontra-se extensivamente distribuído nos Estados Unidos, do Oeste do México até o nordeste da Argentina, cobrindo uma faixa quase continua de aproximadamente 7.000 km de áreas montanhosas. Ao longo desta área, diferenças morfológicas que poderiam afetar a adaptação dos feijões selvagens a condições tão contrastantes foram observadas (Kami et al.,



1995). Há diferenças botânicas entre os tipos selvagens encontrados no México e América Central (*P. vulgaris* var. *mexicanus*) e aqueles da América do Sul (*P. vulgaris* var. *aborigineus*). Entretanto, há diversos tratos, tais como hábito trepador, grande número de vagens pequenas e deiscentes, com sementes pequenas, duras e com difícil germinação que são comuns nos tipos selvagens, mas não nas formas cultivadas de (*P. vulgaris*). Estas espécies sofreram modificações extensivas nas suas características durante o processo de domesticação, e as cultivares atuais apresentam um pequeno número de flores, vagens e sementes os quais são uma consequência da pequena proporção de flores que atingem a maturidade comparada aos tipos selvagens. Além disto, as cultivares modernas tem o crescimento mais restrito e mais compacto, tornando-as mais baixas e eretas, com folhas maiores; o caule mais robusto, flores, sementes e vagens maiores além de que as sementes são mais permeáveis à água permitindo uma germinação mais uniforme e menor tempo de cocção, supressão dos mecanismos de dispersão das sementes, decréscimo na percentagem do conteúdo de fibras e neutralidade de fotoperíodo. Os tipos selvagens cruzam facilmente com as cultivares modernas de *P. vulgaris* produzindo sementes férteis nas gerações F₁ e F₂, indicando que os dois pertencem à mesma espécie e não há barreiras nos mecanismos reprodutivos para isolá-los. De acordo com Singh (2001), as diferenças genéticas entre as duas formas parecem ter afetado apenas uma pequena proporção de loci, mais especificamente a ocorrência do gene *dl-1* nos feijões meso americanos e *di-2* nos andinos cultivados e selvagens.

A caracterização da diversidade genética entre acessos de feijoeiro comum de diferentes *pool* gênicos usando marcadores moleculares vem sendo de grande ajuda na elucidação dos mecanismos associados ao processo de domesticação e evolução, efeitos da domesticação na redução da diversidade genética e permitir a administração mais eficiente da exploração efetiva do germoplasma (Delgado-Salinas et al., 2006; Gepts et al., 2008; Aragão et al., 2011).

O genoma de *P. vulgaris* ainda não foi completamente seqüenciado. No entanto existe agora uma iniciativa para o seqüenciamento do genoma estrutural do feijoeiro em um projeto colaborativo que inclui grupos no México, Brasil, Espanha e Argentina. Em fevereiro de 2010 havia 83.847 entradas de EST (*Expressed Sequence Tag*; marcador de seqüência expressada) no banco de dados (GenBank) do National Center for Biotechnology Information (NCBI) e em novembro desse mesmo ano esse número já chega a 114.139 EST, mostrando o avanço na



obtenção desses dados. Como parte dessas análises genômicas, Gaitan-Solis et al. (2008) identificaram uma alta frequência de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*; polimorfismos de base única) no genoma de genótipos do pool gênico mesoamericano e andino.

Produção e Consumo Seguro de Feijão no Brasil (Wander, 2007)

O Brasil é o maior produtor mundial de feijão comum. As produções de feijão em grão nos anos de 1975 e 2008 foram, respectivamente, de 2,28 milhões e 2,80 milhões de toneladas (FAO, 2010). O cultivo desta leguminosa é feito em três safras distintas, a primeira (safra das “águas”) com plantio nos meses de agosto a novembro e colheita de novembro a fevereiro, a segunda (safra da seca ou safrinha) com plantio de dezembro a março e colheita de março a junho e a terceira (safra de inverno ou irrigada) com plantio de abril a julho e colheita de julho a outubro.

A área colhida de feijão no Brasil, que em 1975 era de 4.145.916 hectares, aumentou para 5.926.143 em 1982 e em 2008 foi de 3.768.589 hectares. Assim, houve uma redução de 9,1% no período 1975-2008, liberando 377.327 hectares para outras atividades em 33 anos (FAO, 2010). Esta diminuição da área colhida ocorreu em todas as três safras. Conforme dados do Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA) entre 1990 e 2008, a área da primeira safra diminuiu de 2.491.312 para 2.074.897 hectares (-16,7%), a da segunda safra diminuiu de 1.981.374 para 1.517.426 hectares (-23,4%) e a da terceira safra diminuiu de 207.399 para 189.585 hectares (-8,6%) (IBGE, 2010b).

Ao longo dos últimos 23 anos a segunda e a terceira safras, apresentaram um comportamento semelhante (Figura V.2). Entretanto, a segunda safra, que é considerada a de maior risco climático, mostrou oscilações maiores na área colhida, com reduções drásticas em 1993, 1998 e 2001, as quais foram sucedidas por aumentos em 1994, 1999 e, de maneira mais suave, em 2002 e 2003, voltando a diminuir em 2004 e 2005. A área colhida na terceira safra se manteve praticamente estabilizada entre 1985 e 2000, aumentando a partir de 2001, com pequenas oscilações nos anos seguintes.

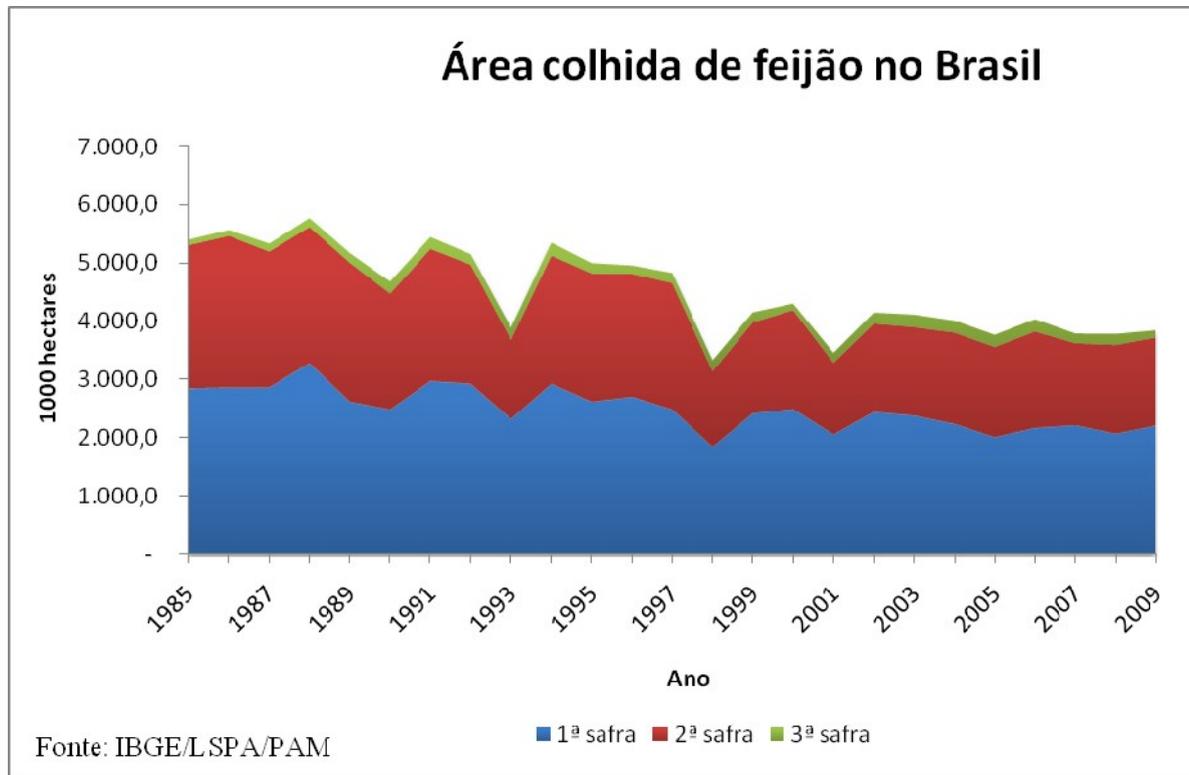


Figura V.2. Área colhida de feijão por safra no Brasil, período de 1985 a 2009. Fonte: IBGE (2010b).

A produtividade média do feijão apresentou aumento contínuo nas três safras no período 1985 a 2008. Percebe-se que os ganhos de produtividade foram bem maiores na terceira safra (Figura V.3). De acordo com dados do Levantamento Sistemático da Produção Agrícola a produtividade média da terceira safra em 2008 foi de 2.208 kg/ha (IBGE, 2010b).

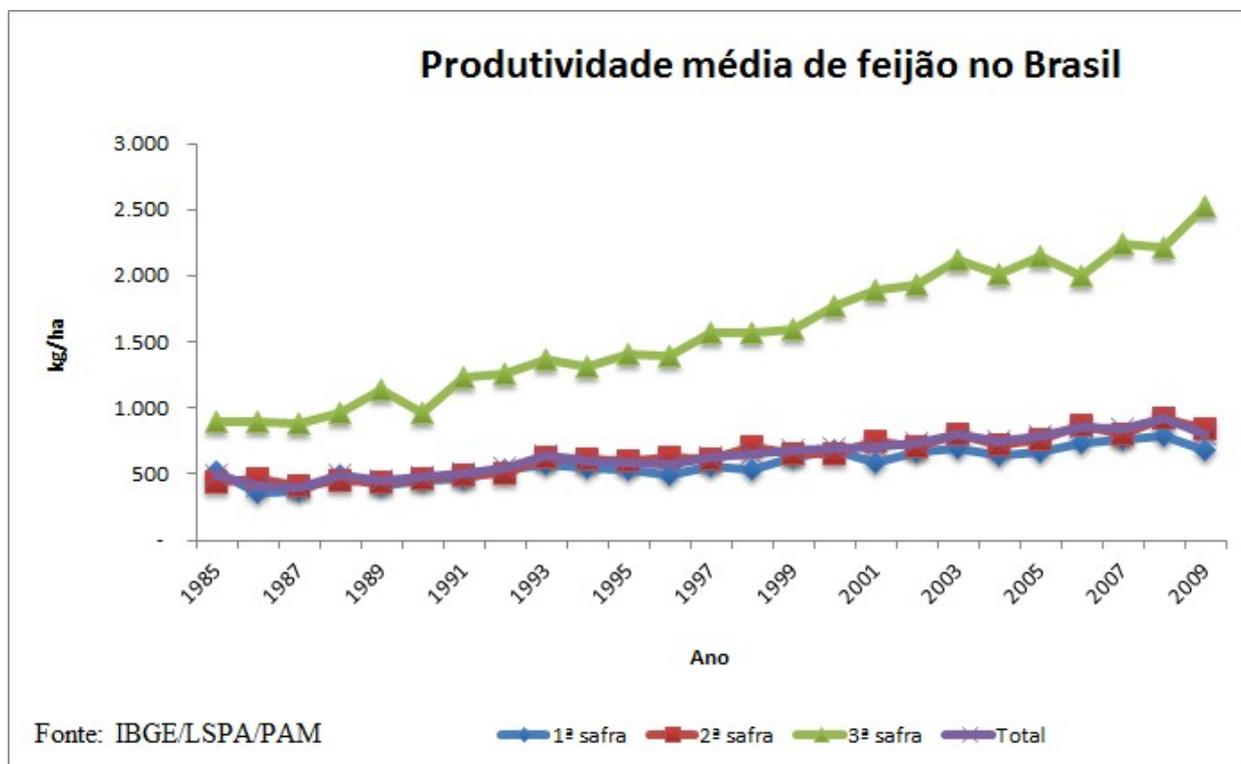


Figura V.3. Produtividade média de feijão na primeira, segunda e terceira safras e média geral das três safras no Brasil, período de 1985 a 2009. Fonte: IBGE (2010b).

Considerando que nos últimos 23 anos a produção de feijão na primeira safra praticamente se manteve estável e que o volume produzido pela segunda safra diminuiu nos primeiros anos, voltando a aumentar nos últimos anos do período, e a terceira safra foi responsável pela tendência de aumento da produção total de feijão entre 1985 e 2005, complementando os aumentos de produção proporcionados pela 2ª safra (Figura V.4).

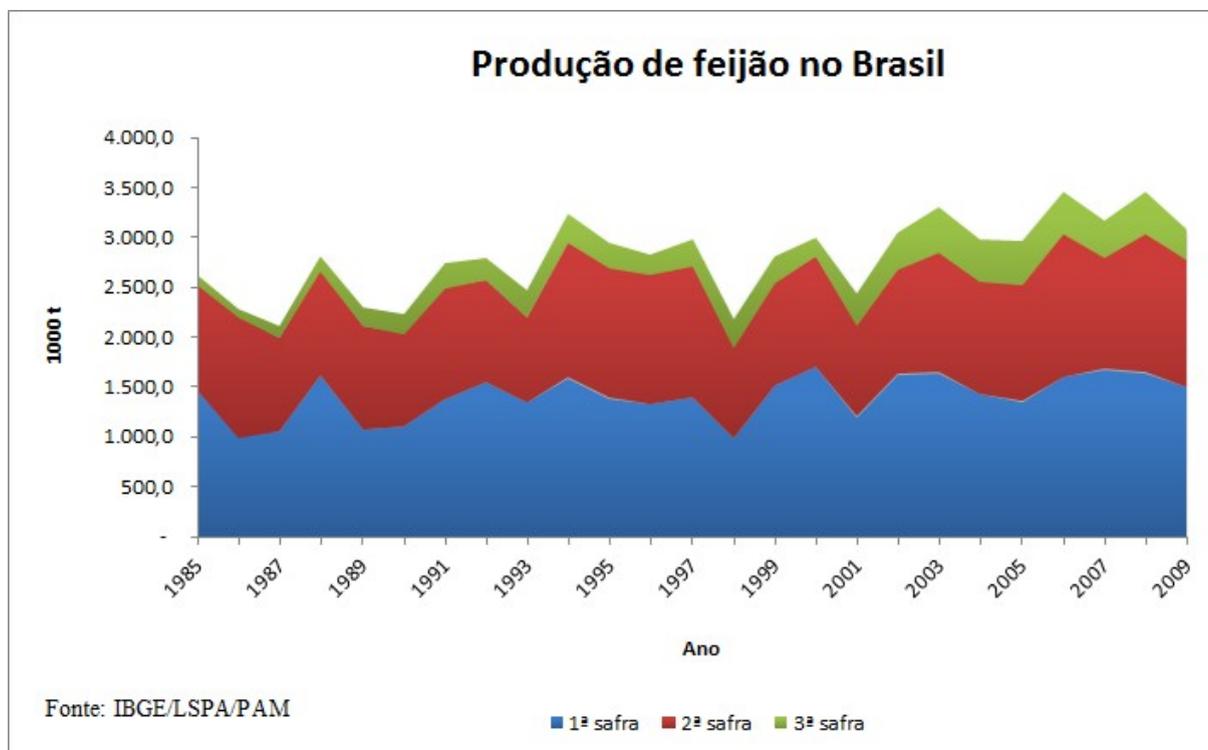


Figura V.4. Produção de feijão no Brasil considerando as três safras, período de 1985 a 2009. Fonte: IBGE (2010b).

O maior volume de produção nos últimos anos, contudo, não foi suficiente para atender o abastecimento interno, cuja demanda foi complementada com importações. Entre 1998 e 2008 estas importações giraram em torno de 100 mil toneladas anuais e sua participação percentual no suprimento nacional se manteve estável, tendo aumentado para acima de 200 mil toneladas em 2008. As importações têm ocorrido, principalmente, em função dos preços e época de colheita de feijão preto na Argentina. A participação das três safras e das importações no suprimento interno tem apresentado variações, mas percebe-se que a sua importância relativa para o suprimento interno ainda é o mesmo: 1ª safra, 2ª safra, 3ª safra e importações (Figura V.5).

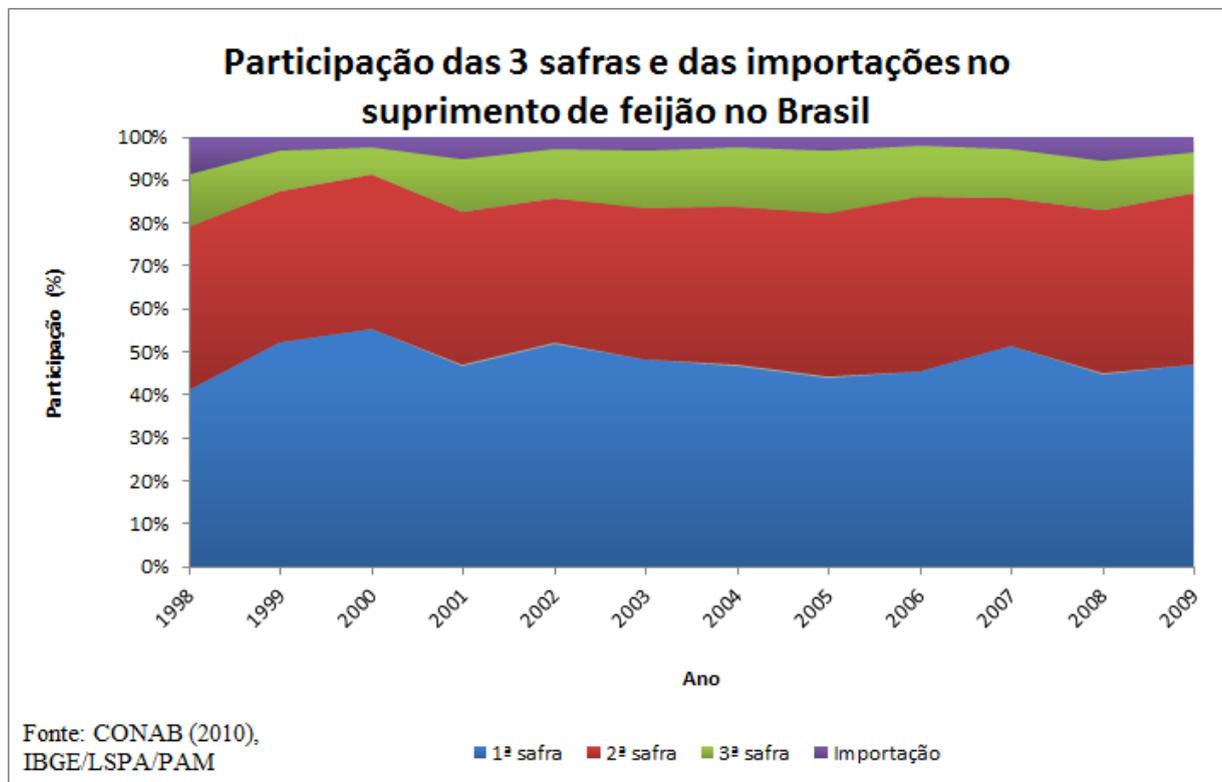


Figura V.5. Participação no abastecimento do mercado brasileiro do feijão da primeira, segunda e terceira safras e das importações de feijão, período de 1998 a 2009. Fonte: CONAB (2010), IBGE (2010b).

Até a década de 80 a colheita de feijão ocorria apenas em algumas épocas do ano. Com isso, havia superoferta em alguns meses e a falta de produto em outros, normalmente os meses de inverno, provocando grandes oscilações de preço ao longo do ano (Figuras V.6).

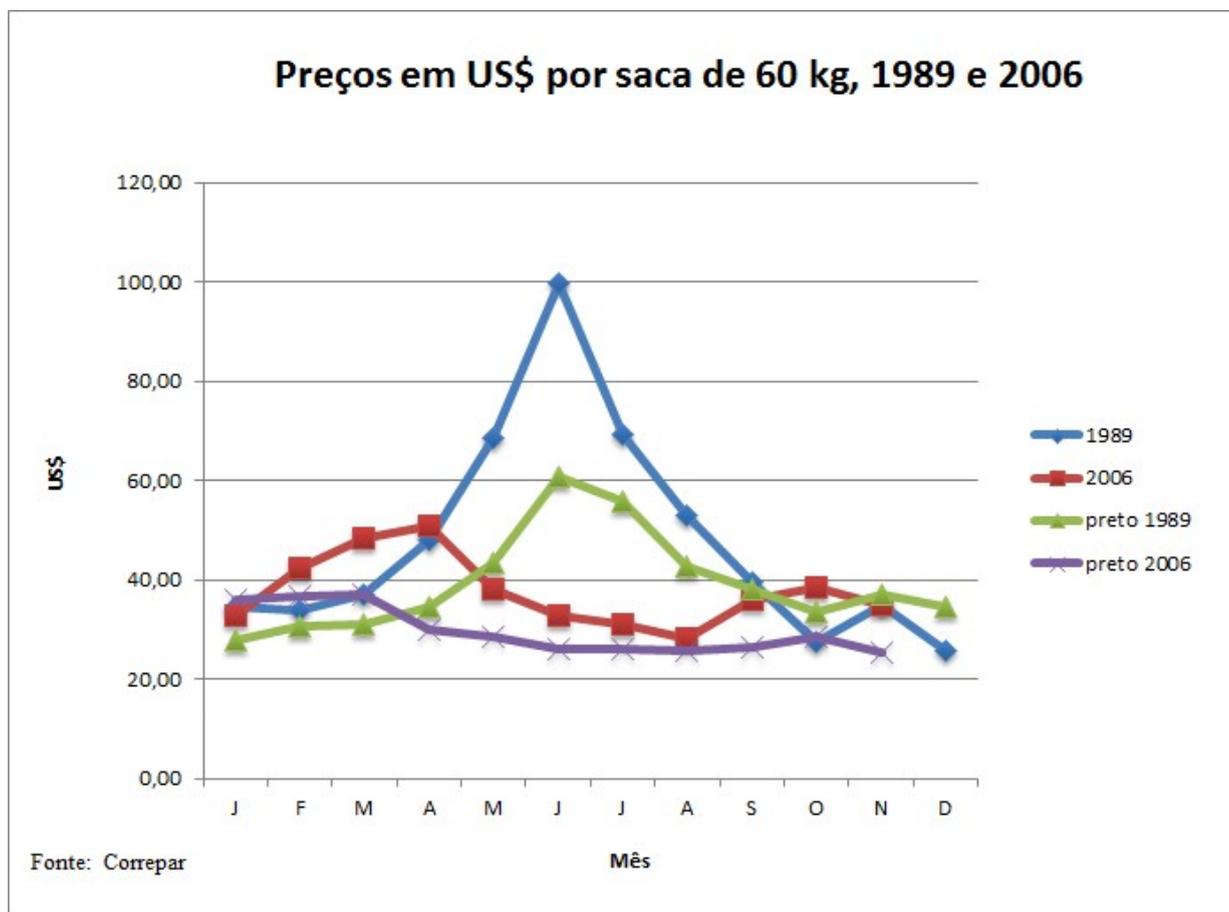


Figura V.6. Oscilação dos preços de feijões carioca e preto em US\$ por saca de 60 kg, pagos aos produtores no Estado do Paraná em 1989 e 2006.

O aumento do rendimento por hectare graças à introdução do feijão tipo carioca nos programas de melhoramento e a consolidação das três safras contribuíram para a regularização da oferta do produto ao longo do ano, diminuindo as oscilações de preço (Figura V.6).

Uma simulação considerando o consumo médio *per capita* de 16,6 kg de feijão por ano e a produção dos Estados brasileiros em 2005, indicou que apenas dez Estados são superavitários na oferta de feijão (oferta – consumo > 0) (Tabela V.3). Do montante excedente, cerca de 80% é de feijão comum e apenas 20% de feijão caupi (Tabela V.4).



Tabela V.3. Estados superavitários (oferta – consumo > 0) do feijão no Brasil em 2005.

Estado	Espécie predominante
Rondônia	Feijoeiro comum
Piauí	Feijão caupi
Ceará	Feijão caupi
Paraíba	Feijão caupi
Bahia	Feijoeiro comum e caupi
Minas Gerais	Feijoeiro comum
Paraná	Feijoeiro comum
Santa Catarina	Feijoeiro comum
Mato Grosso	Feijoeiro comum
Goiás	Feijoeiro comum

Fonte: CONAB (2010), IBGE (2010b).

Tabela V.4. Participação das diferentes espécies na oferta de feijão no Brasil em 2005.

Sistema	Percentual em relação à oferta total*
Feijão comum	79,6
Feijão caupi	20,4

* Produção de caupi estimada com base em Araújo & Watt (1988, p.102)

Fonte: CONAB (2010), IBGE (2010b).

Existem três regiões superavitárias na oferta de feijão no Brasil: a primeira no Sul, formada pelos Estados do Paraná e Santa Catarina; a segunda no Brasil Central, pelos Estados de Rondônia, Bahia, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso; e a terceira no Nordeste, pelos Estados do Piauí, Ceará e Paraíba. Na primeira safra é produzido o feijão comum, na segunda o feijoeiro comum e o caupi no Nordeste e Norte, e na terceira o feijoeiro comum irrigado. Por outro lado, há duas regiões deficitárias em feijão comum: uma no Rio Grande do Sul, e a outra no Centro-Sul (Mato Grosso do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro e Espírito Santo). Além destas, o Norte (exceto Rondônia) e parte do Nordeste são deficitários em feijão caupi. Deve ser notado que a região central brasileira engloba a Região Sudeste (Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais), a Região Centro-Oeste (Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul) e



alguns Estados das Regiões Norte (Tocantins, Acre e Rondônia) e Nordeste (Região Oeste da Bahia).

Distribuição Territorial da Produção de Feijão

O crescimento da produção de feijão no Brasil, no período de 1991 a 2005, foi de 35,2%, destacando-se os Estados de Goiás (135,8%), Bahia (103,3%), Paraná (99,6%) e Minas Gerais (90,7%). Desde 1992 o Paraná se manteve como o principal produtor, exceto no ano 2000, quando a Bahia foi o maior produtor. Nos anos de 2002 a 2004 o Paraná consolidou sua participação na produção nacional em torno dos 21 a 22%. Em 2005, porém, sua participação na produção total caiu para 18,4%, ficando em segundo lugar neste ano.

O Estado de Minas Gerais se consolidou como segundo maior produtor nacional de feijão, passando de 12% em 1991 para aproximadamente 16% a partir de 2001. Em 2005 aumentou sua participação para 18,5%, passando a ser o maior produtor nacional.

A Bahia disputa o terceiro lugar com São Paulo desde 1998, se estabelecendo na posição a partir de 2002, com participação entre 10 e 12% da produção nacional. Em 2005, sua participação chegou aos 15%. O Estado de São Paulo aparecia em quarto lugar, com 9 a 10% da produção nacional, até 2004. Em 2005, foi ultrapassado por Goiás, que ocupou o quarto lugar com 9,3% da produção nacional.

Enquanto Estados como Santa Catarina, Espírito Santo, Rondônia, Rio Grande do Sul, Piauí, Rio Grande do Norte, São Paulo, Paraíba, Mato Grosso do Sul, Maranhão, Alagoas, Rio de Janeiro e Acre perderam em importância, outros Estados como Paraná, Minas Gerais, Goiás, Bahia, Pará, Mato Grosso, Ceará, Distrito Federal, Tocantins, Sergipe, Pernambuco, Amazonas, Amapá e Roraima aumentaram sua participação na produção nacional de feijão (Tabelas V.5 e V.6).



Tabela V.5. Variação da quantidade produzida de feijão nos Estados, considerando as médias de produção dos triênios 1990-1992 e 2003-2005.

Estados que reduziram a produção			Estados que aumentaram a produção		
Estado	Tonelada (t)	% em relação ao total da diminuição	Estado	Tonelada (t)	% em relação ao total do aumento
Santa Catarina	-134.344	42,05	Paraná	284.214	34,48
Espírito Santo	-46.978	14,70	Minas Gerais	220.048	26,70
Rondônia	-36.171	11,32	Goiás	141.893	17,21
Rio Grande do Sul	-27.325	8,55	Bahia	38.283	4,64
Piauí	-15.495	4,85	Pará	33.092	4,01
Rio Grande do Norte	-11.796	3,69	Mato Grosso	31.814	3,86
São Paulo	-10.849	3,40	Ceará	27.803	3,37
Paraíba	-9.327	2,92	Distrito Federal	21.716	2,63
Mato Grosso do Sul	-8.899	2,79	Tocantins	8.905	1,08
Maranhão	-6.816	2,13	Sergipe	7.910	0,96
Alagoas	-4.641	1,45	Pernambuco	4.237	0,51
Rio de Janeiro	-4.298	1,35	Amazonas	3.783	0,46
Acre	-2.571	0,80	Amapá	442	0,05
			Roraima	113	0,01
Total	-319.511	100,0	Total	824.253	100,0

Fonte: IBGE (2010d).

Entre os triênios 1990-1992 e 2003-2005 ocorreram alterações quanto a importância da participação dos Estados na produção nacional. No primeiro triênio, os principais Estados produtores de feijão e sua respectiva participação na produção nacional foram: Paraná (13,9%), Bahia (13,3%), Minas Gerais (11,7), São Paulo (11,1%) e Santa Catarina (10,9%). Já no triênio 2003-2005 os principais produtores de feijão passaram a ser Paraná (20,8%), Minas Gerais (16,9%), Bahia (12,4%), São Paulo (9,0%) e Goiás (8,4%).

A partir de 2001 verifica-se um quadro mais estável da participação dos principais Estados produtores de feijão no cenário nacional. Os cinco maiores produtores são Minas Gerais, Paraná, Bahia, Goiás e São Paulo. Apesar de o ranking destes estados ter mudado entre os últimos cinco

anos, são eles os cinco maiores produtores nacionais de feijão, tendo sido responsáveis por 67,4% da produção nacional em 2005 (Tabela V.6).

A participação dos Estados na produção nacional de feijão pode ser dividida em três faixas. Uma faixa formada pelos Estados com participação menor que 1%; outra, com aqueles que tiveram participação entre 1% a 3%; e a terceira, com aqueles com participação acima de 3%. Comparando os resultados encontrados nos triênios 1990-1992 e 2003-2005, verifica-se que houve um aumento de 2,0% para 4,5% da contribuição dos estados com participação abaixo de 1% na produção nacional. Por outro lado, houve uma redução da contribuição dos estados com participação entre 1% e 3% de 22,1% para 14,6%. Já a faixa dos estados com participação acima de 3% passou a contribuir mais, aumentando de 75,9% para 81,0% (Figura V.7).

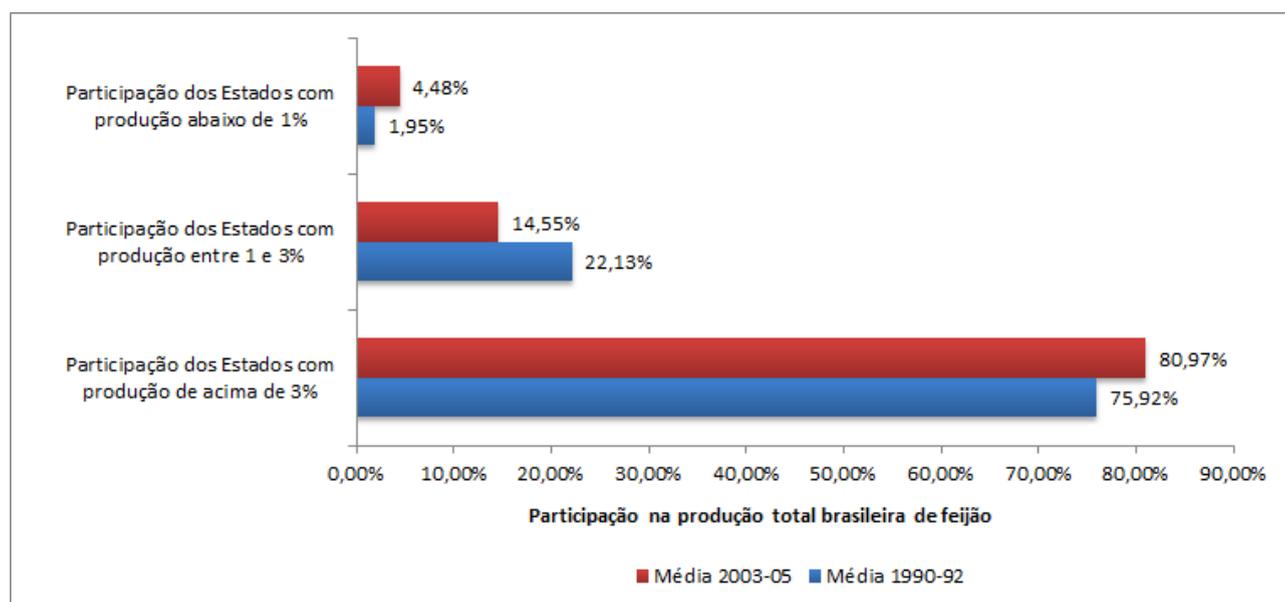


Figura V.7. Participação percentual das faixas de participação na produção de feijão no Brasil, média dos triênios 1990-1992 e 2003-2005. Fonte: IBGE (2010d).



Tabela V.6. Participação percentual dos Estados na produção total de feijão, de 1992 a 2005.

Pos.	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005
1°	PR (16,1)	PR (19,1)	PR (15,6)	PR (15,4)	PR (20,0)	PR (16,7)	PR (22,6)	PR (20,1)	BA (17,7)	PR (18,9)	PR (20,2)	PR (21,4)	PR (22,4)	MG (18,5)
2°	BA (16,1)	MG (14,6)	MG (11,5)	MG (11,7)	BA (13,1)	BA (16,7)	MG (15,5)	MG (13,5)	PR (16,2)	MG (15,8)	MG (16,2)	MG (16,5)	MG (15,6)	PR (18,4)
3°	SC (13,2)	BA (12,6)	SC (10,2)	SC (10,7)	MG (10,7)	MG (12,3)	SP (11,6)	BA (12,3)	MG (13,3)	SP (13,1)	BA (12,2)	BA (10,8)	BA (11,2)	BA (15,3)
4°	SP (11,1)	SP (12,4)	BA (9,0)	BA (8,5)	SC (9,0)	SC (8,0)	BA (10,1)	SP (10,4)	SP (7,8)	BA (10,0)	SP (9,8)	SP (9,2)	SP (9,5)	GO (9,3)
5°	MG (10,2)	SC (11,8)	SP (8,7)	SP (7,8)	SP (7,1)	SP (7,8)	GO (8,4)	SC (7,5)	SC (7,5)	GO (9,0)	GO (7,7)	GO (8,8)	GO (7,1)	SP (8,2)
6°	RS (6,7)	RS (6,3)	CE (8,7)	CE (7,1)	CE (5,9)	GO (5,9)	SC (7,2)	GO (7,0)	GO (6,6)	SC (6,7)	CE (6,5)	CE (6,3)	SC (4,8)	CE (4,4)
7°	GO (4,1)	GO (5,1)	PE (5,1)	RS (6,5)	PE (5,9)	RS (4,9)	RS (5,4)	CE (6,7)	CE (6,4)	RS (5,7)	SC (5,6)	SC (5,7)	RS (4,5)	SC (3,7)
8°	CE (3,7)	RO (3,4)	RS (5,0)	PE (5,1)	GO (4,5)	CE (4,7)	CE (2,6)	RS (5,6)	RS (4,8)	CE (3,6)	RS (4,8)	RS (4,2)	CE (4,4)	PE (3,1)
9°	PB (2,5)	ES (2,6)	GO (4,3)	GO (4,5)	RS (4,1)	PE (4,4)	RO (2,5)	PI (2,5)	PE (3,4)	PA (2,1)	PE (2,7)	PA (2,1)	PE (3,2)	RS (2,5)
10°	RO (2,4)	PA (1,7)	PI (3,4)	PB (3,0)	RO (2,8)	PB (3,4)	PA (2,0)	RO (2,1)	PB (3,0)	PE (1,9)	PA (1,9)	PB (2,1)	MT (2,2)	MT (2,2)
11°	ES (2,3)	MA (1,7)	PB (2,8)	PI (2,9)	RN (2,5)	RO (2,4)	AL (1,7)	PA (2,0)	PI (2,0)	AL (1,9)	PB (1,7)	PE (1,7)	PA (2,2)	PA (1,9)
12°	PE (2,2)	CE (1,6)	RO (2,7)	RO (2,7)	PB (2,4)	AL (2,0)	MS (1,5)	SE (1,3)	RO (1,6)	RO (1,7)	AL (1,3)	PI (1,6)	PB (2,1)	PB (1,8)
13°	RN (1,8)	PI (1,2)	RN (2,6)	RN (2,6)	PI (2,2)	PA (1,7)	SE (1,3)	PE (1,3)	PA (1,5)	MA (1,5)	MT (1,3)	MT (1,5)	RN (1,4)	PI (1,6)
14°	PI (1,2)	MS (1,2)	AL (2,1)	AL (2,4)	PA (2,1)	RN (1,5)	ES (1,3)	AL (1,2)	RN (1,4)	MS (1,3)	RN (1,3)	RN (1,3)	RO (1,4)	AL (1,5)
15°	PA (1,1)	MT (1,0)	ES (1,7)	SE (1,9)	AL (1,6)	PI (1,5)	PE (1,2)	DF (1,0)	AL (1,2)	MT (1,2)	RO (1,2)	RO (1,0)	PI (1,3)	DF (1,2)
16°	MS (1,0)	PE (0,8)	PA (1,5)	PA (1,7)	SE (1,4)	SE (1,3)	DF (1,1)	ES (1,0)	DF (1,0)	PI (1,2)	DF (1,2)	DF (1,0)	AL (1,3)	MA (1,2)
17°	MT (1,0)	AL (0,7)	SE (1,4)	MA (1,4)	ES (1,3)	ES (1,1)	PI (0,8)	MS (0,9)	MA (1,0)	DF (1,0)	MA (1,0)	MS (1,0)	MA (1,2)	SE (1,1)
18°	MA (1,0)	AC (0,4)	MA (1,4)	ES (1,3)	MA (0,8)	MS (1,1)	MA (0,8)	MA (0,9)	SE (0,9)	ES (0,8)	PI (0,9)	MA (1,0)	MS (1,1)	RO (1,1)
19°	AL (0,8)	RJ (0,4)	MT (0,7)	MS (0,8)	MT (0,8)	MA (0,8)	MT (0,7)	MT (0,9)	ES (0,9)	SE (0,7)	ES (0,8)	ES (0,8)	SE (0,9)	MS (0,8)
20°	SE (0,4)	PB (0,4)	MS (0,6)	MT (0,8)	MS (0,6)	MT (0,7)	RN (0,3)	PB (0,7)	MT (0,8)	PB (0,5)	SE (0,7)	TO (0,6)	ES (0,7)	RN (0,7)
21°	AC (0,4)	DF (0,4)	AC (0,3)	DF (0,3)	RJ (0,3)	DF (0,6)	RJ (0,3)	RN (0,4)	MS (0,3)	AC (0,5)	MS (0,6)	SE (0,6)	DF (0,6)	ES (0,7)
22°	RJ (0,3)	SE (0,3)	DF (0,3)	RJ (0,3)	DF (0,3)	RJ (0,2)	AC (0,3)	RJ (0,2)	AC (0,2)	RN (0,3)	AC (0,2)	AL (0,4)	AC (0,3)	TO (0,4)
23°	DF (0,2)	TO (0,2)	RJ (0,3)	AC (0,2)	AC (0,2)	AC (0,2)	PB (0,2)	AC (0,2)	RJ (0,2)	RJ (0,2)	RJ (0,1)	AC (0,2)	TO (0,2)	RJ (0,2)
24°	TO (0,1)	AM (0,1)	TO (0,1)	AM (0,1)	AM (0,2)	AM (0,2)	AM (0,2)	AM (0,2)	AM (0,1)	AM (0,2)	AM (0,1)	RJ (0,2)	RJ (0,2)	AM (0,2)
25°	AM (0,05)	RN (0,1)	AM (0,1)	TO (0,1)	TO (0,1)	TO (0,1)	TO (0,1)	TO (0,1)	TO (0,1)	TO (0,1)	TO (0,1)	AM (0,1)	AM (0,2)	AC (0,1)
26°	RR (0,02)	AP (0,002)	RR (0,05)	RR (0,02)	RR (0,02)	RR (0,02)	RR (0,01)	RR (0,01)	RR (0,005)	AP (0,03)	AP (0,02)	RR (0,02)	RR (0,02)	AP (0,02)
27°	AP (0,001)	RR (0,000)	AP (0,001)	AP (0,003)	AP (0,01)	AP (0,001)	AP (0,002)	AP (0,005)	AP (0,004)	RR (0,01)	RR (0,01)	AP (0,01)	AP (0,01)	RR (0,02)

Fonte: IBGE (2010d).

Em suma, no período de 1990 a 2005 ocorreu uma concentração da produção de feijão em três pólos principais, um no Centro-Sul do país, um no Brasil-Central e outro, menor importância, no Estado da Bahia. Essa concentração já foi confirmada em outros trabalhos (Ferreira & Del Peloso, 2005). No triênio 1990-1992, os cinco primeiros Estados produtores eram Paraná, Bahia, Minas Gerais, São Paulo e Santa Catarina, que conjuntamente, produziram o equivalente a 60,9% da produção nacional. Já no triênio 2003-2005, os cinco primeiros Estados foram Paraná, Minas Gerais, Bahia, São Paulo e Goiás, que, juntos, responderam por 67,4% da produção nacional (Figuras V.8 e V.9), indicando uma nova ‘geografia da produção’ do feijão.

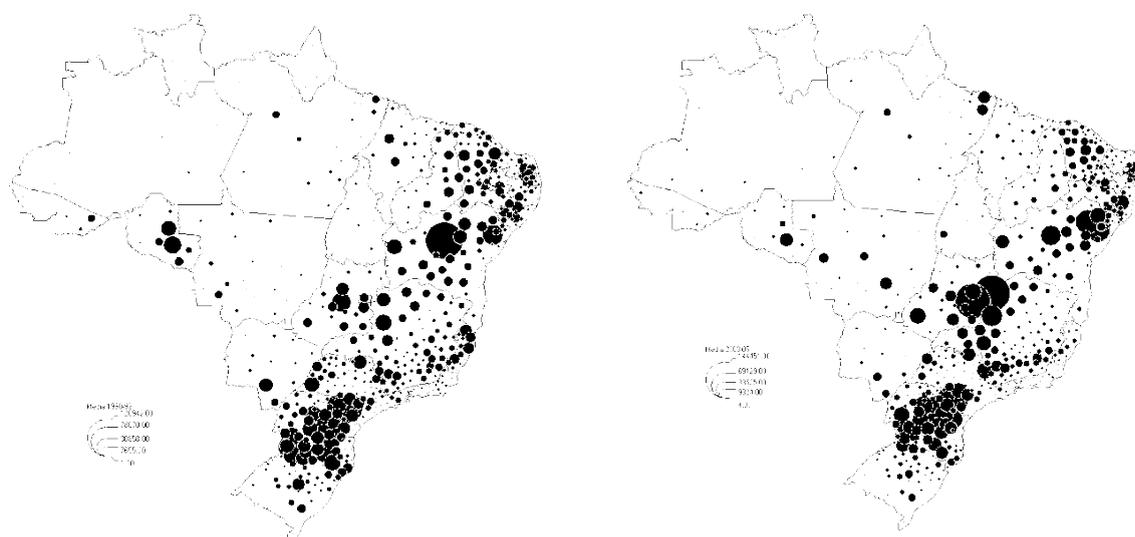


Figura V.8. Produções proporcionais da produção de feijão nas microrregiões brasileiras no triênio 1990-1992. Fonte: IBGE (2010d).
Figura V.9. Produções proporcionais da produção de feijão nas microrregiões brasileiras no triênio 2003-2005. Fonte: IBGE (2010d).

O número de microrregiões necessárias para se agregar 50, 75 e 95% da produção nacional de feijão também diminuíram, confirmando a hipótese de que houve concentração da produção em um número menor de microrregiões (Tabela V.7).

Tabela V.7. Número de microrregiões geográficas necessárias para agregar 50, 75 e 95% da produção de feijão no Brasil nos triênios 1990-1992 e 2003-2005.

Participação	Número de microrregiões		
	1990-1992	2003-2005	Variação (%)
50% da produção nacional	56	41	-26,79%
75% da produção nacional	142	113	-20,42%
95% da produção nacional	317	296	-6,62%

Fonte: IBGE (2010d).

Ao analisar a variação percentual da produção de feijão nas microrregiões homogêneas, entre os triênios 1990-1992 e 2003-2005, observa-se que as microrregiões em que houve maior aumento na produção estão situadas, na sua maioria, nos Estados das regiões Centro-Oeste (Goiás e Mato Grosso) e Norte (Tocantins, Pará, Amazonas e Amapá), além da Bahia no Nordeste e do Paraná no Sul (Figura V.10).

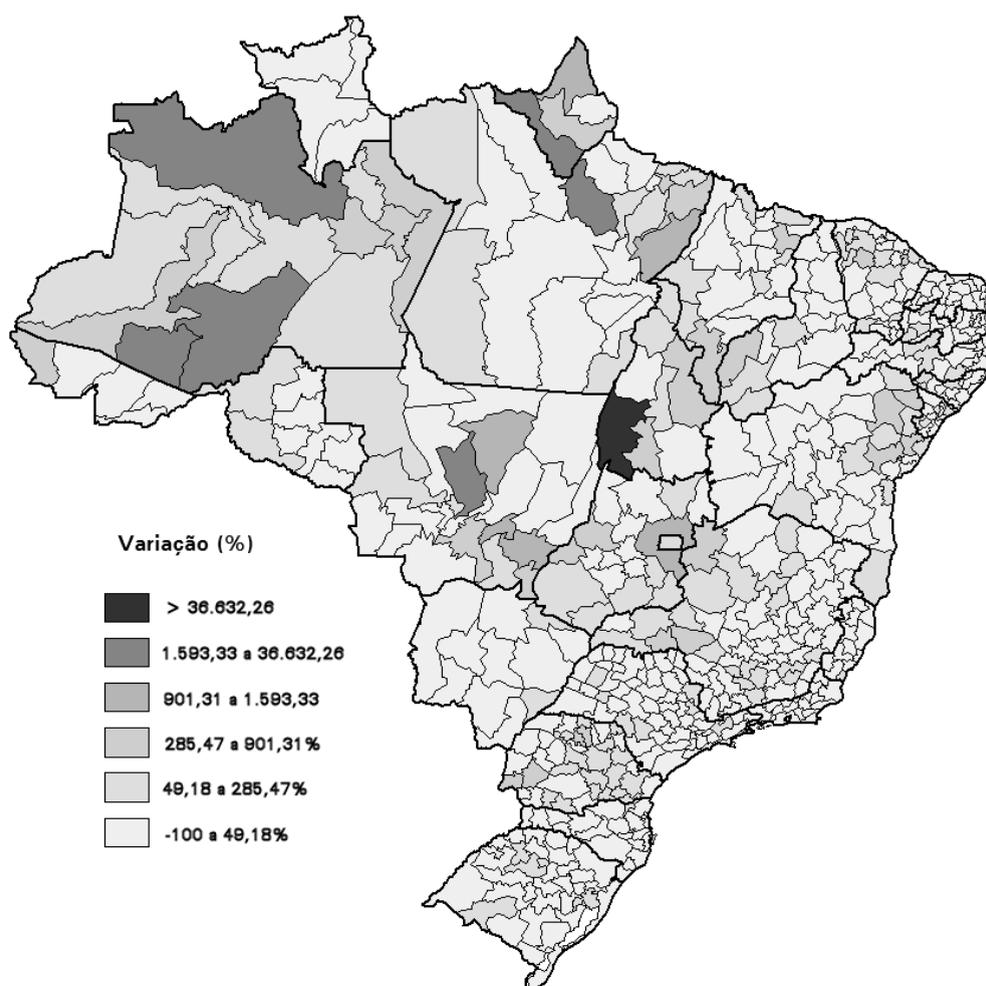


Figura V.10. Variação percentual da produção de feijão nas microrregiões brasileiras entre os triênios 1990-1992 e 2003-2005. Fonte: IBGE (2010d).

Nota-se, também, que houve diminuição da produção em microrregiões localizadas em praticamente todos os Estados, destacando-se o Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Rondônia, além dos Estados que compõem a Região Nordeste.

Evolução da Produtividade

Entre os triênios 1990-1992 e 2003-2005 houve profundas mudanças quanto à produtividade média de feijão em várias microrregiões. Na evolução do número de microrregiões nas diferentes faixas de produtividade média. Observa-se que no triênio 1990-1992 não houve microrregião com produtividades acima de 2.000 kg/ha, duas com 1.600 a 2.000 kg/ha, 19 com 1.200 a 1.600 kg/ha, 78 com 800 a 1.200 kg/ha, 290 com 400 a 800 kg/ha, 167 com até 400 kg/ha e duas sem registro de produção de feijão. Já no triênio 2003-2005 houve 25 microrregiões com produtividade acima de 2.000 kg/ha, 30 com 1.600 a 2.000 kg/ha, 53 com 1.200 a 1.600 kg/ha, 125 com 800 a 1.200 kg/ha, 219 com 400 a 800 kg/ha, 91 com até 400 kg/ha e 15 sem registros de produção de feijão (Tabela V.8). Percebe-se, portanto, um aumento considerável do número de microrregiões com produtividades acima de 800 kg/ha e uma drástica redução do número daquelas com produtividades abaixo de 800 kg/ha. Acredita-se que isso tenha acontecido porque em níveis de produtividade abaixo de 800 kg/ha a rentabilidade do feijão seja menos atrativa que a de outras culturas, as quais o substituíram em muitas microrregiões.

Tabela V.8. Faixas de produtividade de feijão e o número de microrregiões geográficas, médias dos triênios 1990-1992 e 2003-2005.

Produtividade (kg/ha)	Número de microrregiões		Variação (%)
	1990-1992	2003-2005	
2.000 < 3.000	-	25	-
1.600 < 2.000	2	30	1.400%
1.200 < 1.600	19	53	179%
800 < 1.200	78	125	60%
400 < 800	290	219	-24%
0 < 400	167	91	-46%
Sem dados	2	15	650%
Total	558	558	-

Fonte: IBGE (2010d).

Conforme a Tabela V.8, no triênio 1990-1992 não houve microrregião com produtividade média de feijão acima dos 2.000 kg/ha. Entre 1.600 e 2.000 kg houve apenas duas microrregiões (Tabela V.8), localizadas em Goiás e Minas Gerais (Figura V.11). As 19 microrregiões que naquela época apresentavam produtividades entre 1.200 e 1.600 kg/ha se localizaram, na sua maioria, no Brasil Central, incluindo microrregiões em Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Bahia e Mato Grosso.

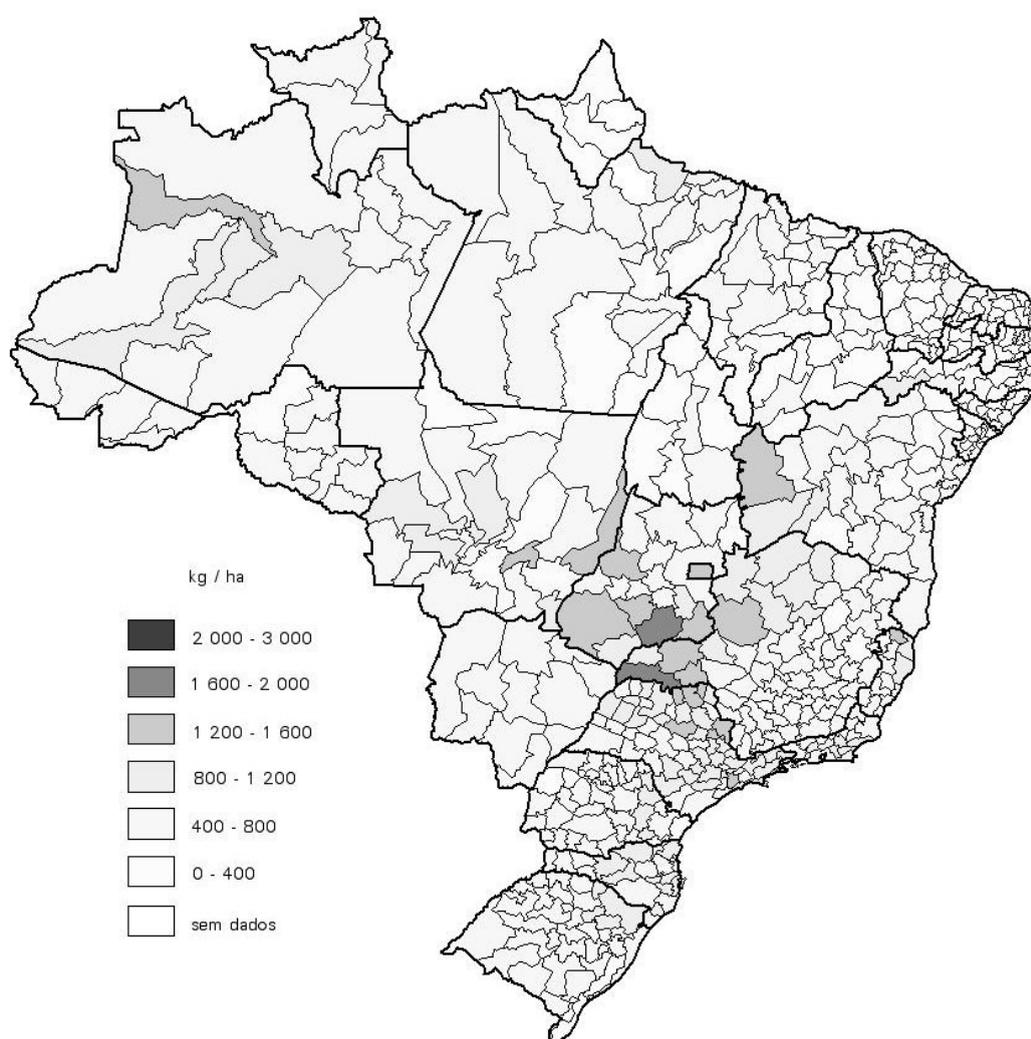


Figura V.11. Faixas de produtividade de feijão nas microrregiões, considerando a média do triênio 1990-1992. Fonte: IBGE (2010d).

De acordo com os dados apresentados na Tabela V.8, no triênio 2003-2005 já houve 25 microrregiões com produtividades médias de feijão acima dos 2.000 kg/ha.

Estas, em geral, coincidem com aquelas que no triênio anterior possuíram produtividades entre 1.600 e 2.000 kg/ha (Figuras V.11 e V.12). Este aumento da produtividade média nestas microrregiões foi possível, principalmente, em função da viabilização da 3ª época de cultivo durante os meses do outono/inverno, a qual ocorre sob irrigação em pivôs centrais.

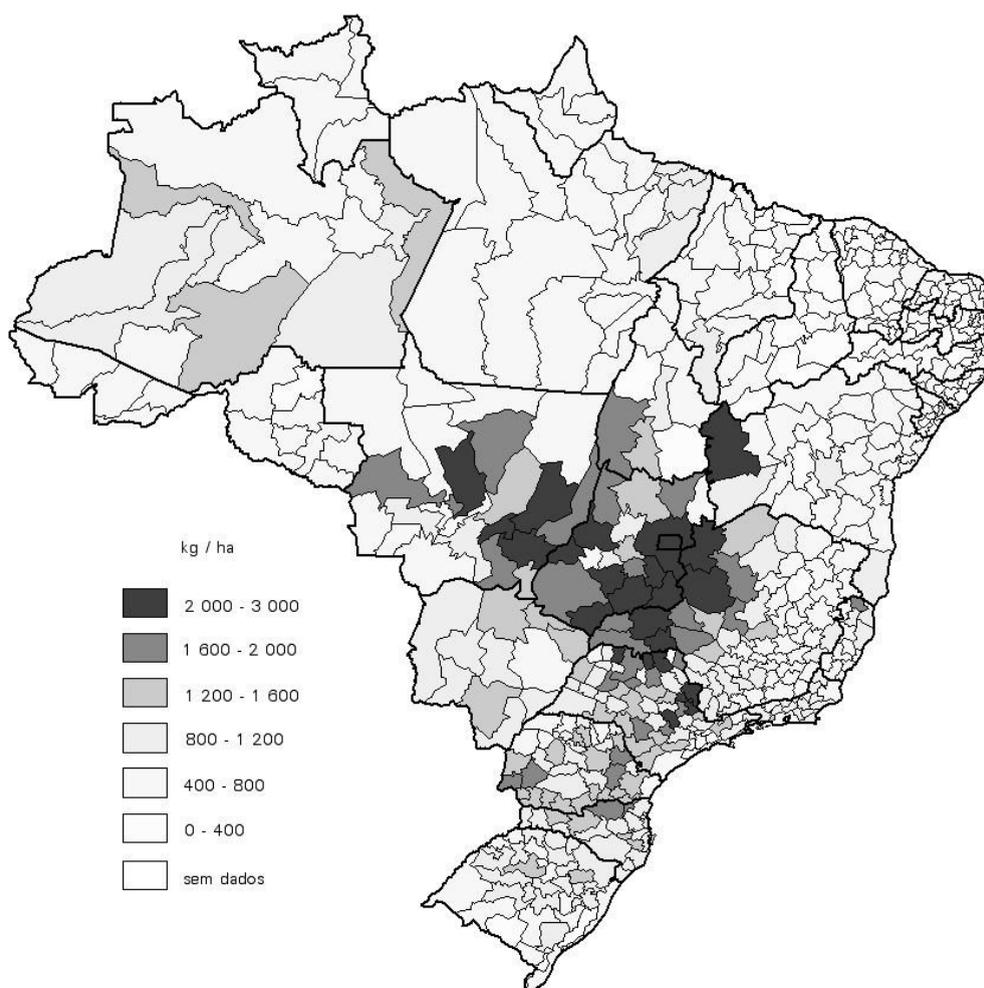


Figura V.12. Faixas de produtividade de feijão nas microrregiões, considerando a média do triênio 2003-2005. Fonte: IBGE (2010d).

Houve, portanto, um aumento significativo da produtividade em algumas regiões e, por outro lado, algumas microrregiões deixaram de produzir feijão no período analisado.

Levantamentos de custos de produção realizados pela Embrapa nos anos de 2003/2004 e 2004/2005 em diferentes regiões do país mostram que as produtividades mais elevadas dos sistemas de produção mais tecnificados e com níveis de

produtividade acima de 3.000 kg/ha (3ª safra no Brasil Central) apresentaram desempenho econômico (lucro líquido por hectare e relação benefício/custo) inferior àqueles com produtividades entre 1.800 e 2.400 kg/ha, obtidos com menor uso de insumos (Wander et al., 2005). Esse fato está relacionado ao produto marginal decrescente na produção do feijão. O maior lucro líquido por hectare é obtido em situações onde a receita marginal é igual ao custo marginal, o que acontece um pouco abaixo da produtividade máxima.

Consumo de Feijão no Brasil

Os dados oficiais apontam para um aumento do consumo nacional de feijão de 2.500 mil toneladas em 1997/98 para 3.150 mil toneladas em 2005/06 (CONAB, 2010). O panorama do abastecimento de feijão para o Brasil no período de 1997/98 a 2005/06, mostra persistente aumento do consumo acompanhado pela resposta da produção (Tabela V.9).

Tabela V.9. Estoques iniciais e finais, produção, importação, suprimento, consumo e exportação de feijão (comum + caupi) no Brasil entre as safras 1997/98 e 2005/06.

Safra	Estoque inicial	Produção	Importação	Suprimento	Consumo	Exportação	Estoque final
1997/98	185,3	2.206,3	211,3	2.602,9	2.500,0	6,2	96,7
1998/99	96,7	2.895,7	92,9	3.085,3	2.950,0	2,6	132,7
1999/00	132,7	3.098,0	78,8	3.309,5	3.050,0	4,7	254,8
2000/01	254,8	2.587,1	130,3	2.972,2	2.880,0	2,3	89,9
2001/02	89,9	2.983,0	82,3	3.155,2	3.000,0	16,2	139,0
2002/03	139,0	3.205,0	103,3	3.447,3	3.030,0	2,8	414,5
2003/04	414,5	2.978,3	79,2	3.472,0	3.050,0	2,3	419,7
2004/05	419,7	3.045,6	100,7	3.566,0	3.100,0	2,3	463,7
2005/06	463,7	3.667,6	100,0	4.231,3	3.150,0	2,9	1.078,4

Fonte: CONAB (2010).

Segundo dados da FAO, entre 1975 e 2002 o consumo *per capita* de feijão no Brasil teria caído de 18,5 para 16,3 kg/hab/ano (Wander, 2005). Considerando a produção bruta e uma população de 180 milhões de habitantes, o consumo *per capita* anual de feijão é de aproximadamente 17,5 kg/hab/ano para 2005, considerando feijão comum + caupi.

É importante registrar que este valor é maior que aqueles obtidos pelas Pesquisas de Orçamento Familiar (POF) 1995/96 (IBGE, 1998) e POF 2002/03 (IBGE, 2010c), que foram, respectivamente, 10,2 e 12,4 kg/hab/ano, devido ao fato de que as Pesquisas de Orçamento Familiar apenas contemplam a parcela de feijão adquirida para ser consumida no domicílio, ignorando o que for consumido fora dele (Figura V.13). A POF considera somente o consumo *per capita* realizado no domicílio.

Estes dados permitem três deduções. Primeira, cerca de 27% do feijão no Brasil é consumido fora do domicílio. Segunda, entre 1998 e 2005, o consumo *per capita* de feijão comum + caupi cresceu 12,9% e o coeficiente na equação linear da linha de tendência é positivo (Figura V.13). Terceira, o consumo de feijão cresceu fora do domicílio. Assim, constata-se que as pessoas estão comendo mais feijão, considerando feijão comum + caupi, e uma grande parte do que se está consumido a mais de feijão nos dias atuais ocorre fora do domicílio, uma vez que cada vez mais pessoas fazem mais refeições fora de casa.

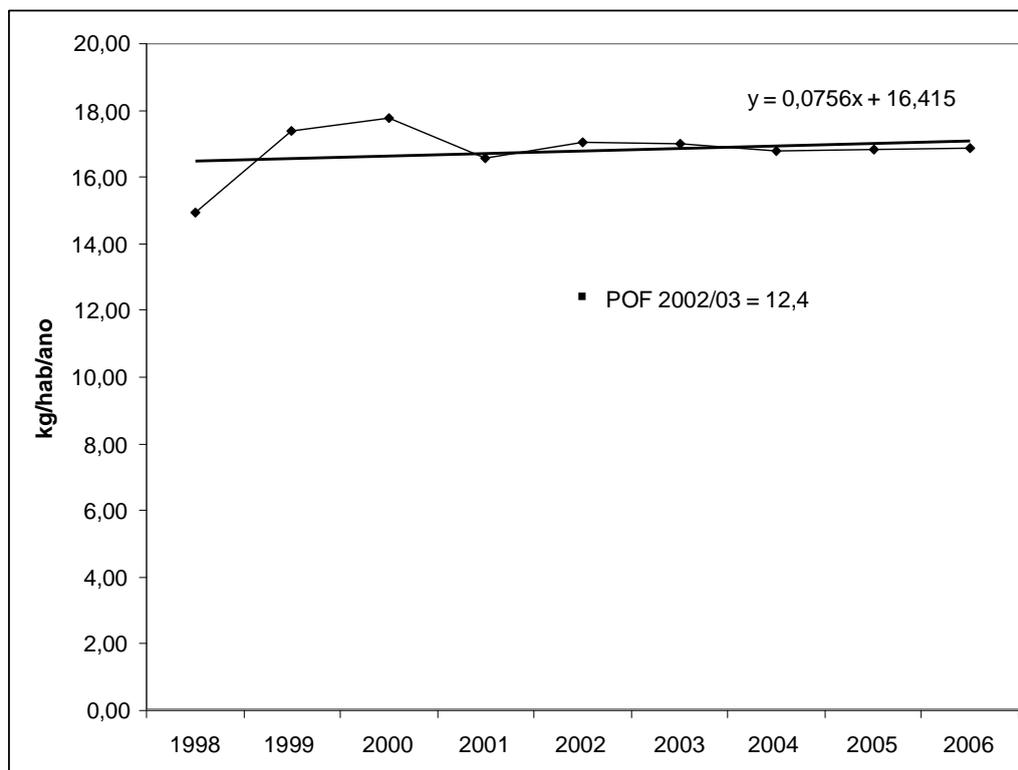


Figura V.13. Consumo *per capita* anual de feijão no Brasil. Fonte: FAO (2010), IBGE (2010a, 2010c).

Os estados brasileiros com maior consumo domiciliar *per capita* de feijão são Ceará e Piauí, onde se consome predominantemente o feijão caupi. Por outro lado, os estados onde o consumo domiciliar *per capita* de feijão é menor são Amazonas, Roraima e Amapá, que consomem principalmente o caupi, além de Distrito Federal, Espírito Santo, São Paulo, Paraná e Santa Catarina, onde se consome o feijão comum (Figura V.14).

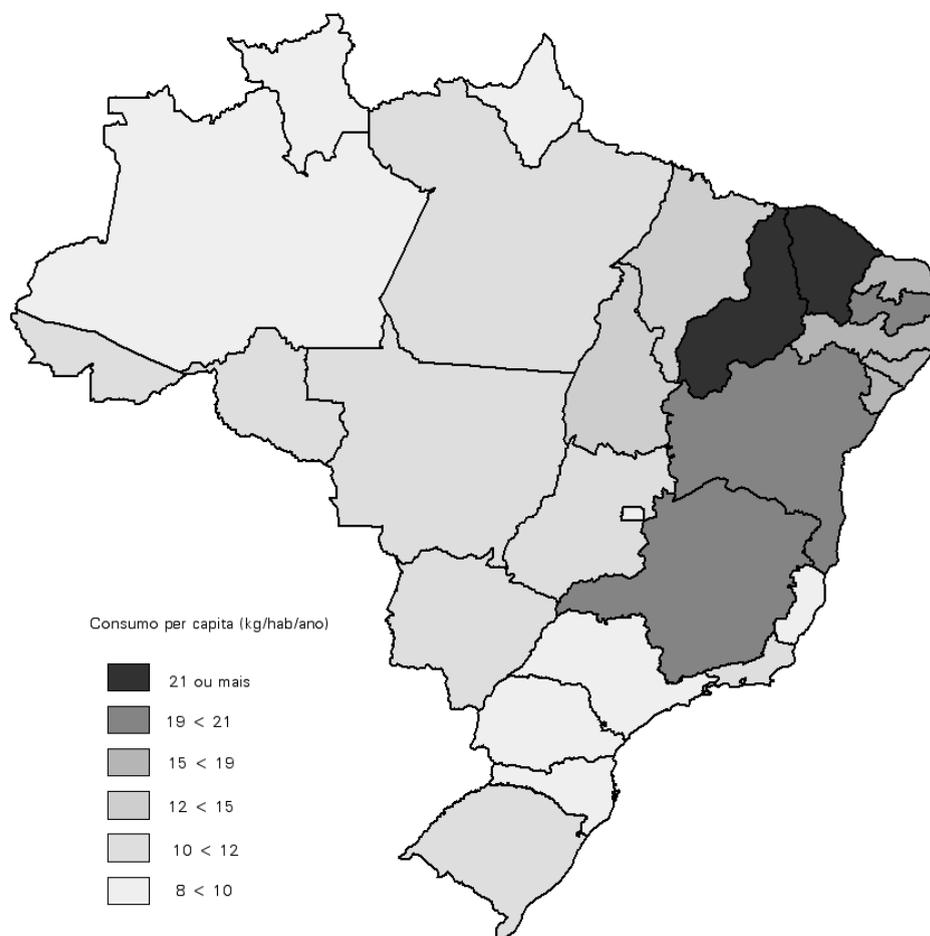


Figura V.14. Faixas de consumo domiciliar *per capita* de feijão nos estados em 2002-2003. Fonte: IBGE (2010c).

Com relação ao consumo domiciliar *per capita* nas diferentes faixas de renda (Figura V.15), observa-se que, a medida que a renda aumenta, ocorre uma diminuição do consumo domiciliar *per capita* (IBGE, 2010c). Estudos anteriores já haviam

confirmado o fato de que, a partir de um determinado nível, se a renda aumentar, o consumo per capita cai (Ferreira & Yokoyama, 1999; Hoffmann, 2000; Ferreira, 2001; Ferreira et al., 2002). Isso significa que, a medida que a renda vai aumentando, uma parte do feijão passa a ser consumido fora do domicílio e outra parte pode estar sendo substituída por outros tipos de alimentos.

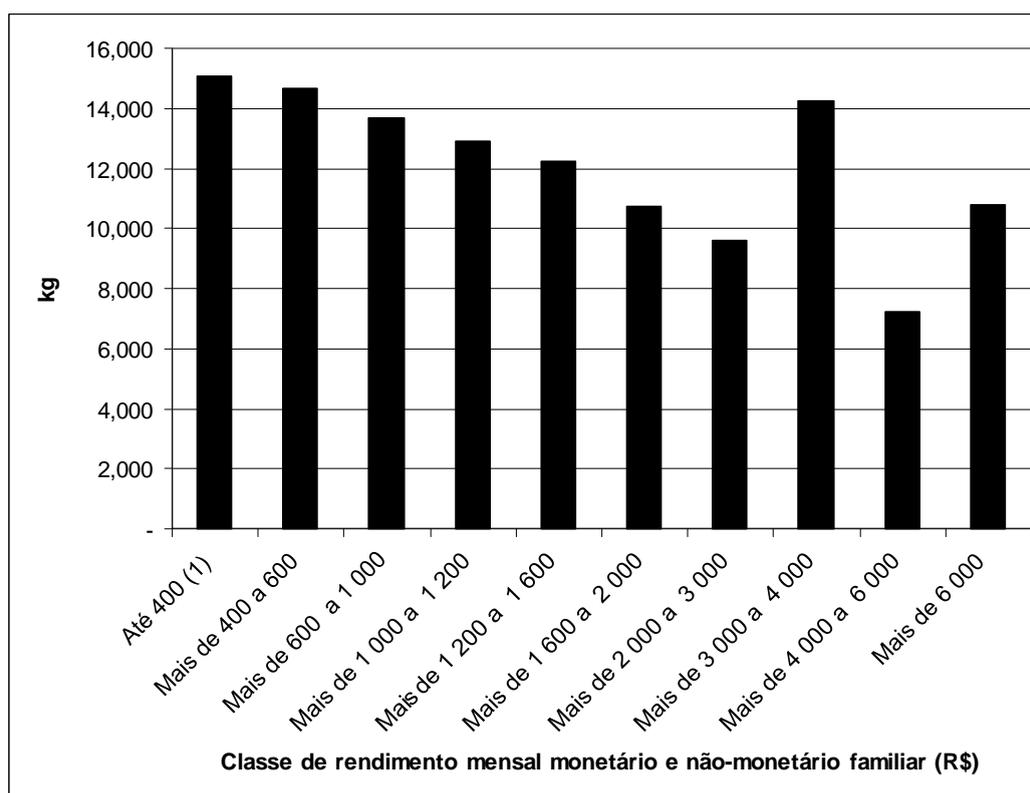


Figura V.15. Consumo domiciliar *per capita* de feijão no Brasil por faixa de renda em 2002-2003. Fonte: IBGE (2010c).

Nos últimos 20 anos a cultura do feijão no Brasil passou por intensas modificações, destacando-se o aumento de produtividade, principalmente na terceira safra, e a concentração da produção em regiões mais favorecidas. A dinâmica dos acontecimentos culminou num processo de polarização da produção de feijão em três regiões: (a) Paraná e sul de São Paulo, (b) entorno do Distrito Federal, e (c) na Bahia. Os dados sobre consumo indicam que o consumo *per capita* no período de 1998 a 2006 aumentou, e as informações da POF indicam que a quantidade de feijão consumida no domicílio em 2002/03 foi maior nas faixas com menor renda per capita.

O evento de transformação genética (feijão Embrapa 5.1)

O feijão (*P. vulgaris*) geneticamente modificado, de que trata essa solicitação de liberação comercial foi desenvolvido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). Esse evento, chamado nessa proposta de Embrapa 5.1 (EMB-PVØ51-6), foi gerado com o uso da estratégia de RNA interferente (RNAi) e é resistente ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro [cuja nomenclatura oficial em língua inglesa é *Bean golden mosaic virus* (BGMV)]. O evento Embrapa 5.1 foi obtido a partir da inserção de transgenes no genoma nuclear com a utilização do método de biobalística descrito por Aragão et al. (1996). Para obtenção de resistência ao vírus foi inserido um gene quimérico para expressão de um RNA contendo um fragmento, posicionado em senso e antisenso (intercalados por um intron), do gene *rep* (*AC1*) do BGMV. Esse RNA foi desenhado para formar um grampo com seqüências de RNA de dupla fita (dsRNA) que são reconhecidas pela maquinaria celular para geração de pequenos fragmentos de RNA (siRNA) que interferem na expressão do gene *rep* viral. Como consequência da falta de expressão do gene *rep*, a replicação viral é comprometida e as plantas se tornam resistentes ao vírus (Figura V.16). O cassette de expressão do RNA grampo (hpRNA) será chamado doravante de $\Delta AC1hpRNA$. Para seleção dos brotos geneticamente modificados originados de células apicais de em embriões zigóticos de feijão foi inserido o gene *csr1.2* (também chamado de *AtAhas*; essa será a nomenclatura utilizada nesse documento) de *Arabidopsis thaliana* com seu promotor e região não traduzida 3' (3'UTR) nativos. O gene *Atahas* codifica a subunidade maior da enzima acetohidroxiácido sintase (AtAHAS), também chamada de acetolactato sintase, que confere tolerância aos herbicidas do grupo químico das imidazolinonas. Embora o evento Embrapa 5.1 tenha cópias íntegras do gene *AtAhas*, se verificou que as plantas não têm significativa tolerância aos herbicidas. A tolerância é suficiente apenas para que permita a seleção de brotações geradas a partir de células transformadas, originadas a partir do meristema apical de embriões de feijoeiro. O evento Embrapa 5.1 é a base para o desenvolvimento de variedades comerciais de feijoeiro de diversos grupos para cultivo no Brasil.

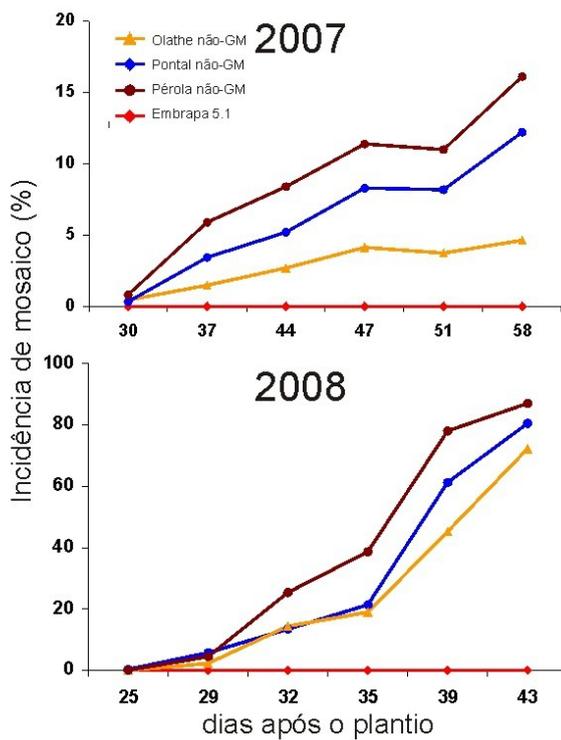


Figura V.16. Desenvolvimento do evento Embrapa 5.1. O evento 5.1 foi inicialmente testado em condições de casa de vegetação mostrando alta resistência ao mosaico dourado, mesmo após inoculação mediada por um grande número de moscas brancas virulíferas por planta e durante todo o ciclo de vida da planta. Essas plantas foram testadas em condições de campo e também demonstraram alta resistência em condições de inoculação natural, em que as plantas não-GM mostram cerca de 18% (em 2007) e 90% (em 2008), enquanto as plantas GM não mostraram sintomas.

A seguir há uma descrição detalhada do mosaico dourado, causado pelo BGMV, que é uma doença importante para a cultura do feijoeiro no Brasil e outros países das Américas, como mostra o mapa da Figura V.17.

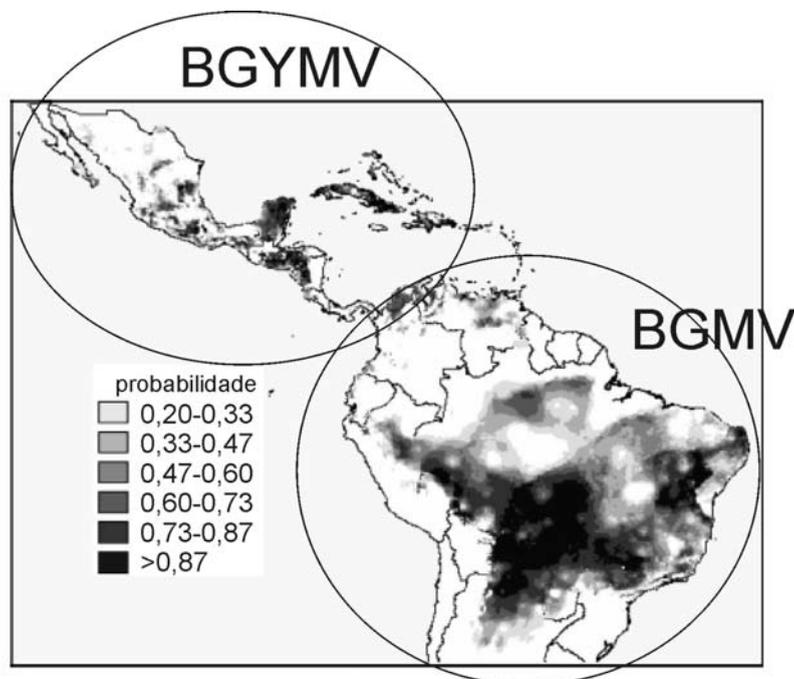


Figura V.17. Probabilidade de ocorrência dos Begomovirus que infectam feijão (*Bean golden mosaic virus* e *Bean golden yellow mosaic vírus*) (adaptado de Morales & Jones, 2004)

O mosaico dourado do feijoeiro e possíveis métodos de controle

O mosaico dourado (MD) do feijoeiro foi primeiramente encontrado no município de Campinas, SP, nos arredores do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) pelo virologista Álvaro Santos Costa (Costa, 1965) e desde então o agente causal disseminou-se por quase todas as regiões produtoras de feijão do País, principalmente aquelas com climas propícios ao desenvolvimento do inseto vetor, *Bemisia tabaci*, Genn. (Costa, 1987; Faria & Maxwell, 1999). Na época a doença foi vista como de menor importância dada a sua restrita ocorrência. A sintomatologia da doença pode ser descrita como um amarelecimento foliar brilhante e intenso ou dourado que geralmente

se inicia nas primeiras folhas trifolioladas, mas que ocasionalmente pode também se iniciar nas folhas primárias em casos de inoculações precoces (Faria, 2000). Frequentemente observa-se uma rugosidade característica e o enrolamento ou encarquilhamento das folhas das cultivares mais sensíveis à doença. As plantas podem ainda apresentar sintomas de nanismo e/ou superbrotamento. Plantas infectadas precocemente tendem a alongar o ciclo vegetativo, fato relacionado ao excessivo abortamento de flores. As vagens, quando desenvolvem, mostram-se deformadas e de tamanho reduzidos, com as sementes subdesenvolvidas, afetando a qualidade final dos grãos e o seu valor comercial (Figura V.18).

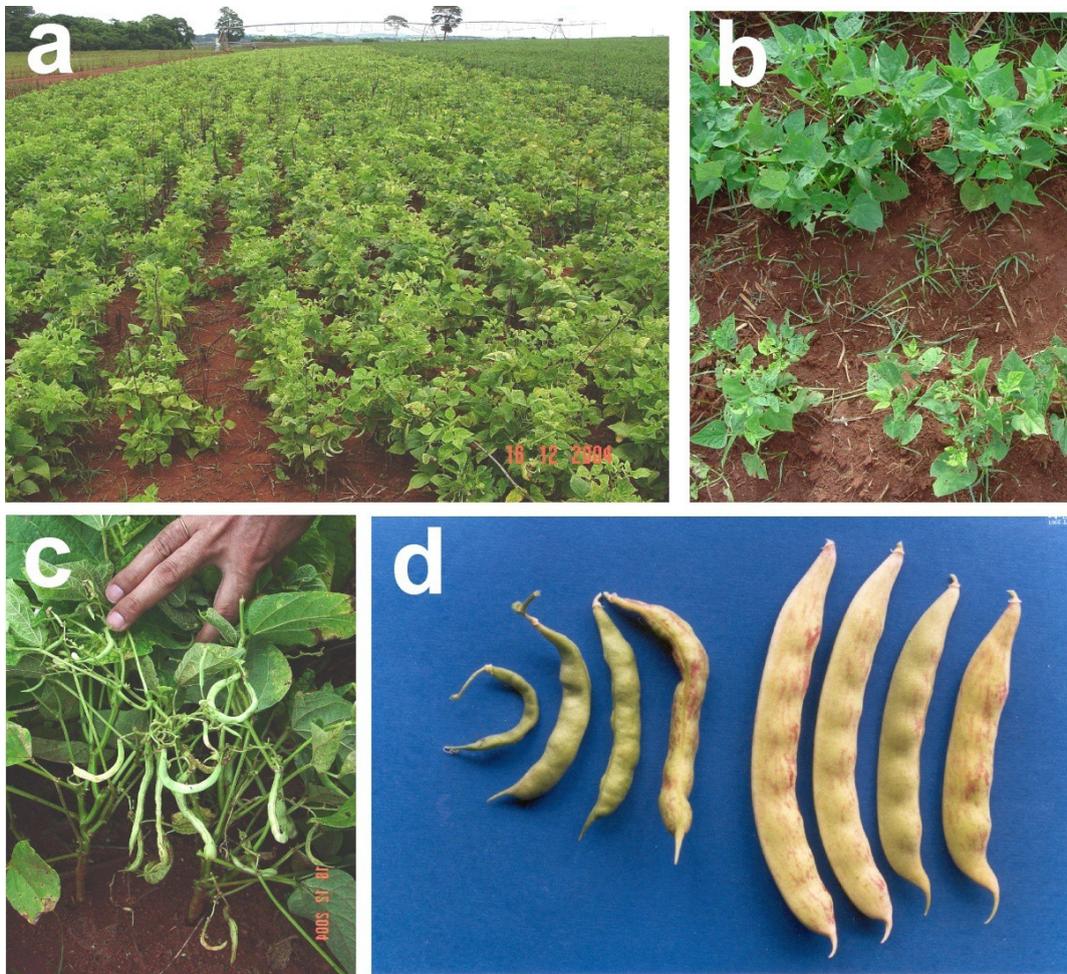


Figura V.18. Sintomas causados pelo *Bean golden mosaic virus*. a) Campo em que praticamente todas as plantas estão infectadas pelo vírus. b) Plantas com sintomas de mosaico e nanismo (embaixo) comparadas com plantas saudáveis (acima). c) Planta mostrando nanismo e deformação nas vagens. (d) Vagens de plantas infectadas (esquerda) comparadas com vagens produzidas em plantas saudáveis (direita).

O Vírus do Mosaico Dourado- taxonomia e organização genômica

O vírus do mosaico dourado (VMDF) ou de acordo com a nomenclatura corrente internacional *Bean golden mosaic virus* (BGMV), pertence ao gênero *Begomovirus*, família *Geminiviridae*. Durante as últimas décadas os vírus do gênero *Begomovirus* [todos são transmitidos por mosca branca (*Bemisia tabaci*)] tornaram-se conhecidos como fitoviroses de grande importância econômica (doenças emergentes), especialmente nas regiões tropicais e subtropicais, causando severas perdas econômicas e ameaçando seriamente a produção de alimentos, o abastecimento, e a segurança alimentares. Os virions dos membros da família *Geminiviridae*, apresentam-se como partículas geminadas características, icosaédricas, com 18 x 30 nm, as quais encapsidam DNA genômico circular, de fita simples, de aproximadamente 2,6 Kb. Trata-se de vírus com replicação no núcleo de células dos tecidos do floema de plantas pelo mecanismo conhecido como “círculo rolante” que utiliza fita dupla de DNA como intermediário da replicação.

O BGMV foi clonado e completamente seqüenciado (Gilbertson et al., 1993), sendo as seqüências depositadas no GenBank com os números de acesso M88686 e M88687, para os componentes A e B respectivamente. O genoma clonado foi purificado de feijoeiro infectado pelo vírus coletado na Embrapa Arroz e Feijão, Fazenda Capivara, em Santo Antônio de Goiás, GO, em 1986. Os agentes causais de outros vírus causando mosaico dourado amarelo (*Bean golden yellow mosaic virus*, BGYMV) em feijoeiro na América Central, Caribe e América do Norte também foram seqüenciados e são distintos do BGMV tanto em propriedades biológicas como na seqüência do DNA (Faria et al., 1994; Blair et al., 1995; Garrido-Ramirez et al., 2000).

A organização do genoma de todos os geminivírus é muito similar. A seguir, mostra-se apenas parte da organização dentro do gênero *Begomovirus*, no qual se encontra o BGMV. Eles podem apresentar o genoma bipartido, como em *Bean golden mosaic virus*, ou monopartido, como em *Tomato yellow leaf curl virus*, podendo ou não apresentar o satélite denominado de DNA β . A Figura V.19 apresenta a organização genômica para o caso de genoma bipartido típico.

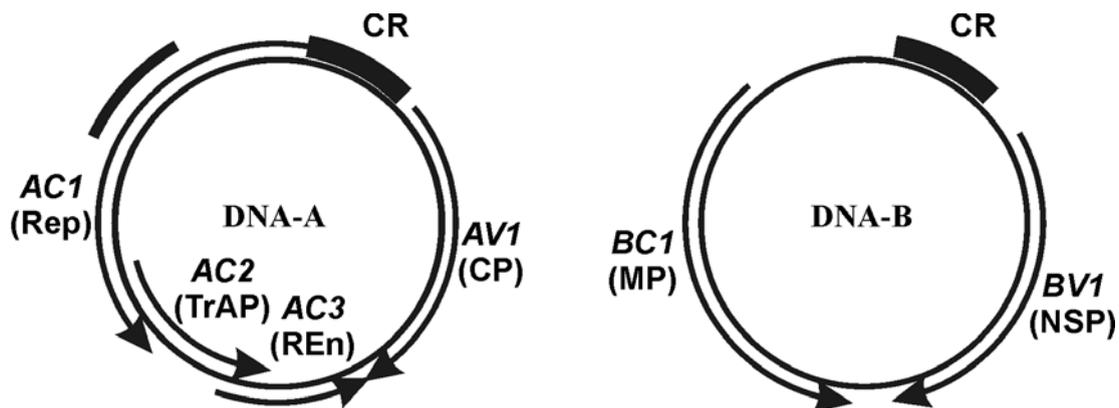


Figura V.19. Organização genômica de Begomovirus. As setas representam as seções abertas de leitura (ORF). Rep – proteína associada à replicação; cp – capa protéica, TrAP- proteína ativadora da transcrição, REn- proteína amplificadora da replicação, CR- região comum, NSP – proteína de movimento nuclear (*nuclear shuttle*), e MP – proteína de movimento.

O DNA-A e DNA-B de *Begomovirus* apresentam diferenças em suas seqüências, exceto uma seqüência de aproximadamente 200 nucleotídeos denominada de região comum (RC), localizadas na região intergênica. A região comum é idêntica entre os componentes A e B (DNA-A e DNA-B) de um mesmo vírus (>91%), mas é diferente entre vírus distintos com exceção de um elemento de 30 nucleotídeos (nt), conservado entre os geminivírus que infectam um mesmo tipo de hospedeiro (dicotiledôneas ou monocotiledôneas) (Timmermans et al., 1994). A estrutura em grampo encontrada na região comum possui uma seqüência nonanucleotídica característica dos geminivírus (TAATATT↓AC) que constitui o sítio da origem de replicação do DNA viral, as seqüências de ligação reconhecidas pela proteína REP, e seqüências da regulação de transcrição bidirecional (Orozco & Hanley-Bowdoin, 1996). A região intergênica contém seqüências promotoras da RNA polimerase II responsável pela transcrição de genes em ambos os sentidos (viral e complementar). O DNA-A contém um total de quatro genes, sendo um no sentido viral - o gene que codifica a proteína da capa (*cp*) - e três no sentido complementar: *Rep*, *TRap*, *REn*. No DNA-B estão presentes dois genes, responsáveis pelas proteínas MP e NSP. A movimentação do vírus no interior da célula e célula-a-célula é mediada pelas proteínas codificadas por genes do DNA-B. A proteína NSP (*Nuclear Shuttle Protein*, também chamada de BV1 e BR1) é necessária

no tráfico intracelular do DNA viral do núcleo para o citoplasma, enquanto que a MP - *Movement Protein* - (também conhecida como BC1 e BL1) é envolvida no movimento do DNA viral célula-a-célula (Palmer & Rybicki, 1998).

A capa protéica é a única proteína estrutural dos geminivírus, sendo capaz de formar multímeros, e encapsida o ssDNA viral resultando nas partículas geminadas características. Sabe-se que a CP é responsável pela especificidade do vetor de transmissão, mas não é necessária para o movimento do vírus no hospedeiro, ou para a infectividade. Há indicações de que interage e regula a produção de *rep*, tendo, portanto, papel no controle da replicação do DNA (Malik et al., 2005).

A proteína REP é a proteína associada à replicação e é responsável por iniciar e intermediar a replicação via círculo rolante. É constituída por vários domínios estruturais responsáveis por uma gama de funções durante a replicação do DNA. REP se liga de modo altamente específico a sequência do DNA denominada de iterons localizadas na região comum, reprime o seu próprio promotor, cliva e liga DNA e funciona como helicase, além de interagir com proteínas do hospedeiro e consigo mesma. Mutações na proteína REP em geral causam a incapacidade de replicar ao vírus (razão de sua escolha para a utilização em resistência derivada do patógeno - PDR).

Perdas causadas pelo mosaico dourado

As perdas estimadas da produção de grãos devido à doença podem variar de 40 a 100% dependendo da incidência, da época de plantio e da cultivar (Costa, 1987). As avaliações de perdas incitadas pelo mosaico dourado podem ser realizadas em condições de casa de vegetação ou de campo. Costa & Cupertino (1976) foram os primeiros a avaliar detalhadamente as perdas, utilizando um estudo de casa de vegetação. Os autores inocularam a cultivar 'Rico 23' aos 15 e 30 dias após o semeio, e observaram reduções de rendimento de 85% e 48% respectivamente. Observaram ainda redução no tamanho dos grãos, número de grãos por vagem, comprimento das vagens, altura das plantas e prolongamento do ciclo das plantas. Menten et al. (1980) avaliaram as perdas pelo mosaico dourado em condições de campo, para a cultivar Carioca, no estado de São Paulo. Foi tomado por base nos estudos a marcação de plantas com e sem sintomas da doença no campo, no estágio de floração, para a posterior colheita. Além das perdas de até 61% de massa dos grãos (ou 64%, se as considerasse como sementes),

houve efeito negativo da virose sobre parâmetros de qualidade, como a velocidade de emergência de plântulas derivadas das sementes, comprimento do hipocótilo, altura das plântulas e presença de microorganismos aderidos às sementes. Faria & Zimmermann (1988) compararam cultivares com ou sem aplicação de inseticidas em Rio Verde (GO) quanto a aspectos de perdas de produção e de resistência. A incidência de mosaico dourado foi acompanhada desde o aparecimento dos primeiros sintomas aos 22 dias após o semeio até aos 55 dias. Notaram-se correlações significativas entre as incidências de mosaico e a produção, sendo as correlações mais altas aquelas obtidas com leituras de incidência realizadas aos 33 e aos 42 dias (-0,67, com $P < 0,01$, $n=96$) após o semeio. Estas datas coincidem com o início e final do florescimento, respectivamente. As perdas obtidas, calculadas em relação ao tratamento com carbofuran e cinco pulverizações com monocrotofós, foram de 76 a 91% (média de 87%), dependendo da cultivar. A incidência máxima de doença foi de 95%, aos 55 dias após o semeio. Vicente et al. (1988) observaram as incidências de mosaico dourado em Presidente Prudente (SP) durante dois anos, em semeaduras de março e maio, com ou sem tratamento com inseticidas. A doença foi avaliada aos 15, 45 e 60 dias após o semeio. A incidência de doença foi alta nos semeios de março (com 100 e 10% aos 45 dias, em 1985 e 1986, respectivamente), enquanto nos semeios de maio, as incidências foram reduzidas, mesmo aos 60 dias, para cerca de 24%, em ambos os anos. As perdas de produção atingiram 40%. Barbosa et al. (2002) em experimentos avaliando o efeito de inseticidas no tratamento de sementes e também em pulverizações, obtiveram incidências em até 42% das plantas, com uma redução de produção de até 39%.

Acredita-se que pelo menos 200.000 hectares estão atualmente inviabilizados para o cultivo do feijoeiro na safra “da seca”, nas Regiões Sudeste, Centro-Oeste, e Sul (Norte do Paraná) (Melo et al., 2005).

Com o objetivo de determinar o período de proteção da cultura do feijão contra a infecção pelo vírus do mosaico dourado, foram avaliadas as perdas de rendimento ocasionadas pelo MD, nas cultivares Jalo Precoce (ciclo curto), Carioca e Pérola (ciclo médio/tardio). Estas cultivares foram escolhidas a fim de definir a época de inoculação em que ocorrem danos significativos e também o período no qual é necessário adotar medidas de controle. Em casos extremos, em que ocorram incidências de MD próximas de 100%, as medidas de controle não são mais necessárias, por não resultarem em incrementos significativos na produção. Os estudos foram conduzidos em condições de

casa telada, na Embrapa Arroz e Feijão. O delineamento experimental foi o inteiramente ao acaso, com três cultivares e oito épocas de infecção. Cada unidade experimental foi constituída de um vaso/duas plantas/cultivar/época de infecção, com dez repetições, totalizando 80 vasos/cv. O semeio foi realizado em vasos contendo 5 kg de solo previamente fertilizado, tendo sido deixadas duas plantas por vaso após o desbaste. O semeio foi iniciado em diferentes épocas, de modo que a inoculação foi realizada simultaneamente para todos os tratamentos. Grupos de 20 plantas/cultivar (duas plantas/vaso) foram inoculados em intervalos semanais, iniciando uma semana após a emergência das plântulas até aos 56 dias, com intervalos de sete dias. Foi mantido um grupo de plantas como controle (20 plantas/cultivar) sem inoculação. Terminado o período de inoculação de três dias, as plantas foram pulverizadas com inseticidas para mantê-las livres de insetos até o final do ciclo e evitar que as testemunhas fossem infectadas. As plantas foram avaliadas quanto ao grau de deformação das vagens e a produtividade. Os resultados são apresentados em percentagem de vagens deformadas e da redução de massa dos grãos produzidos em relação à respectiva testemunha não inoculada.

Ficou evidenciado em todas as cultivares que a inoculação precoce das plantas (até aos 21 dias após a emergência- DAE) resulta em perda total de produção das plantas. A partir desta época há uma diferenciação entre cultivar precoce e de ciclo médio/tardio, sendo que aos 28 DAE, a redução da deformação foi significativa apenas para a cultivar precoce, e não para as de ciclo médio. A inoculação aos 35 DAE não teve efeito sobre a cultivar Jalo Precoce, mas ainda mostrou efeito sobre as cultivares mais tardias. Ficou claro que estas estão correlacionadas ao período de floração. Quando a infecção pelo VMDF ocorreu após a floração média causou pouco ou nenhum dano à planta (Tabela V.10). Estes dados têm implicações diretas no estabelecimento de um programa de manejo da doença, seja pelo controle químico das moscas brancas, ou pela época de semeio, para evitar a infecção precoce.

Tabela V.10. Danos causados e períodos de proteção para reduzir o impacto do mosaico dourado.

Dias após a emergência	Percentagem de vagens deformadas/percentagem de perda de massa de grãos		
	Jalo Precoce	Carioca	Pérola
A (7)	-*/100,0	-/100,0	-/100,0
B (14)	-/48,2	-/100,0	-/100,0
C (21)	100,0/82,2	-/100,0	-/100,0
D (28)	48,2/55,6	95,5/90,8	78,6/90,0
E (35)	0,0/0,0	45,0/46,0	52,2/61,1
F (42)	--**/3,0	--/12,4	3,2/21,3
G (49)	--/1,7	--/15,3	--/10,1
H (56)	--/0,0	--/11,6	--/8,2
I (testemunha)	--0,0	--/0,0	--/0,0

-*Não houve formação de vagens;

--**não houve deformação.

Resistência genética ao mosaico dourado

A busca por cultivares resistentes ao mosaico dourado foi iniciada na década de 70 (Galvez & Morales, 1989) tendo sido encontrados apenas baixos níveis de tolerância à doença. Não existe cultivar com nível adequado de resistência ao mosaico dourado em utilização no Brasil, e também não foi observada imunidade à doença no gênero *Phaseolus* (Bianchini, 1999; Faria et al., 2000). Há tolerância em cultivares de origem meso-americana, especialmente ao BGYMV, mas não há imunidade (Garrido-Ramirez et al., 2000). Como consequência desta falta de alto nível de resistência genética, o controle do mosaico dourado tornou-se dependente de práticas culturais que possam facilitar o manejo da doença e de métodos de controle químico do vetor.

O Vetor - Mosca Branca

Em termos epidemiológicos os insetos constituem-se nos mais importantes fatores na transmissão de fitovirose. Os geminivírus pertencentes ao gênero *Begomovirus* são transmitidos pela mosca branca, *Bemisia tabaci* Gennadius (1889). A transmissão do BGMV pelo vetor se dá de modo circulativo (não replicativo),

persistente (Hohn, 2007). Os geminivírus não possuem nenhum fator conhecido de transmissão pelo inseto, dependendo tão somente da proteína capsidial (Hohn, 2007). Por outro lado, existe um relacionamento íntimo e evolucionariamente estável entre vírus–vetor-endosimbionte de *Bemisia tabaci* que, juntamente com a capacidade extraordinária de adaptar a ambientes modificados para o uso na agricultura, torna este complexo totalmente diferenciado. Contudo, a interação entre estes fatores permanece sem uma definição conclusiva (Brown, 2007a). O complexo relacionamento begomovírus-vetor (Brown, 2007b) exhibe absoluta especificidade de transmissão entre o gênero viral e a espécie de mosca branca. Recentemente apareceram evidências de que a competência de transmissão ou a eficiência de transmissão pode variar. Há maior competência de transmissão para complexos begomovírus-*B. tabaci* que têm a mesma origem geográfica (Bedford et al., 1994; Sseruwagi et al., 2006).

A mosca branca é classificada na família *Aleyrodidae* (Sternorrhyncha: Hemiptera/s.o. Homoptera). Os parentais mais próximos das moscas brancas seriam os afídeos e cochonilhas, que possuem aparelhos bucais capazes de perfurar e succionar, e se especializaram em se alimentar do floema das plantas hospedeiras. O sistema de reprodução das moscas brancas é totalmente distinto de outros insetos: trata-se de um sistema de reprodução haplo-diplóide no qual os ovos fertilizados dão origem a fêmeas, enquanto que os machos são provenientes de ovos não fertilizados. Geneticamente isto significa que os machos têm herança maternal enquanto as fêmeas têm herança de ambos os pais, e assim maior diversidade. A relação macho:fêmea na população é regulada por uma produção abundante de fêmeas quando a população de machos se torna muito alta. Por outro lado, mais machos são produzidos quando a oferta de machos está em declínio devido ao alto número de ovos não fertilizados que, por sua vez, redundam em mais fêmeas sendo produzidas (Brown, 2007a).

No Brasil, a mosca branca *Bemisia tabaci* é conhecida desde 1923, em plantas daninhas e cultivadas, sendo considerada importante vetor de vírus, como o mosaico dourado do feijoeiro. A sua presença foi relatada em lavouras de algodão, em 1968, no norte do Paraná. A partir de 1972/73, devido a condições favoráveis e à grande expansão da cultura da soja, surgiram elevadas populações de mosca branca no norte do Paraná e sul de São Paulo, além de outras regiões do país (Costa, 1975).

Na década de 1980, um novo biótipo caracterizado por ter maior diversidade de plantas hospedeiras, e principalmente por sua estreita associação com a planta

ornamental poinsetia (bico de papagaio) *Euphorbia pulcherrima* Wild, adquiriu enorme importância nos EUA, Caribe e América Central. A partir de 1986, este biótipo foi observado causando danos em estufas de produção de poinsetia na Flórida. Após detalhados estudos biológicos e caracterização eletroforética, conclui-se pela existência de uma nova espécie, então denominada de *Bemisia argentifolii* Bellows et al. (1994). Atualmente, esta espécie é considerada como *Bemisia tabaci* biótipo B. A mosca branca vem causando elevados prejuízos nas principais culturas de importância econômica como a soja, algodão, tomate e feijão, nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste.

Ciclo de vida – variação com os hospedeiros

A mosca branca, na realidade, é de coloração amarelo-pálida. Os adultos medem de 1 a 2 mm, sendo a fêmea maior que o macho. O abdômen é geralmente bem visível quando encontra-se em repouso. A longevidade dos machos varia de 9 a 17 dias, com média de 13; e as fêmeas, de 38 a 74 dias, com média de 62 dias. Contudo, esta longevidade varia com o hospedeiro e as condições climáticas. As seguintes etapas do ciclo de vida podem ser generalizadas: a) ovos-período de incubação – 3 a 6 dias; b) ninfas – 10 dias; c) pupas – 4 dias; d) número de gerações – 11 a 15 por ano. O potencial biótico da espécie foi avaliado em abobrinha, feijão, mandioca, milho, poinsetia, repolho e tomate por Villas Bôas et al. (2002). A melhor capacidade de crescimento da população no presente estudo foi obtida em feijão e repolho, enquanto as maiores mortalidades foram em milho e mandioca (94,2% e 97,9%). A razão sexual em geral foi favorável às fêmeas. A Figura V.20 ilustra o inseto adulto e as fases iniciais do desenvolvimento em plantas de soja e feijão.



Figura V.20. Adultos de mosca branca em soja (esquerda) e feijão (direita).

Na região Centro-Oeste o sistema produtivo é composto de diversas culturas como soja, tomate, algodão, feijão, milho, sorgo, trigo e hortaliças. Excetuando as gramíneas, as demais culturas são hospedeiras da mosca branca. As épocas de plantio das culturas e a dinâmica populacional da mosca branca podem ser visualizadas de forma esquemática na Figura V.21.



Figura V.21. Culturas hospedeiras da mosca branca no panorama do sistema agrícola de produção no Centro Oeste.

Com o cultivo intensivo de lavouras e a oferta constante de alimentos, a população da mosca branca mantém-se em elevado nível, causando danos diretos e indiretos. Esta alta densidade populacional da mosca branca, nas diferentes épocas de cultivo, vem sendo a responsável pela infestação desde a fase inicial de desenvolvimento das culturas.

Os principais fatores que influenciam no desenvolvimento populacional da mosca branca são as condições climáticas de alta temperatura e a diversidade de plantas hospedeiras com a conseqüente oferta de alimento durante o ano. Em períodos de estiagem o crescimento populacional pode ser acelerado, atingindo níveis que causam

danos consideráveis na produção. Em condições de ocorrência de chuvas intermitentes, o crescimento populacional da mosca branca pode ser menor, devido à temperatura mais amena e em consequência pelo alongamento do ciclo de vida do inseto. Durante o ano, em condições de altas temperaturas, é possível a ocorrência de 11 a 15 gerações de mosca branca.

Na região Centro-Oeste, antes do advento da irrigação por pivô central, o cultivo (plantio das lavouras) era realizado principalmente no período das chuvas (outubro/novembro), e em segunda safra, denominada de safrinha, em janeiro e fevereiro. A colheita encerrava-se nos meses de abril e maio. Entre os meses de maio a outubro, período sem precipitação e o cultivo de culturas, verificava-se a redução da população da mosca branca pela falta de plantas hospedeiras para o seu desenvolvimento. Na implantação da nova safra em outubro, o nível populacional inicial da mosca branca era baixo. Esta população atingia níveis elevados em fevereiro/março, época em que a cultura do feijoeiro sofria as maiores perdas devido à transmissão do mosaico dourado. Com a irrigação por pivô central, houve uma ampliação nas épocas de plantio das lavouras. Quando a lavoura de soja entra na fase de maturação, a população da mosca branca desenvolvida em cada época de semeio inicia o processo de migração, colonizando as culturas em desenvolvimento. A coincidência entre a colheita do feijão e tomate, em outubro, com o início de desenvolvimento da soja, propicia uma condição inicial de um novo ciclo da cultura a qual já se inicia com alta população de mosca branca.

A Figura V.22 ilustra bem este fato. As fotos foram tomadas em uma mesma data em fazenda localizada no estado de Goiás, em 2006. Havia lavouras iniciadas em pelo menos quatro épocas.



Figura V.22. Plantio escalonado de feijoeiro contribuindo para o avanço da mosca branca e conseqüentemente do mosaico dourado sob pivô central.

São três as diferentes épocas de plantio da cultura do feijão. Nas regiões Sul e Sudeste, a principal época de plantio denominada de “safra” é entre os meses de setembro a dezembro. Em seguida aparece a segunda época de plantio, “safrinha”, cultivo de nível tecnológico baixo. Mais especificamente na região nordeste do estado do Paraná e sul de São Paulo, a mosca branca tem causado danos consideráveis à cultura do feijão pela transmissão do BGMV. Os primeiros cultivos de feijão e soja realizados em setembro iniciam o processo de multiplicação da mosca branca. Durante o desenvolvimento destas culturas e com a elevação da temperatura, a mosca branca encontra ambiente ideal para o seu desenvolvimento atingindo níveis populacionais elevados. Nos plantios de setembro/outubro, a taxa de plantas de feijoeiro com MD ainda é baixo. A população da mosca branca desenvolvida no feijoeiro tende a aumentar a taxa de adultos virulíferos, portanto com capacidade de transmissão do MD. Em plantios escalonados a partir de meados de novembro, a probabilidade de ocorrência de MD no feijoeiro, é alta no início do desenvolvimento vegetativo. Quanto mais precoce ocorrer a transmissão do MD nas plantas, maiores serão as perdas.

Na região Centro-Oeste e parte da região Sudeste, as principais épocas de plantio de feijão são: “safrinha” e “inverno”. O feijão da “safrinha” tende a ser muito afetado

pela mosca branca (e mosaico dourado) proveniente da cultura da soja, em fase de maturação e colheita. A safra de “inverno” que tem início em meados de março se estende até os meses de julho/agosto. Em março/abril a mosca migrante é proveniente da cultura da soja em fase de maturação fisiológica.

Controle da mosca branca

O principal método de controle da mosca branca continua sendo o químico. Um número aproximado de 23 princípios ativos está registrado para o controle da mosca branca no feijoeiro, entretanto, poucos deles têm se mostrado eficientes. Em testes realizados em condições controladas, os princípios ativos do grupo dos organofosforados, piretróides, carbamatos, foram eficientes no controle de adultos da mosca branca *B. tabaci* raça A, mas ineficientes para a *B. tabaci* raça B.

Os inseticidas do grupo dos neonicotinóides têm sido eficientes no controle de adultos da mosca branca *B. tabaci* raça B. Os princípios ativos thiamethoxan, acetamiprid e imidacloprid foram os mais eficientes no controle de adultos da mosca branca *B. tabaci* raça B. O thiametoxan e o imidacloprid são posicionados em tratamento de sementes e em pulverizações.

Atualmente, em testes realizados com os neonicotinóides, em pulverização, tem-se verificado uma redução acentuada na eficiência e no efeito residual para o controle de adultos. Este fato tem como principal causa, a exposição contínua das populações de mosca branca aos neonicotinóides, largamente utilizados no seu controle.

O inseticida pyriproxyfen, análogo do hormônio juvenil, afeta o balanço hormonal dos insetos causando a supressão da embriogênese quando o adulto ou os ovos são tratados e também afetam a formação dos adultos quando as larvas são expostas ao produto. Possui um espectro mais amplo de controle da mosca branca, atuando sobre ovos e ninfas. Este produto exibe atividade translaminar, pois no tratamento da superfície foliar, os ovos e as ninfas presentes na face inferior são afetados.

No estabelecimento de uma lavoura de feijão, com probabilidade de ser infestada pela mosca branca provenientes de outras culturas em fase de colheita (ex. soja), recomenda-se como medida preventiva o tratamento de sementes e pulverizações sequenciais com adulticidas. Em áreas de cultivo sequencial de feijoeiro, esta mesma

recomendação não terá o efeito esperado, porque ocorre a migração de adultos virulíferos com o vírus do mosaico dourado. O inseticida atua com eficiência no controle de adultos da mosca branca, mas não é capaz de evitar a transmissão da virose.

Os inseticidas recomendados para o controle de adultos, têm pouca ação sobre ninfas. Portanto, as aplicações visando somente o controle de adultos têm resultado em pulverizações seqüenciais, com elevação nos custos de produção, sem o efeito desejado para a eliminação da mosca branca. Após a aplicação de um inseticida adulticida, e com o fim do efeito residual, uma nova população de adultos, se estabelece na cultura, porque não há quebra do ciclo de vida da praga.

Em áreas da cultura de feijão estabelecido, infestada com a mosca branca, recomenda-se o controle químico com inseticida de ação sobre ovos e ninfas, complementando com a aplicação de adulticidas, visando a quebra do ciclo da praga na lavoura. À medida que a população da mosca branca é controlada pela ação de inseticidas sobre ovos e ninfas, a tendência é diminuir a migração de adultos das lavouras mais velhas para as mais novas. Mesmo com a possibilidade de uma diminuição na população migrante, recomenda-se o tratamento de sementes, como a primeira medida preventiva de controle da mosca branca.

Os produtos do grupo dos organofosforados, piretróides e carbamatos são ineficientes para o controle de adultos, com exceção do endosulfan e cartap. O uso do endosulfan é limitado devido ao seu registro em algumas culturas. O cartap tem apenas ação direta e não tem poder residual. Dentro deste grupo, o registro foi obtido em testes com a mosca branca *Bemisia tabaci* raça A, portanto a comercialização e a aplicação destes produtos ineficientes estão respaldadas pelo registro.

Os neonicotinóides - thiametoxan, imidacloprid e acetamiprid - são eficientes no controle de adultos de mosca branca. Na dose recomendada para o controle de adultos, o efeito sobre as ninfas não atinge a eficiência de 20%.

O posicionamento de tratamento de sementes feijão e pulverizações complementares com thiametoxan e imidacloprid tem apresentado resultados positivos na produção de feijão, quando se tem uma população de mosca migrando de outras culturas como tomate, soja ou algodão. Em plantios escalonados subseqüentes, o mesmo posicionamento de tratamento de sementes de feijão e as aplicações complementares, não têm resultados positivos na produção, porque a mosca virulífera com o vírus do mosaico dourado transmite-o às plantas em desenvolvimento. O produto em tratamento

de sementes é eficaz no controle da mosca, entretanto, não evita a transmissão do vírus. A recomendação é a aplicação de inseticida para o controle de ovos e ninfas, visando a quebra do ciclo da praga.

No posicionamento do tratamento de mudas de tomate na bandeja, os resultados obtidos são similares ao do feijão. Quando a migração da mosca é de outras culturas, pode-se tratar como praga. Nos cultivos escalonados subsequentes, a mosca migrante da cultura do tomate para o tomate é considerada como vetora. A recomendação é o uso de inseticida com ação sobre ovos e ninfas, com o objetivo de quebrar o ciclo da mosca, evitando a migração e a transmissão de viroses nos cultivos subsequentes.

No tratamento de sementes de soja com os neonicotinóides pode reduzir a população da mosca branca em 24 vezes, comparando-se áreas tratadas e sem tratamento. Como resultado do controle da mosca branca há incremento na produção, além da diminuição da praga.

A integração dos resultados obtidos com a avaliação de épocas de infecção pelo vírus do mosaico dourado, ciclo das cultivares e dos diferentes produtos químicos com propriedades diferenciadas de modo a atingir as diferentes fases do ciclo de vida da mosca branca, conduz a algumas ponderações interessantes.

Diversas práticas podem ser utilizadas visando o controle da mosca branca. Dentre as medidas de maior efetividade está a aplicação de medidas legislativas através das Instruções Normativas (IN) que regulamentam as épocas de plantio, eliminação de plantas voluntárias (tigüera) / restos culturais, visando diminuir a oferta de alimentos e, conseqüentemente, baixar a população da praga. A instrução normativa para a cultura da soja tem como objetivo a ferrugem asiática, no algodão o alvo é o bicudo e no tomate é a mosca branca. Embora as INs tenham como foco diferentes alvos, a sua implementação tem atuado de forma sinérgica no manejo da mosca branca, uma vez que todas as culturas são hospedeiras do mesmo inseto alvo.

A limitação da época de plantio visa reduzir a oferta de alimentos para o inseto. Com esta prática existe maior flexibilidade quanto à implantação de novos plantios, após o encerramento da colheita das culturas antecedentes. Na prática, o cultivo intensivo propicia a sobreposição de culturas em diferentes estágios de desenvolvimento, principalmente entre a fase de maturação com a de implantação de uma nova cultura, quando a mosca branca migra das culturas em fase de colheita para aquelas em início de desenvolvimento.

A eliminação de restos culturais deve ser uma prática imediata à colheita. Eliminando-se os restos culturais, seja por método químico ou físico, elimina-se a mosca branca, evitando a migração e infestação de cultivos subsequentes.

No processo de colheita da soja e feijão, há um percentual de perda de grãos que irá resultar na emergência de novas plantas. Estas plantas voluntárias (tigüera), poderão ser uma fonte permanente de manutenção da população da mosca branca e conseqüentemente de viroses por ela transmitida. A eliminação das plantas voluntárias reduz a oferta de alimentos e a multiplicação da mosca neste ambiente.

Em propriedades que adotam o sistema de plantio direto, recomenda-se a realização de amostragens em plantas daninhas, visando determinar o nível populacional da mosca branca. Detectando-se a ocorrência de altas populações de mosca branca, o produtor poderá tomar medidas preventivas como a realização da dessecação, deixando a área em pousio (duas semanas), antes da semeadura. Em caso de semeadura imediata após a dessecação das plantas daninhas, recomenda-se a aplicação de um inseticida na área de plantio para o controle de adultos da mosca branca, antes da emergência da plantas. Já foi observado que, mesmo após o dessecamento, ainda continua a emergência de adultos a partir de ninfas já existentes.

Na década de 90, surgiu um novo grupo de inseticidas, os neonicotinóides, com alta eficácia no controle de adultos de mosca branca. Os princípios ativos que são eficientes no controle de adultos de mosca branca: thiametoxan, imidacloprid e acetamiprid. O thiametoxan e o imidacloprid podem ser aplicados no tratamento de sementes, mudas de tomateiro na bandeja e em pulverização para o controle de adultos da mosca branca. O acetamiprid tem sido utilizado no tratamento de mudas do tomateiro e em pulverização. Devido à falta de outros princípios ativos, os neonicotinóides constituem-se na principal ferramenta utilizada no controle da mosca branca. Esta exposição freqüente da mosca branca a este grupo químico trouxe como consequência, uma redução na eficiência e no poder residual. Atualmente estão sendo desenvolvidos estudos de avaliação de eficácia dos neonicotinóides em populações de mosca branca, de diferentes regiões. Resultados preliminares indicam a necessidade do aumento da dose, de 30 a 50%, em relação à dose recomendada.

Um inseticida que atua sobre ovos e ninfas cujo princípio ativo é o pyriproxyfen, é um análogo do hormônio juvenil e afeta o balanço hormonal dos insetos causando a supressão da embriogênese. Possui ação transovariana, pois adultos em contato com o

produto, efetuam a postura de ovos inviáveis. Este juvenóide tem um espectro mais amplo de controle da mosca branca, atuando sobre ovos e ninfas. Não é eficiente no controle de adultos, mas estes, em contato com o produto, realizam a postura de ovos inviáveis (ação transovariana). Este produto exibe translocação translaminar, pois na aplicação sobre a superfície foliar, os ovos e as ninfas presentes na face inferior, são afetados.

No controle da mosca branca, as aplicações de produtos visando apenas o controle de adultos têm resultado em pulverizações sequenciais, com a elevação dos custos de produção, sem o efeito desejado. A aplicação de inseticidas com ação sobre ovos e ninfas, complementada com adulticidas, tem resultado em efeito positivo na quebra do ciclo da praga na lavoura.

V.2. Classificação taxonômica, a partir de família, até o nível mais detalhado do organismo a ser liberado, incluindo, quando apropriado, subespécie, cultivar, patovar, estirpe e sorotipo.

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), organismo parental do OGM, é um diplóide ($2n=22$) que pertence à família Fabaceae e apresenta a seguinte taxonomia, de acordo com o ITS (*Integrated Taxonomic Information System*, <http://itis.gov>), com o número de série TSN 26857:

Reino: *Plantae* – Plantas
Sub-reino: *Tracheobionta* - Plantas vasculares
Divisão: *Magnoliophyta* - Angiospermas, plantas com flores
Classe: *Magnoliopsida* - Dicotiledôneas
Sub-classe: *Rosidae*
Ordem: *Fabales*
Família: *Fabaceae*
Sub-família: *Faboideae*
Tribo: *Phaseolae*
Sub-Tribo: *Phaseolinae*
Gênero: *Phaseolus* Linnaeus
Espécie: *Phaseolus vulgaris* L. – Feijoeiro comum

Características da planta receptora

A variedade de feijoeiro Olathe foi desenvolvida e lançada pela Colorado State University Experiment Station (EUA) em 1979 (Wood & Keenan, 1982). Essa variedade é resistente a *Uromyces phaseoli* var. *typica*, resistente a 15 estirpes americanas do vírus *Bean common mosaic* e ao *Curly top virus*. Olathe foi o resultado de uma seleção simples feita em 1972 de uma população (bulk 23) composto de uma geração F2 de cruzamentos feitos em 1962 entre uma população F2 (5958-B-1 e B23). Essa variedade foi utilizada na transformação do feijoeiro por causa da morfologia do meristema apical (Aragão & Rech, 1997) e por responder ao estímulo de citocininas, que induz mutibrotação a partir de células meristemáticas apicais de embriões zigóticos. Possui as seguintes características gerais:

Presença/ausência de antocianina nos cotilédones e hipocótilo: Ausente

Tipo de crescimento do caule: Indeterminado, Tipo II, com guia longa, podendo enredar

Porte da planta: Ereto à semi-ereto

Presença/ausência de antocianina no caule: Levemente pigmentado do terço superior ao ápice

Peso de 100 sementes: 39g

Intensidade da cor verde nas folhas: Verde médio

Presença/ ausência de rugosidade na folha: Ausente

Tamanho do folíolo central: Médio

Cor da flor: Branca

Cor da vagem durante a maturação fisiológica: Verde a verde com estrias vermelhas

Cor da vagem madura: Amarela e amarela estriada de roxo

Perfil da vagem: Arqueada; ocorre, também, semi-arqueada e reta

Forma do ápice da vagem: Abrupto

Forma do dente apical da vagem: Arqueado; ocorre também semi-arqueado e reto

Posição do dente apical da vagem: Marginal; ocorre também não marginal

Cor primária da semente: Bege

Cor secundária da semente: Marron

Forma da cor secundária da semente: Pontuações e estrias

Cor do halo: Amarelo



Brilho da semente: Levemente Intermediário

Forma da semente: Elíptica semi-cheia (Convencional) predominam.

Ciclo (dias): Emergência - 8

Floração média (50%) : 26-31

Maturação colheita: 68-70

V.3. Genes introduzidos, organismos de origem e suas funções específicas.

O evento de feijão Embrapa 5.1 foi transformado com o vetor pBGMVRNAiAHAS que contém o cassete de expressão $\Delta AC1hpRNA$ e *AtAhas* (com seu promotor e região não traduzida 3' (3'UTR) nativos). O vetor pBGMVRNAiAHAS foi digerido com a enzima *FspI* para interromper o gene *bla* (de *Escherichia coli*) que confere tolerância aos antibióticos beta-lactâmicos em organismos procarióticos. Desta forma esse gene não está funcional no vetor utilizado para transformação do feijoeiro.

Gene quimérico $\Delta AC1hpRNA$

O gene quimérico $\Delta AC1hpRNA$ consiste de um cassete com a finalidade de expressar um RNA-grampo (hpRNA), formando estrutura de dupla fita, composto de um fragmento de 411 pb do gene *rep* do BGMV (Acesso do GenBank NC 004042; posição 1836-2247) posicionado em senso e antisenso intercalados pelo intro do gene *pdk* (intro do gene da enzima da piruvato ortofosfato diquinase) de *Flaveria trinervia* (*Viridiplantae, Asteraceae*), sob o controle do promotor do RNA 35 do vírus do mosaico da couve-flor [*Cauliflower mosaic virus* (CaMV)], doravante chamado de 35SCaMV (Guilley et al., 1982; Ow et al., 1987). O sinal de poliadenilação e terminação da transcrição está na seqüência 3' do gene da octopina sintase de *Agrobacterium tumefaciens* (doravante chamado de *ocs3'*). Como mencionado, esse cassete é uma construção do tipo *intron-hairpin* (hpRNA) que tem como objetivo expressar um RNA com uma estrutura de grampo, com regiões de dupla fita (dsRNA). O RNA fita dupla (dsRNA) desencadeia uma seqüência de degradação de RNA mensageiro (mRNA) específicos, em um processo conhecido como RNA interferente (RNAi) onde o dsRNA é processado por enzimas DICER-like em pequenos RNA interferentes (siRNA) de 21 a 26 nt (Hamilton & Baulcombe, 1999). Uma fita do siRNA

é relaxada e incorporada a um complexo ribonucleoprotéico (RISC), que contém um membro da família das proteínas Argonaute (AGO) (Brodersen & Voinnet, 2006), guiando esse complexo para um mRNA com uma seqüência complementar, que será clivada, levando ao silenciamento gênico. As Figura V.23 e V.24 descrevem esse mecanismo e a estratégia para obtenção de plantas resistentes ao geminivírus. O objetivo da construção $\Delta AC1hpRNA$ é gerar o silenciamento específico do gene rep (AC1) do BGMV. Como a expressão gene é essencial para a replicação viral, seu silenciamento leva ao comprometimento da geração de novas partículas virais e conseqüentemente à resistência. Análises de Northern blot permitiram detectar os siRNA nos tecidos foliares do evento Embrapa 5.1. Nas sementes, apenas um sinal muito fraco foi observado (dados apresentados na seção V.10).

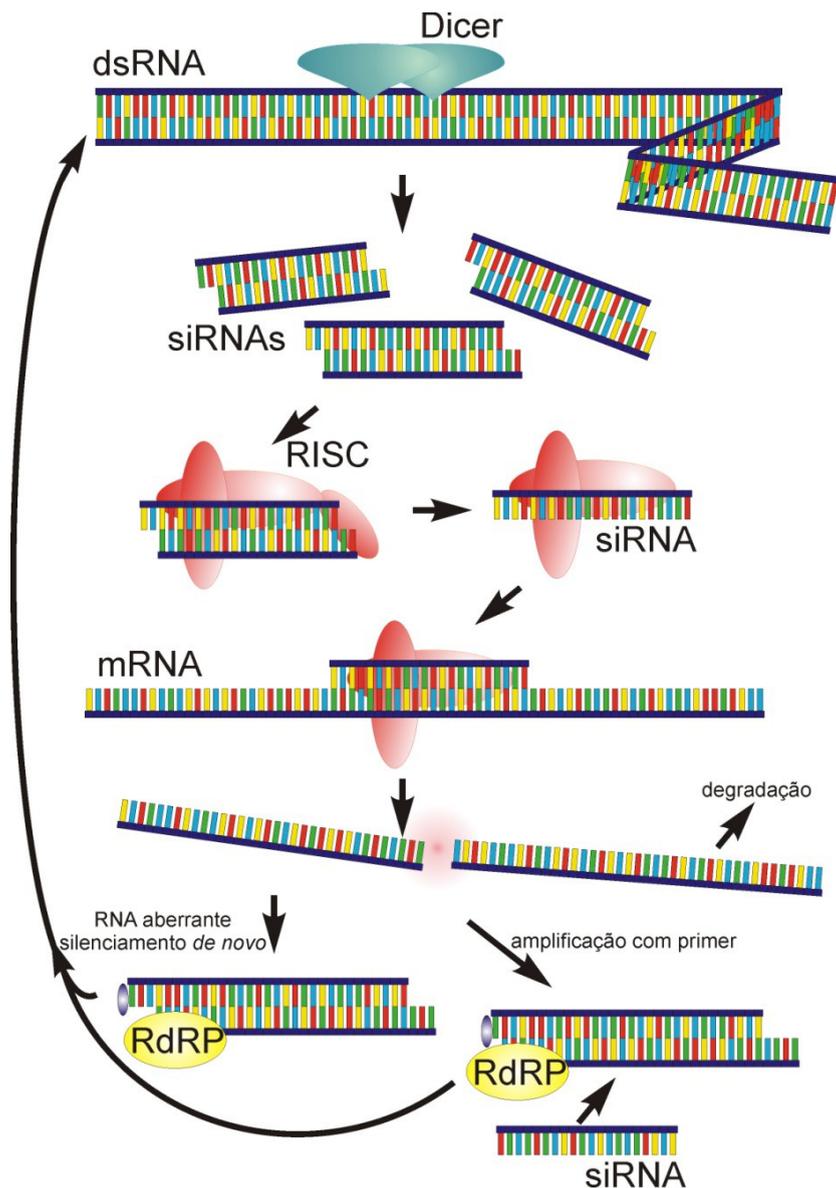


Figura V.23. Um RNA de dupla fita (dsRNA) é expresso na célula (como a construção do transgene, RNA virais etc.) e é reconhecido e clivada pela Dicer, que é membro da superfamília das RNase III, com a geração de RNA de dupla fita pequenos (siRNA) que são caracterizados por dois nucleotídeos salientes na região 3'. Estes siRNA formam um complexo com ribonucleoproteínas, chamado de RISC. O complexo inclui uma nuclease chamada de Slicer que promove o relaxamento dos siRNA. O siRNA de fita simples associado a RISC é acoplado ao RNA alvo de uma maneira que é seqüência específica. O RNA alvo é clivado e pode ser reconhecido pela célula como aberrante e é em seguida degradado, impedindo a sua tradução e, conseqüentemente levando ao silenciamento gênico. Em plantas, o RNA aberrante pode também servir como molde para uma RNA polimerase RNA-dependente (RdRP) para fazer uma nova molécula de dsRNA em um processo não mediado por *primer*. O dsRNA resultante é substrato para Dicer, o que gera mais siRNAs. Em plantas e outros organismos, siRNA não associado à RISC si ligam ao mRNA alvo de uma forma específica e serve como um *primer* para uma RdRP polimerase para síntese da fita antisenso, gerando um dsRNA, que também é um substrato para a Dicer (adaptado de Aragão & Figueiredo, 2009).

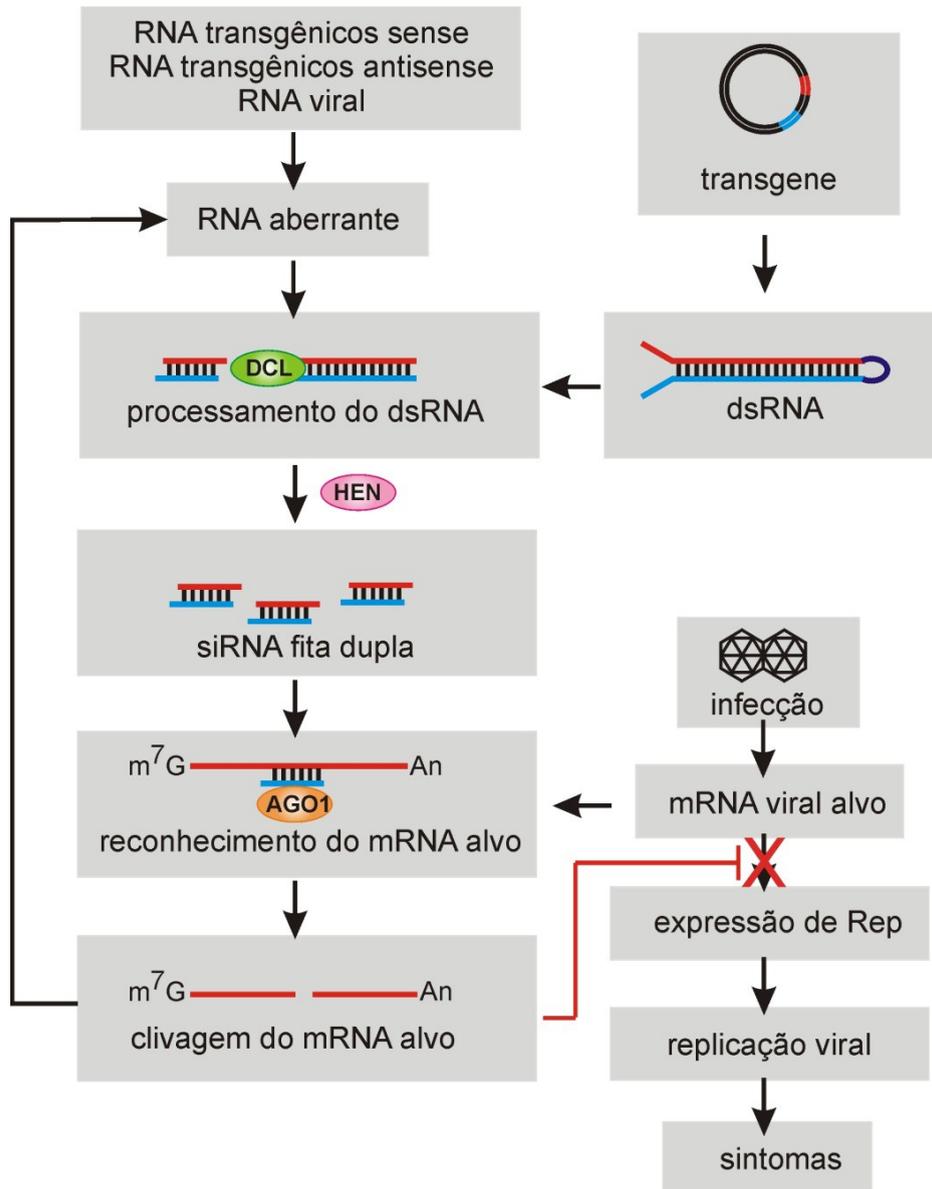


Figura V.24. Ilustração simplificada mostrando o mecanismo de ação do transgene para obtenção de resistência ao geminivírus BGMV pelo mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS). As plantas transgênicas de feijoeiro foram modificadas para expressar um RNA de dupla fita (dsRNA) com uma seqüência do gene viral *rep* (que codifica para a proteína Rep, essencial para que ocorra a replicação viral). O dsRNA é convertido em siRNA de dupla fita por RNaseIII tipo-Dicers (DCL) que são metilados no terminal 3' por RNA methyltransferase (HEN). Uma das fitas dos siRNA são subsequentemente incorporados ao RISC. Uma das proteínas que compõe o complexo RISC é Argonaute (AGO1). Guiado pelo siRNA complementar Argonaute cliva o mRNA alvo, levando ao silenciamento gênico. Após a infecção das células vegetais, o BGMV expressa na célula vegetal a proteína Rep que é essencial para que ocorra a replicação viral. No entanto, nas plantas de feijoeiro geneticamente modificadas o gene *rep* é silenciado, levando então à não expressão de Rep, interferindo no ciclo viral. Isso foi capaz de gerar plantas resistentes ao vírus de forma estável e duradoura.

Existem outros exemplos de plantas geneticamente modificadas para silenciamento de um gene que foram aprovadas para comercialização: os eventos de tomate desenvolvidos pelas empresas Monsanto (Calgene) (Flavr SavrTM), Zeneca, DNA Plant Technology's 'Endless Summer e Agritope; o mamoeiro resistente ao vírus da mancha anelar (*Papaya ring spot virus*). No momento da geração desses eventos o mecanismo molecular de silenciamento era vago, uma vez que foram gerados pela estratégia de RNA antisense ou genes trucados (<http://www.agbios.com>; <http://rasm.icgeb.org/>), análises posteriores já confirmaram a presença siRNA (Krieger et al., 2008; Frizzi & Huang, 2010). Outros eventos com construções para silenciamento gênico foram aprovadas mais recentemente, como é o caso da soja com supressão da $\delta 12$ desaturase (FAD2-1) PlenishTM (DuPont) (evento DP-305423-1).

Vale ainda mencionar que seqüência invertidas (IR) têm sido encontradas naturalmente em plantas. Por exemplo, em arroz a mutação LGC-1 (low glutelin content-1) gera grãos adequados para o consumo humano, uma vez que a glutelina é restritiva para uma parcela da população (Frizzi & Huang, 2010). A explicação molecular para esse fenótipo é uma deleção no alelo LGC-1 entre dois genes da glutelina altamente similares, resultando em uma seqüência IR. siRNA derivados dessa IR causa o silenciamento da família multigênica da glutelina (Kusaba et al., 2003). Outro exemplo é o da soja cujo tegumento da semente é amarela, gerado por uma IR que ocorre naturalmente no gene endógeno da chalcone sintase (CHS) silenciando todas as cópias dos genes *chs*, inibindo a pigmentação do tegumento (Tuteja et al., 2004).

Gene *AtAhas* (*csr1.2*) de *Arabidopsis thaliana*

O gene *AtAhas* de *Arabidopsis thaliana* codifica a subunidade maior da enzima acetohidroxiácido sintase (AtAHAS) (também chamada de acetolactato sintase (EC 4.1.3.18), que confere o fenótipo de tolerância aos herbicidas do grupo químico das imidazolinonas devido a uma mutação pontual que resulta na substituição de uma serina na posição 653 por uma asparagina (S653N) (Sathasivan et al., 1990; Acesso do GenBank Ns. X51514 e AL133315). A subunidade catalítica de AtAHAS codificada pelo gene *AtAhas* possui propriedades de ligação a herbicidas comprometida. Assim, os herbicidas do grupo das imidazolinonas passam a não se ligarem à enzima mantendo

sua função normal no metabolismo da planta (Pang et al., 2002). A enzima AtAHAS é naturalmente encontrada em plantas e microorganismos. Essa enzima catalisa a primeira etapa da biossíntese dos aminoácidos ramificados (valina, leucina e isoleucina) (Sathasivan et al., 1990). Essa enzima catalisa a condensação de suas moléculas de piruvato para formar uma molécula de acetolactato, que é o precursor de valina e leucina. Ela catalisa também a condensação de uma molécula de piruvato com uma molécula de 2-cetobutirato para formar 2-aceto-2-hidroxi-butirato, um intermediário na biossíntese de isoleucina (Delfourne et al., 1994). O gene *AtAhas* codifica uma pré-proteína de 670 aminoácidos que inclui um peptídeo de trânsito de 55 aminoácidos na região N-terminal de endereçamento para o cloroplasto. Durante o transporte para o cloroplasto, o peptídeo de trânsito é clivado para produzir a enzima ativa de aproximadamente 64 kDa (Mazur et al., 1987). A regulação da transcrição do gene *AtAhas* no evento Embrapa 5.1 está sob o controle do seu promotor nativo de *A. thaliana*, que está localizado entre a região 5' da seqüência codificante de *AtAhas*. A terminação da transcrição do gene *AtAhas* é controlada pelas seqüências de terminação da transcrição do próprio gene dentro da região 3' não-traduzida (UTR) localizada a jusante da região codificante. Inicialmente a região a montante da região codificante, de 2.483 pb, foi inicialmente anotada como a região promotora do gene *AtAhas*. Entretanto, análises genômicas posteriores revelaram que este segmento também contém um gene de *Arabidopsis thaliana* até então não anotado, que codifica a subunidade gama da proteína SEC61 (*Atsec61γ*). A proteína SEC61 é uma proteína multimérica de transporte localizada no retículo endoplasmático, que está presente em todas as plantas e outros eucariontes (Hartmann et al., 1994). Experimentos de RT-PCR indicaram que a expressão do gene *Atsec61γ* não foi detectada nos tecidos foliares do evento Embrapa 5.1. Esses dados estão apresentados na seção V.10. Como mencionado anteriormente, o gene *AtAhas* foi utilizado unicamente para permitir a seleção do eventos de transformação. O evento Embrapa 5.1 não apresenta tolerância significativa aos herbicidas do grupo das imidazolinonas (dados apresentados na seção VII.11). Além disso, não foi possível detectar altos níveis da proteína AtAHAS por ELISA (dados apresentados na seção V.10). Em realidade os níveis de proteína AtAHAS estão tão baixos que os valores obtidos nas análises de ELISA estão próximos do basal encontrados em plantas de Olathe. Isso é condizente com a baixa tolerância aos

herbicidas do grupo químico das imidazolinonas (seções V.10 e VII.11. Também não foi possível detectar AtAHAS nas sementes do evento Embrapa 5.1.

O gene *ahas* de *Phaseolus vulgaris* (*PvAhas*) foi também clonado para a composição desse processo (acesso do GenBank No. GQ466185) e possui uma similaridade de seqüência de 75% com o gene *AtAhas* e uma similaridade na seqüência de aminoácidos de 83% (Quadro V.1). A similaridade nas regiões catalíticas, encontradas na superfamília das enzimas dependentes de tiamina difosfato (ThDP), é entre 98-100%.

Recentemente a CTNBio aprovou o evento de soja BPS-CV127-geneticamente modificada tolerante aos herbicidas do grupo químico das imidazolinonas, devido à expressão do gene *AtAhas* (mesmo cassete de expressão usado para geração do evento de feijoeiro Embrapa 5.1) (Parecer Técnico nº 2236/2009, Processo nº 01200.000010/2009-06). As informações sobre esse cassete de expressão foram primeiramente apresentadas em 1990 quando um fragmento de 5,8 kb correspondendo a uma seqüência genômica isolada de *A. thaliana* tolerante a imidazolinonas (Sathasivan et al., 1990).



Quadro V.1. Similaridade entre as seqüências de PvAHAS (AHAS endógeno de *P. vulgaris*) e AtAHAS (proteína codificada pelo transgene isolado de *A. thaliana*).

PvAHAS	MAAATTTTTTSSSISFSTKPSPPSSSKSPLPISRFLPFLSLNPNKSSSSSSRRRGIKSSSPS
AtAHASMEAVTAPKPAFTAFPPSSHTPKPFLRFALPFSSLPNAPLLSQRRSLQISPAIS
PvAHAS	SISAVLNTTTNVTTPSPPTKPTKPTETFISRFPDQPRKGADILVEALERQGVETVFAYPG
AtAHAS	DAAAAKSTAAEPFL.....SRFGLLEPRKGADILVEALERQGVTDVVFAYPG
PvAHAS	GASMEIHQALTRSSSIRNVLP RHEQGGVFAAEGYARSSGKPGIC IATSGPGATNLVSGLA
AtAHAS	GASMEIHQALTRSATIRNVLP RHEHGGVFAAEGYARSSGLPGVCIATSGPGATNLVSGLA
PvAHAS	DALLDSVPLVAITGQVPRRMIGTDAFQETP IVEVTRSITKHNYLVMDVEDIPRIIEEAF
AtAHAS	DALLDSVPLVAITGQVPRRMIGTDAFQETP IVEVTRSITKHNYLVLDVDDIPRIVNEAF
PvAHAS	LATSGRPGPVLVDVPKDIQQQLAIPNWEQAMRLPGYMSRMPKPPEDSHLEQIVRLISEK
AtAHAS	LATSGRPGPVLIDIPKDIQQQLAIPNWDQPIRLSGYMSRLPKSPNEKHLELIVRLLFEAK
PvAHAS	KPVLYVGGGCLNSDELGRFVELTGIPVASTLMGLGSYPCDEL SLHMLGMHGT VYANYA
AtAHAS	KPVLYVGGGCLNSSEELRRFVQLTGVPVASTLMGLGAYPIADENSLQMLGMHGT VYANYA
PvAHAS	VEHSDLLLAFGVRFDDRVTGKLEAFASRAKIVHIDIDS A EIGKNKTPHVSVC GDVKLALQ
AtAHAS	VDRSDLLLAFGVRFDDRVTGKLEAFASRAKIVHIDIDS A EIGKNKQPHVSV CADIKLALK
PvAHAS	GMNKVLENRAEELKLD FGVWRNELNVQKQK FPLSFKTFGEAIPPQYAIKV LDELTDGKAI
AtAHAS	GINLVLESRGAKGLDFRSWREELNEQKRK FPLSYKTFEEEEISPQYAIQV LDELTDNGEAI
PvAHAS	ISTGVGQHQMWA AQFYNYKKPRQWLSSGGLGAMGFGLPAAIGASVANPD AIVVDIDGDGS
AtAHAS	VSTGVGQHQMWA AQFYKYKRPRQWLTS GGLGAMGFGLPAA MGAAVANPG AIVVDIDGDGS
PvAHAS	FIMNVQELATIRVENLPVKVLLLNQH LGMVMQWEDRFYKANRAHTFLGDPAQEDEIFPN
AtAHAS	FIMNVQELATIKVEKLPVKILLLNQH LGMVVQWEDRFYKSNRGHTYLGDP SNESAIFPN
PvAHAS	MLLFAAACGIPAARVTKKADLREAIQTMLDTPGPYLLDVICPHQEHLVLP MIPSGGTFNDV
AtAHAS	FLKFADACGIPAARVAKKEDLKAAIQKMLDTPGPYLLDVIVPHQEHLVLP MIPSNGT FQDV
PvAHAS	ITEGDGRIKY
AtAHAS	ITEGDGRKSN

V.4. O vetor utilizado e seu espectro de hospedeiros.

Origem do vetor pBGMVRNAiAHAS (Figura V.25) possui 14.440 pb e é derivado do vetor pBluescript II SK(-) (Stratagene Inc., La Jolla, EUA, Alting-Mees & Short, 1989) no qual o gene *AtAhas* foi clonado no sítio de *Xba*I. O cassete de expressão Δ ACIhpRNA foi clonado no sítio de *Not*I. Para transformação genética do evento Embrapa 5.1 o vetor pBGMVRNAiAHAS foi digerido com a enzima *Fsp*I que corta o vetor na posição 474 e 11.736 removendo um fragmento que corresponde a seqüências de *E. coli* contendo parte do gene *bla*, que codifica para uma beta-lactamase.

Como mencionado anteriormente, o organismo doador do gene *AtAhas* (e também da seqüência codificante completa da subunidade gama da proteína AtSEC61 γ) é a espécie *Arabidopsis thaliana* (Viridiplantae, Spermatophyta; Brassicaceae) é nativa da Europa, Ásia e Noroeste da África. *A. thaliana* é o organismo doador do gene *AtAhas* e não apresenta patogenicidade a humanos e outros animais. Apesar de a *A. thaliana* ter pouco significado direto para agricultura, ela é uma planta amplamente utilizada como organismo modelo para estudos de genética e desenvolvimento de plantas. Foi a primeira planta cujo genoma foi seqüenciado, e um considerável número de trabalhos têm sido realizados para desvendar a função de seus 27.000 genes e das 35.000 proteínas codificadas por eles. Não existe qualquer evidência de que a *A. thaliana* seja patogênica a humanos ou que produza toxinas e alérgenos. Por não ser tipicamente consumida na alimentação humana ou animal, a *A. thaliana* não possui histórico de consumo. Contudo, a *Arabidopsis thaliana* é um membro da família da mostarda (Brassicaceae), que inclui espécies cultivadas como repolho e rabanete, espécies que possuem histórico de uso seguro para consumo humano. Além disso, como mostrado anteriormente, o gene *AtAhas* é encontrado em todas as espécies vegetais em que esse gene foi buscado e têm alta similaridade, inclusive com o gene *PvAhas* (que codifica para AHAS do feijoeiro).

As seqüências do BGMV presentes no evento Embrapa 5.1 não codificam para uma nova proteína e o hpRNA resultante da expressão do gene quimérico que contém essas seqüência é processado pela célula em siRNA (como demonstrado na seção V.10). As questões relativas à segurança dos siRNA produzidos no evento Embrapa 5.1 serão discutidas nas seções V.10 e VI.10 desse documento. Cabe mencionar que em plantas

não geneticamente modificadas infectadas por geminivírus há a ocorrência natural das mesmas seqüências de siRNA em folhas e outros tecidos (Chellappan et al., 2004; Carrillo-Tripp et al., 2007; Ribeiro et al., 2007). Não há qualquer evidência que o consumo dessas plantas infectadas com vírus e expressando esses siRNA gerem qualquer problema para a saúde humana ou animal. Além disso, quando plantas não geneticamente modificadas de feijoeiro são infectadas pelo BGMV há uma grande variação no perfil de proteínas expressas, isto é, a infecção viral altera o metabolismo da planta (Gaspar & Costa, 1993) levando à expressão de uma série de novas proteínas que não são expressas em plantas não infectadas (Koga-Ban et al., 1992). Apesar disso não existe qualquer evidência de que plantas de feijoeiro infectadas pelo BGMV causem qualquer dano à saúde humana e de outros animais. Quanto aos elementos reguladores, foram usados para a construção do gene quimérico $\Delta AC1hpRNA$ o promotor do RNA 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) e o sinal de poliadenilação e terminação da transcrição (terminador) do gene da octopina sintase (*ocs*) de *A. tumefaciens*. O CaMV tem um baixo espectro de hospedeiros, sendo restrito às plantas da família Cruciferae (couve, couve-flor, brócolis, repolho, mostarda). *Phaseolus vulgaris* não é hospedeiro do CaMV (ICTV, 2006). A seqüência 3' do gene *ocs* é oriunda de *A. tumefaciens* que é uma bactéria Gram-negativa do solo e que tem uma gama de hospedeiros mais ampla. As seqüências do CaMV e *A. tumefaciens* isoladas, como presentes no evento de feijão Embrapa 5.1 não causam danos à planta sob qualquer aspecto estudado, além de não serem codificadoras de proteínas. Para esse caso específico, não há qualquer evidência de que o uso desses elementos isolados na construção do gene quimérico $\Delta AC1hpRNA$ tenham risco potencial para o meio ambiente, saúde humana e animal.

As análises realizadas no evento Embrapa 5.1 não mostraram a ocorrência de qualquer seqüência funcional oriunda do vetor pBlueScript II KS.

V. 5. O mapa genético utilizado no processo de transformação (transgene/vetor)

Como mencionado anteriormente, o vetor pBGMVRNAiAHAS (figura X) possui, além dos genes de interesse *AtAhas* e $\Delta AC1hpRNA$, as seqüências que compõem o vetor pBlueScript II SK (-), que possui: (1) origem de replicação ColE1 e fagoF1 para manutenção do plasmídeo em *E. coli*; (2) o gene *bla* de *E. coli* que codifica para uma

beta-lactamase (que confere resistência a beta-lactâmicos como a ampicilina e é usado como marcador de seleção); (3) gene do fragmento alfa de lacZ de *E. coli* cuja expressão é regulada pelo promotor do gene lacZ (esse gene codifica a enzima beta-galactosidase de *E. coli*). O fragmento alfa do gene lacZ presente no plasmídeo pBGMVRNAiAHAS foi interrompido pela inserção dos genes de interesse *AtAhas* e $\Delta AC1hpRNA$ no polilinker.

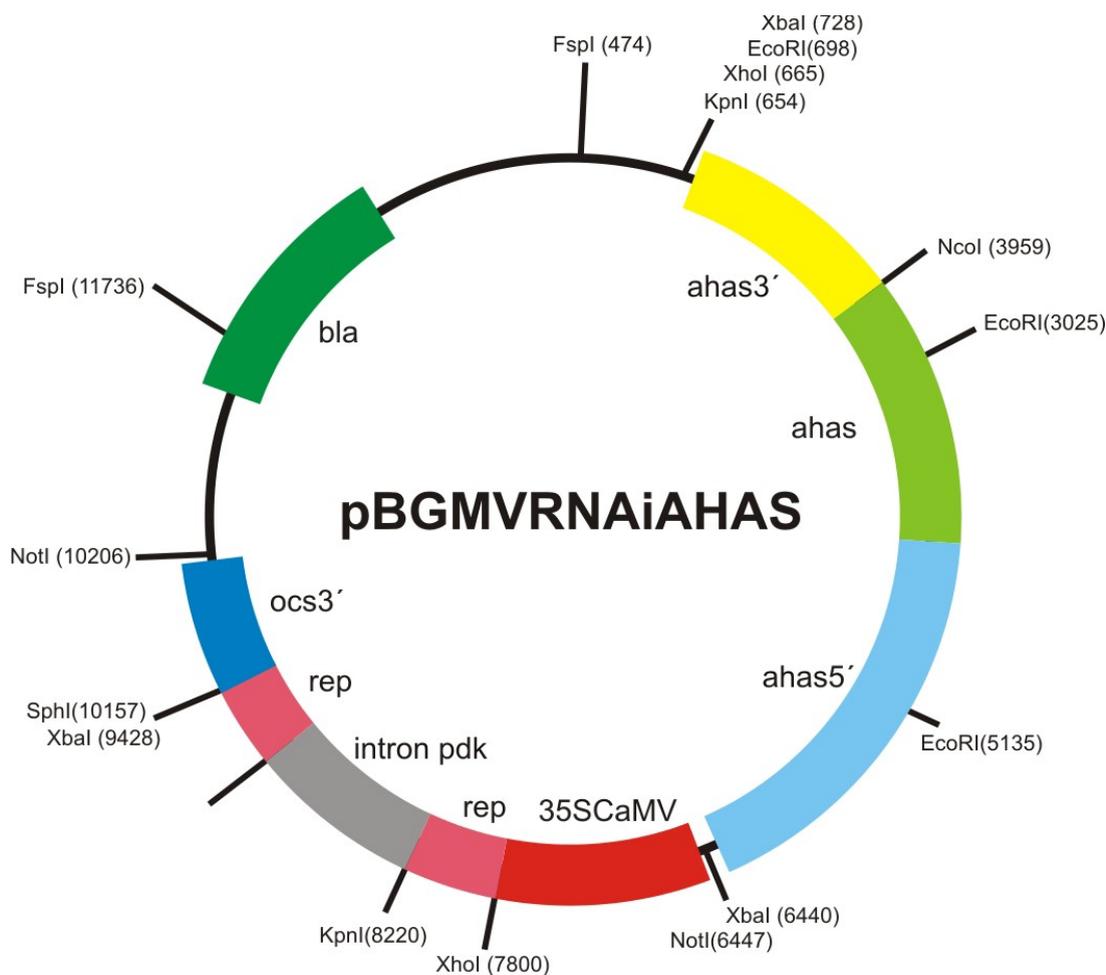


Figura V.25. Mapa do vetor pBGMVRNAiAHAS. ahas5': promotor do gene da acetolactato sintase de *A. thaliana*; ahas: região codificante para a acetolactato sintase de *A. thaliana*; ahas3': acetolactato sintase *Arabidopsis thaliana*; 35SCaMV: promotor do RNA 35S do *Cauliflower mosaic virus*; rep: fragmento de 411 pb do gene rep (*AC1*) do *Bean golden mosaic virus*; intron pdk: intron do gene que codifica para a piruvato ortofosfato diquinase de *Flaveria trinervia*; ocs3': terminador do gene da octopina sintase de *Agrobacterium tumefaciens*; bla: gene da beta-lactamase de *Escherichia coli*. Para transformação genética pelo processo de biobalística, esse vetor foi previamente clivado com a enzima *FspI*.

A sequência nucleotídica completa do vetor pBGMVRNAiAHAS está apresentada a seguir:

LÓCUS: pBGMVRNAiAHAS 12.440 pb

DEFINIÇÃO: Derivado do pBluescript II SK(-) vetor DNA, phagemid retirado do lambda ZAPII.

terminador 731..1951

/label=ahas3' acetolactato sintase Arabidopsis thaliana

CDS complement(1952..3965)

/label=ahas\cds acetolactato sintase Arabidopsis thaliana

promotor complement(3966..6448)

/label=ahas5' acetolactato sintase Arabidopsis thaliana

promotor 6465..7801

/label=35SCaMV- 35S Cauliflower mosaic virus

Frag. CDS 7815..8226

/label=AC1\seq AC1 Bean golden mosaic virus posição – GenBank NC 004042 pos. 1836-2247

intron 8248..8999

/label=pdk\intron da piruvato ortofosfato diquinase – Flaveria trinervia

Frag. CDS complement(9030..9441)

/label=AC1\seq AC1 Bean golden mosaic virus pos. 1836-2247

terminator 9448..10213

/label=ocs3' octopina sintase Agrobacterium tumefaciens

CDS complement(11452..12312)

/label=bla - beta-lactamase resistance gene Escherichia coli

```

1 ctgacgcgcc ctgtagcggc gcattaagcg cggcgggtgt ggtggttacg cgcagcgtga
61 ccgctacact tgccagcgcc ctagcgcccg ctcctttcgc tttcttcctt ccctttctcg
121 ccacgttcgc cggctttccc cgtcaagctc taaatcgggg gctcccttta gggttccgat
181 ttagtgcttt acggcacctc gaccccaaaa aacttgatta gggatgaggt tcacgtagtg
241 ggccatcgcc ctgatagacg gtttttcgcc ctttgacggt ggagtccacg ttctttaata
301 gtggactcct gttccaaact ggaacaacac tcaaccctat ctcggtctat tcttttgatt
361 tataagggat tttgcccatt tcggcctatt ggtaaaaaa tgagctgatt taacaaaaat
421 ttaacgcgaa ttttaacaaa atattaacgc ttacaatttc cattcgccat tcaggctgcg
481 caactggttg gaagggcgat cgggtcgggc ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg
541 gggatgtgct gcaaggcgat taagtgggt aacgccaggg tttcccagc cagcagcttg
601 taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata cgactcacta tagggcgaat tgggtaccgg
661 gccccccctc gaggtcgacg gtatcgataa gcttgatgc gaattcctgc agcccggggg
721 atccactagt tctagatatt gtttttgatt cacataaatg tcgttttgga ttattcatgt
781 aatattttta actaaagtac aatttttgac tacttttagt tactagttaa gcttttattt
841 ttttgactaa ccattgaatg atgaagagat caacgcatca tatttacaac ttacatagtc
901 ttttggaagt gtaaattgct aatactacct aaaatatatc tataattaac taatattttt
961 tcgtcaatta taatagatca attaaaaggc tatcaaaagg aaaaaaatga aatccacatc
1021 ctgccatcat aacctcatgc tggaaaaaga aatgaaaaaa tataaaaaat ttcttttggt
1081 tattaatttt acaactttta tactagtctt tttctattt tttaaaagct ttgtctctt
1141 acttaaaaaa aaaaaacttt ttgaaatatt cctacttcca atgtctgatt agtgctctg
1201 gatttccttt ttggatcatg tgaatcctaa atcagaaaaa ttcataataat acccaattca
1261 gtatattttc atacttcaat ttacaagagt tctctatggt ttagcttctt ttcttttaag

```

1321 ccaaatgttt taagcatctt ttatacatta aaataattta gtgttgagtt gagatTTTTT
 1381 tttttttttt tttggattta cttgttcaaa atctgaaaaa atgtttacag aaggTTAAAA
 1441 tgaacccaaa ggcataatcaa gctagatttt gaattaccct atttcatcgt atacacaaaa
 1501 ctgataatgt ggacacagtt gattttactt ctctgatgaca tcgtagtttt atttaatttg
 1561 gaaaccacgg cccatatgag cacatttcaa ttaaaaaacca atggtaagag cttttccat
 1621 gcaagattcg agagatatta acccagtgac tgttaaaaca gcttagaacc ctaataacga
 1681 atttcaatta ctcaatttac cttcgcatt tcgcaataac caaactgagc cagtcacaag
 1741 gagtaaaccg aaccggatta tttatttata aaatgaaaga aaggaaacca aacaacaaca
 1801 gcagtagtag tctgacgtaa accaaaaagc aggcatca acaactaaaa gaaactcaaa
 1861 ttacccaaaac aaacaggaaa ttgcaaaacta agttttttta ccatatgcat acaaagacca
 1921 taaaaggttc tgataatcac cgttttcac tctcagtatt taatccggcc atctccttc
 1981 gttatgacat cgttgaaagt gccaccactc gggatcatcg gcaacacatg ttcttggtgc
 2041 ggacaaatca catccaacag gtaaggtcct ggtgtatcca gcattgtctg aatagcttct
 2101 cggagatctg ctttctttgt caccctcgcc gctggaatcc cgcaagctgc tgcaaacagc
 2161 aacatgttcg ggaatatctc gtcctcctga gccggatccc cgagaaatgt gtgagctcgg
 2221 ttagctttgt agaaccgatc ttcccattgc ataaccatgc caagatgctg gttgtttaat
 2281 aaaagtacct tcaactggaag attctctaca cgaatagtgg ctagctcttg cacattcatt
 2341 ataaagcttc catctccgtc aatatccaca actatcgcat cagggttagc aacagacgct
 2401 ccaatcgcag caggaagtcc aaatcccata gctccaaggc ctctgatga tagccactgc
 2461 cttggtttct tgtaattgta gaactgcgcc gccacattt gatgttgccc gacaccagta
 2521 cttattatgg cttttccatc agtcaactca tcaaggacct taatcgcata ctgtggagga
 2581 atagcttccc caaacgtctt aaagctcaac ggaaacttct gtttctgtac gttcaactca
 2641 ttctccaaa ctccaaaatc aagcttaagc tctctcgctc ggttctcaag aaccttattc
 2701 atcccttgca aagccagctt aacatcacca cacacagaca catgaggagt cttattcttc
 2761 ccaatctcag ccgagtcaat atcaaatatga acaatcttag ccctactagc aaaagcctca
 2821 agcttaccog tgacacgatc atcaaacctt accccaaaacg ccaacaacaa atcactatgc
 2881 tccacagcgt aatttgcata cacagtccca tgcattccaa gcatatgtaa cgacaactca
 2941 tcaatcaaac gataagatcc cagccccatc aacgtactcg caacagggat ccccgtaagc
 3001 tcaacaaaac tacccaattc atcgtagaa ttcaaaacaac caccacaac atacaacaca
 3061 ggcttcttag actcagaaat caacctaaca atctgctcca aatgagaatc ttccggaggt
 3121 ttaggcatcc tagacatata accaggtaat ctcatagcct gttcccaatt aggaatcgca
 3181 agctgttgtt gaatatcttt aggaacatca accaaaaacag gtccaggctc accagaagta
 3241 gctaaaaaga aagcttcctc aataatccta gggatatctt caacatccat cacaagatag
 3301 ttatgcttcg taatcgaacg cgttacctca acaatcggag tctcttgaaa cgcactctgta
 3361 ccaatcatac gacgagggac ttgtcctgtg attgctacaa gaggaacact atctaacaac
 3421 gcatcggcta atccgctaac gagatttcta gctccgggac ctgaagtggc tatacagata
 3481 cctggtttac ctgaggatcg agcgtatcct tctgctgca atacacctcc ttgttcgta
 3541 cgaggaagga cgttacggat tgaggaagag cgggttaagg cttggtgaa ctccattgat
 3601 gcacctccag ggtaagcgaa tacggtttct acgccttgac gttctaaagc ttcgacgagg
 3661 atatcagcgc ctttgcgggg ttgatctgga gcgaatcggg agatgaaatgt ttcggtttg
 3721 gtaggtttgg ttggagaggg agtggttgg acattggtgg ttgtgttgag cacggcggag
 3781 atggaggagg gagagctgga tttgataccg cggcggcggg aggaggagga tgatttgtg
 3841 gggtttaggg agaatgggag ggagaatctg gagattggtg atggtgattt ggaggaggaa
 3901 ggagatggtt tgggtggaga ggagatcgaa gaagatggtt ttgttgttgt tgttgccgcc
 3961 gccatggttc aggagaaaga tgagcaagag atagagaaac agagaagaag aagagacttg
 4021 tgaacatgat ttgtttaaaa atgagacttg aagtttaagg gttttatggt ggattacgaa
 4081 aatgccctcg ggatttgatt tttggtcctt tatttataga taaaactcac gtgacgctgg
 4141 aatctctagt ctatctattg tatttgtgat tgagccttcg atatgctaaa acctaaatgt
 4201 agaatttgtg gctgagaaat ttatcaaat gatctttctt tcttttttta ttggttaaga
 4261 gaatggatac aagctgcaag ttggttccac gaattggaca aaaacatagt cctggtgatt
 4321 tgagatttag attttaaaaga tacttcttga tgacaatata atttgtatac atgaataaaa
 4381 aacttataag gtctataagg aacaagagat aagtgaaaat ggaataagaa tggagaattt
 4441 ggctacaaa acaataacaa aactaagagc ttctcaaaag ggctgataat gtcgtttgg
 4501 tcgttcttct cctcctactc ctccggagcat tgcctgtagc gcgattcaga gtttagaaac
 4561 tttcacaat gagtgttat ctacgattt cttgcatgaa acaaccacac atgcattaca
 4621 gaaacatgga acagagactc catccatgac accagagcga acgaatacag acaaacaaa
 4681 actcatggga cgaatagata taataaagat acaaggagac agaagcgtgt cgatagcaga
 4741 agcaatggag acagcaaaagc actaatcttt tgagacaata agccaaaaaa aaaaactagc
 4801 tgaaattcat cctaaagtct tccactatct gatctataac caatctactt ctatatccac
 4861 caatatgatt acaaatatt gaggaatgaa ccaagaatgt ggtctagtca aatgatctt

4921 taaaggaatt aacagaacta ttgaatcaat gactatatgt caagtaacat aacccaaatg
 4981 tagatatata atgcgagatc aattacctcg taaagaaagt actacactaa gaagatccaa
 5041 cgatgatggt gttgattggg atgaaaacga gcttcacgaa gaatccaacg aatcccatca
 5101 ccacaaatcc aatcgccgta cgcacagcta ctttcgtgaa ttctgataac caattcaatt
 5161 acaaatgata tcaaaatctc agaaaaccct aatctacaga tcaaaaatcg gaaatgagat
 5221 ttttttgaga aaaggcggtta cccttgcgat cgggtttgtg acagcgctgg acgagacgaa
 5281 cactgctctt agcgaaatct ctgagaggat cgattgcgga atcaatggct tccatgactt
 5341 ctttttagat cggaattggt aatcgaaaatt agggtttcag caggttcgtt taaggatgaa
 5401 aattggggtt tatttttgac atttggtttt ataccttagt tccgttgact ttgcctcca
 5461 ccataatctc tccaattcag atttgattcg gtctgaacac aaagtccggg ttggtttctt
 5521 atttgtctta atatcgatta ctttccatct ataaaaatatt tttctacaac atcttaagaa
 5581 ttataattga gtgatgttga tgctactatt ttaagttagg aaaataaaca ctaaaaagac
 5641 aaatgtctca ctcacaaaag taaaactctt gaaaagtgca agagctctga aatttgagaa
 5701 cgaagacaag actccttggt tttttttggt tttttttgct aaaaatttaa atattcatta
 5761 ttacaatgaa aatttcgggt acataataaa tggtaaccaa atcatgggtc catgacaaaa
 5821 aaggataaaa agcatggaag cataccaaga ctcttggtta ctacgtcaat ctcttttata
 5881 cgttttcagc caagattccg gattatgaaa gaatcttggg attctaacac tttttctttt
 5941 tttgcttgaa agaggtttac aaattttaac actttttttt tghtgaggat tttagagtga
 6001 aacacatggt ttgaactgtc ttcaactgaa caattcatgt taggcgtcta tataaccgtc
 6061 ggttattcac gaggtaacta cacatgaaca tgataaattt actctctctt ttcattaaaa
 6121 aaaagttgta caacttaatt acttatgtca tgaaaatagt atatacgtaa aagtagatta
 6181 tttttgtggt tttccttttt tttactataa caataaataa ttctatgtta cctaaatfff
 6241 cttaggtagt ataattggatc aaattgatat ggagtaaaca aaagaaaaac ttaaataatc
 6301 tggctctataa tttgaagcgc ttcaagcctt caacatcaat ccgagtacga acaataatat
 6361 gagatttcat caaaatatta tcctggaaac gatttttcat ttatatgcca ttatattggt
 6421 aatgaaagtt ggaaatacat aatctagagc ggccgcgcgg ccgctcgacg aattaattcc
 6481 aatcccacaa aaatctgagc ttaacagcac agttgctcct ctcagagcag aatcgggtat
 6541 tcaacaccct catatcaact actacgttgt gtataacggt ccacatgccg gtataataca
 6601 tgaatggggt tgtacaaagg cggcaacaaa cggcgttccc ggagtgcag acaagaaatt
 6661 tgccactatt acagaggcaa gacgagcagc tgacgcgtac acaacaagtc agaaacaga
 6721 caggttgaac ttcaccccca aagggaagc tcaactcaag cccaagagct ttgctaaggc
 6781 cctaacaagc ccaccaaaagc aaaaagccca ctggctcacg ctaggaacca aaaggcccag
 6841 cagtgatcca gccccaaaag agatctcctt tgccccggag attacaatgg acgatttctt
 6901 ctatctttac gatctaggaa ggaagttcga aggtgaaggt gacgacacta tgttcaccac
 6961 tgataatgag aaggttagcc tcttcaatff cagaaagaat gctgaccac agatgggttag
 7021 agaggcctac gcagcaggtc tcatcaagac gatctacccg agtaacaatc tccaggagat
 7081 caaatacctt cccaagaagg ttaaagatgc agtcaaaaga ttcaggacta attgcatcaa
 7141 gaacacagag aaagacatat ttctcaagat cagaagtact attccagtat ggacgattca
 7201 aggcttgctt cataaaccaa ggcaagtaat agagattgga gtctctaaaa aggtagttcc
 7261 tactgaatct aaggccatgc atggagtcta agattcaaat cgaggatcta acagaactcg
 7321 ccgtgaagac tggcgaacag ttcatacaga gtcttttacy actcaatgac aagaagaaaa
 7381 tcttcgtaa catggtggag cacgacactc tggctactc caaaaatgct aaagatacag
 7441 tctcagaaga ccaaagggtt attgagactt ttcaacaaaag gataatftcg ggaaacctcc
 7501 tggattcca ttgcccagct atctgtcact tcatcgaaaag gacagtagaa aaggaaggtg
 7561 gctcctacaa atgccatcat tgcgataaag gaaaggctat cattcaagat ctctctgccg
 7621 acagtggctc caaagatgga cccccacca cgaggagcat cgtggaaaaa gaagacgttc
 7681 caaccacgtc ttcaaagcaa gtggattgat gtgacatctc cactgacgta aggatgacg
 7741 cacaatccca ctatccttcg caagaccctt cctctatata aggaagttca tttcatttgg
 7801 agaggacacg ctcgagatag tgcggtgcga tgtcatcaat gacgttatac tcagcatgat
 7861 ttgaaaacac ctttgagttg aaatccaggt gaccacttaa ataattgtgg gtccctaattg
 7921 cacgtgccc aattgtcttc cccgttcgtg aatcaccttc gatgatgata ctaatagggtc
 7981 tctccggccg cgcagcggca cctctcccga aataatcatc tgcccattct tgcactctc
 8041 tgggtacggt agtaaaagag gagaggtgat acggaggtga ccacggatcc ggagcttttg
 8101 tgaatattct atccaggtta ctggataaat tgtgatattg gaagagaaac ttttccggta
 8161 gtttctcttt gattatttgc atggcttctt ctttgaaga agcattcaat gcttcggatg
 8221 ccgcatggta cccaattgg taaggaaata attattttct ttttccctt tagtataaaa
 8281 tagttaagtg atgttaatta gtatgattat aataatatag ttgttataat tgtgaaaaaa
 8341 taatttataa atatattggt tacataaaca acatagtaat gtaaaaaaat atgacaagtg
 8401 atgtgtaaga cgaagaagat aaaagttgag agtaaagtata ttatttttaa tgaatttgat
 8461 cgaacatgta agatgatata ctagcattaa tatttgtttt aatcataata gtaattctag

8521 ctggtttgat gaattaaata tcaatgataa aatactatag taaaaataag aataaataaa
 8581 ttaaaataat atttttttat gattaatagt ttattatata attaaatc tataaccatta
 8641 ctaaataatt tagtttaaaa gttaataaat attttgtag aaattccaat ctgcttgtaa
 8701 tttatcaata aacaaaatat taaataacaa gctaaagtaa caaataatat caaactaata
 8761 gaaacagtaa tctaagttaa caaaacataa tctaagtcta atataacaaa gcgcaagatc
 8821 tatcatttta tatagtatta ttttcaatca acattcttat taatttctaa ataatacttg
 8881 tagttttatt aacttctaaa tggattgact attaattaaa tgaattagtc gaacatgaat
 8941 aaacaaggta acatgataga tcatgtcatt gtggtatcat tgatcttaca tttggattga
 9001 ttacagttgg gaaattgggt tcgaaatcga tgcggcatcc gaagcattga atgcttcttc
 9061 aaaggaagaa gccatgcaaa taatcaaaga gaaactaccg gaaaagtttc tctccaata
 9121 tcacaattta tccagtaacc tggatagaat attcacaaaa gctccggatc cgtggtcacc
 9181 tccgtatcac ctctcctctt ttactaacgt accgagagag atgcaagaat ggcagatga
 9241 ttatttcggg agaggtgccc ctgctgccc ggagagacct attagatca tcatcgaagg
 9301 tgattcacga acggggaaga caatgtgggc acgtgcatta gggaccaca attatttaag
 9361 tggtcacctg gatttcaact caaaggtgtt ttcaaatcat gctgagtata acgtcattga
 9421 tgacatcgca ccgcaactatc tagagtctg cttaatgag atatgcgaga cgcctatgat
 9481 cgcgatgatat ttgctttcaa ttctgttggt cacgttgtaa aaaacctgag catgtgtagc
 9541 tcagatcctt accgccggtt tcggttcatt ctaatgaata tatccccgt tactatcgta
 9601 tttttatgaa taatattctc cgttcaattt actgattgta ccctactact tatatgtaca
 9661 atattaaaat gaaaacaata tattgtgctg aataggttta tagcgacatc tatgatagag
 9721 cgccacaata acaaaacatt gcgttttatt attacaaatc caattttaa aaaagcggca
 9781 gaaccggtca aacctaaaag actgattaca taaatcttat tcaaattca aaaggcccca
 9841 ggggctagta tctacgacac accgagcggc gaactaataa cgttactga agggaactcc
 9901 ggttccccgc cggcgcgcat gggtgagatt ccttgaagt gagtattggc cgtccgctct
 9961 accgaaagt acgggcacca ttcaaccggg tccagcacgg cggccgggta accgacttgc
 10021 tgccccgaga attatgcagc atttttttgg tgtatgtggg ccccaaatga agtgcaggtc
 10081 aaaccttgac agtgacgaca aatcgttggg cgggtccagg gcgaattttg cgacaacatg
 10141 tcgaggctca gcaggacctg caggatgca agctagctta ctagtatgc atattcata
 10201 gtgtcaccta aatctgcggc cgcaccggc gtggagctcc agctttgtt ccttttagt
 10261 agggttaatt gcgcgcttgg cgtaatcatg gtcatagctg tttcctgtgt gaaattgta
 10321 tccgctcaca attccacaca acatacgagc cgggaagcata aagtgtaaag cctggggtgc
 10381 ctaatgagtg agctaactca cattaattgc gttgcgctca ctgcccgtt tccagtcggg
 10441 aaacctgtcg tgccagctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcg
 10501 tattgggccc tcttccgctt cctcgtcac tgactcgtg cgtcggctc ttcggctgcg
 10561 gcgagcggta tcagctcact caaaggcggg aatacgggta tccacagaat caggggataa
 10621 cgcaggaaag aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggcgc
 10681 gttgctggcg tttttccata ggctccgccc ccctgacgag catcacaaaa atcgacgctc
 10741 aagtcagagg tggcgaacc cgacaggact ataaagatac caggcgttc cccctggaag
 10801 ctccctcgtg cgtctcctc tccgacctt gccgcttacc ggatacctgt ccgctttct
 10861 cccttcggga agcgtggcgc tttctcatag ctcacgctgt aggtatctca gttcgggtga
 10921 ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagccc accgctgccc
 10981 cttatccggt aactatcgtc ttgagtcaa cccgtaaga cagacttat cgcactggc
 11041 agcagccact ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt
 11101 gaagtgggtg cctaactacg gctacactag aaggacagta tttggtatc gcgctctgct
 11161 gaagccagtt accttcggaa aaagagtgg tagctctga tccggcaaac aaccaccgc
 11221 tggtagcgtt ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaa aagactctca
 11281 agaagatcct ttgatcttt ctacggggtc tgacgctcag tggaaacgaaa actcacgta
 11341 agggattttg gtcagagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatcctt taaattaa
 11401 atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggctgaca gttaccaatg
 11461 cttaatcagt gaggcacct tctcagcgt ctgtctatt cgttcatcca tagttgctg
 11521 actccccgct gtgtagataa ctacgatac ggagggctta ccatctggcc ccagtgtgct
 11581 aatgataccg cgagaccac gctcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc
 11641 cggaaaggcc gagcgcagaa gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa
 11701 ttggtgcccg gaagctagag taagtgttc gccagttaat agtttgcgca acggtgtgct
 11761 cattgctaca ggcacgtgg tgtcacgctc gtcggttgg atggcttcat tcagctccgg
 11821 tcccaacga tcaaggcgag ttacatgat ccccatggtg tgcaaaaaag cggtagctc
 11881 cttcggtcct ccgatcgtt tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatggttat
 11941 ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgcttt ctgtgactgg
 12001 tgagtactca accaagtcat tctgagaata gtgtatgccc cgaccgagtt gctcttggcc
 12061 ggcgtcaata cgggataata ccgcgccaca tagcagaact taaaagtgc tcatcattgg



12121 aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctggtgagat ccagttcgat
12181 gtaaccact cgtgcaccca actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg
12241 gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaagggg ataagggcga cacggaaatg
12301 ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct
12361 catgagcgga tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac
12421 atttcccga aaagtgccac //

V. 6. Resumo das construções para obtenção do OGM

O evento de feijão Embrapa 5.1 foi transformado com o vetor pBGMVRNAiAHAS que contém o cassete de expressão $\Delta AC1hpRNA$ e *AtAhas* (com seu promotor e região não traduzida 3' (3'UTR) nativos).

O gene quimérico $\Delta AC1hpRNA$ consiste de um cassete com a finalidade de expressar um RNA-grampo (hpRNA), formando estrutura de dupla fita, composto de um fragmento de 411 pb do gene *rep* do BGMV posicionado em senso e antisenso intercalados pelo intro do gene *pdk* (intro do gene da enzima da piruvato ortofosfato diquinase) de *F. trinervia* (*Asteraceae*), sob o controle do promotor 35SCaMV. O sinal de poliadenilação e terminação da transcrição está na seqüência 3' do gene da octopina sintase de *Agrobacterium tumefaciens*. O objetivo da construção $\Delta AC1hpRNA$ é gerar o silenciamento específico do gene *rep* (AC1) do BGMV. Como a expressão gene é essencial para a replicação viral, seu silenciamento leva ao comprometimento da geração de novas partículas virais e conseqüentemente à resistência.

O gene *AtAhas* de *A. thaliana* codifica a subunidade maior da enzima acetohidroxiácido sintase (AtAHAS) (também chamada de acetolactato sintase (EC 4.1.3.18), que confere o fenótipo de tolerância aos herbicidas do grupo químico das imidazolinonas devido a uma mutação pontual que resulta na substituição de uma serina na posição 653 por uma asparagina (S653N). A enzima AtAHAS é naturalmente encontrada em plantas e microorganismos. Essa enzima catalisa a primeira etapa da biossíntese dos aminoácidos ramificados (valina, leucina e isoleucina). A regulação da transcrição do gene *AtAhas* no evento Embrapa 5.1 está sob o controle do seu promotor nativo de *A. thaliana*, que está localizado entre a região 5' da seqüência codificante de *AtAhas*. A terminação da transcrição do gene *AtAhas* é controlada pelas seqüências de terminação da transcrição do próprio gene dentro da região 3' não-traduzida (UTR) localizada a jusante da região codificante. Inicialmente a região a montante da região codificante, de 2.483 pb, foi inicialmente anotada como a região promotora do gene *AtAhas*. Entretanto, análises genômicas posteriores revelaram que este segmento também contém um gene de *A. thaliana* até então não anotado, que codifica a subunidade gama da proteína SEC61 (*Atsec61γ*). A proteína SEC61 é uma proteína multimérica de transporte localizada no retículo endoplasmático, que está presente em



todas as plantas e outros eucariontes. Experimentos de RT-PCR indicaram que o gene *Atsec61γ* não foi detectado nos tecidos foliares do evento Embrapa 5.1.

V. 7. Classificação de risco do organismo geneticamente modificado

De acordo com a Resolução Normativa n. 02 de 27 de Novembro de 2006, o feijão Embrapa 5.1 é considerado de classe de risco 1, ou seja, baixo risco individual e baixo risco para a coletividade.

V. 8. Métodos utilizados para a modificação genética.

O evento Embrapa 5.1 foi gerado pelo método descrito por Aragão et al. (1996) em que o células do meristema apical de eixos embrionários de feijoeiro são transformados pelo método de biobalística. A partir dessas células, plantas geneticamente modificadas são obtidas, com indução de morfogênese pelo cultivo de embriões maduros em meio de cultura contendo a citocinina benzilaminopurina (BAP).

A biobalística utiliza microprojéteis acelerados a altas velocidades para carrear e introduzir ácidos nucléicos e outras substâncias em células e tecidos *in vivo* (Aragão & Rech, 1998). Este processo também tem sido denominado de método de bombardeamento com microprojéteis, método do *gene gun* (arma de genes), método de aceleração de partículas, entre outros. Foram desenvolvidos e construídos diferentes sistemas capazes de acelerar micropartículas (de tungstênio ou ouro), cobertas com seqüências de ácidos nucléicos, a velocidades superiores a 1500 km.h⁻¹. Todos estes sistemas baseiam-se na geração de uma onda de choque com energia suficiente para deslocar uma membrana carreadora contendo as micropartículas cobertas com DNA (Aragão & Rech, 1998). Os sistemas que utilizam alta pressão de gás hélio e descarga elétrica têm demonstrado possuírem um amplo espectro de utilização e serem mais eficientes para a obtenção de altas frequências de transformação. Foi demonstrado que as micropartículas aceleradas penetram a parede e membrana celular de maneira não letal (Aragão et al., 1993). Um grande número de plantas transgênicas tem sido obtido utilizando-se o processo de biobalística. Na verdade, a maioria das plantas geneticamente modificadas aprovadas para comercialização até o momento foram obtidas com essa tecnologia.

V. 9. Caracterização molecular do inserto no organismo receptor, fornecendo informações relacionadas a: (1) número de cópias inseridas; (2) localização do inserto no genoma, quando possível; (3) seqüências flanqueadoras do gene; (4) seqüências nucleotídicas do transgene inserido no OGM.

Foi realizada uma caracterização molecular completa do inserto e da região flanqueadora presente no cromossomo do evento de feijoeiro Embrapa 5.1. Devido à presença de estruturas de grampos presentes na estrutura dos transgenes inseridos no genoma do feijoeiro Embrapa 5.1 foram utilizadas técnicas especiais de seqüenciamento, bem como a utilização de estratégias de Genome Walking e seqüenciamento com método de Sanger e com as metodologias de seqüenciamento de última geração. As seqüências completas do locus de integração dos transgenes no genoma do evento Embrapa 5.1 estão apresentadas no anexo II. O resultado dessas análises, associados às análises de Southern, mostram que os transgenes foram inseridos no genoma do feijoeiro Embrapa 5.1 em um único locus. Isso corrobora os dados obtidos com as análises genéticas de segregação dos transgenes em várias gerações e após cruzamentos, como mostrado na seção V.12. A figura V.26 mostra a estrutura dos transgenes presentes no locus de integração. Encontrou-se três seqüências completas íntegras do cassete de expressão para o gene *AtAhas* e duas para o cassete de expressão *ΔAC1hpRNA*. Todas as regiões dos transgenes encontradas, tanto para o *AtAhas* quanto *ΔAC1hpRNA*, bem como outras regiões presentes no restantes do vetor, se mostraram fieis às seqüências presentes no vetor original utilizado para transformação genética. Foram encontradas duas regiões flanqueadoras correspondentes ao genoma do feijoeiro. Essas seqüências não estão anotadas nos bancos de dados públicos e aparentemente não correspondem a seqüências gênicas. Análises de comparação utilizando a ferramenta BLAST revelou uma alta similaridade com o genoma de *Vigna radiata* [BABL01044495.1, VRKPSa44495 (97% de identidade) (região flanqueadora 1) e BABL01006572.1 contig: VRKPSa6572 (96% de identidade); BABL01009118.1, contig: VRKPSa9118 (98% de identidade); (região flanqueadora 2)]. Também foram encontradas três regiões intercaladoras. Essas regiões entremeiam seqüências exógenas (transgenes) e correspondem ao genoma nuclear ou cloroplasmático de *Phaseolus vulgaris*. Vários estudos têm mostrado que não é incomum a transferência de seqüências

do DNA cloroplasmáticos (clDNA) para o genoma nuclear (nDNA) de diversas espécies, demonstrando que isso ocorre com uma frequência muito mais alta do que se supunha (Stegemann et al., 2003; Guo et al., 2008), embora já tenha sido observado antes (Cheung et al. 1988). Embora isso possa gerar variações entre indivíduos, não tem sido associado a problemas para a saúde humana, animal ou meio ambiente, uma vez que é um fenômeno que ocorre a milhões de anos, tendo vários genes migrado tanto do genoma mitocondrial (mtDNA) quanto do clDNA para o nDNA durante a história evolutiva de eucariotos (para uma revisão ver Leister, 2005). Recentemente verificou-se que o evento de mamoeiro (linhagem 55-1) autorizado para comercialização nos Estados Unidos (Havaí) apresenta cinco, entre as 6 seqüências de DNA flanqueadoras de três insertos (transgenes) presentes no genoma nuclear são seqüências de clDNA (Suzuki et al., 2008). No caso do evento Embrapa 5.1 nenhuma das seqüências de clDNA presentes no sítio de integração correspondem a seqüência com potencial de tradução.

Embora o vetor tenha sido digerido com a enzima *FspI*, foi encontrado um sítio íntegro correspondente ao sítio dessa enzima na posição 477 do vetor pBluescript II SK, atribui-se a digestão parcial do fragmento de DNA que foi integrado no genoma do feijoeiro. No entanto, não foram encontrados sítio de *FspI* íntegros correspondentes à posição 2.266 do pBluescript II SK que está localizada dentro da seqüência do gene *bla*, que codifica para a beta-lactamase de *E. coli*. Portanto não foram encontradas seqüências íntegras que codifiquem para o gene de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos no evento de feijoeiro Embrapa 5.1. As análises de Southern também confirmam esse achado.

O vetor utilizado para obtenção do evento Embrapa 5.1 possui 12.429 pb e foram seqüenciados 50.030 pb correspondendo ao locus de integração. Embora essa seqüência seja relativamente longa se comparada a outros eventos GM gerados até o momento, todas as análises realizadas (Southern de várias gerações e após cruzamentos, PCR para amplificação de seqüências específicas, fenótipo de resistência ao BGMV, padrão de segregação Mendeliano) mostram que está estável por várias gerações.

Uma análise por FISH para detecção dos transgenes no genoma haplóide na fase de paquíteno demonstrou a presença de uma única estrutura correspondente ao locus de integração. Isso corrobora os dados de segregação dos transgenes, que sempre co-segregaram por múltiplas gerações e após cruzamentos (demonstrado nas seções V.11,



V.12 e V.14), e são condizentes com as análises feitas após seqüenciamento dos transgenes no genoma do evento Embrapa 5.1.

Com exceção da seqüência truncada 35SPv1 (discutida a seguir), não foram encontradas seqüências com potencial de transcrição e tradução nos sítio de integração além dos próprios transgenes introduzidos.

Foram realizadas análises de Southern com quatro sondas correspondendo a fragmentos dos elementos nos3', ahas5, 35SCaMV e fragmento do gene *bla* (Figura V.27). Todos os fragmentos esperados a partir das análises de seqüências são observados nas análises de Southern. Isso indica que os fragmentos presentes no genoma do evento 5.1 foram detectados nas análises de seqüenciamento do lócus de integração. Foram encontradas cinco seqüências parciais correspondendo a fragmentos do gene *bla*. Portanto nenhuma dessas seqüências é funcional e apenas uma pode ser detectada pela sonda correspondendo a um fragmento do gene *bla* (sonda 4).

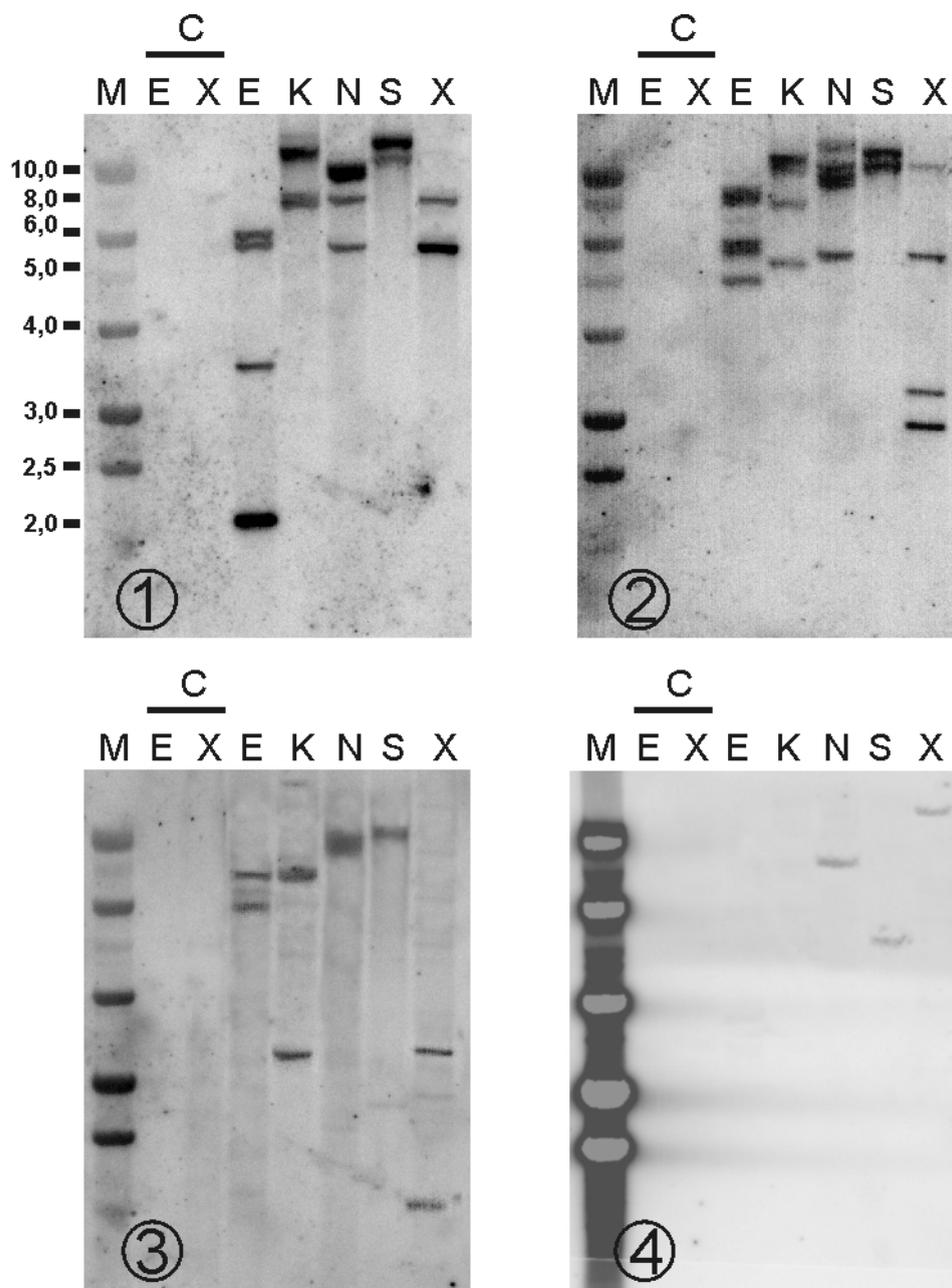


Figura V.27. Análises de Southern para detecção dos transgenes no evento Embrapa 5.1. O DNA genômico foi digerido com *EcoRI* (E), *XbaI* (X), *KpnI* (K), *NcoI* (N) e *SphI* (S), transferido para uma membrana de nylon e sequencialmente hibridizado com sondas radiativas correspondendo a fragmentos do *ahas5'*(1), *35SCaMV* (2), *nos3'* (3) e *bla* (4). Como controles (C) foram usadas plantas não-GM cujo genoma foi digerido com *EcoRI* e *XbaI*. M= marcador de massa molecular (kb) 1 kb Ladder.

Encontrou-se uma seqüência truncada do promotor 35SCaMV, tendo uma a montante uma seqüência específica do feijoeiro Embrapa 5.1 (presente no clone originalmente chamado de R70). Essa seqüência foi chamada nesse documento como 35SPv1 (Anexo II). Caso o promotor 35SCaMV estivesse funcional no evento Embrapa 5.1 haveria a possibilidade de transcrição de 35SPv1. No entanto como essa seqüência não possui sinal de poliadenilação dificilmente haveria qualquer possibilidade de tradução. Caso isso corresse haveria a possibilidade de geração de um peptídeo de 11 resíduos de amino ácidos decorrente da tradução abaixo:

ATG GCG CAC GGC TCC GGT AGA GAG GTC AGC TGT TAA
M A H G S G R E V S C

De qualquer forma uma análise de RT-PCR foi realizada para verificar a possibilidade de transcrição de 35SPv1. O resultado está na Figura V.28 e mostra que não foi possível identificar qualquer transcrito para essa ORF. Provavelmente isso decorre da não funcionalidade do promotor 35SCaMV que não possui parte dos elementos posicionados na região 3' terminal, tais como CCAAT e TATA. O RNA 35S é o mais abundante do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), ou vírus do mosaico da couve-flor, quando se analisa plantas infectadas (Guilley et al., 1982). Esse RNA possui repetições diretas na região terminal, que têm função de molde para a transcrição reversa durante a replicação viral. Deleções na região proximal reduzem drasticamente os níveis de expressão promovidos pelo promotor 35SCaMV e eliminação de elementos nessa região podem abolir a expressão (Ow et al., 1987). A região terminal, juntamente com a região de 60 nt (região estimulatória 1, S1) que está jusante da região proximal e do sítio de inicialização da transcrição do 35S CaMV RNA pode aumentar a expressão gênica e tem importância para a tradução e transcrição, uma vez que várias proteínas nucleares da célula vegetal se ligam nesse motivo. Conseqüentemente, a falta dessa região leva a transcrição a níveis basais (Futterer et al., 1990; Pauli et al., 2004). Além da perda dos elementos TATA e CCAAT no 35SCaMV truncado de 35SPv1, houve a perda de 24 nt do elemento UE1 e “e” (região core). O promotor 35S possui três domínios: um componente essencial (UE1) e dois domínios intercambiáveis do “enhancer” (UE2 e UE3). Os elementos “e” são elementos essenciais para UE1 e UE3

(Noad et al., 1997). Provavelmente isso explica a não transcrição de 35SPv1, que mesmo se ocorresse provavelmente não seria traduzido. Adicionalmente não foi possível encontrar o peptídeo MAHGSGREVSC em análises de espectrometria de massa.

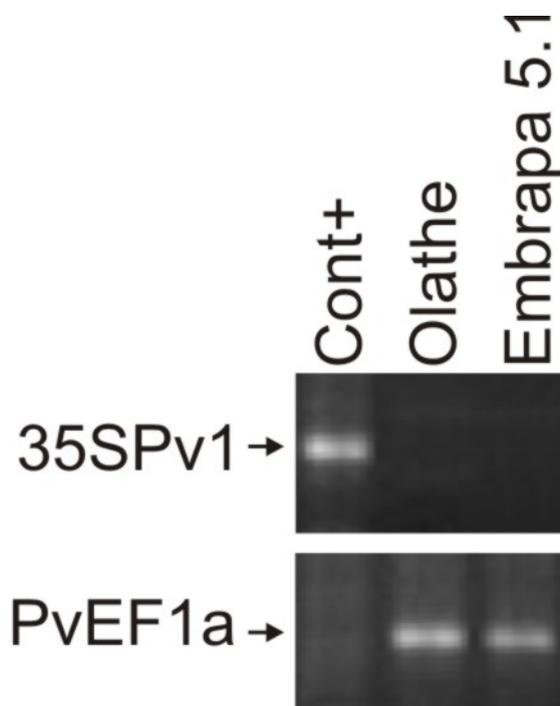


Figura V.28. Análise usando RT-PCR para detecção de possível transcrição da ORF 35SPv1 em folhas do evento Embrapa 5.1. Cont+: 15 ng de DNA genômico do evento Embrapa 5.1. Plantas não GM (Olathe foram utilizadas como controle negativo, uma vez que a região de 35SPv1 a jusante de 35SCaMV truncado não é anotada como uma região gênica. O gene de expressão constitutiva *PvEF1a* (fator de alongamento alfa) foi utilizado como controle interno.

Detecção dos transgenes no locus de integração por FISH

Como uma análise complementar para demonstrar que os transgenes estão inseridos em um único locus do genoma do evento Embrapa 5.1 foi realizado um mapeamento da dos transgenes/locus de integração nos cromossomos com a metodologia de Hibridização In Situ Fluorescente de elevada resolução adaptada de Capdeville et al. (2009) e Szinay et al. (2008). Com essa metodologia foi possível confirmar a presença dos transgenes em um único locus, confirmando mais uma vez o que foi previamente observado nos dados de segregação Mendeliana em uma proporção 3:1 e as análises de sequência do locus transgênico (Figura V.29).

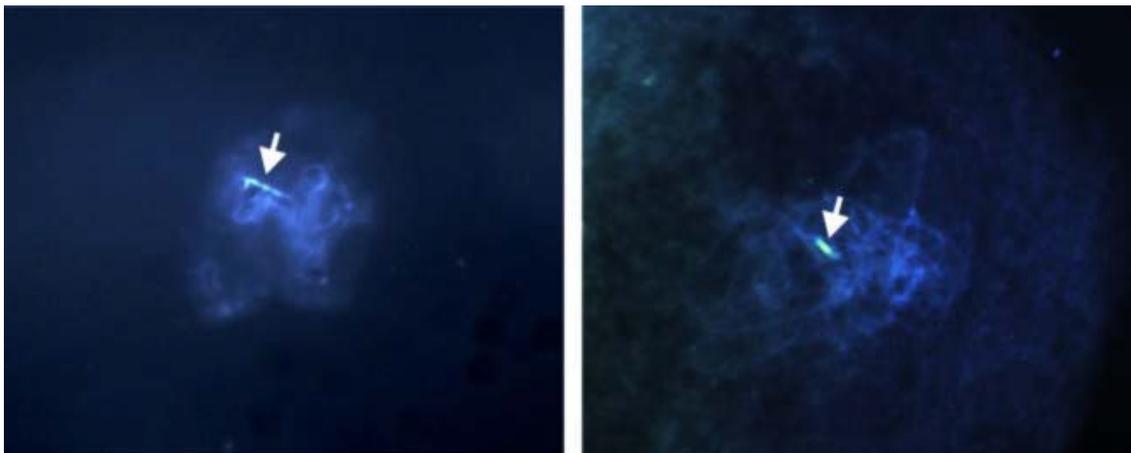


Figura V.29. Hibridização fluorescente in situ (*FISH*) de alta resolução para detecção do locus de integração dos transgenes nos *cromossomos* meióticos do evento de feijoeiro Embrapa 5.1. A seta mostra a marcação da detecção de um único locus com presença de sinal gerado pela sonda correspondente aos transgenes inseridos nesse evento de transformação.

V.10. O produto da expressão do gene inserido no organismo receptor, descrito em detalhes.

Pequenos siRNA correspondentes à construção $\Delta AC1hpRNA$

Como mencionado anteriormente, o produto da expressão de $\Delta AC1hpRNA$ são pequenos siRNA (pequenos RNA interferentes) que podem ser observados em gel de acrilamida. Esses siRNA são o resultado do processamento do dsRNA gerado com a construção do tipo *intron-hairpin* descrita anteriormente.

Os siRNA foram inicialmente detectados nas plantas geneticamente modificadas de feijoeiro Embrapa 5.1 (Bonfim et al., 2007). Como os genes *AC1*, *AC2*, e *AC3* (Figura XE) podem ser expressos de um mRNA policistrônico (Hanley-Bowdoin et al., 1999), os siRNA derivados da expressão de $\Delta AC1hpRNA$ poderiam servir como *primer* para a síntese de siRNA secundários correspondentes aos genes *AC2*, e *AC3* usando o mRNA viral como molde. No entanto a análise de siRNA usando como sondas fragmentos dos genes *AC1*, *AC2*, e *AC3* mostrou que não foram observados siRNA correspondentes a outras regiões além daquela do gene *AC1* usada na construção do cassete de expressão $\Delta AC1hpRNA$ (Figura V.30). Além disso, nenhum siRNA foi detectado em plantas não modificadas.

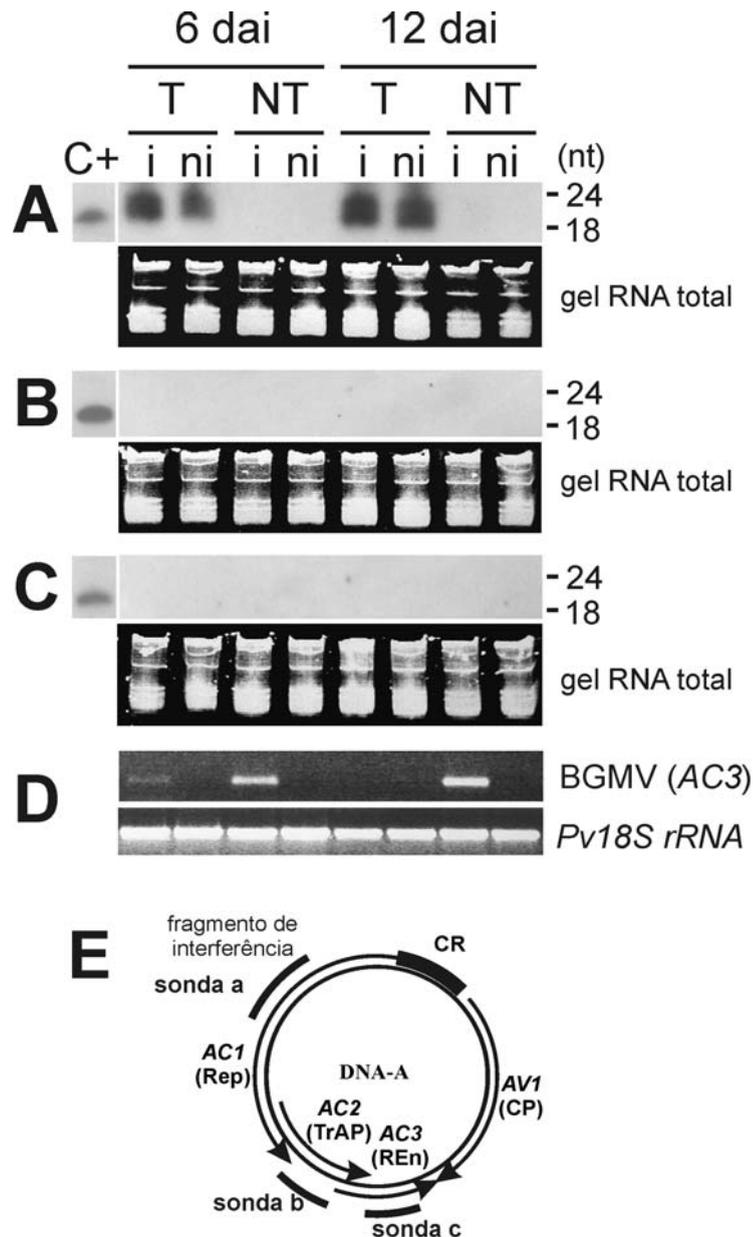


Figura V.30. Análise de Northern blot para detecção de siRNA isolados de plantas do evento Embrapa 5.1. As plantas foram mantidas em contato com moscas brancas virulíferas por um período de 6 dias e então removidas. O RNA total foi isolado das folhas 6 e 12 dias após a inoculação (dai) de plantas inoculadas (i) e não-inoculadas (ni) com o BGMV. As membranas foram hibridizadas com sondas correspondentes a fragmentos dos genes virais *AC1* (sonda a), *AC2* (sonda b) e *AC3* (sonda c). Os géis estão mostrados respectivamente em A, B e C. As sondas estão mostradas em E (representação esquemática do componente A do BGMV). C+: 50 ng de oligos contendo seqüências dos genes *AC1* (em A), *AC2* (em B), e *AC3* (em C) do BGMV. Géis mostrando os RNA totais corados com brometo de etídio estão mostrados abaixo de cada membrana. Todas as plantas geneticamente modificadas evento Embrapa 5.1 se mantiveram livres de sintomas enquanto que as plantas não geneticamente modificadas que foram inoculadas apresentaram sintomas severos. D mostra uma análise semi-quantitativa por PCR do DNA viral presente nas amostras. O gene *Pv18S rRNA* foi usado como controle interno.

Com a finalidade de antever a funcionalidade da expressão do gene quimérico *ΔAC1hpRNA* em distintas condições ambientais, as plantas foram cultivadas nas temperaturas de 15°C, 25 °C e 35 °C. A figura V.31 mostra que não houve uma diferença significativa na expressão do transgene nessas condições. Isso foi confirmado em análises posteriores em que plantas de feijoeiro foram cultivadas em distintos ambientes, em Santo Antônio de Goiás (GO), Londrina (PR) e Sete Lagoas (MG) por dois anos e nenhuma diferença na expressão do cassete *ΔAC1hpRNA* foi observada, como pode ser confirmado na figura V.32. A figura V.32 mostra que não houve diferença detectável na expressão dos siRNA correspondentes ao cassete *ΔAC1hpRNA* mesmo que as plantas tenham sido cultivadas em regiões edafo e climaticamente diversas.

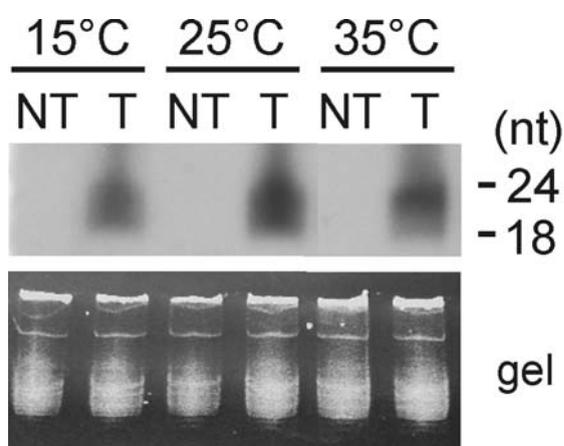


Figura V.31. Análise de Northern blot para detecção de siRNA isolados de plantas do evento Embrapa 5.1 cultivadas por um período de 5 dias em distintas temperaturas. NT = plantas não geneticamente modificadas; T = plantas geneticamente modificadas evento Embrapa 5.1.

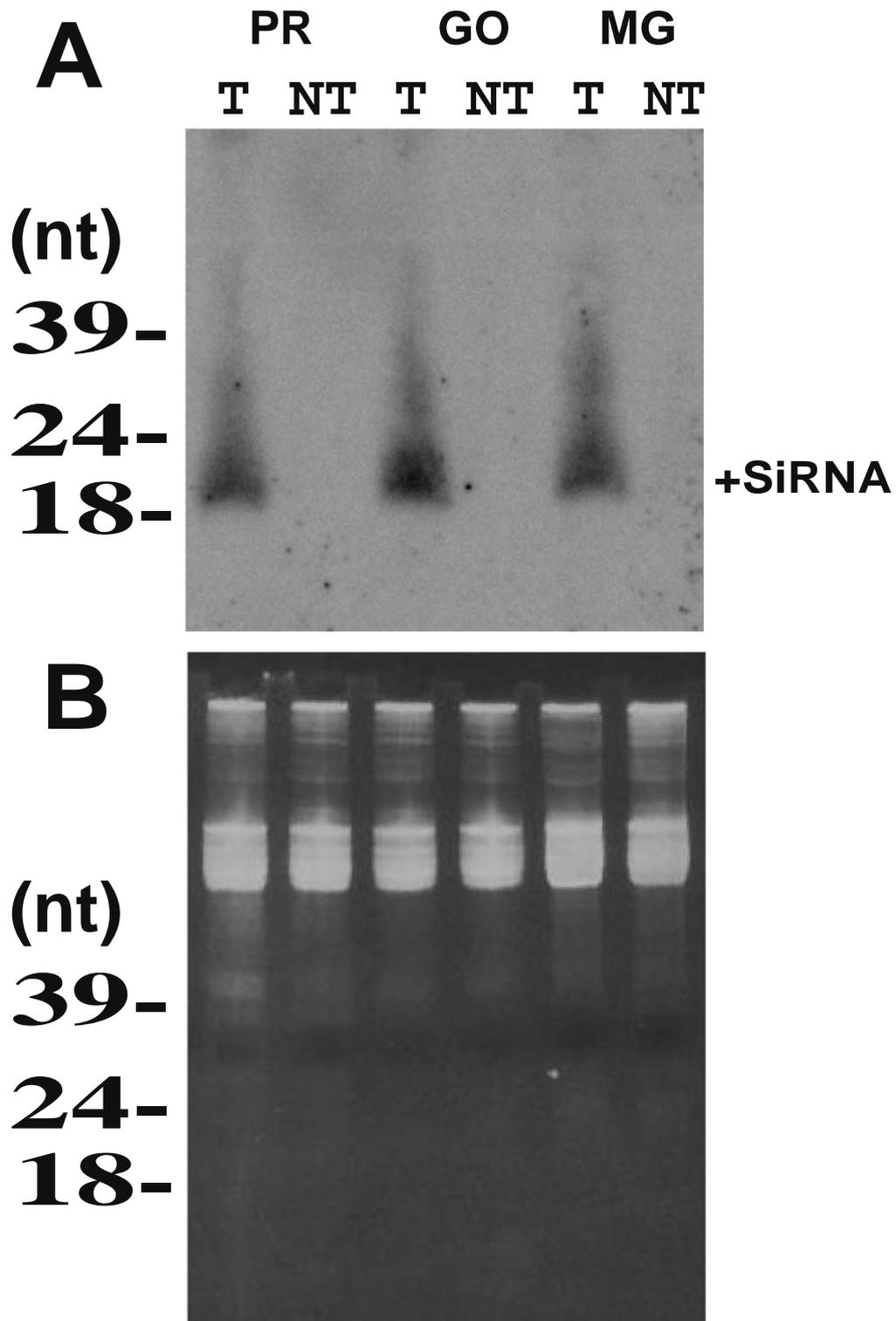


Figura V.32. A) Detec9ao de siRNA de folhas de plantas cultivadas no campo em Londrina (PR), Santo Antonio de Goias (GO) e Sete Lagoas (MG). B) Gel mostrando o RNA total isolados de folhas e sementes.

siRNA correspondentes aos esperados como resultado da expressão do gene quimérico $\Delta ACIhpRNA$ foram analisados em sementes de feijoeiro em diversos estágios de desenvolvimento (10, 15, 20 e 25 dias após a polinização; estágios fonológicos de R8 a R9) (Figura V.33). Os resultados mostram que o nível de siRNA em sementes de qualquer estágio analisado é muito inferior ao observado nas folhas. Mesmo em baixo nível de estringência o nível de siRNA observado das sementes está próximo do nível de detecção. Uma vez que há a possibilidade do consumo de sementes imaturas de feijão, os resultados mostram que não há diferença, mesmo se comparados aos das sementes secas (forma mais comum de consumo do feijão). O mesmo pode ser dito de sementes embebidas por um período de 16h, o que mimetiza uma prática comum no Brasil de embeber os grãos por o período de uma noite antes do cozimento. Tentativas de isolamento de siRNA ou mesmo RNA total de sementes maduras ou imaturas (incluindo vagens) após o cozimento resultaram sem sucesso. RNA maiores correspondentes às seqüências do gene quimérico $\Delta ACIhpRNA$ de tamanhos superiores aos dos siRNA (>24 nt) também não foram observados em qualquer situação analisada, tanto em folhas quanto em sementes.

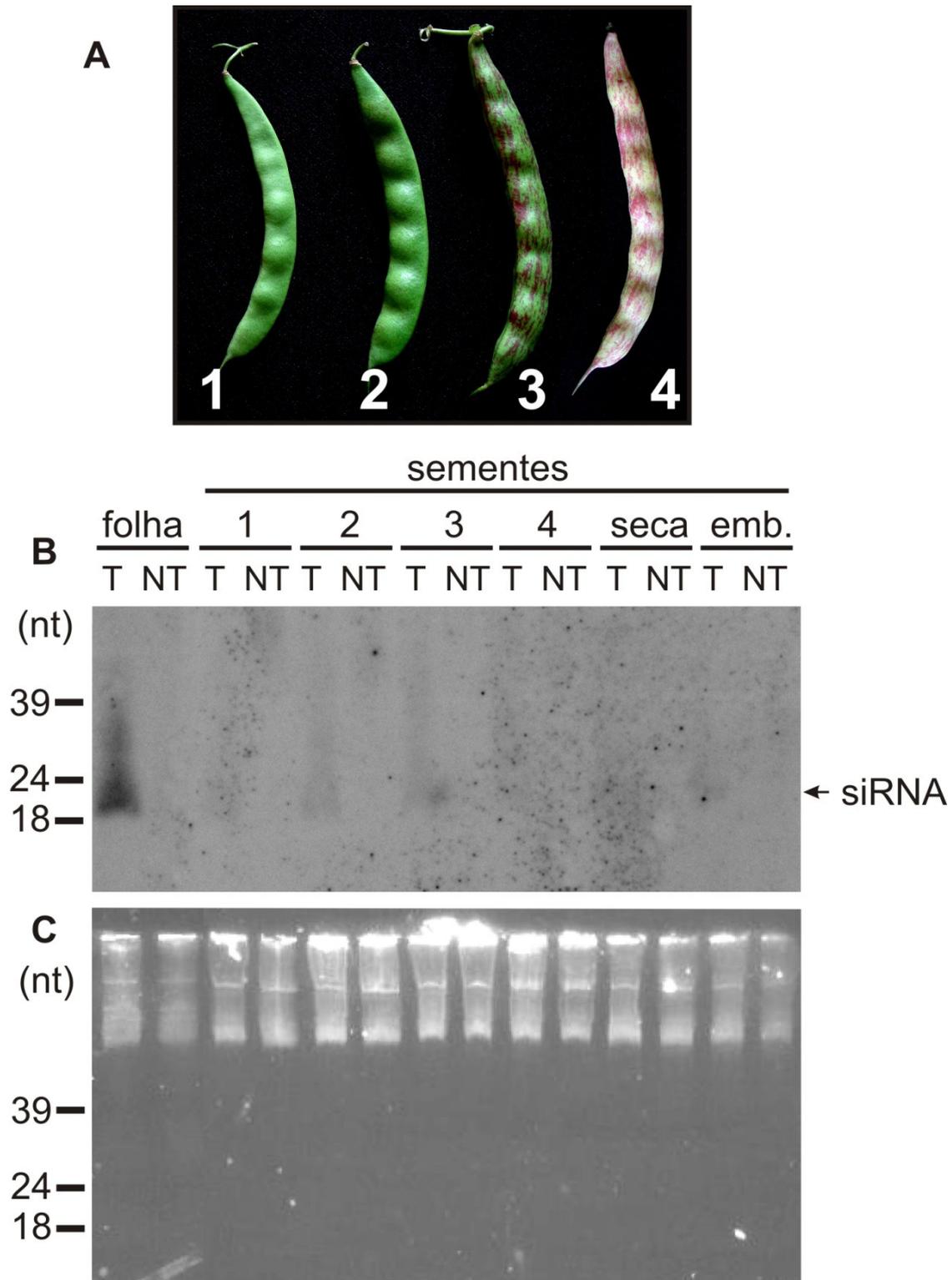


Figura V.33. Análise da presença de siRNA em sementes. A) Vagens colhidas 10 (1), 15 (2), 20 (3) e 25 (4) dias após a polinização, entre os estágios R_8 e R_9 . As sementes dessas vagens foram analisadas para a presença de siRNA específicos decorrentes da expressão do transgene $\Delta AC1hpRNA$. Também foram analisadas sementes secas e sementes secas embebidas por 16h. Os níveis de siRNA detectados em sementes podem ser comparados com aqueles observados em folhas. C) Gel mostrando o RNA total isolados de folhas e sementes.



Coletivamente essas análises mostram que o nível de expressão dos siRNA nos tecidos de feijoeiro que são comumente consumidos é muito baixo e se mantêm em níveis estáveis em plantas cultivadas em distintas condições ambientais. Além disso, a quantidade de siRNA em tecidos cozidos de feijoeiro (grãos e vagens) foi em níveis indetectáveis. Mesmo assim foi realizado um experimento em que animais consumiram siRNA isolados de folhas de plantas geneticamente modificadas evento Embrapa 5.1. Os resultados estão detalhados na seção VI e demonstram a segurança da ingestão de siRNA gerados a partir da expressão do gene $\Delta AC1hpRNA$.

Proteínas AtAHAS e AtSEC61 γ produzidas no feijão Embrapa 5.1

Análises de RT-PCR semi-quantitativas foram realizadas para detectar transcritos correspondentes aos genes *AtAhas* e *Atsec61* presentes no genoma do evento Embrapa 5.1. A figura V.34 mostra os resultados dessas análises em folhas, raízes, caules e sementes em desenvolvimento do evento Embrapa 5.1. Foi possível detectar transcritos do gene *AtAhas*, mas não foi possível detectar transcritos do gene *Atsec61*. Os resultados mostraram também que os níveis de transcritos do gene *AtAhas* foram menores em sementes imaturas e pétalas e de uma maneira geral inferiores aos encontrados em folhas de *A. thaliana*.

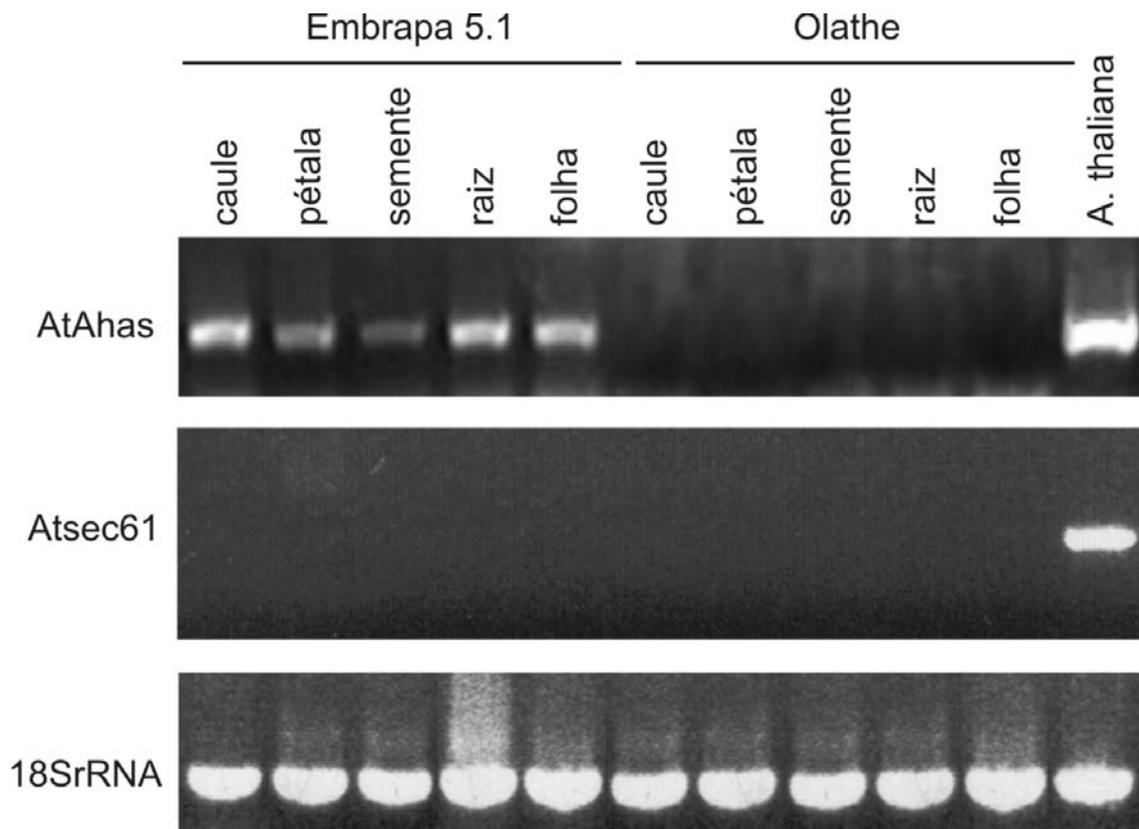


Figura V.34. Análises de RT-PCR para detecção de transcritos dos genes *AtAhas* e *Atsec61* presentes no genoma do evento Embrapa 5.1. O gene *Pv18SrRNA* foi usado como controle interno.

Uma vez que apenas foi possível detectar transcritos do gene *AtAhas*, análises posteriores usando ELISA foram realizadas para detectar a proteína em tecidos da planta. Embora haja uma grande similaridade entre as proteínas AtAHAS e PvAHAS (AHAS endógeno do feijoeiro), foi possível produzir anticorpos específicos para uma e outra proteína ou que reconheça ambas as proteínas, usando peptídeos de 31-33 resíduos de aminoácidos. O gene *PvAhas* foi clonado para este estudo (Acesso no GenBank GQ466185) e a sequência deduzida da proteína PvAHAS (juntamente com a de AtAHAS) foi usada para síntese de peptídeos específicos. A seguir estão as seqüências das proteínas AtAHAS e PvAHAS nas quais estão marcados os peptídeos sintetizados e ligados à proteína hemocianina de *Megathura crenulata* (mcKLH) (Pierce, Rockford, IL, USA) para produção de anticorpos em coelho conforme descrito no Anexo I.

Os resultados demonstraram que os peptídeos mostraram uma especificidade suficiente para estimar o nível de expressão da proteína AtAHAS (Figura V.35). Com o

uso do anticorpo gerado com o peptídeo PEP. 08/22 pode-se verificar uma especificidade para detecção de AtAHAS conforme observado na figura V.36, onde os valores de leitura para o extrato protéico de *A. thaliana* foi mais que 4 vezes a leitura obtida para o extrato protéico de feijoeiro convencional. No entanto, na leitura para o extrato do evento Embrapa 5.1 percebe-se um diferença de aproximadamente 2 vezes em relação ao feijoeiro convencional. Essa análise mostra que os níveis de proteína AtAHAS no evento Embrapa 5.1 são baixos e menores que os encontrados no organismo doador do gene (*A. thaliana*). Esses resultados foram validados com o uso de anticorpo gerado com o peptídeo PEP 08/24, desenhado a partir de uma região comum às proteínas AtAHAS e PvAHAS. Nestas análises obteve-se uma leitura similar entre as amostras (Figura V.35). Também com o peptídeo PEP 08/25 (desenhado a partir de uma região específica de PvAHAS, observa-se uma certa especificidade, com leituras superiores para as amostras de feijoeiro, quando comparadas às de *A. thaliana*, e muito similares entre as amostras de feijoeiro (Figura V.36). O anticorpo específico para AtAHAS (produzido com PEP. 08/22) foi usado para comparar os níveis de AtAHAS nas folhas, raízes, flores e sementes ao longo do desenvolvimento. Os resultados mostram que é possível detectar a proteína AtAHAS apenas em folhas, raízes e flores. Entretanto, os níveis de AtAHAS encontrados são muito baixo, quase no limite da detecção. A quantidade de AtAHAS que pode estar presente nas sementes em qualquer estágio analisado não pode ser detectada (Figura V.36).

Coletivamente esses dados mostram que os anticorpos gerados foram suficientes para detecção específicas de AtAHAS no evento Embrapa 5.1, mostrando que a proteína esta presente nas folhas, mas em níveis muito inferiores aos observados no organismo doador. Também foi possível demonstrar que não houve alteração no nível da proteína PvAHAS endógena no evento Embrapa 5.1 quando comparado ao parental (cv. Olathe convencional). Além disso, os níveis de AtAHAS em sementes são muito baixos, aquém do limite detecção, mostrando um padrão similar ao que foi encontrado no evento de soja BPS-CV127-9 analisado e aprovado para comercialização pela CTNBio (Processo nº 01200.000010/2009-06). Os resultados dos ensaios de detecção de AtAHAS nas sementes por ELISA estão condizentes com as análises de RT-PCR para detecção de transcritos do gene *AtAhas*, embora para outros tecidos não tenha sido observada uma relação direta.

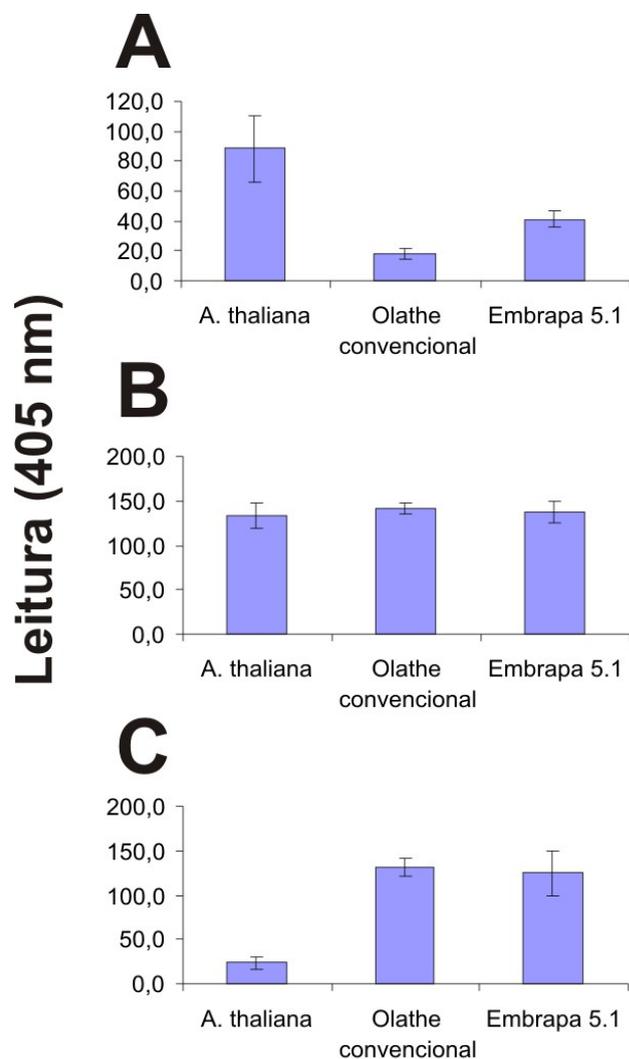


Figura V.35. Análise da presença da proteína AtAHAS em folhas de *A. thaliana*, Olathe convencional (não GM) e o evento GM Embrapa 5.1 (A, B e C). As análises foram realizadas com anticorpo produzido com os peptídeos PEP. 08/22 (A), PEP 08/24 (B) e PEP 08/25). Resultados de 10 repetições biológicas.

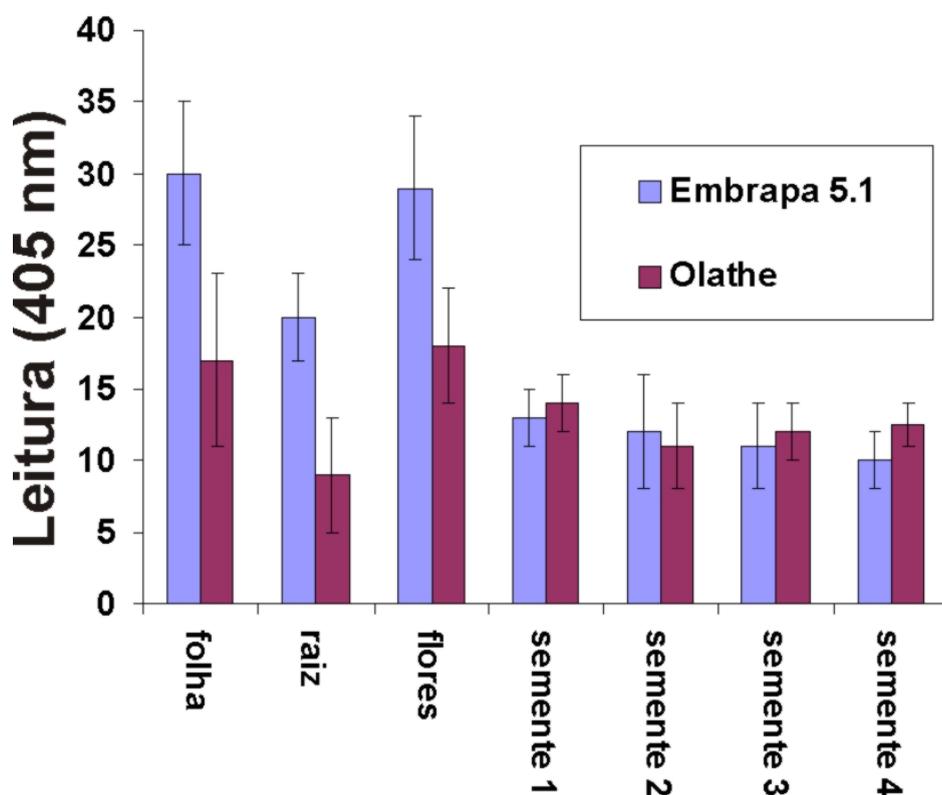


Figura V.36. Análise da presença da proteína AtAHAS em folhas, raízes, flores e sementes em vários estágios de desenvolvimento (Sementes 1 a 4 se referem às vagens segundo Figura V.33, seção V.10). O anticorpo gerado com o peptídeo PEP. 08/22 foi utilizado para analisar a presença de AtAHAS no evento Embrapa 5.1 e o Olathe não-GM. Resultados de 10 repetições biológicas.

Uma vez que foi possível detectar a presença da proteína AtAHAS em tecidos foliares do evento Embrapa 5.1, ensaios foram realizados para mostrar sua funcionalidade em conferir tolerância a herbicidas do grupo das imidazolinodas. Em ensaio realizado para determinar a tolerância a imazapyr 80 nM in vitro, pode-se verificar que existe uma certa tolerância de eixos embrionários a essa concentração do herbicida (Figura V.37). Esse nível de tolerância provavelmente foi importante para a seleção do evento de transformação Embrapa 5.1.

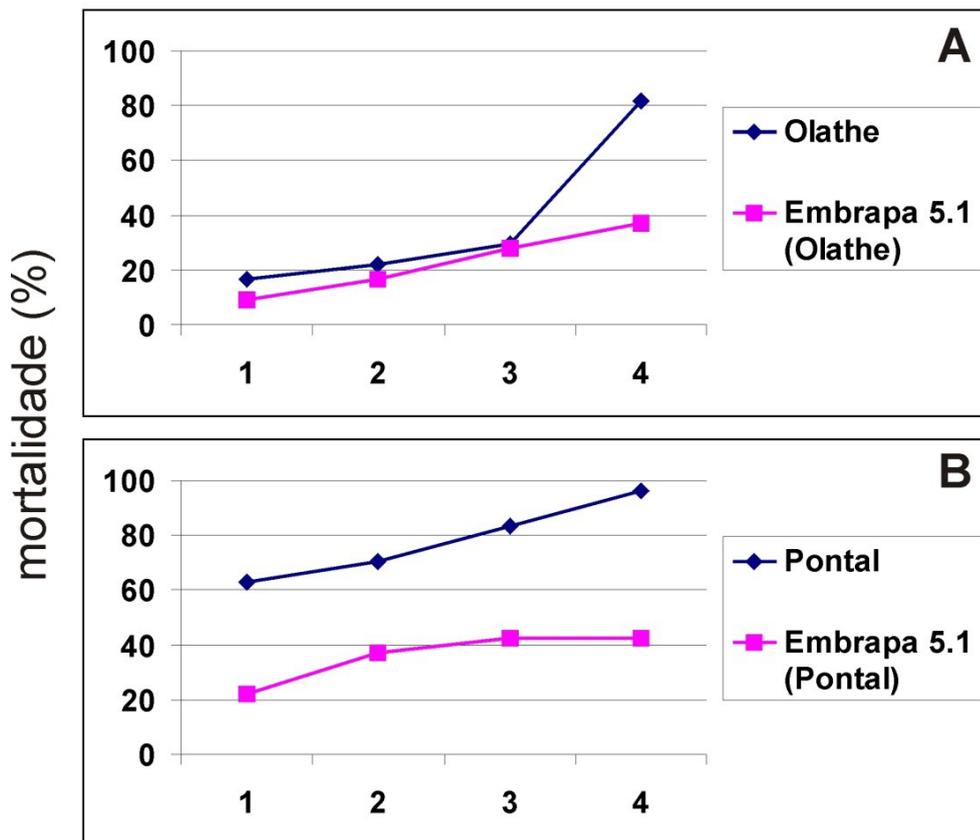


Figura V.37. Avaliação da tolerância ao herbicida imazapyr 80 nM in vitro. Os embriões foram cultivados em meio contendo imazapyr e a frequência de sobrevivência foi analisada ao longo de 4 semanas para o evento Embrapa 5.1 comparado à mesma variedade não GM (A) e a linhagem derivada resultante de cruzamentos com a var. BRS Pontal (B).

Entretanto, quando plantas adultas foram tratadas com dosagens entre 50 e 200 g i.a./há com herbicidas do grupo químico das imidazolinonas {imazapic (Ácido 2-[4,5-dihidro-4-metil-4-(1-metiletil) -5-oxo-1Himidazol-2-il]-5-metil-3-piridine carboxílico, imazapyr: ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il) e Imazamox: Ácido 2-[(RS)-4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolina-2-yl]-5-metoxymetil nicotínico} e não se observou qualquer nível de tolerância. Todas as plantas tratadas com imidazolinonas morreram independentemente da dosagem utilizada (50 a 200 g i.a./ha). Essa baixa tolerância aos herbicidas do grupo das imidazolinonas corrobora as baixas concentrações de proteína AtAHAS encontradas nas análises de ELISA, com níveis próximos do limite de detecção. Esses resultados demonstram que a presente tecnologia para resistência ao BGMV não tem qualquer relevância no que diz respeito ao controle de ervas daninhas.

V. 11. As técnicas de detecção gerais e específicas do OGM, apresentando metodologia pertinente.

As seqüências flanqueadoras e intercaladoras do inserto foram usadas para o desenvolvimento de uma técnica de PCR para identificação específica do feijoeiro Embrapa 5.1. A descrição dos materiais e métodos usados no PCR está apresentada no Anexo I desse documento.

Sete PCR evento-específico para o feijoeiro Embrapa 5.1 foram desenhados com um primer ancorado na seqüência flanqueadoras 5' ou intercaladora e o outro primer ancorado no inserto. Na tabela abaixo estão especificados os primers utilizados e os fragmentos obtidos.

PCR	Pares de Primers	Seqüências (5'-3')	Fragmento amplificado (pb)
1	R124F1 SOJAE3P3R	TACAGGCCAAGCAGCTAGGAAG GGACTCCAACGTCAAAGGGCGA	717
2	COLR22R1 PUCLINK19R	GCCATTATCATGACGCCACCAAC GGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGT	434
3	SOJAE3P1R PVCOLF	TACCAATGCTTAATCAGTGAGGC CGGTATTCTCCAGCACATTCG	533
4	FEIJÃO12 FEIJÃO3	GAGTTGGTAGCTCTTGATCC GCAGGAATTCGATATCAAGC	394
5	PVCLOROR3 AHAS534C	TACATAATAGGGAGGCTGTTC GGAGTGGTTGTGACATTGGTGG	530
6	PVCLOROF FEIJÃO3	GTGTGCCGACTTGAGATTTTG GCAGGAATTCGATATCAAGC	417
7	R14R FEIJÃO7	CAAATCACGAATAAGTTGTATAG TCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACC	486
8	PVCOLF2 35SKAN2F	ATCATGAAGGCGCGCTGAATGT CCTACAAATGCCATCATTGCG	355
9	PVCLOR3 FEIJÃO8	TAGCGGAGATTGATGACGTACC TTAATCGCCTTGCAGCACATCC	439

Todos os nove fragmentos amplificados por PCR geraram produtos específicos de tamanho esperado partindo de DNA extraído de folhas ou sementes do evento Embrapa 5.1, sugerindo que qualquer um dos conjuntos de primers pode ser usado para a detecção do evento Embrapa 5.1 com o gene presente na variedade hospedeira

(Olathe) e uma linhagem avançada da variedade BRS Pontal (Figura V.38). A figura V.39 mostra os fragmentos amplificados com as nove combinações de primers utilizadas. Esses fragmentos não foram amplificados em amostras isoladas do feijoeiro parental Olathe. Foram usadas como moldes amostras de DNA genômico isoladas de plantas de Olathe 5.1 (após 13 gerações de autofecundação) e de uma linhagem avançada do grupo Carioca [BRS Pontal 5.1, após 9 gerações de autofecundação do retrocruzamento 4 (RC4F9)]. Nos dois casos o padrão de fragmentos amplificados foi o mesmo.

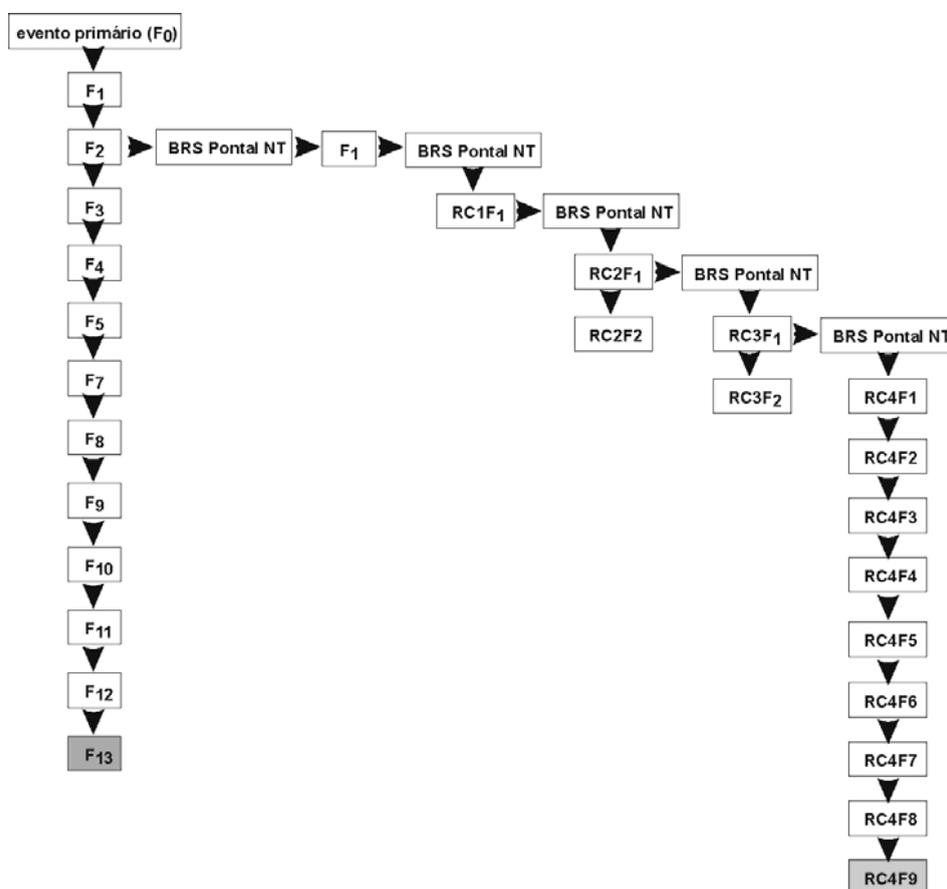


Figura V.38. Esquema mostrando as várias gerações do evento Embrapa 5.1 e após cruzamentos com a variedade BRS Pontal. Os quadros cinza mostram plantas que foram utilizadas para a detecção de seqüências específicas por PCR. O resultado dessas análises pode ser visto na figura V.39.

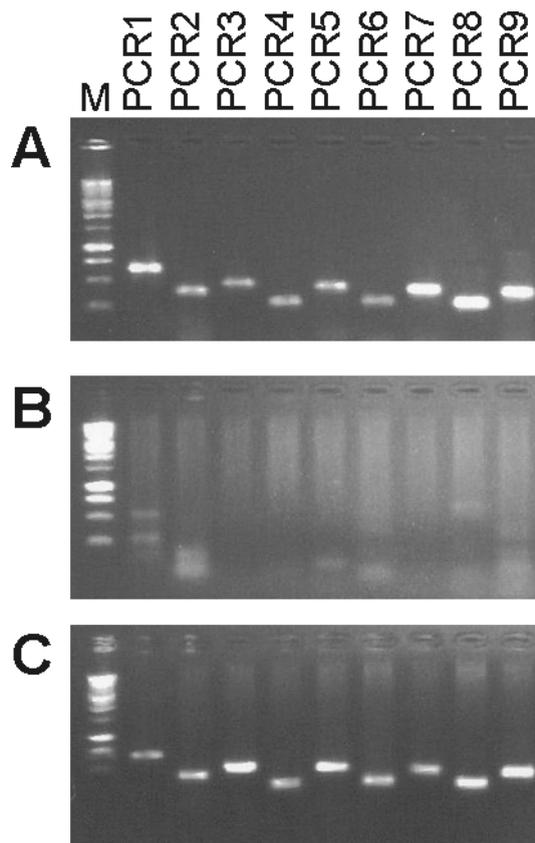


Figura V.39. Análise de PCR para amplificação de fragmentos específicos para o evento Embrapa 5.1. A: DNA do evento Embrapa 5.1 (Olathe); B: Parental Olathe não-GM; C: evento BRS Pontal 5.1 (Carioca). M: marcador 1 kb Ladder (Invitrogen).

V.12. O padrão de herança genética dos genes inseridos.

O material genético utilizado para este estudo foi obtido a partir de plantas em homozigose da variedade Olathe resultante de autopolinizações a partir do evento original geneticamente modificado. Os transgenes inseridos mostraram um padrão de segregação Mendeliana condizentes com a inserção estável de um único locus. Os resultados das análises de Southern por várias gerações também corroboram esses resultados, conforme poderá ser verificado na secção V.14.

Para confirmar esse padrão de segregação a linhagem em homozigose Embrapa 5.1 foi cruzada com a variedade BRS Pontal não geneticamente modificada. Para os cruzamentos, o evento Embrapa 5.1 foi sempre utilizado como doador de pólen, enquanto BRS Pontal foi a receptora (mãe). Isto foi feito para facilitar a identificação de possíveis autofecundações por PCR para detecção dos transgenes e resistência ao

BGMV. O sucesso dos cruzamentos foi observado baseado no fato de que todas as plantas F₁ analisadas eram portadoras do transgene. Todas as plantas foram expostas durante sete dias a uma população virulífera de moscas brancas. Foi observado que algumas plantas transgênicas apresentaram sintomas de mosaico dourado (MD). Por se tratar de número restrito de plantas (24) decidiu-se por inocular outras 24 plantas do mesmo cruzamento e geração. Assim, na geração F₁ todas as 24 plantas obtidas foram positivas para a presença do gene *AtAhas*, das quais 05 plantas foram infectadas com o BGMV [verificou-se que entre 20-30% de uma população de plantas de hemizigose mostram infecção com o BGMV e sintomas de mosaico dourado (MD)]. Na geração R₃ todas as plantas testadas (n=12) mostraram a presença do gene *AtAhas* e foram resistentes ao MD enquanto que 10 de um total de 11 plantas da variedade BRS Pontal (pai recorrente) foram infectadas com MD. Para a inoculação foram usadas entre 81 e 301 moscas brancas por planta, com média de 177 moscas por planta.

A geração F₁RC1 mostrou segregação de modo Mendeliano, demonstrando a normalidade de formação do zigoto e desenvolvimento do embrião sem abortamentos (Tabela V.11). O mesmo padrão de segregação foi observado em cruzamentos entre Embrapa 5.1 e Pérola não geneticamente modificado (Tabela V.12). Cruzamentos similares foram realizados com a cv. Pérola (Tabelas V.15 e V.16).

Tabela V.11. Avaliação da geração F₁ de RC1= F₁RC1 com BRS Pontal por PCR para a presença dos transgenes.

	Observado	Esperado	χ^2	P
Positivas	36	39,5	0,62	0,51
Negativas	43	39,5		
Total	79			

Os valores obtidos não diferem do esperado, de 1:1

Tabela V.12. Avaliação da segregação da geração F₁RC1 do cruzamento entre Pérola e Embrapa 5.1

	Observado	Esperado	χ^2	P
Positivas	36	40	0,80	0,54
Negativas	44	40		
Total	80			

Os valores obtidos não diferem do esperado, de 1:1

Foram realizados os retrocruzamentos planejados até o quarto retrocruzamento (para mais detalhes ver seção conforme poderá ser verificado na seção V.14). Em cada geração F₁ as plantas que apresentavam sintomas de MD eram descartadas do programa, não sendo, portanto, utilizadas para os retrocruzamentos. As plantas transgênicas foram sempre usadas como parentais doadores de pólen, enquanto o parental recorrente sempre funcionou como receptora (mãe).

Tabela V.13. Segregação do transgene baseado em PCR com primers para o gene *AtAhas* na geração F2RC4 do cruzamento entre BRS Pontal e o evento Embrapa 5.1

	Observado	Esperado	χ^2	P
Positivas	150	157,5	1,43	0,232
Negativas	60	52,5	n.s.	
Total	210			
	Testemunhas			
BRS Pontal	10			10 com MD
Embrapa 5.1	20			0 com MD

Os valores obtidos não diferem do esperado, 3:1

Tabela V.14. Segregação da resistência ao mosaico dourado (MD) na geração F2RC4 do cruzamento entre BRS Pontal e Embrapa 5.1 utilizando-se as plantas da Tabela V.13.

	Observado	Esperado	χ	P
Resistentes ao MD	168	157,5	2,8	0,092
Suscetíveis ao MD	42	52,5	n.s.	
Total	210			

Os valores obtidos não diferem do esperado para segregação mendeliana de 3:1

Tabela V.15. Segregação do transgene baseado em PCR com primers para o gene *ahas* na geração F2RC4 do cruzamento entre cultivar Pérola e Embrapa 5.1

Embrapa 5.1 X Pérola Geração F4RC4	Observado	Esperado	χ^2	P
Positivas	37	42	2,38	0,123 n.s.
Negativas	19	14		
Total	56			
	Testemunha			
Pérola	20			20 com MD
Embrapa 5.1	20			0 com MD

Tabela V.16. Segregação da resistência ao mosaico dourado na geração F2RC4 do cruzamento entre cultivar Pérola e Embrapa 5.1 utilizando-se as plantas da Tabela V.15.

Embrapa 5.1 X Pérola Geração F2RC4	Observado	Esperado	χ^2	P
Resistentes ao MD	36	41,25	2,67	0,102 n.s
Suscetíveis ao MD	19	13,75		
Total	55			

As Tabelas V.13 e V.15 apresentam os resultados da segregação do transgene baseado na presença do gene *Ahas*, enquanto os resultados de segregação obtidos para a inoculação com o BGMV encontram-se nas Tabelas V.14 e V.16. O teste de qui-quadrado (χ^2) mostra que as relações de positivo (geneticamente modificado, GM): negativo (não-GM) ou da herança de resistência ao mosaico dourado observadas foram conforme o esperado, considerando uma segregação de 3:1 para um gene. Houve a co-segregação da presença do transgene *AtAhas* e da resistência ao vírus do mosaico dourado no caso dos cruzamentos efetuados. Embora o evento Embrapa 5.1 tenha mais de uma cópia dos transgenes inseridos no genoma, essas seqüências estão inseridas em um único locus. Isso é verificado na caracterização molecular desse evento e pelos padrões de segregação Mendelianos condizentes com a existência de um único locus. No experimento com o cruzamento com BRS Pontal houve vários escapes no controle suscetível, e várias plantas, que não tinham o transgene, também se comportaram como resistentes, ou vice-versa, afetando a relação resistente:suscetível, porém não chegou a comprometer os resultados. As plantas segregantes apresentaram fenótipo normal, em todos os casos.

Adicionalmente, o evento Embrapa 5.1 foi cruzado com as cultivares Olathe Pinto, Jalo Precoce, BRS Supremo e Dark Red Kidney 18, com o objetivo de avaliar a geração F₁ quanto a herança do transgene e inocular para verificar se havia desvio em relação à dominância do transgene, conforme observado para os cruzamentos com BRS Pontal e Pérola. Para cada cruzamento foi obtido número variável de sementes. A planta convencional (não-GM) foi sempre usada como receptora do pólen da planta GM (Embrapa 5.1) a fim de facilitar a identificação de possível autopolinização baseado na presença do transgene na progênie F₁. A presença do transgene foi detectada por PCR e

todas as plantas foram submetidas à inoculação durante sete dias com alta população de moscas brancas virulífera.

Tabela V.17. Segregação do transgene e da resistência ao mosaico dourado na geração F₁

Cruzamento^a	GM	Resistentes	Suscetíveis	% Suscetíveis
Olathe 5.1 X Jalo Precoce	20	13	7	35,0
Olathe 5.1 X Olathe Pinto	20	17	3	15
Olathe 5.1 X Dark Red Kidney 18	20	13	7	35,0
Olathe 5.1 X BRS Supremo	20	18	2	10,0
Olathe 5.1 X BRS Pontal	58	37	21	36,2
Olathe 5.1 X Pérola	36	29	7	19,4
Parental Olathe 5.1	16	16	0	0,0

^aJalo Precoce (grão jalo, origem Andina), Olathe Pinto (grão pinto, origem Mesoamericana), Dark Red Kidney 18 (grão “red kidney” origem Andina), BRS Supremo (grão preto, origem Mesoamericano), BRS Pontal (grão carioca, origem Mesoamericana), Pérola (grão carioca, origem Mesoamericana)

A Tabela V.17 confirmou e expandiu o conceito de que, no caso de plantas heterozigotas, o padrão observado de resistência ao mosaico dourado é coerente com o conceito de “efeito de dosagem gênica” ou expressividade (Rieger et al., 1976), onde há a ação diferencial dos alelos de um gene sobre a expressão fenotípica do caráter em questão. Obviamente que o PCR avalia apenas a presença do gene, enquanto a inoculação revela o seu efeito.

Como conclusão pode-se afirmar que a herança seguiu o padrão Mendeliano com segregação típica monogênica dominante, mas existindo um efeito de expressividade gênica marcante, que pode resultar em desvios significativos na proporção esperada de segregação quando se avalia a resistência ao mosaico dourado em populações segregantes. Está bem documentado na literatura o efeito de dosagem do silenciamento gênico mediado com RNAi.

V. 13 Descrição dos efeitos pleiotrópicos e epistáticos dos genes inseridos, quando observados.

Não foram observados efeitos pleiotrópicos e epistáticos provocados pela inserção dos genes *AtAhas* e *ΔAC1hpRNA* no feijoeiro Embrapa 5.1. O conjunto dos resultados de caracterização agrônômica, dos estudos de avaliação de segurança à saúde humana e animal e a segurança ao meio ambiente realizados com o feijoeiro Embrapa 5.1 corroboram com a declaração de que a inserção dos transgenes nesse evento não gerou, ampliou ou modificou a expressão de outros genes de forma relevante ou observável.

Uma extensiva caracterização agrônômica foi conduzida em condições de campo (no ano de 2008 em Santo Antônio de Goiás (GO), Londrina (PR) e Sete Lagoas (MG) e em 2009 em Santo Antônio de Goiás e Sete Lagoas) em que uma série de variáveis foi analisada: produção (g/parcela de 25 m²; germinação (%); altura inicial das plântulas (cm); largura máxima das folhas primárias (cm); comprimento máximo das folhas primárias (cm); N° de sementes por vagem; massa de 100 sementes; comprimento das vagens (cm); largura das vagens (mm); comprimento das sementes (mm); largura das sementes (mm); espessura das sementes (mm). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SAS, no modo GLM (general linear model) de acordo com a necessidade do conjunto de dados.

A Tabela V.18 mostra os resultados obtidos após essas observações no ano de 2008 em Santo Antônio de Goiás, Londrina e Sete Lagoas. (1) Para a produção o coeficiente de variação (CV) para o conjunto de dados foi de 15,8%, e a média da produção, para os três locais 4,55 kg/parcela (x400=kg/ha). Não houve diferença significativa entre os dois acessos (evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe), ao nível de 5% de probabilidade. Houve diferença entre locais ($P \leq 0,0001$). (2) Para a germinação o CV para o conjunto de dados foi de 7,9%, e a média da germinação, para os três locais 85,97%. Não houve diferença significativa entre o evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe, ao nível de 5% de probabilidade. Não houve efeito de local sobre esta característica. (3) Para a altura inicial das plântulas, o CV para o conjunto de dados foi de 5,5%, e a média da altura inicial das plântulas, para os três locais 11,2 cm. Não houve diferença significativa entre o evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe, ao nível de 5% de probabilidade. Houve diferença entre locais ($P \leq 0,0001$). (4) Para a largura das

folhas o coeficiente de variação para o conjunto de dados foi de 3,9%, e a média da largura das folhas, para os três locais 6,75 cm. Não houve diferença significativa entre o evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe, ao nível de 5% de probabilidade. Houve efeito de local sobre esta característica ($P \leq 0,0001$). (5) Para o comprimento máximo das folhas primárias o CV para o conjunto de dados foi de 2,9%, e a média do comprimento das folhas, para os três locais 6,96 cm. Houve diferença entre locais e entre o evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe ao nível de 1% de probabilidade. (6) Para o número de sementes por vagem o CV para o conjunto de dados foi de 5,8%, e a média do número de sementes por vagem, para os três locais 5,53. Não houve diferença significativa entre o evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe, ao nível de 5% de probabilidade. Não houve efeito de local sobre esta característica. (7) Para a massa de 100 sementes o CV para o conjunto de dados foi de 8,6%, e a média da massa de 100 sementes, para os três locais 31,00 g. Não houve diferença significativa entre o evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe, ao nível de 5% de probabilidade. Não houve efeito de local sobre esta característica. (8) Para o comprimento das vagens o CV para o conjunto de dados foi de 3,8%, e a média do comprimento das vagens, para os três locais 11,03 cm. Houve diferença significativa entre o evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe, ao nível de 1% de probabilidade. Não houve efeito de local sobre esta característica. (9) Para a largura das vagens o CV para o conjunto de dados foi de 3,3%, e a média da largura das vagens, para os três locais 11,54 mm. Não houve diferença significativa entre o evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe, ao nível de 5% de probabilidade. Houve diferença entre locais ($P \leq 0,0025$). (10) Para o comprimento das sementes o CV para o conjunto de dados foi de 2,00%, e a média do comprimento das sementes, para os três locais 12,7 mm. Houve diferença entre locais e entre o evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe aos níveis de $P \leq 0,008\%$ e $P \leq 0,011\%$, respectivamente, para local e tratamentos. (11) Para a largura das sementes o CV para o conjunto de dados foi de 13,05%, e a média da largura das sementes, para os três locais 8,3 mm. Não houve diferença significativa entre o evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe, ao nível de 5% de probabilidade. Não houve efeito de local sobre esta característica. (12) Para a espessura das sementes o CV para o conjunto de dados foi de 3,7%, e a média da espessura das sementes, para os três locais 5,8 mm. Não houve diferença significativa entre o evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe, ao nível de 5% de probabilidade. Houve diferença entre locais ($P \leq 0,0001$).

Tabela V.18. Médias das variáveis agrônômicas observadas em condições de campo cultivados no ano de 2008. Entre parêntese estão os valores mínimos e máximos observados para cada uma das variáveis analisadas

Variável	Santo Antônio de Goiás			Sete Lagoas			Londrina		
	N	Olathe	Embrapa 5.1	N	Olathe	Embrapa 5.1	N	Olathe	Embrapa 5.1
PROD.	8	1,85±1,21 a* (0,91-3,93)	1,58±1,00 a (0,50-2,70)	8	6,15±0,90 a* (4,60-7,10)	6,19±0,76 a (5,14-7,60)	8	5,68±0,51 a* (5,20-6,6)	5,86±0,35 a (5,40-6,30)
GERM	8	89,68±1,97 a (86,67-92,30)	91,32±1,88 a (89,08-95,06)	8	86,94±1,89 a (84,44-89,56)	85,40±4,79 a (78,33-91,44)	8	77,43±13,86 a (50,00-93,06)	85,07±5,69 a (77,78-94,44)
ALTIN	8	10,29±0,79 a (9,35-11,40)	10,21±0,66 a (8,72-10,80)	8	14,03±0,24 a (13,60-14,30)	13,46±0,66 b (12,40-14,00)	8	9,73±0,39 a (9,25-10,30)	9,70±0,55 a (9,00-10,36)
LARG	8	6,65±0,23 a (6,29-6,94)	6,53±0,20 a (6,25-6,85)	8	7,43±0,24 a (7,06-7,85)	7,40±0,39 a (6,76-7,93)	8	6,32±0,24 a (6,07-6,67)	6,21±0,31 a (5,67-6,65)
COMP	8	6,90±0,21 a (6,59-7,26)	6,76±0,25 a (6,28-7,04)	8	7,69±0,22 a (7,42-8,03)	7,38±0,28 b (6,87-7,63)	8	6,70±0,21 a (6,33-6,99)	6,33±0,19 b (6,05-6,65)
SEVA	8	5,75±0,41 a (5,33-6,33)	5,72±0,17 a (5,56-6,00)	8	5,30±0,31 a (4,80-5,60)	5,36±0,25 a (4,80-5,60)	8	5,55±0,33 a (5,30-6,00)	5,68±0,23 a (5,30-6,00)
P100S	8	27,27±1,91 a (25,41-30,32)	29,66±1,65 a (27,16-31,07)	8	30,97±4,84 a (21,82-36,70)	32,09±4,01 a (26,00-39,13)	8	31,42±2,17 a (29,09-34,95)	32,70±2,21 a (29,11-35,72)
COMPV	8	10,55±0,60 a (9,68-11,17)	11,17±0,26 a (10,86-11,45)	8	10,93±0,36 a (10,34-11,41)	11,09±0,31 a (10,55-11,39)	8	10,85±0,36 a (10,25-11,43)	11,47±0,41 b (10,67-12,09)
LARGV	8	10,76±0,23 a (10,44-10,99)	10,67±0,37 a (10,16-11,11)	8	11,84±0,30 a (11,26-12,24)	11,85±0,21 a (11,46-12,14)	8	11,80±0,41 a (11,40-12,53)	11,74±0,81 a (10,68-12,85)
COMPS	8	12,80±0,14 a (12,62-12,98)	13,25±0,22 b (13,02-13,55)	8	12,43±0,39 a (11,89-13,13)	12,60±0,18 a (12,38-12,92)	8	12,72±0,37 a (12,31-13,40)	12,86±0,38 a (12,27-13,29)
LARGS	8	10,13±3,18 a (7,87-15,07)	7,89±0,22 a (7,65-8,09)	8	7,89±0,15 a (7,65-8,13)	7,91±0,15 a (7,63-8,09)	8	8,40±0,21 a (8,20-8,85)	8,22±0,47 a (7,09-8,52)
ESPS	8	6,41±0,41 a (5,82-6,88)	6,59±0,30 a (6,22-7,04)	8	5,59±0,18 a (5,30-5,87)	5,64±0,18 a (5,46-5,89)	8	5,70±0,17 a (5,49-6,02)	5,73±0,23 a (5,37-6,03)

Variáveis: PROD- produção (g/parcela de 25 m²); GERM- germinação (%); ALTIN- altura inicial das plântulas (cm); LARG- largura máxima das folhas primárias (cm); COMP- comprimento máximo das folhas primárias (cm); SEVA- Nº de sementes por vagem; P100S- massa de 100 sementes; COMPV- comprimento das vagens (cm); LARGV- largura das vagens (mm); COMPS- comprimento das sementes (mm); LARGS- largura das sementes (mm); ESPS- espessura das sementes (mm). *Números seguidos de letras iguais não diferem estatisticamente (p<0.05)

A Tabela V.19 mostra os resultados obtidos das observações agrônômicas no ano de 2009 em Santo Antônio de Goiás e Sete Lagoas. (1) Para a produção houve efeito significativo de local ao nível de 0,044%; o CV foi de 22,74%, e a média de produção foi de 2,478 kg/parcela (x 400=kg/ha). Não houve diferença significativa entre os tratamentos Embrapa 5.1 e Olathe em nenhum dos dois locais ou considerando a análise conjunta. (2) Para a germinação houve efeito de local ($P < 0,0043\%$), entretanto não houve diferença significativa entre os dois tratamentos ($P < 0,1050$). O CV foi de 5,18% e a média de germinação de 81,3%. (3) Para a altura inicial das plântulas não houve diferenças significativas entre os locais bem como entre os dois tratamentos. O CV foi de 20,6% e a média de altura inicial das plantas foi de 7,93 cm. (4) A largura das folhas das plantas diferiu entre os dois locais analisados ao nível de $P < 0,0001\%$. Entretanto não houve diferença entre os dois tratamentos ($P < 0,2291$). O CV foi de 3,17% e a média das larguras de folhas de 7,52 cm. (5) Para o comprimento máximo das folhas primárias a análise estatística revelou diferença significativa entre os dois locais estudados, mas não houve diferença entre os dois tratamentos ($P < 0,7869\%$). O CV foi de 3,6% e a média do comprimento foliar foi 7,47 cm. (6) A análise estatística para a massa média de 100 sementes indicou diferença estatisticamente significativa entre os dois locais ($P < 0,0043\%$) e também entre os dois tratamentos ($P < 0,003\%$). O CV foi de 3,44 e a média da massa de 100 sementes de 29,48 g. (7) Não houve diferenças significativas estatisticamente entre locais e tratamentos para o comprimento das vagens. O CV foi de 4,51% e o comprimento médio das vagens de 10,35 cm. (8) Não houve diferenças significativas estatisticamente entre locais e tratamentos para o comprimento das vagens. O CV foi de 16,34% e a largura média das vagens de 12,35 mm. (9) Para o comprimento da semente a análise de variância indicou haver diferenças significativas estatisticamente entre os dois ambientes estudados ($P < 0,0018\%$) e também entre os dois tratamentos ($P < 0,0261\%$). O CV foi de 3,61% e a média do comprimento das sementes foi de 13,53 mm. (10) Para a largura das sementes a análise de variância indicou haver diferenças significativas estatisticamente entre os dois ambientes estudados ($P < 0,0399\%$), porém não houve diferenças significativas entre os dois tratamentos ($P < 0,0978\%$). O CV foi de 2,40% e a média da largura das sementes foi de 7,86 mm. (11) Para a espessura das sementes a análise de variância indicou haver diferenças significativas estatisticamente entre os dois ambientes estudados ($P < 0,0355\%$), porém

não houve diferenças significativas entre os dois tratamentos ($P < 0,7162\%$). O CV foi de 5,69% e a média da espessura das sementes foi de 5,94 mm. (12) para a característica vagens cheias, a análise de variância indicou haver diferenças significativas entre os dois ambientes estudados ($P < 0,0053\%$), porém não houve diferenças significativas entre os dois tratamentos ($P < 0,7324\%$). O CV foi de 11,26% e a média da porcentagem de vagens cheias foi de 75,68%. (13) Para o número de grãos por vagem de 10 vagens, composta de uma vagem por planta (NGV1) a análise de variância indicou não haver diferenças significativas entre os dois ambientes estudados ($P < 0,5510\%$), bem como não houve diferenças significativas entre os dois tratamentos ($P < 0,7825\%$). O CV foi de 19,69% e a média do número de grãos por vagem foi de 4,87 sementes por vagem, considerando as 10 melhores vagens de 10 plantas por parcela. Finalmente, para o número de grãos por vagem do conjunto de vagens de 10 plantas da parcela (NGV2) a análise de variância indicou não haver diferenças significativas entre os dois ambientes estudados ($P < 0,0744\%$), porém houve diferenças significativas entre os dois tratamentos ($P < 0,0360\%$). O CV foi de 9,26% e a média do número de grãos por vagem foi de 3,75 sementes por vagem, considerando-se todas as vagens de 10 plantas colhidas por parcela.

Tabela V.19. Médias das variáveis agrônômicas observadas em condições de campo cultivados no ano de 2009. Entre parêntese estão os valores mínimos e máximos observados para cada uma das variáveis analisadas

Variáveis	Santo Antônio de Goiás			Sete Lagoas		
	N	Olathe	Embrapa 5.1	N	Olathe	Embrapa 5.1
PROD.	7	2,72±0,55 (1,70-3,30)	3,15±0,41 (2,50-3,52)	8	2,19±0,7 (1,50-3,30)	1,98±0,53 (1,10-2,80)
GERM	8	87,01±4,73 (78,33-93,33)	83,96±6,63 (76,67-96,11)	8	78,19±2,73 (74,17-82,50)	76,08±3,45 (70,28-80,28)
ALTIN	8	7,46±0,44 (7,00-8,08)	7,52±0,42 (6,96-8,26)	8	8,71±3,34 (6,87-16,93)	8,04±0,37 (7,40-8,52)
LARG	8	6,75±0,27 (6,40-7,20)	6,63±0,24 (6,16-6,88)	8	8,20±0,22 (7,76-8,45)	8,54±0,19 (8,28-8,85)
COMP	8	6,81±0,23 (6,44-7,10)	6,69±0,27 (6,30-7,02)	8	8,11±0,25 (7,77-8,63)	8,29±0,22 (8,03-8,69)
P100S	8	29,32±0,94 (27,95-30,87)	31,30±0,93 (29,58-32,42)	8	27,92±2,56 (25,70-33,65)	29,42±1,65 (27,43-32,68)
COMPV	8	10,47±0,31 (9,77-10,73)	10,73±0,51 (10,04-11,64)	8	10,15±0,24 (9,86-10,57)	10,07±0,69 (9,05-10,83)
LARGV	8	10,73±0,51 (11,17-11,90)	11,38±0,24 (11,15-11,86)	8	12,61±0,44 (12,03-13,29)	13,93±4,24 (11,97-24,39)
COMPS	8	12,75±0,41 (12,22-13,37)	13,20±0,45 (12,53-13,72)	8	13,88±0,55 (12,74-14,61)	14,30±0,45 (13,77-14,95)
LARGS	8	7,67±0,24 (7,32-8,01)	7,78±0,17 (7,57-8,04)	8	7,93±0,18 (7,72-8,20)	8,07±0,20 (7,75-8,26)
ESPS	8	5,72±0,15 (5,53-5,94)	5,70±0,15 (5,46-5,91)	8	6,13±0,16 (5,99-6,50)	6,23±0,63 (5,74-7,73)
VCH	8	61,86±8,73 (49,83-79,71)	71,32±8,19 (56,98-82,98)	8	88,46±7,90 (71,70-95,73)	81,11±6,88 (71,09-88,24)
NGV1	8	4,89±1,30 (2,75-7,03)	5,24±1,35 (3,72-7,98)	8	4,78±0,18 (4,50-5,00)	4,61±0,25 (4,10-4,90)
NGV2	8	4,05±0,36 (3,59-4,60)	3,75±0,38 (3,41-4,35)	8	3,74±0,33 (3,19-4,39)	3,47±0,55 (2,52-4,33)
NGV	8	5,25±0,34 (4,50-5,50)	5,26±0,31 (4,70-5,75)	8	4,78±0,18 (4,50-5,00)	4,61±0,25 (4,10-4,90)

Variáveis: PROD- produção (g/parcela de 25 m²); GERM- germinação (%); ALTIN- altura inicial das plântulas (cm); LARG- largura máxima das folhas primárias (cm); COMP- comprimento máximo das folhas primárias (cm); P100S- massa de 100 sementes; COMPV- comprimento das vagens (cm); LARGV- largura das vagens (mm); COMPS- comprimento das sementes (mm); LARGS- largura das sementes (mm); ESPS- espessura das sementes (mm); NGV1 - vagem por planta; NGV2- número de grãos por vagem, com base em 10 plantas. Não foram observadas diferenças significativas (p<0.05)

Embora se tenha observado algumas diferenças significativas para algumas características entre o evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe no ano de 2008 (comprimento máximo das folhas primárias, número de sementes por vagem, comprimento das vagens e comprimento das sementes) e 2009 (peso de 100 sementes, comprimento das sementes e número de grãos por vagem), tais diferenças não foram consistentes todo o tempo em todos os locais. Portanto essas diferenças não foram associadas a um determinado local, não se repetindo em outros locais ou em outros anos, o que pode indicar que este tipo de variável é muito flutuante e instável. Por outro lado, mesmo se estas variáveis tiverem importância agrônômica, o evento Embrapa 5.1 será utilizado apenas como doador do transgene para cultivares comerciais de feijoeiro, haja vista no Brasil não se ter a classe de grão “pinto” comercialmente.

Uma outra maneira de visualizar os dados, de modo conjunto, é através da análise de componentes principais (ACP). A ACP é uma técnica estatística poderosa que pode ser utilizada para redução do número de variáveis e para fornecer uma visão estatisticamente privilegiada do conjunto de dados. É tida como uma análise robusta, capaz de lidar com dados não normais, com alto desempenho (Bernardi et al., 2009) e fornece as ferramentas adequadas para identificar as variáveis mais importantes no espaço das componentes principais. Com isto poder-se melhor discriminar se as poucas diferenças observadas acima realmente são de grande importância no contexto. Uma das vantagens principais da modelagem dos dados em termos de ACP é a facilidade de visualização das principais componentes em duas dimensões.

A ACP consiste em reescrever as variáveis originais em novas variáveis denominadas componentes principais, através de uma transformação de coordenadas. A transformação de coordenadas é um processo trivial quando feito usando matrizes. A transformação matemática das coordenadas pode ser feita de diversas maneiras conforme o interesse. A transformação das variáveis originais em componentes principais tem algumas especificidades apresentadas a seguir.

Os componentes principais são as novas variáveis geradas através de uma transformação matemática especial realizada sobre as variáveis originais. Esta operação matemática está disponível em diversos softwares estatísticos especializados, tal como o

SAS. Cada componente principal é uma combinação linear de todas as variáveis originais. Por exemplo, um sistema com dez variáveis, após a transformação, terá dez componentes principais. Cada uma destas componentes principais, por sua vez, será escrita como uma combinação linear das dez variáveis originais. Nestas combinações, cada variável terá uma importância ou peso diferente. Duas características das componentes principais tornam-nas mais efetivas que as variáveis originais para a análise do conjunto das amostras (Prado et al., 2002). As variáveis podem guardar entre si correlações que são suprimidas nas componentes principais. Ou seja, as componentes principais são ortogonais entre si. Deste modo, cada componente principal traz uma informação estatística diferente das outras. A segunda característica importante é decorrente do processo matemático-estatístico de geração de cada componente que maximiza a informação estatística para cada uma das coordenadas que estão sendo criadas. As variáveis originais têm a mesma importância estatística, enquanto que as componentes principais têm importância estatística decrescente. Ou seja, as primeiras componentes principais são tão mais importantes que podemos até desprezar as demais. Destas características podemos compreender como a análise de componentes principais:

- a) podem ser analisadas separadamente devido à ortogonalidade, servindo para interpretar o peso das variáveis originais na combinação das componentes principais mais importantes
- b) podem servir para visualizar o conjunto da amostra apenas pelo gráfico das duas primeiras componentes principais, que detêm a maior parte da informação estatística. Deve ser enfatizado que a primeira componente principal é responsável pela maior parte possível da variância dos dados, e sucessivamente cada um dos componentes seguintes são responsáveis pelo máximo do restante da variância possível.

A Figura V.40 mostra a distribuição dos pontos referentes a Embrapa 5.1 e Olathe nos três locais de cultivo do ano de 2008, plotando a componente principal 2 (Prin2) versus componente principal 1 (Prin1), a partir da matriz de covariâncias. Estes dois eixos explicam 89,77% da variância total. Deve se notar que, Embrapa 5.1 e Olathe formaram, basicamente, um único agrupamento. Caso os agrupamentos fossem um para Embrapa 5.1 e outro para Olathe (portanto dois conjuntos) isto indicaria diferença entre os dois tratamentos, no entanto essa análise mostra que não há agregação entre os pontos.

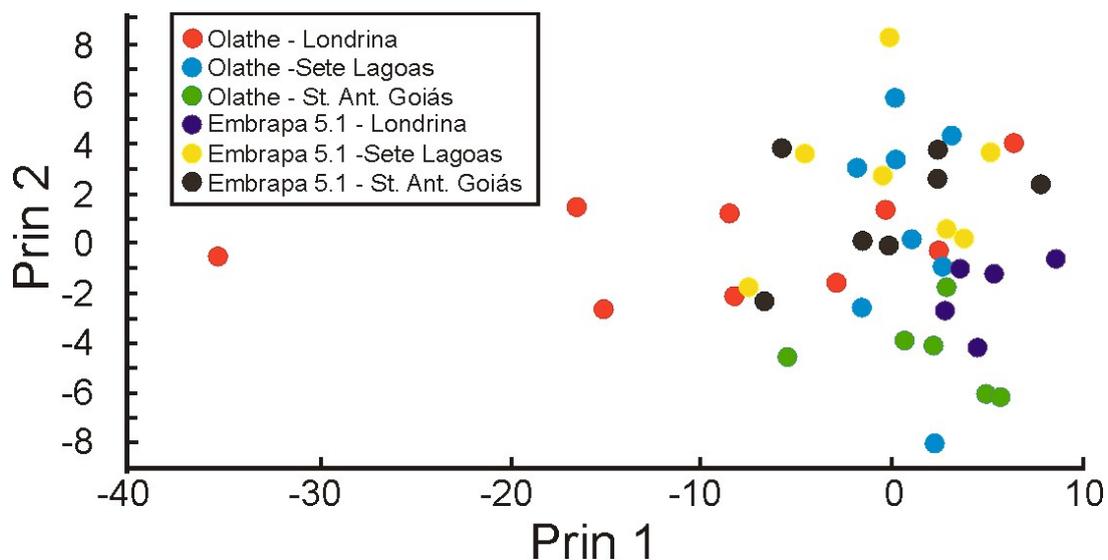


Figura V.40. Gráfico dos pontos gerados em análise de componentes principais entre as duas componentes que mais contribuíram para a variância observada (Prin1 e Prin2) para o conjunto dos três locais do ano de 2008.

A Figura V.41 mostra a distribuição dos pontos referentes a Embrapa 5.1 e Olathe nos dois locais de cultivo do ano de 2009, plotando a componente principal 2 (Prin2) versus componente principal 1 (Prin1). Como aconteceu par ao ano de 2008, para cada local, Embrapa 5.1 e Olathe formaram um único agrupamento.

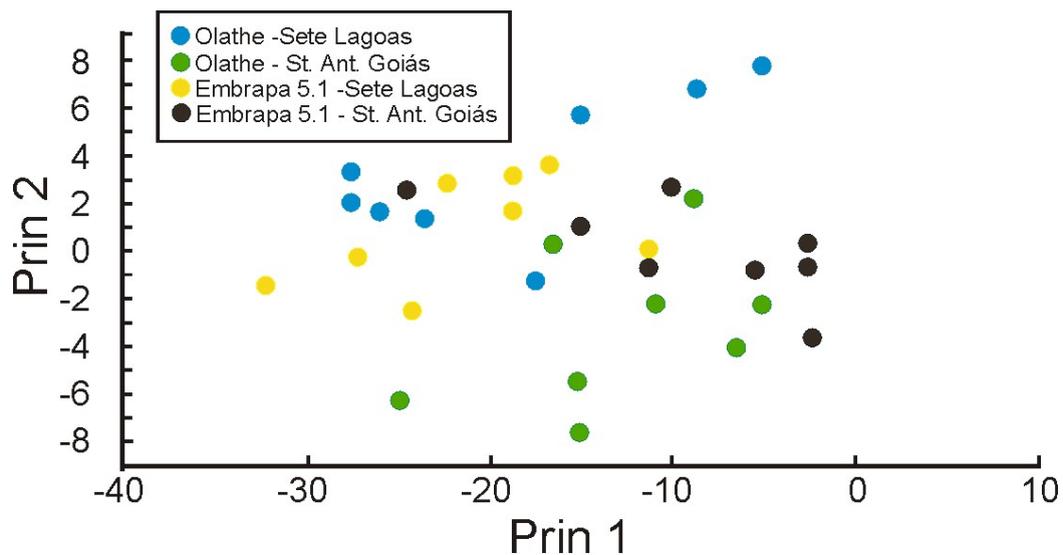


Figura V.41. Gráfico dos pontos gerados em análise de componentes principais entre as duas componentes que mais contribuíram para a variância observada (Prin1 e Prin2) para o conjunto de dois locais do ano de 2009.

Em conjunto, os dados agronômicos dos dois anos, sendo três locais no primeiro ano e dois no segundo ano, fornecem uma base robusta para afirmar que o evento Embrapa 5.1 e o seu parental Olathe são equivalentes, exceto pela diferença em resistência ao mosaico dourado, discutida na seção V.3.

V. 14. O grau de estabilidade genotípica, especificando a metodologia utilizada e o número de gerações avaliadas.

Para demonstrar a estabilidade dos transgenes, análise de Southern foi realizada com o evento Embrapa 5.1 até a oitava geração após autopolinizações e após cruzamento e retro-cruzamentos com a var de feijoeiro BRS Pontal não geneticamente modificada. Como mostrado na Figura V.42, todas as plantas analisadas em qualquer geração analisada mostraram o mesmo perfil de hibridização com a sonda correspondente ao fragmento do CaMV. Essa sonda, associada à digestão do genoma com a enzima *XbaI* foram utilizadas na análise de Southern por renderem múltiplos fragmentos dos transgenes, o que torna a análises mais robusta.

Além disso, as análises por PCR mostradas na seção V.11 demonstram a estabilidade da estrutura dos transgenes uma vez que o parental Olathe 5.1 mostrou amplificação com nove pares de primers específicos com o mesmo padrão mostrado em plantas da variedade BRS Pontal após quatro retro-cruzamentos e quatro gerações de autopolinização. Isso corrobora os dados das análises de Southern e mostra que, mesmo em uma análise mais sensível essa estabilidade é comprovada.

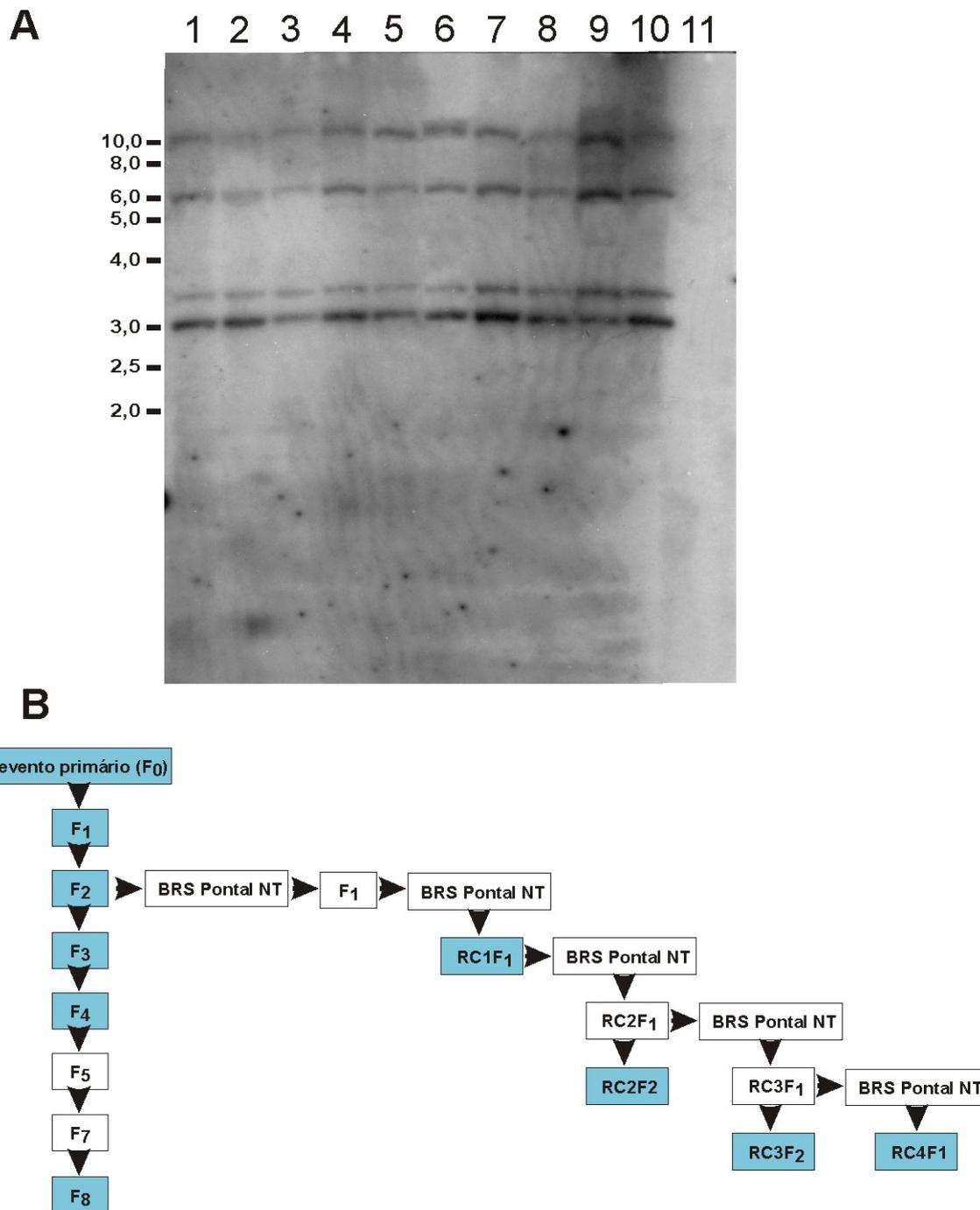


Figura V.42. Análise de Southern para demonstração da estabilidade dos transgenes presentes no evento Embrapa 5.1 (A). As análises foram realizadas nas gerações F₀ (planta mãe ou evento primário, poço 1), F₁ (poço 2), F₂ (poço 3), F₃ (poço 4), F₄ (poço 5) e F₈ (poço 6) após autopolinização e após cruzamento e retro-cruzamentos com a var BRS Pontal não geneticamente modificada [geração F₁ do retrocruzamento 1 (RC1F₁, poço 7), geração F₂ do retrocruzamento 2 (RC2F₂, poço 8), geração F₂ do retrocruzamento 3 (RC3F₂, poço 9) e geração F₁ do retrocruzamento 4 (RC4F₁, poço 10)]. O poço 11 corresponde a uma planta de feijoeiro não geneticamente modificado. O genoma das plantas foi digerido com a enzima *Xba*I e analisado com a sonda correspondente a um fragmento do 35SCaMV. (B) Esquema para mostrar as diversas gerações em que as plantas foram amostradas (quadros com realce).

V. 15. A existência de interações com efeitos adversos, quando dois ou mais genes forem introduzidos no mesmo OGM, por técnicas de ADN recombinante e suas possíveis conseqüências.

No evento Embrapa 5.1 foram inseridos dois genes, o primeiro é um gene quimérico para expressar um dsRNA (*ΔAC1hpRNA*) correspondente a uma região do gene *rep* do BGMV. Esse gene não é transcrito, mas não traduzido, uma vez que os RNA gerados foram uma estrutura de grampo que é convertido em siRNA (como demonstrado na seção V.10). O segundo gene (*Atahas*) tem sua origem em *A. thaliana* e codifica para a enzima acelolactato sintase, uma enzima da via de síntese de aminoácidos ramificados (valina, leucina e isoleucina). A análise de biossegurança é de grande relevância quando existem dois ou mais genes que atuam na mesma rota metabólica ou vias bioquimicamente complementares (embora lato senso se possa dizer que todas as vias metabólicas são complementares). Nesses casos poderá haver um efeito sinérgico quando um ou mais genes de uma mesma rota metabólica são expressos concomitantemente. No entanto, quando tratamos de piramidação de genes para resistência a vírus por estratégias com uso de seqüências derivadas do patógeno e tolerância a herbicidas, estamos falando de vias distintas e, portanto não se deve esperar que a presença de dois genes (*ΔAC1hpRNA* e *Atahas*) tenha algum efeito diferente daquele que se esperar para cada característica quando presentes de forma independentes. No evento Embrapa 5.1 os dois genes foram inseridos concomitantemente (estão presentes em um único vetor de transformação) e co-segregam (como pode ser observado nas seções V.12 e V.14).

No caso específico do evento Embrapa 5.1, os genes inseridos têm funções completamente independentes, sem contar o fato de que para a construção *ΔAC1hpRNA* não há expressão de uma nova proteína. As análises *in silico* e *in planta* não mostraram qualquer sinal de efeito *off-target* ou da possibilidade de alteração bioquímica nas plantas, como pode ser observado pelas análises de caracterização agrônômica e análises de composição nutricional. Assim, no caso específico do evento Embrapa 5.1 não há qualquer razão para hipotetizar a existência de interações entre os genes com geração de efeitos adversos



V. 16. As modificações genéticas incluídas no OGM que podem alterar sua capacidade de reprodução, sobrevivência, disseminação ou transferência de genes inseridos para outros organismos.

Nenhuma modificação genética visando alteração da capacidade de reprodução, sobrevivência, disseminação ou transferência de genes para outros organismos foi inserida no feijoeiro Embrapa 5.1.

Os dados apresentados nesse documento mostram que não houve diferença na capacidade de sobrevivência, absorção de nutrientes ou resistência a predadores (seções VII.3, VII.4, VII.10 e VII.12). Portanto os dados não sugerem qualquer alteração nas características relacionadas à reprodução, sobrevivência, disseminação, transferência de genes ou potencial como planta daninha entre o feijoeiro Embrapa 5.1, seu parental e as variedades de feijoeiro convencional usadas como padrão de referência.

Os parâmetros de germinação e qualidade de sementes são características importantes usadas para a comparação do comportamento de diferentes variedades de uma espécie e germinação é também uma das diversas características de importância biológica usada para avaliar o potencial como planta daninha de diferentes espécies de plantas. Assim, os parâmetros de germinação e de qualidade de sementes (medido pelo método de envelhecimento acelerado e germinação) do evento Embrapa 5.1 demonstraram que não há diferença quando comprado com o seu parental Olathe.



SEÇÃO VI

Avaliação de Risco à Saúde Humana e Animal

VI. 1. O histórico de uso na alimentação, no Brasil e em outros países do organismo parental ou doador, indicando o nível de consumo, o processamento anterior ao consumo e as espécies animais que se alimentam destes organismos.

O organismo parental *Phaseolus vulgaris*

Por pelo menos 8000 anos, o feijão comum (*P. vulgaris*) tem evoluído de uma vinha selvagem nas regiões da América Central e Andes para uma importante leguminosa produzida e consumida em várias partes do globo (Gepts & Debouck, 1991, Gepts et al., 2008). Dentre outras necessidades alimentares, a alta concentração de proteína, as generosas quantidades de fibra e a presença de carboidratos complexos presentes no feijão comum o fazem ser considerados por nutricionistas como o alimento “quase perfeito” (Centro Internacional de Agricultura Tropical, 2010). Além disso, estão amplamente documentados na literatura os benefícios para a saúde associados ao consumo de feijões, como redução do risco de câncer, redução de doenças cardiovasculares e influência no controle da taxa de glicose no sangue (Geil & Anderson, 1994; Hangen & Bennink, 2002; Leterme, 2002; Kokubo et al., 2007; Winham et al., 2008).

O feijão comum é a leguminosa mais consumida no Brasil, sendo considerado o ingrediente-símbolo da gastronomia brasileira. O feijão preto é mais popular no Rio Grande do Sul, Santa Catarina, sul e leste do Paraná, Rio de Janeiro, sudeste de Minas Gerais e sul do Espírito Santo. O feijão tipo carioca é aceito em praticamente todo o Brasil, 53% da área cultivada é semeada com este tipo grão. O feijão mulatinho é mais aceito na Região Nordeste também chamados de Chita Fina e Bagajó. Feijões roxo e rosinha são mais populares nos Estados de Minas Gerais e Goiás. O feijão branco é



importado. Na alimentação dos brasileiros, o feijão é a principal fonte de proteína, seguido, em importância, pela carne bovina e pelo arroz. Apenas esses três alimentos básicos contribuem com 70% da ingestão protéica, além de ser uma cultura de grande expressão sócio-econômica no Brasil (Machado et al., 2008). A importância alimentar do feijão deve-se, especialmente, ao menor custo de sua proteína em relação aos produtos de origem animal (Mesquita et al., 2007).

Dentre os componentes do feijão, destacam-se principalmente os compostos fenólicos, substâncias antioxidantes vinculadas a um menor risco no desenvolvimento de alguns tipos de câncer e a uma menor incidência de doenças degenerativas (Machado et al., 2008); a isoforma 1 do inibidor da alfa-amilase, que apresenta potencial efeito no combate à obesidade e no tratamento adjuvante do diabetes (Obiro et al., 2008); e as fibras solúveis que, depois de ingeridas, transformam-se em gel, permanecendo mais tempo no estômago, o que acarreta uma maior sensação de saciedade. Esse “gel” atrai as moléculas de gordura e de açúcar, que são eliminadas pelas fezes, ajudando assim, a reduzir os níveis de colesterol e glicemia do sangue.

O consumo em quantidades médias a alta de feijão está sendo associado à diminuição de riscos para outras doenças como o diabetes, doenças cardiovasculares e até mesmo neoplasias. Acredita-se que esse efeito benéfico do consumo do feijão é devido à presença de metabólitos secundários nessa leguminosa, os fitoquímicos, principalmente os compostos fenólicos e os flavonóides.

Este alimento apresenta, porém, um problema: suas proteínas têm valor nutricional pouco inferior ao apresentado pelas carnes, o que é decorrente do teor e biodisponibilidade reduzidos de aminoácidos sulfurados (Evans & Bauer, 1978; Antunes & Sgarbieri, 1980; Fukuda et al., 1982), principais aminoácidos que participam da síntese protéica (Geraldo, 2006); entretanto, quando combinado com arroz, por exemplo, forma uma mistura de proteínas mais nutritiva. Isto porque o arroz é relativamente rico em aminoácidos sulfurados (Mesquita et al., 2007).

Seguem abaixo as principais formas de utilização do feijão nas diferentes regiões brasileiras e o seu valor nutricional:



Estado/região	Tipo de feijão	Preparação
Bahia	Feijão fradinho	Acarajé Feijão com arroz
Rio de Janeiro	Feijão Preto	Feijoada Feijão preto com arroz
São Paulo	Feijão carioca ou mulatinho	Virado à Paulista Feijão com arroz Feijoada
Minas Gerais	Feijão preto	Tutu a mineira Feijão com arroz
Minas Gerais	Feijão Jalo	Feijão tropeiro
Paraná	Feijão cavalo	Salada de feijão cavalo Feijão com arroz
Santa Catarina	Feijão branco	Cozido com Joelho de Porco Feijão com arroz
Pará	Feijão fradão	Feijão fradão com vinagrete, farofa, arroz e peixe no espeto. Feijão com arroz
Pantanal	Feijão rosinha	Feijão a moda do Pantanal

O consumo *per capita* de feijão passou de 23 kg/habitante/ano em 1960 para 17,6 kg/habitante/ano em 2007, sendo o consumo rural praticamente o dobro do consumo metropolitano. O prato "feijão com arroz" (ou "arroz-e-feijão") é um dos mais típicos dos lares brasileiros, acompanhado com alguma "mistura" (nome comum no estado de São Paulo para qualquer coisa que se coma com arroz-e-feijão, como, por exemplo, bife ou batata-frita). O feijão preto é a base de um dos principais pratos da culinária típica brasileira, a feijoada, tal como em Portugal onde o feijão comum é a base de várias sopas e da feijoada, misturado com arroz ou como elemento de acompanhamento obrigatório das tripas à moda do Porto e ainda em alguma doceria (por exemplo o pastel de feijão). Outras formas de preparo do feijão em nosso país são como feijão cozido, virado, saladas e doces diversos. As vagens verdes (feijão verde) podem acompanhar, cozidas, qualquer prato de peixe cozido, e, cortadas às tiras, em



sopa (sopa de feijão carrapato). No caso do feijão frade, é frequentemente servido com cebola e salsa picadas, como acompanhamento do atum.

O feijão-vagem é cultivado em todos os estados brasileiros. As vagens são colhidas ainda verdes, não fibrosas, tenras, antes das sementes ficarem salientes e quando as pontas são facilmente quebradas. Em função do hábito de crescimento e do formato das vagens, as variedades podem ser reunidas em três tipos:

- 1) tipo macarrão – crescimento indeterminado, vagens com seção transversal cilíndrica; Atibaia, Bandeirante, Macarrão Preferido, Macarrão Trepador, Mimoso, Brasília, Itatiba;
- 2) tipo macarrão rasteiro – crescimento determinado, vagens com seção transversal cilíndrica;
- 3) tipo manteiga – crescimento indeterminado, vagens com seção transversal achatada. Manteiga Maravilha, Senhorita, Talharim, Teresópolis, Manteiga Direta.

A vagem é consumida a maior parte ao natural, depois de cozida, nas mais diversas receitas culinárias; ou na forma industrializada (congelada, conservas). É um alimento pobre em proteína e calorias em comparação com grãos secos, mas ricos em vitaminas, sais minerais e fibras.

Segundo dados da FAO (2010), o consumo de feijões no mundo cresceu entre 1993 e 2007 (Os valores informados como consumo, quando fontes da FAO, referem-se à disponibilidade de grãos existentes e não são medidas diretas de consumo). Como os dados compreendem um período de 15 anos, neste texto será adotado, para maior facilidade de visualização e praticidade, o valor médio dos triênios entre 1993 e 2007, totalizando-se 5 triênios. O consumo médio de cada triênio entre 1993 e 2007 por continente é mostrado na Figura VI.1, sendo que no período 2005-2007 o consumo médio anual de feijões foi de aproximadamente 15,2 milhões de toneladas. Comparando-se a média de consumo dos triênios 1993-1995 e 2005-2007, o continente africano foi o que mostrou maior taxa de crescimento de consumo (50,5%), seguido pela América do Sul (18,4%) e Américas Central e do Norte (6,2%), conforme ilustrado na Tabela VI.1.

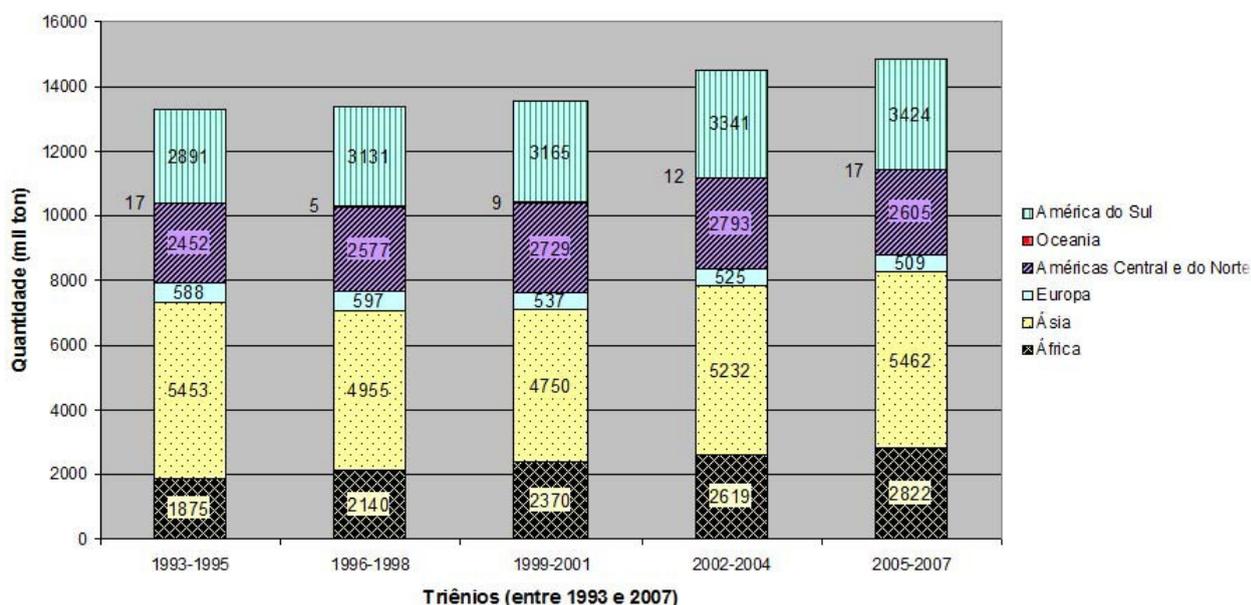


Figura VI.1. Consumo médio, em mil toneladas, de feijões desidratados em cada triênio, entre 1993 e 2007, por continente. Fonte: adaptado de FAO (2010).

Tabela VI.1. Contribuição dos continentes no consumo médio de feijões desidratados e no percentual de crescimento nos triênios 1993-1995 e 2005-2007.

	Consumo médio (mil ton) 1993-1995	Consumo médio (mil ton) 2005-2007	Percentual de crescimento do consumo mundial de feijões na média dos triênios 1993-1995 e 2005-2007
Mundo	13 277	15 171	14,3
África	1 875	2 822	50,5
América do Sul	2 891	3 424	18,4
Américas Central e do Norte	2 452	2 605	6,2
Ásia	5 453	5 462	0,2
Oceania	17	17	0
Europa	588	509	-13,4

Fonte: adaptado de FAO (2010).

Embora o consumo de feijões pelo continente africano tenha crescido a tais taxas, o continente asiático foi o que mais importou feijões desidratados e o que

apresentou maior crescimento percentual de importação no comparativo dos períodos 1993-1995 e 2005-2007 (Figura VI.2). Segundo a FAO (2010), no último triênio (2005-2007), vinte países foram responsáveis pela importação de aproximadamente 70% de todo feijão importado no mundo. Somente a Índia importou 17% de feijões na média do período, totalizando aproximadamente 470 mil toneladas. Os Estados Unidos importaram quase 157 mil toneladas, seguidos de Cuba, com 135 mil, Reino Unido, com 121 mil e, em quinto lugar, Japão, com 120 mil toneladas de feijões importados.

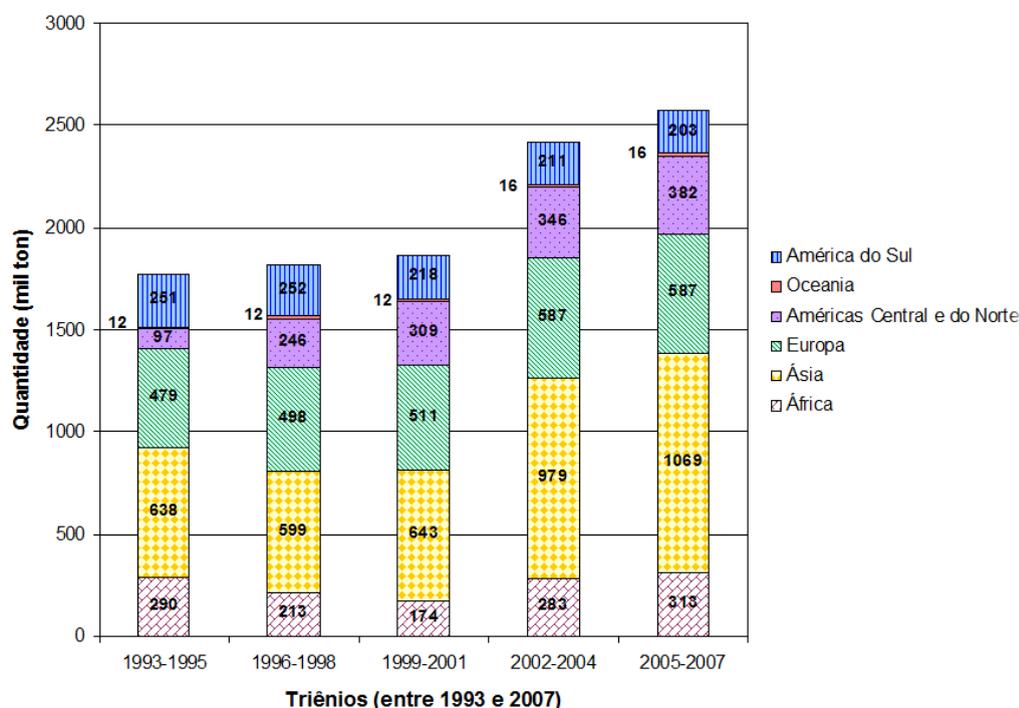


Figura VI.2. Volume médio de feijões importados em cada triênio (entre 1993-2007) por continente. Fonte: adaptado de FAO (2010).

A Figura VI.3 ilustra em maiores detalhes a relação consumo/importação desses grãos, considerando-se o volume médio de feijões consumidos e/ou importados no período 2005-2007 pelos 20 maiores importadores mundiais. O continente asiático consumiu, no total, 5.462.000 toneladas, sendo que 808.927 toneladas foram importadas pela Índia, Japão, Paquistão, Coreia do Sul, China e Malásia.

Para prover feijões para o mercado internacional, somente cinco países respondem por mais de 75% de todos os feijões exportados mundialmente, a saber:



Myanmar, China, Estados Unidos, Argentina e Canadá (Figura VI.4). Na média do período de 1993 a 2007, Myanmar foi o país que mais exportou: 699 toneladas anuais. Entretanto, comparando-se o volume médio do último triênio (2005-2007), a China exportou 779 mil toneladas contra 511 mil toneladas de Myanmar. A Figura VI.4 mostra o histórico de exportações dos cinco principais países provedores de feijões. Myanmar sofreu uma queda significativa na exportação de feijões a partir de 2002, voltando aos patamares de exportação praticados em 2003. A China tem se mostrado um grande provedor, sendo o maior exportador desde 2005. Os Estados Unidos têm se apresentado como provedores com tendência à queda a partir de 1999, enquanto o Canadá tem aumentado paulatina, mas firmemente, sua participação no mercado internacional. A Argentina tem sido um exportador estável nos últimos 15 anos.

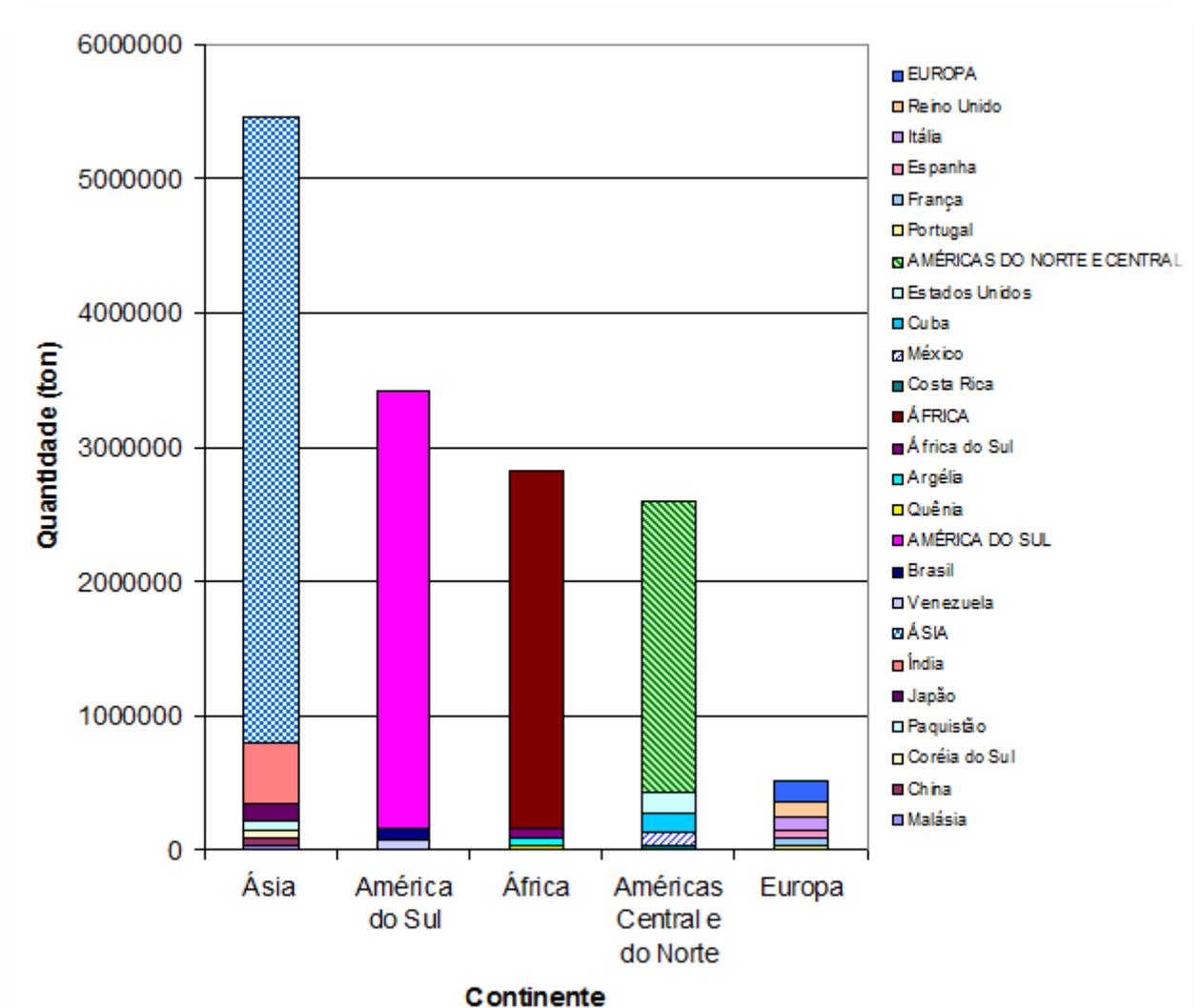


Figura VI.3. Volume total de feijões desidratados consumidos por continente com destaque para o volume de grãos importados pelos 20 principais importadores mundiais, considerando-se a média do triênio 2005-2007. Fonte: adaptado de FAO (2010).

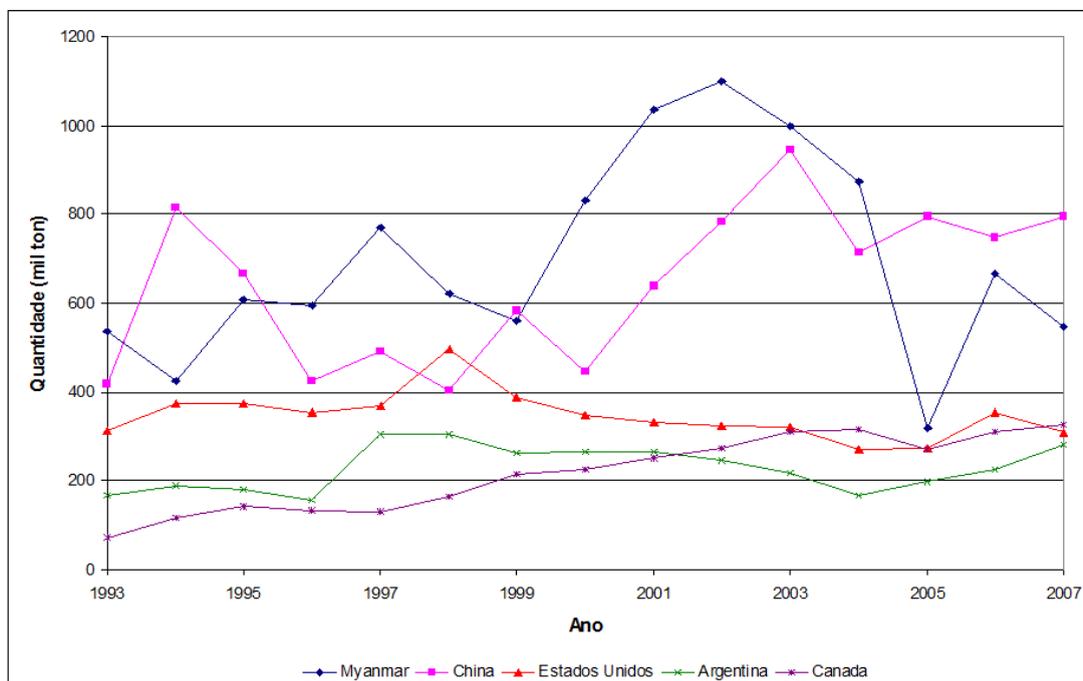


Figura VI.4. Volume de exportações, em mil toneladas, de Myanmar, China, Estados Unidos, Argentina e Canadá entre 1993 e 2007. Fonte: adaptado de FAO (2010).

O Brasil, considerado o maior produtor mundial de feijões desde 2004 pela FAO (2009), foi o 8º maior importador na média entre 2005 e 2007 (89.010 toneladas, FAO, 2010) e não possui tradição em exportação de feijões desidratados, consumindo praticamente toda a produção. A Figura VI.5 compara o suprimento, produção, consumo, importação e exportação de feijões (*Phaseolus* e *Vigna*) segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab, 2010). O suprimento, no ano, é a soma do estoque inicial, produção e importação, que se iguala à soma do total consumido e exportado.

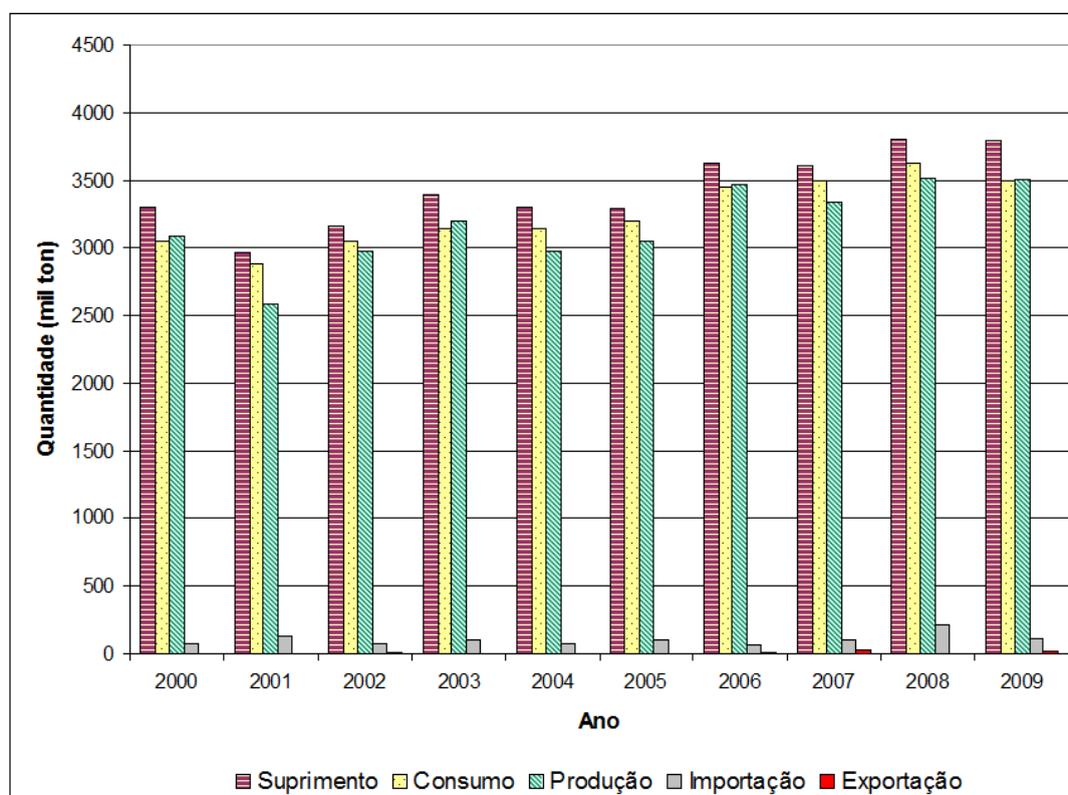


Figura VI.5. Comparação entre suprimento, consumo, produção, importação e exportação de feijões (*Phaseolus* e *Vigna*) no Brasil, em mil toneladas, entre 2000 e 2009. Fonte: adaptado da Conab (2010).

As exportações de feijões pelo Brasil ainda são tímidas, mas com potencial para crescer, haja vista que o país possui uma grande extensão de áreas agricultáveis e tradição no cultivo e consumo de feijões. Somado à vantagem competitiva de colher três safras anuais de feijão enquanto o hemisfério norte, maior provedora dos grãos, só possui uma, mostra que o país tem potencial para produzir mais e exportar feijões. De acordo com o Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (2010), o pico de exportações de feijões (*Phaseolus vulgaris*) foi em 2007, quando o país exportou aproximadamente 30 mil toneladas a US\$ 29.349.000 [FOB; *Free On Board*, sigla que especifica onde se encerram as obrigações do vendedor, ou seja, quando a mercadoria transpõe a amurada do navio no porto de embarque). Em totais de feijões desidratados (*Phaseolus* e *Vigna*), o maior volume exportado foi em 2009, quando

foram exportadas 37.618 toneladas a US\$ 18.226.000 (FOB). As Figuras VI.6 e VI.7 mostram, respectivamente, os volumes de feijões *Phaseolus* exportados pelo Brasil entre 1996 e 2009 em relação ao volume total de feijões que deixaram o país e os respectivos valores em US\$ FOB.

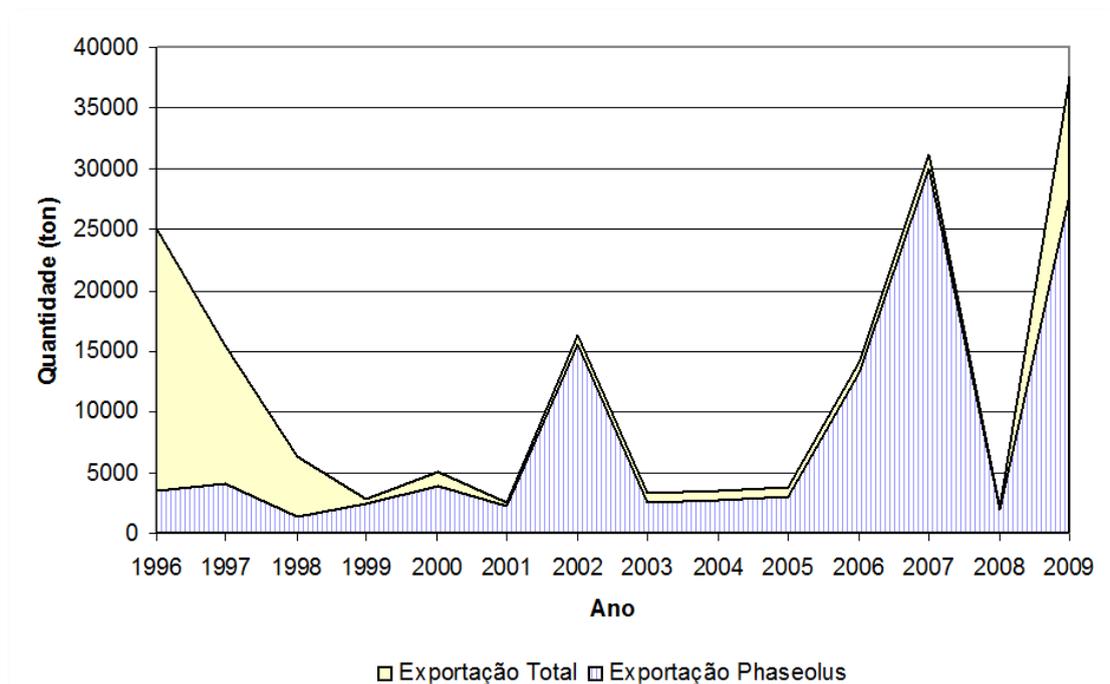


Figura VI. 6. Volume de feijões *Phaseolus* exportados, em toneladas, em comparação com volume total de feijões exportado (*Phaseolus* e *Vigna*) no período 1996-2009. Fonte: Adaptado do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (2010)

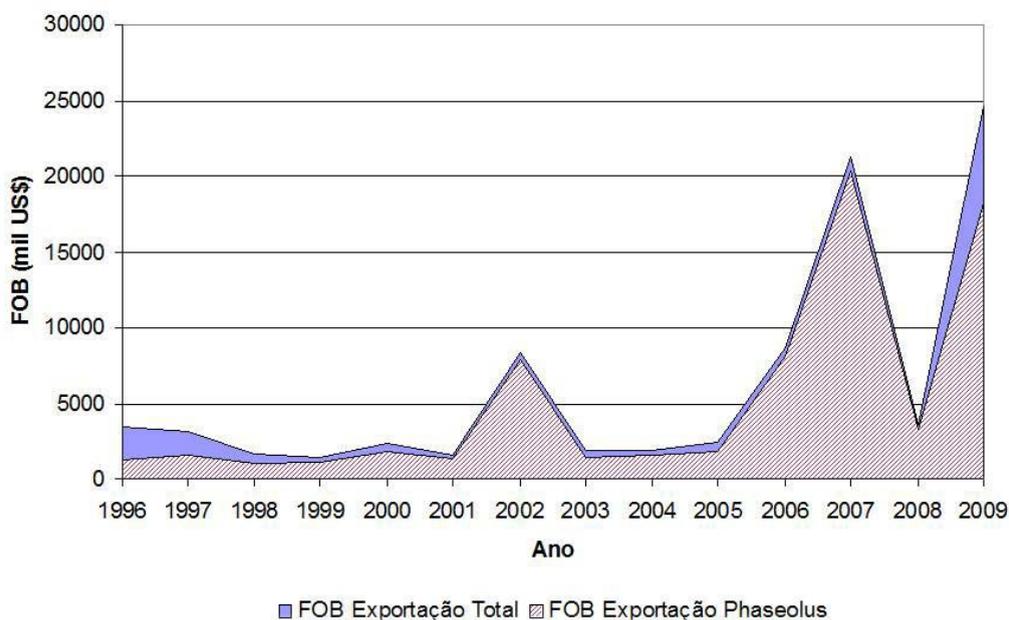


Figura VI.7. Valores totais negociados na exportação de feijões Phaseolus, em mil US\$ FOB, em comparação com totais negociados de feijões (*Phaseolus* e *Vigna*) no período 1996-2009. Fonte: adaptado do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (2010).

Informações a respeito dos organismos doadores

A única sequência codificante para uma proteína funcional no evento Embrapa 5.1 é o gene *AtAhas*. O organismo doador do gene *AtAhas* (e também da sequência codificante completa da subunidade gama da proteína *AtSEC61γ*, mas cuja expressão não foi detectada) é a espécie vegetal *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. A *Arabidopsis* é uma pequena planta nativa da Europa, Ásia e Noroeste da Ásia. Apesar de *A. thaliana* ter pouco significado direto para agricultura, ela é uma planta amplamente utilizada como organismo modelo para estudos de genética e desenvolvimento de plantas. Tem uma série de características que a torna um modelo muito útil para a compreensão de aspectos genéticos, celulares e moleculares de plantas. Seu genoma de tamanho reduzido facilita o sequenciamento genético. De fato, ela foi a primeira planta cujo genoma foi sequenciado e um considerável número de trabalhos têm sido realizados para desvendar a função de seus 27.000 genes e das 35.000 proteínas codificadas por



estes. O resultado de toda essa pesquisa aponta que não existe nenhuma evidência de que a *A. thaliana* seja patogênica a humanos e a outros animais, ou que produza toxinas e alérgenos. Por não ser tipicamente consumida na alimentação humana ou animal, a *Arabidopsis thaliana* não possui histórico de consumo. Contudo, a *Arabidopsis thaliana* é um membro da família da mostarda (*Brassicaceae*), que inclui espécies cultivadas como repolho e rabanete. Tais espécies possuem histórico de uso seguro para consumo humano.

O outro cassete de expressão ($\Delta ACIhpRNA$) presente na construção pBGMVRNAiAHAS usada para obtenção do evento Embrapa 5.1 tem como finalidade a expressão de um dsRNA correspondente ao gene *rep* (*ACI*) do BGMV. Esse RNA foi desenhado para formar um grampo com sequências de RNA de dupla fita (dsRNA) que são reconhecidas pela maquinaria celular para geração de pequenos fragmentos de RNA (siRNA) que interferem na expressão do gene *rep* viral. Dessa forma não há a possibilidade de codificação de um polipeptídeo. De qualquer forma essas sequências são encontradas na natureza em plantas infectadas com gemínívos. Esse gene é bastante conservado na família *Geminiviridae* e existem várias espécies de gemínivírus infectando várias culturas como soja, feijão, tomate e algodão. Não há qualquer evidência que um vírus específico de vegetais possa causar qualquer problema para a saúde humana ou animal.

VI. 2. Possíveis efeitos na cadeia alimentar humana e animal pela ingestão de OGM e seus derivados.

A segurança à saúde humana e animal e a segurança ao meio ambiente da soja CV127 foram confirmadas pelos resultados de uma série de estudos de avaliação de segurança inter-relacionados entre si. Inicialmente, a caracterização molecular detalhada do locus de integração dos transgenes no evento Embrapa 5.1 mostrou a presença de cassetes íntegros que expressão de *AtAhas* e do dsRNA correspondente a um fragmento do gene *rep* do BGMV. Nenhuma outra sequência com possibilidade de expressão de outra proteína ou RNA foi identificado. Em seguida, a caracterização bioquímica demonstrou que a proteína AtAHAS expressa em quantidades próximas do limite de



detecção por ELISA no feijoeiro Embrapa 5.1 é típica da classe das proteínas AHAS (inclusive o do próprio feijoeiro) cujo histórico de uso na alimentação humana e animal é seguro, e cujas características associadas a proteínas alergênicas ou tóxicas não foram encontradas. Em terceiro lugar, a composição e a equivalência nutricional do feijoeiro Embrapa 5.1, quando comparado ao seu parental e a outras variedades convencionais, foram demonstradas por análise de nutrientes importantes e de fatores anti-nutricionais. A equivalência nutricional do feijoeiro Embrapa 5.1 foi ainda confirmada em um estudo de alimentação animal. Os animais alimentados com feijoeiro cozidos GM e não-GM não mostraram diferenças no desenvolvimento ou em análises bioquímicas e histológicas. Todos esses estudos demonstram que o feijoeiro Embrapa 5.1 apresenta a mesma segurança à alimentação humana e animal e que os feijoeiros convencionais, com histórico de uso seguro na alimentação humana no Brasil.

As informações relatadas acima estão mostradas nas seções V e VI do presente documento.

VI. 3. Diferenças de composição química e nutricional entre o alimento oriundo do vegetal geneticamente modificado e do vegetal não modificado

Análise da composição em grãos

As análises de composição foram conduzidas nos grãos para confirmar que os níveis de nutrientes e anti-nutrientes encontrados no evento de feijoeiro Embrapa 5.1 são compráveis aos níveis encontrados em seus parentais (Olathe) e as outras quatro variedades convencionais cultivadas no Brasil. Essas outras variedades foram cultivadas oito localidades do Brasil em múltiplos anos, e foram utilizadas como padrão de referencia para estabelecer uma faixa de variação natural para cada substância analisada.

O evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe foram cultivados em condições de campo em Londrina (PR), Santo Antônio de Goiás (GO) e Sete Lagoas (MG) no ano de 2008 e em Santo Antônio de Goiás (GO) e Sete Lagoas (MG) no ano de 2009. Os grãos foram colhidos e submetidos a análises de composição para determinação da composição de açúcares, vitaminas (B1 e B2), minerais (alumínio, cálcio, cobre, ferro, fósforo, magnésio, manganês, potássio, zinco), aminoácidos (triptofano, cisteína,



metionina, ácido aspártico, serina, ácido glutâmico, glicina, histidina, arginina, treonina, alanina, prolina, tirosina, valina, lisina, isoleucina, leucina, fenilalanina). Além disso, foram realizadas análises físico-químicas para determinação de umidade, cinzas, proteína total, extrato etéreo, ácido fítico e de inibidores de tripsina. Uma vez que não estavam disponíveis dados de composição fatores nutricionais e anti-nutricionais presentes em grãos de feijão cultivados no Brasil, um banco de dados foi gerado com o cultivo de feijoeiro [variedades BRS Valente, Diamante Negro, Pérola, Timbó e Olathe (parental do evento Embrapa 5.1)] nos anos de 2003, 2004, 2005, 2006 e 2007 nos municípios de Santo Antônio de Goiás (GO), Simão Dias (SE), Lavras (MG), Ponta Grossa (PR), Anápolis (GO), Passo Fundo (RS) em distintas épocas do ano. As análises estatísticas foram realizadas com os dados obtidos de cada repetição utilizando o programa estatístico SAS versão 9.1 (SAS Institute Inc, Cary, NC, EUA) por meio de seu procedimento proc glm.

Os dados obtidos foram utilizados para comparar o evento de feijoeiro Embrapa 5.1 com o seu parental Olathe cultivado nos mesmos ambientes em diversos ambientes brasileiros (Tabelas VI.2 a VI.9). De uma maneira geral as análises de composição dos grãos demonstraram que o evento Embrapa 5.1 é equivalente, em termos de composição e de valor nutricional, e é tão seguro quanto ao seu parental não-GM e às outras variedades de feijoeiro convencional com histórico de uso seguro no Brasil.

Foi observada uma diferença estatisticamente significativa para o teor de Cisteína entre o evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe cultivado em Londrina (PR) no ano de 2008 (Tabela VI.3). Entretanto, essa diferença não foi observada nos demais locais para esse mesmo ano, bem como no ano seguinte. Também foi observada uma diferença estatística entre o evento Embrapa 5.1 e Olathe para o extrato etéreo, nos grãos colhidos do campo de Santo Antônio de Goiás no ano de 2008 (tabela VI.4). No entanto, essa discrepância não se repetiu em outros locais nesse mesmo ano ou no outro ano do estudo. Além disso, o valor obtido para o evento Embrapa 5.1 está dentro da faixa observada para os feijoeiros cultivados no Brasil. Foi observada uma diferença estatisticamente significativa no teor de vitamina B2 em grãos do feijoeiro Embrapa 5.1 cultivado em Santo Antônio de Goiás no ano de 2009 (tabela 5). No entanto, essa diferença não foi observada em outro local estudado naquele ano ou no ano de 2008 nos três locais estudados. As pequenas diferenças nas quantidades de componentes



individuais de nutrientes que foram detectadas entre os grãos do feijoeiro Embrapa 5.1 e de seu parental são provavelmente resultado da heterogeneidade que existe entre essas duas linhagens. Devido ao fato de que o feijoeiro Embrapa 5.1 tenha sido originado a partir de uma única semente, esse fato deve ser levado em consideração, uma vez que na verdade foi realizada uma seleção ao acaso de um indivíduo que pode ter variações que ocorrem naturalmente, não se atribuindo as pequenas diferenças observadas à presença dos transgenes. Tanto que essas diferenças não são observadas quando o evento Embrapa 5.1 é comparado à variedade Olathe cultivada em oito regiões do Brasil por um período de cinco anos. Portanto, essas diferenças não foram consideradas biologicamente significativas. Além disso, a variação de valores encontrados para o evento Embrapa 5.1 se enquadra dentro da variação encontrada no banco de dados para feijoeiro cultivados no Brasil e considerados de uso seguro para a alimentação humana (Figuras VI.8 e VI.9)

Em conjunto, esses resultados das análises de composição mostram que os níveis os principais açúcares, vitaminas, aminoácidos, minerais proteína e fatores anti-nutricionais presentes no evento Embrapa 5.1 são equivalentes ao seu parental cultivado em diversos ambientes no Brasil, bem como comparáveis aos outros feijoeiros cultivados no Brasil com histórico de uso seguro para a alimentação humana.



Tabela VI.2. Composição de açúcares e vitaminas (cromatografia líquida) em grãos do evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe cultivados em três regiões do Brasil no ano agrícola de 2008. Os dados entre parênteses correspondem aos valores máximos e mínimos para cada componente analisado.

Elemento (mg/100g)	Londrina			Santo Antonio de Goiás			Sete Lagoas			Banco de Dados
	Olathe BD ¹	Olathe ²	Embrapa 5.1 ²	Olathe BD ¹	Olathe ²	Embrapa 5.1	Olathe BD ¹	Olathe ²	Embrapa 5.1 ²	
Sacarose	N/A	3,21a (2,76 - 3,87)	3,40a (3,27 - 3,57)	N/A	2,71a (2,56 - 2,94)	2,78a (2,67 - 2,96)	N/A	2,64a (2,38 - 2,97)	3,27a (3,16 - 3,50)	N/A
Rafinose	0,21 a (0,11 - 0,35)	0,27 a (0,26 - 0,29)	0,25 a (0,21 - 0,30)	0,21 a (0,11 - 0,35)	0,19 a (0,16 - 0,21)	0,21 a (0,17 - 0,25)	0,21 a (0,11 - 0,35)	0,19 a (0,18 - 0,2)	0,24 a (0,22 - 0,27)	0,27 (0,03 - 0,57)
Estaquiase	2,90 a (1,74 - 4,30)	2,50 a (2,22 - 2,69)	2,90 a (2,72 - 3,13)	2,90 a (1,74 - 4,30)	2,60 a (2,38 - 2,83)	3,10 a (2,94 - 3,33)	2,90 ab (1,74 - 4,30)	2,15 b (1,92 - 2,52)	3,09 a (3,02 - 3,26)	3,11 (0,64 - 5,35)
Vit. B1	0,33 a (0,14 - 0,58)	0,40 a (0,37 - 0,43)	0,46 a (0,44 - 0,47)	0,33 a (0,14 - 0,58)	0,40 a (0,39 - 0,42)	0,49 a (0,46 - 0,54)	0,33 b (0,14 - 0,58)	0,40 ab (0,45 - 0,5)	0,56 a (0,52 - 0,57)	0,57 (0,14 - 1,39)
Vit B2	0,08 b (0,03 - 0,13)	0,18 a (0,17 - 0,19)	0,09 b (0,08 - 0,10)	0,08 b (0,03 - 0,13)	0,13 a (0,12 - 0,14)	0,08 a (0,07 - 0,08)	0,08 b (0,03 - 0,13)	0,21 a (0,18 - 0,23)	0,07 b (0,07 - 0,08)	0,08 (0,03 - 0,79)

¹Olathe proveniente do Banco de dados N varia de 4 a 28; ²Olathe e Embrapa 5.1 N=4; ³Banco de Dados (médias de cultivares e anos) N varia de 4 a 162; N/A – dado não disponível
Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (Tukey's Studentized Range - HSD), ao nível de 5% de probabilidade.

Os dados do Banco de Dados correspondem á média dos valores obtidos de 8 variedades de feijoeiro comumente cultivados no Brasil, cultivados nas principais regiões de cultivo no território nacional por um período de 5 anos.



Tabela VI.3. Composição de aminoácidos (cromatografia líquida) em grãos do evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe cultivados em três regiões do Brasil no ano agrícola de 2008. Os dados entre parênteses correspondem aos valores máximos e mínimos para cada componente analisado.

Elemento (mg/100g)	Londrina			Santo Antonio de Goiás			Sete Lagoas			Banco de Dados
	Olathe BD ¹	Olathe ²	Embrapa 5.1 ²	Olathe BD ¹	Olathe ²	Embrapa 5.1	Olathe BD ¹	Olathe ²	Embrapa 5.1 ²	
Triptofano	0,16 a (0,1 - 0,21)	0,13 a (0,11 - 0,15)	0,12 a (0,11 - 0,12)	0,16 a (0,1 - 0,21)	0,14 a (0,13 - 0,15)	0,12 a (0,12 - 0,13)	0,16 a (0,1 - 0,21)	0,15 a (0,13 - 0,16)	0,11 a (0,11 - 0,12)	0,17 (0,10 - 0,29)
Cisteína	0,17 b (0,07 - 0,22)	0,16 b (0,13 - 0,18)	0,24 a (0,21 - 0,29)	0,17 a (0,07 - 0,22)	0,2 a (0,16 - 0,25)	0,18 a (0,17 - 0,21)	0,17 b (0,07 - 0,22)	0,18 ab (0,13 - 0,21)	0,22 a (0,19 - 0,24)	0,20 (0,00 - 0,28)
Metionina	0,20 a (0,14 - 0,28)	0,15 b (0,12 - 0,17)	0,21 a (0,19 - 0,23)	0,20 a (0,14 - 0,28)	0,20 a (0,18 - 0,23)	0,20 a (0,19 - 0,22)	0,20 (0,14 - 0,28)	0,19 a (0,14 - 0,22)	0,20 a (0,18 - 0,22)	0,19 a (0,08 - 0,28)
Ácido Aspártico	3,68 a (0,94 - 13,9)	3,51 a (2,05 - 4,42)	2,7 a (1,82 - 3,37)	3,68 a (0,94 - 13,9)	3,49 a (2,27 - 5,14)	2,54 a (2,3 - 3,11)	3,68 a (0,94 - 13,9)	5,11 a (2,42 - 6,31)	2,58 a (2,11 - 3,1)	3,71 (0,94 - 14,74)
Serina	1,84 a (0,4 - 6,47)	0,82 a (0,79 - 0,84)	0,79 a (0,72 - 0,85)	1,84 a (0,4 - 6,47)	0,81 a (0,76 - 0,91)	0,93 a (0,8 - 1,06)	1,84 a (0,4 - 6,47)	0,90 a (0,83 - 0,94)	0,83 a (0,72 - 1,01)	1,78 (0,4 - 6,47)
Ácido Glutâmico	4,75 a (1,1 - 19,19)	5,48 a (2,17 - 7,09)	4,87 a (3,76 - 5,87)	4,75 a (1,10 - 19,19)	4,93 a (2,32 - 6,72)	2,84 a (2,54 - 3,59)	4,75 a (1,1 - 19,19)	6,82 a (2,84 - 8,47)	3,89 a (2,45 - 5,37)	4,35 (1,1 - 19,19)
Glicina	1,29 a (0,29 - 4,63)	0,61 a (0,57 - 0,67)	0,53 a (0,44 - 0,6)	1,29 a (0,29 - 4,63)	0,60 a (0,54 - 0,73)	0,68 a (0,57 - 0,79)	1,29 a (0,29 - 4,63)	0,75 a (0,68 - 0,82)	0,60 a (0,51 - 0,7)	1,30 (0,29 - 8,22)
Histidina	1,11 a (0,28 - 3,71)	0,36 a (0,21 - 0,54)	0,22 a (0,16 - 0,25)	1,11 a (0,28 - 3,71)	0,33 a (0,18 - 0,54)	0,61 a (0,53 - 0,72)	1,11 a (0,28 - 3,71)	0,44 a (0,34 - 0,65)	0,41 a (0,26 - 0,57)	1,08 (0,28 - 4,14)
Arginina	2,28 a (0,48 - 8,79)	1,05 a (0,82 - 1,28)	1,31 a (1,16 - 1,46)	2,28 a (0,48 - 8,79)	1,06 a (0,81 - 1,29)	1,13 a (1 - 1,27)	2,28 a (0,48 - 8,79)	0,92 a (0,78 - 1,02)	0,99 a (0,89 - 1,14)	2,2 (0,48 - 9,12)
Treonina	1,32 a (0,29 - 4,75)	0,52 a (0,41 - 0,59)	0,59 a (0,51 - 0,64)	1,32 a (0,29 - 4,75)	0,56 a (0,47 - 0,67)	0,68 a (0,59 - 0,77)	1,32 a (0,29 - 4,75)	0,52 a (0,45 - 0,64)	0,53 a (0,4 - 0,68)	1,35 (0,29 - 5,06)
Alanina	1,28 a (0,29 - 4,84)	0,56 a (0,53 - 0,58)	0,53 a (0,46 - 0,59)	1,28 a (0,29 - 4,84)	0,58 a (0,52 - 0,65)	0,67 a (0,58 - 0,77)	1,28 a (0,29 - 4,84)	0,66 a (0,62 - 0,7)	0,56 a (0,49 - 0,65)	1,28 (0,29 - 4,9)
Prolina	1,25 a (0,28 - 4,47)	0,52 a (0,47 - 0,57)	0,47 a (0,41 - 0,52)	1,25 a (0,28 - 4,47)	0,57 a (0,46 - 0,68)	0,65 a (0,55 - 0,79)	1,25 a (0,28 - 4,47)	0,75 a (0,65 - 0,83)	0,52 a (0,44 - 0,59)	1,27 (0,28 - 5,24)
Tirosina	1,21 a (0,28 - 3,86)	0,53 a (0,47 - 0,62)	0,47 a (0,42 - 0,5)	1,21 a (0,28 - 3,86)	0,54 a (0,46 - 0,70)	1,05 a (0,8 - 1,36)	1,21 a (0,28 - 3,86)	0,66 a (0,53 - 0,77)	0,59 a (0,41 - 0,74)	1,19 (0,28 - 7,42)

Continua na próxima página



Continuação da tabela VI.3

Elemento (mg/100g)	Londrina			Santo Antonio de Goiás			Sete Lagoas			Banco de Dados
	Olathe BD ¹	Olathe ²	Embrapa 5.1 ²	Olathe BD ¹	Olathe ²	Embrapa 5.1	Olathe BD ¹	Olathe ²	Embrapa 5.1 ²	
Valina	1,66 a (0,4 - 6,17)	0,73 a (0,67 - 0,77)	0,68 a (0,59 - 0,76)	1,66 a (0,4 - 6,17)	0,76 a (0,66 - 0,89)	0,89 a (0,75 - 1,05)	1,66 a (0,4 - 6,17)	0,86 a (0,78 - 0,9)	0,78 a (0,62 - 0,96)	1,65 (0,4 - 6,29)
Lisina	2,19 a (0,29 - 8,63)	0,95 a (0,63 - 1,11)	0,80 a (0,47 - 1,02)	2,19 a (0,29 - 8,63)	0,95 a (0,7 - 1,19)	0,86 a (0,64 - 1,25)	2,19 a (0,29 - 8,63)	1,10 a (0,7 - 1,28)	1,02 a (0,85 - 1,23)	2,1 (0,29 - 8,63)
Isoleucina	1,54 a (0,37 - 5,65)	0,67 a (0,59 - 0,77)	0,59 a (0,51 - 0,65)	1,54 a (0,37 - 5,65)	0,69 a (0,58 - 0,88)	0,84 a (0,74 - 1,05)	1,54 a (0,37 - 5,65)	0,78 a (0,68 - 0,93)	0,66 a (0,56 - 0,78)	1,48 (0,37 - 5,65)
Leucina	2,55 a (0,54 - 9,53)	1,07 a (0,97 - 1,11)	0,97 a (0,84 - 1,09)	2,55 a (0,54 - 9,53)	1,11 a (0,96 - 1,27)	1,32 a (1,11 - 1,52)	2,55 a (0,54 - 9,53)	1,28 a (1,17 - 1,32)	1,16 a (0,92 - 1,42)	2,47 (0,54 - 9,53)
Fenilalanina	2,34 a (0,38 - 6,66)	0,79 a (0,6 - 0,95)	0,59 a (0,53 - 0,64)	2,34 a (0,38 - 6,66)	0,79 a (0,61 - 1,11)	1,12 a (0,98 - 1,35)	2,34 a (0,38 - 6,66)	0,95 a (0,8 - 1,21)	0,85 a (0,62 - 1,07)	2,29 (0,38 - 6,88)

¹Olathe proveniente do Banco de dados N varia de 4 a 28; ²Olathe e Embrapa 5.1 N=4; ³Banco de Dados (médias de cultivares e anos) N varia de 4 a 162.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (Tukey's Studentized Range - HSD), ao nível de 5% de probabilidade.

Os dados do Banco de Dados correspondem à média dos valores obtidos de 8 variedades de feijoeiro comumente cultivados no Brasil, cultivados nas principais regiões de cultivo no território nacional por um período de 5 anos.



Tabela VI.4. Análises físico-químicas em grãos do evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe cultivados em três regiões do Brasil no ano agrícola de 2008. Os dados entre parênteses correspondem aos valores máximos e mínimos para cada componente analisado.

Elemento (mg/100g)	Londrina			Santo Antonio de Goiás			Sete Lagoas			Banco de Dados
	Olathe BD ¹	Olathe ²	Embrapa 5.1 ²	Olathe BD ¹	Olathe ²	Embrapa 5.1	Olathe BD ¹	Olathe ²	Embrapa 5.1 ²	
Umidade	11,35 a (9,23 - 13,85)	10,00 ab (9,63 - 10,34)	9,08 b (8,5 - 9,72)	11,35 a (9,23 - 13,85)	9,54 b (9,45 - 9,73)	8,61 b (7,5 - 9,14)	11,35 a (9,23 - 13,85)	9,38 b (9,16 - 9,53)	8,00 b (7,65 - 8,67)	11,79 (9,23 - 14,78)
Cinzas	4,15 a (3,34 - 5,12)	4,40 ab (4,24 - 4,6)	3,71 b (3,54 - 3,81)	4,15 a (3,34 - 5,12)	4,53 a (4,48 - 4,58)	4,31 a (4,05 - 4,65)	4,15 ab (3,34 - 5,12)	3,82 b (3,71 - 3,92)	4,5 a (4,33 - 4,64)	4,07 (3,34 - 5,53)
Proteína	18,75 a (14,2 - 27,2)	18,95 a (18,23 - 19,44)	18,91 a (18,29 - 19,72)	18,75 a (14,2 - 27,2)	19,52 a (18,92 - 20,18)	21,15 a (19,72 - 22,37)	18,75 a (14,2 - 27,2)	19,86 a (18,98 - 20,87)	20,13 a (19,9 - 20,47)	19,41 (13,46 - 27,2)
extrato etéreo	1,38 b (1,03 - 2,03)	2,63 a (2,02 - 3,34)	2,42 a (2,11 - 2,82)	1,38 a (1,03 - 2,03)	2,42 b (1,96 - 3,03)	3,71 c (2,51 - 5,48)	1,38 b (1,03 - 2,03)	2,80 a (2,04 - 3,73)	2,85 a (2,61 - 3,13)	1,36 (0,76 - 2,03)
ácido fítico	8,47 a (3,47 - 12,28)	11,56 a (9,95 - 12,36)	11,65 a (10,9 - 12,15)	8,47 a (3,47 - 12,28)	8,72 a (7,57 - 9,31)	9,19 a (8,59 - 9,79)	8,47 b (3,47 - 12,28)	11,27 ab (10,23 - 12,47)	12,81 a (12,58 - 13,39)	8,52 (3,01 - 13,45)
inibidores de tripsina	16977,59 a (10197,1 - 29525)	22015,10 a (19064,9 - 27655,7)	21115,60 a (20231,9 - 22783,3)	16977,59 a (10197,1 - 29525)	16200,65 a (14550,6 - 18702)	16260,95 a (14757 - 20038,5)	16977,59 a (10197,1 - 29525)	18460,20 a (14846,6 - 21843,6)	18269,00 a (16846,5 - 19882)	19137,70 (10197,1 - 39273,06)

¹Olathe proveniente do Banco de dados N varia de 4 a 28; ²Olathe e Embrapa 5.1 N=4; ³Banco de Dados (médias de cultivares e anos) N varia de 4 a 162.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (Tukey's Studentized Range - HSD), ao nível de 5% de probabilidade.

Os dados do Banco de Dados correspondem à média dos valores obtidos de 8 variedades de feijoeiro comumente cultivados no Brasil, cultivados nas principais regiões de cultivo no território nacional por um período de 5 anos.



Tabela VI.5. Composição de minerais em grãos do evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe cultivados em três regiões do Brasil no ano agrícola de 2008. Os dados entre parênteses correspondem aos valores máximos e mínimos para cada componente analisado.

Elemento (mg/100g)	Londrina			Santo Antonio de Goiás			Sete Lagoas			Banco de Dados
	Olathe BD ¹	Olathe ²	Embrapa 5.1 ²	Olathe BD ¹	Olathe ²	Embrapa 51	Olathe BD ¹	Olathe ²	Embrapa 5.1 ²	
		0,66 a								
Alumínio	1,24 a (0,34 - 3,08)	0,66 a (0,52 - 0,84)	0,81 a (0,69 - 0,99)	1,24 a (0,34 - 3,08)	0,66 a (0,49 - 0,76)	0,90 a (0,82 - 1,08)	1,24 a (0,34 - 3,08)	0,37 a (0,25 - 0,41)	0,40 a (0,21 - 0,74)	2,05 (0,34 - 12,72)
Cálcio	134,5 a (76,02 - 205,26)	94,42 a (84,46 - 103,87)	99,17 a (81,5 - 127,66)	134,5 a (76,02 - 205,26)	123,33 a (103,19 - 141,25)	125,53 a (114,73 - 132,67)	134,5 a (76,02 - 205,26)	132,16 a (115,27 - 148,8)1	118,32 a (105,73 - 126,28)	130,67 (62,99 - 205,26)
Cobre	0,88 a (0,49 - 1,32)	0,50 b (0,43 - 0,6)	0,55 b (0,51 - 0,62)	0,88 a (0,49 - 1,32)	0,46 b (0,4 - 0,56)	0,43 b (0,36 - 0,49)	0,88 a (0,49 - 1,32)	0,33 a (0,23 - 0,38)	0,29 a (0,22 - 0,36)	0,97 (0,49 - 1,48)
Ferro	6,12 a (4,72 - 9,45)	6,01 a (5,85 - 6,38)	5,89 a (5,5 - 6,56)	6,12 a (4,72 - 9,45)	5,21 a (4,81 - 5,44)	5,14 a (4,9 - 5,61)	6,12 a (4,72 - 9,45)	4,86 ab (4,63 - 5,05)	4,40 b (4,23 - 4,56)	6,77 (4,72 - 14,18)
Fósforo	410,20 a (322,07 - 575,94)	444,02 a (380,52 - 488,02)	451,51 a (438,95 - 463,71)	410,20 a (322,07 - 575,94)	419,30 a (394,14 - 456,09)	377,87 a (352,84 - 396,39)	410,20 a (322,07 - 575,94)	492,86 a (467,82 - 527,55)	471,84 a (456,89 - 478,84)	405,42 (275,91 - 594,86)
Magnésio	171,03 a (146,84 - 215,84)	171,33 a (164,6 - 175,15)	174,00 a (168,05 - 179,96)	171,03 a (146,84 - 215,84)	182,79 a (181,73 - 185)	175,64 a (165,6 - 186,58)	171,03 a (146,84 - 215,84)	157,46 a (153,51 - 162,19)	154,87 a (151,91 - 157,7)	172,93 (135,71 - 230,36)
Manganês	1,41 a (0,72 - 2,37)	0,57 b (0,51 - 0,74)	0,66 b (0,61 - 0,7)	1,41 a (0,72 - 2,37)	0,60 b (0,52 - 0,72)	0,77 b (0,69 - 0,82)	1,41 a (0,72 - 2,37)	0,29 b (0,24 - 0,32)	0,31 b (0,29 - 0,33)	1,47 (0,71 - 3,19)
Potássio	1454,42 a (972,89 - 1740,16)	1391,06 a (1307,58 - 1442,57)	1459,33 a (1427,33 - 1521,44)	1454,42 a (972,89 - 1740,16)	1398,86 a (1382,86 - 1417,99)	1384,97 a (1374,08 - 1402,47)	1454,42 a (972,89 - 1740,16)	1410,09 a (1384,06 - 1426,73)	1395,62 a (1393,12 - 1400,53)	1413,96 (798,41 - 1766,16)
Zinco	2,87 a (1,97 - 3,73)	2,01 a (1,91 - 2,22)	2,12 a (1,98 - 2,19)	2,87 a (1,97 - 3,73)	2,15 a (2,02 - 2,23)	1,96 a (1,86 - 2,08)	2,87 a (1,97 - 3,73)	2,23 a (2,18 - 2,33)	1,98 a (1,97 - 2,02)	3,07 (1,76 - 15,25)

¹Olathe proveniente do Banco de dados N varia de 4 a 28; ²Olathe e Embrapa 5.1 N=4; ³Banco de Dados (médias de cultivares e anos) N varia de 4 a 162.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (Tukey's Studentized Range - HSD), ao nível de 5% de probabilidade.

Os dados do Banco de Dados correspondem à média dos valores obtidos de 8 variedades de feijoeiro comumente cultivados no Brasil, cultivados nas principais regiões de cultivo no território nacional por um período de 5 anos.



Tabela VI.6. Composição de açúcares e vitaminas (cromatografia líquida) em grãos do evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe cultivados em três regiões do Brasil no ano agrícola de 2009. Os dados entre parênteses correspondem aos valores máximos e mínimos para cada componente analisado.

Elemento (mg/100g)	Santo Antônio de Goiás			Sete Lagoas			Banco de Dados ³
	Olathe BD ¹	Olathe ²	Embrapa 51 ³	Olathe BD ¹	Olathe ²	Embrapa 51	
Sacarose	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Rafinose	0,21 (0,11 - 0,35)	N/A	N/A	0,21 a (0,11 - 0,35)	0,15 a (0,14 - 0,18)	0,14 a (0,13 - 0,15)	0,27 (0,03 - 0,57)
Estaquiose	2,90 a (1,74 - 4,30)	2,71 a (2,40 - 3,04)	3,14 a (2,87 - 3,38)	2,90 a (1,74 - 4,30)	2,52 a (2,44 - 2,60)	2,27 a (1,52 - 2,61)	3,11 (0,64 - 5,35)
Vit. B1	0,33 b (0,14 - 0,58)	0,73 a (0,70 - 0,74)	0,39 b (0,27 - 0,68)	0,33 a (0,14 - 0,58)	0,47 a (0,45 - 0,48)	0,43 a (0,41 - 0,47)	0,57 (0,14 - 1,39)
Vit. B2	0,08 a (0,03 - 0,13)	0,23 b (0,18 - 0,29)	0,13 c (0,11 - 0,15)	0,08 b (0,03 - 0,13)	0,13 a (0,07 - 0,16)	0,10 ab (0,09 - 0,11)	0,08 (0,03 - 0,79)

¹Olathe BD: N variou de 12 a 28; ²Olathe e Embrapa 5.1 – N=4; ³Banco de Dados varia de 13 a 162

As médias devem ser comparadas para os grupos formados por Olathe BD (dados de Olathe tirados do Banco de Dados) e Olathe e Embrapa 5.1 de Santo Antonio de Goiás, e similarmente de Sete Lagoas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (Tukey's Studentized Range - HSD), ao nível de 5% de probabilidade.

Os dados do Banco de Dados correspondem á média dos valores obtidos de 8 variedades de feijoeiro comumente cultivados no Brasil, cultivados nas principais regiões de cultivo no território nacional por um período de 5 anos.



Tabela VI.7. Composição de aminoácidos (cromatografia líquida) em grãos do evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe cultivados em duas regiões do Brasil no ano agrícola de 2009. Os dados entre parênteses correspondem aos valores máximos e mínimos para cada componente analisado.

Elemento (mg/100g)	Santo Antônio de Goiás			Sete Lagoas			Banco de Dados ³
	Olathe BD ¹	Olathe ²	Embrapa 51 ³	Olathe BD ¹	Olathe ²	Embrapa 5.1	
Triptofano	0,16 a (0,10 - 0,21)	0,19 a (0,17 - 0,19)	0,19 a (0,16 - 0,21)	0,16 a (0,10 - 0,21)	0,05 a (0,05 - 0,06)	0,15 a (0,10 - 0,18)	0,17 (0,10 - 0,29)
Cisteína	0,17 b (0,07 - 0,22)	0,27 a (0,24 - 0,28)	0,31 a (0,30 - 0,32)	0,17 b (0,07 - 0,22)	0,28 a (0,25 - 0,30)	0,26 a (0,22 - 0,29)	0,20 (0,00 - 0,28)
Metionina	0,20 a (0,14 - 0,28)	0,22 a (0,21 - 0,22)	0,24 a (0,23 - 0,24)	0,20 b (0,14 - 0,28)	0,25 a (0,22 - 0,27)	0,23 ab (0,19 - 0,25)	0,19 (0,08 - 0,28)
Ácido Aspártico	3,68 a (0,94 - 13,90)	2,24 a (1,42 - 2,68)	1,67 a (1,43 - 2,25)	3,68 a (0,94 - 13,90)	2,63 a (1,85 - 3,29)	1,69 a (1,54 - 1,89)	3,71 (0,94 - 14,74)
Serina	1,84 a (0,40 - 6,47)	1,20 a (0,75 - 1,42)	0,87 a (0,74 - 1,20)	1,84 a (0,40 - 6,47)	1,30 a (0,93 - 1,63)	0,87 a (0,82 - 0,96)	1,78 (0,40 - 6,47)
Ácido Glutâmico	4,75 a (1,10 - 19,19)	2,85 a (2,02 - 3,70)	2,28 a (1,97 - 3,08)	4,75 a (1,10 - 19,19)	3,22 a (1,43 - 4,34)	2,25 a (2,09 - 2,50)	4,35 (1,10 - 19,19)
Glicina	1,29 a (0,29 - 4,63)	0,78 a (0,50 - 0,92)	0,59 a (0,51 - 0,80)	1,29 a (0,29 - 4,63)	0,85 a (0,59 - 1,07)	0,56 a (0,53 - 0,64)	1,30 (0,29 - 8,22)
Histidina	1,11 a (0,28 - 3,71)	0,56 a (0,37 - 0,65)	0,41 a (0,34 - 0,54)	1,11 a (0,28 - 3,71)	0,65 a (0,45 - 0,80)	0,43 a (0,39 - 0,51)	1,08 (0,28 - 4,14)
Arginina	2,28 a (0,48 - 8,79)	1,51 a (1,02 - 1,80)	1,16 a (1,00 - 1,42)	2,28 a (0,48 - 8,79)	1,97 a (1,51 - 2,37)	1,36 a (1,23 - 1,56)	2,20 (0,48 - 9,12)
Treonina	1,32 a (0,29 - 4,75)	0,85 a (0,50 - 0,98)	0,63 a (0,52 - 0,88)	1,32 a (0,29 - 4,75)	0,90 a (0,64 - 1,14)	0,61 a (0,53 - 0,69)	1,35 (0,29 - 5,06)
Alanina	1,28 a (0,29 - 4,84)	0,76 a (0,50 - 0,89)	0,58 a (0,47 - 0,80)	1,28 a (0,29 - 4,84)	0,80 a (0,56 - 1,01)	0,55 a (0,50 - 0,64)	1,28 (0,29 - 4,90)

Continua na próxima página



Continuação da tabela VI.7

Elemento (mg/100g)	Santo Antônio de Goiás			Sete Lagoas			Banco de Dados ³
	Olathe BD ¹	Olathe ²	Embrapa 51 ³	Olathe BD ¹	Olathe ²	Embrapa 5.1	
Prolina	1,25 a (0,28 - 4,47)	0,69 a (0,43 - 0,82)	0,50 a (0,43 - 0,70)	1,25 a (0,28 - 4,47)	0,73 a (0,51 - 0,91)	0,48 a (0,43 - 0,55)	1,27 (0,28 - 5,24)
Tirosina	1,21 a (0,28 - 3,86)	0,74 a (0,45 - 0,87)	0,51 a (0,41 - 0,74)	1,21 a (0,28 - 3,86)	0,76 a (0,56 - 0,96)	0,53 a (0,48 - 0,60)	1,19 (0,28 - 7,42)
Valina	1,66 a (0,40 - 6,17)	0,87 a (0,62 - 1,01)	0,68 a (0,57 - 0,85)	1,66 a (0,40 - 6,17)	1,00 a (0,68 - 1,23)	0,69 a (0,62 - 0,83)	1,65 (0,40 - 6,29)
Lisina	2,19 a (0,29 - 8,63)	1,39 a (1,03 - 1,61)	1,07 a (0,94 - 1,35)	2,19 a (0,29 - 8,63)	1,54 a (1,03 - 1,87)	1,01 a (0,91 - 1,17)	2,10 (0,29 - 8,63)
Isoleucina	1,54 a (0,37 - 5,65)	0,72 a (0,64 - 0,79)	0,62 a (0,52 - 0,67)	1,54 a (0,37 - 5,65)	0,80 a (0,52 - 0,96)	0,61 a (0,50 - 0,84)	1,48 (0,37 - 5,65)
Leucina	2,55 a (0,54 - 9,53)	1,51 a (0,95 - 1,82)	1,10 a (0,94 - 1,50)	2,55 a (0,54 - 9,53)	1,64 a (1,15 - 2,08)	1,13 a (1,04 - 1,29)	2,47 (0,54 - 9,53)
Fenilalanina	2,34 a (0,38 - 6,66)	1,12 a (0,71 - 1,34)	0,81 a (0,69 - 1,11)	2,34 a (0,38 - 6,66)	1,21 a (0,83 - 1,51)	0,83 a (0,75 - 0,99)	2,29 (0,38 - 6,88)

¹Olathe BD: N variou de 12 a 28; ²Olathe e Embrapa 5.1 – N=4; ³Banco de Dados varia de 13 a 162

As médias devem ser comparadas para os grupos formados por Olathe BD (dados de Olathe tirados do Banco de Dados) e Olathe e Embrapa 5.1 de Santo Antonio de Goiás, e similarmente de Sete Lagoas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (Tukey's Studentized Range - HSD), ao nível de 5% de probabilidade.

Os dados do Banco de Dados correspondem à média dos valores obtidos de 8 variedades de feijoeiro comumente cultivados no Brasil, cultivados nas principais regiões de cultivo no território nacional por um período de 5 anos.



Tabela VI.8. Análises físico-químicas em grãos do evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe cultivados em duas regiões do Brasil no ano agrícola de 2009. Os dados entre parênteses correspondem aos valores máximos e mínimos para cada componente analisado.

Elemento (mg/100g)	Santo Antônio de Goiás			Sete Lagoas			Banco de Dados ³
	Olathe BD ¹	Olathe ²	Embrapa 51 ³	Olathe BD ¹	Olathe ²	Embrapa 5.1	
Umidade	11,35 a (9,23 - 13,85)	7,17 b (6,87 - 7,69)	8,38 b (8,07 - 8,54)	11,35 a (9,23 - 13,85)	9,41 b (9,04 - 9,76)	10,95 ab (10,76 - 11,20)	11,79 (9,23 - 14,78)
Cinzas	4,15 a (3,34 - 5,12)	3,81 a (3,70 - 4,02)	3,80 a (3,66 - 3,91)	4,15 a (3,34 - 5,12)	3,79 a (3,40 - 3,95)	3,75 a (3,61 - 3,85)	4,07 (3,34 - 5,53)
Proteína	18,75 a (14,20 - 27,2)	19,03 a (18,80 - 19,32)	19,29 a (19,14 - 19,67)	18,75 b (14,20 - 27,2)	21,31 ab (20,82 - 21,68)	23,36 a (22,83 - 23,63)	19,41 (13,46 - 27,20)
extrato etéreo	1,38 b (1,03 - 2,03)	2,42 a (2,28 - 2,52)	2,78 a (2,30 - 3,19)	1,38 b (1,03 - 2,03)	1,70 ab (1,40 - 2,01)	2,06 a (1,41 - 2,42)	1,36 (0,76 - 2,03)
ácido fítico	8,47 a (3,47 - 12,28)	7,18 a (6,73 - 8,16)	7,27 a (7,15 - 7,55)	8,47 a (3,47 - 12,28)	11,90 a (11,48 - 12,63)	11,86 a (11,50 - 12,52)	8,52 (3,01 - 13,45)
inibidores de tripsina	16977,59 a (10197,10 - 29525,00)	20555,45 a (19830,00 - 21152,90)	18461,43 a (15784,30 - 20524,30)	16977,59 a (10197,10 - 29525,00)	19312,80 a (18862,90 - 19841,90)	17424,38 a (16261,02 - 18139,09)	19137,7 (10197,10 - 39273,06)

¹Olathe BD: N variou de 12 a 28; ²Olathe e Embrapa 5.1 – N=4; ³Banco de Dados varia de 13 a 162

As médias devem ser comparadas para os grupos formados por Olathe BD (dados de Olathe tirados do Banco de Dados) e Olathe e Embrapa 5.1 de Santo Antonio de Goiás, e similarmente de Sete Lagoas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (Tukey's Studentized Range - HSD), ao nível de 5% de probabilidade.

Os dados do Banco de Dados correspondem à média dos valores obtidos de 8 variedades de feijoeiro comumente cultivados no Brasil, cultivados nas principais regiões de cultivo no território nacional por um período de 5 anos.



Tabela VI.9. Composição de minerais em grãos do evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe cultivados em duas regiões do Brasil no ano agrícola de 2009. Os dados entre parênteses correspondem aos valores máximos e mínimos para cada componente analisado.

Elemento (mg/100g)	Santo Antônio de Goiás			Sete Lagoas			Banco de Dados ³
	Olathe BD ¹	Olathe ²	Embrapa 51 ³	Olathe BD ¹	Olathe ²	Embrapa 5.1	
Alumínio	1,24 b (0,34 - 3,08)	2,62 a (1,98 - 3,24)	3,67 a (2,52 - 4,81)	1,24 (0,34 - 3,08)	N/A	N/A	2,05 (0,34 - 12,72)
Cálcio	134,50 a (76,02 - 205,26)	165,34 a (149,64 - 175,60)	160,56 a (146,20 - 189,69)	134,50 a (76,02 - 205,26)	137,30 a (126,60 - 148,10)	134,83 a (129,70 - 144,20)	130,67 (62,99 - 205,26)
Cobre	0,88 a (0,49 - 1,32)	0,35 b (0,28 - 0,47)	0,30 b (0,23 - 0,36)	0,88 a (0,49 - 1,32)	0,78 a (0,68 - 0,84)	0,73 a (0,70 - 0,76)	0,97 (0,49 - 1,48)
Ferro	6,12 a (4,72 - 9,45)	6,71 a (6,4 - 7,15)	7,44 a (6,81 - 8,28)	6,12 a (4,72 - 9,45)	6,64 a (6,48 - 6,94)	6,52 a (6,24 - 6,98)	6,77 (4,72 - 14,18)
Fósforo	410,20 a (322,07 - 575,94)	366,96 a (357,75 - 387,54)	323,80 a (239,42 - 360,83)	410,20 a (322,07 - 575,94)	480,28 a (438,60 - 522,70)	461,23 a (452,1 - 477,9)	405,42 (275,71 - 594,86)
Magnésio	171,03 a (146,84 - 215,84)	179,23 a (176,55 - 184,28)	171,01 a (166,09 - 177,65)	171,03 a (146,84 - 215,84)	179,45 a (177,80 - 182,70)	175,18 a (171,40 - 183,00)	172,93 (135,71 - 230,36)
Manganês	1,41 a (0,72 - 2,37)	1,01 a (0,87 - 1,08)	0,86 a (0,80 - 0,94)	1,41 a (0,72 - 2,37)	1,45 a (1,41 - 1,53)	1,43 a (1,34 - 1,47)	1,47 (0,71 - 3,19)
Potássio	1454,42 a (972,89 - 1740,16)	1350,21 a (1340,34 - 1360,76)	1295,74 a (1277,97 - 1321,46)	1454,42 a (972,89 - 1740,16)	1582,50 a (1555,3 - 1614,7)	1524,15 a (1504,10 - 1541,10)	1413,96 (798,41 - 1766,16)
Zinco	2,87 a (1,97 - 3,73)	2,44 a (2,33 - 2,58)	2,23 a (2,17 - 2,27)	2,87 a (1,97 - 3,73)	2,80 a (2,66 - 2,92)	2,99 a (2,87 - 3,11)	3,07 (1,76 - 15,25)

¹Olathe BD: N variou de 12 a 28; ²Olathe e Embrapa 5.1 – N=4; ³Banco de Dados varia de 13 a 162

As médias devem ser comparadas para os grupos formados por Olathe BD (dados de Olathe tirados do Banco de Dados) e Olathe e Embrapa 5.1 de Santo Antonio de Goiás, e similarmente de Sete Lagoas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (Tukey's Studentized Range - HSD), ao nível de 5% de probabilidade.

Os dados do Banco de Dados correspondem à média dos valores obtidos de 8 variedades de feijoeiro comumente cultivados no Brasil, cultivados nas principais regiões de cultivo no território nacional por um período de 5 anos.

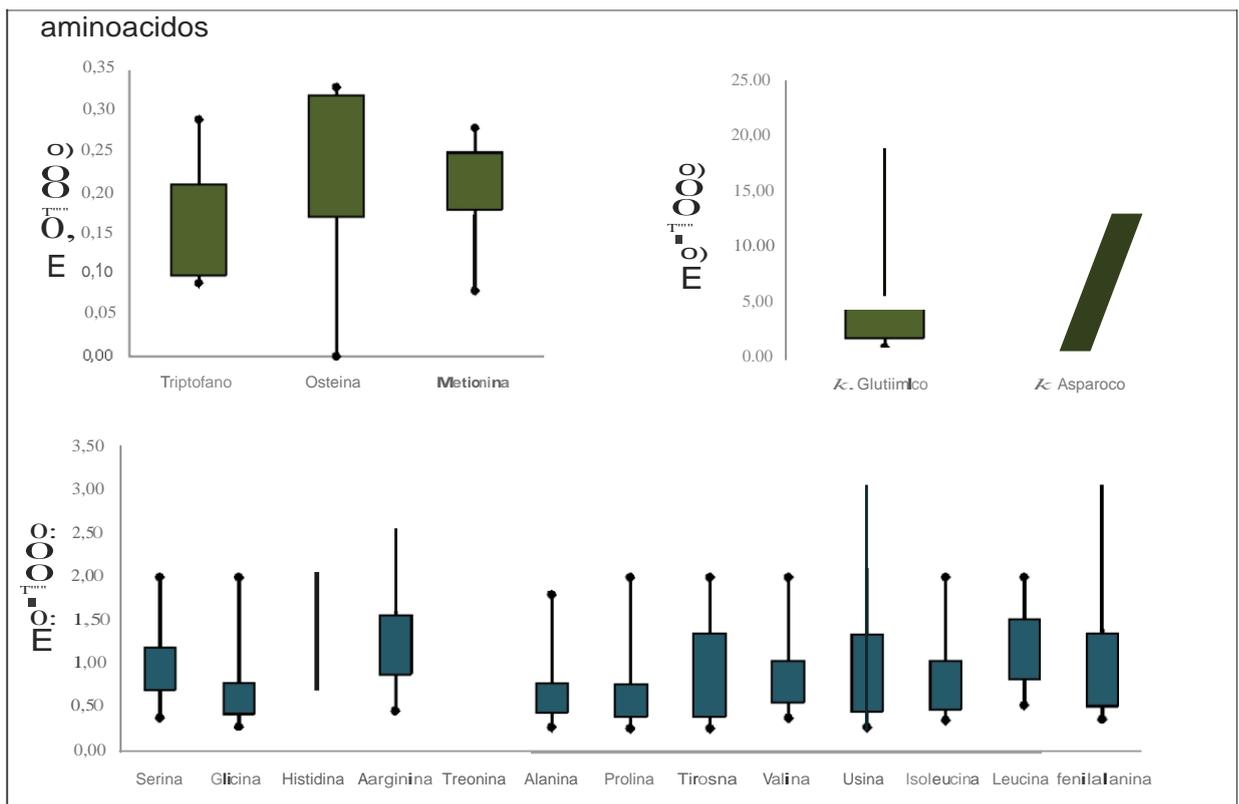
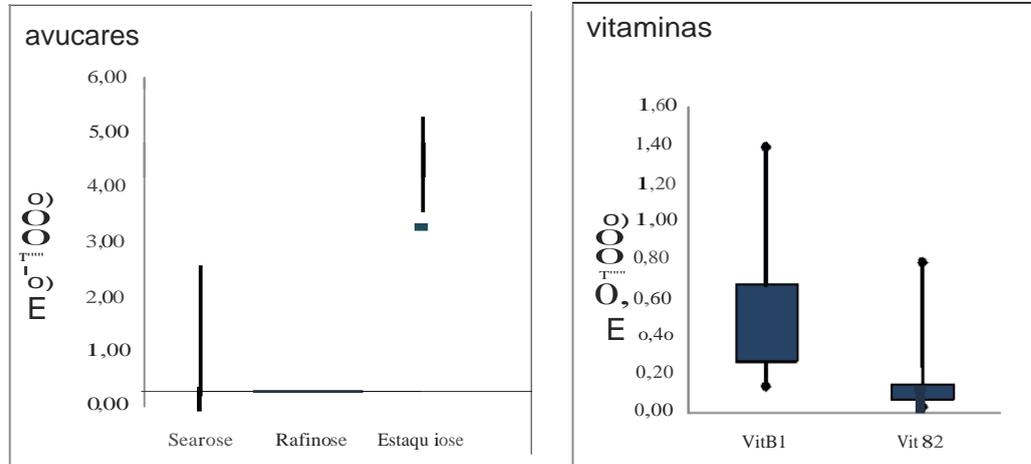


Figura VI.8. Varia9ao (valores maximos e minimos) de nutrientes encontrada no evento Embrapa 5.1 (blocos coloridos), cultivado em campos de Sete Lagoas-MG, Londrina-PR e Santo Antonio de Goias-GO nos anos de 2008 e 2009, comparada com a varia9ao encontrada em feijoeiro cultivados no Brasil (linhas).

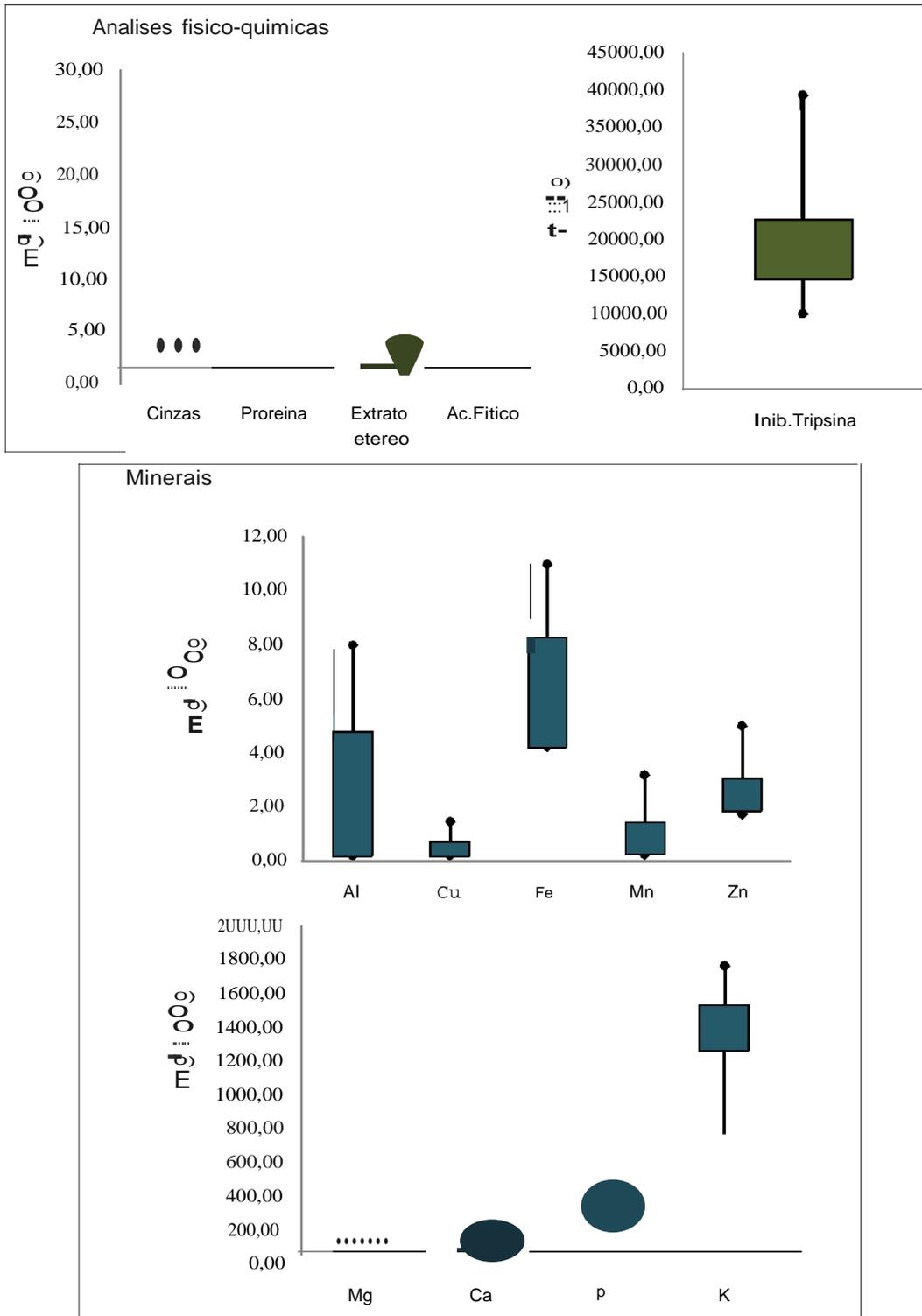


Figura VI.9. Varia9ao (valores rmiximos e minimos) de nutrientes e anti-nutrientes encontrada no evento Embrapa 5.1 (blocos coloridos), cultivado em campos de Sete Lagoas-MG, Londrina-PR e Santo Antonio de Goias-GO nos anos de 2008 e 2009, comparada com a varia9ao encontrada em feijoeiro cultivados no Brasil (linhas)



Variação das proteínas em grãos cultivados em três regiões do Brasil

Foram realizadas análises do perfil protéico em grãos colhidos de campos cultivados com o Evento Embrapa 5.1 e Olathe convencional em Santo Antônio de Goiás (GO), Sete Lagoas (MG) e Londrina (PR) (Figuras VI.10, VI.11, VI.12 e VI.13). Foram identificadas as principais proteínas presentes em grãos maduros de feijão (Figura VI.10). Os resultados mostram que os grãos analisados mostram o mesmo padrão nos distintos campos e que não foi observada diferença entre o evento GM Embrapa 5.1 e genótipo receptor do gene Olathe.

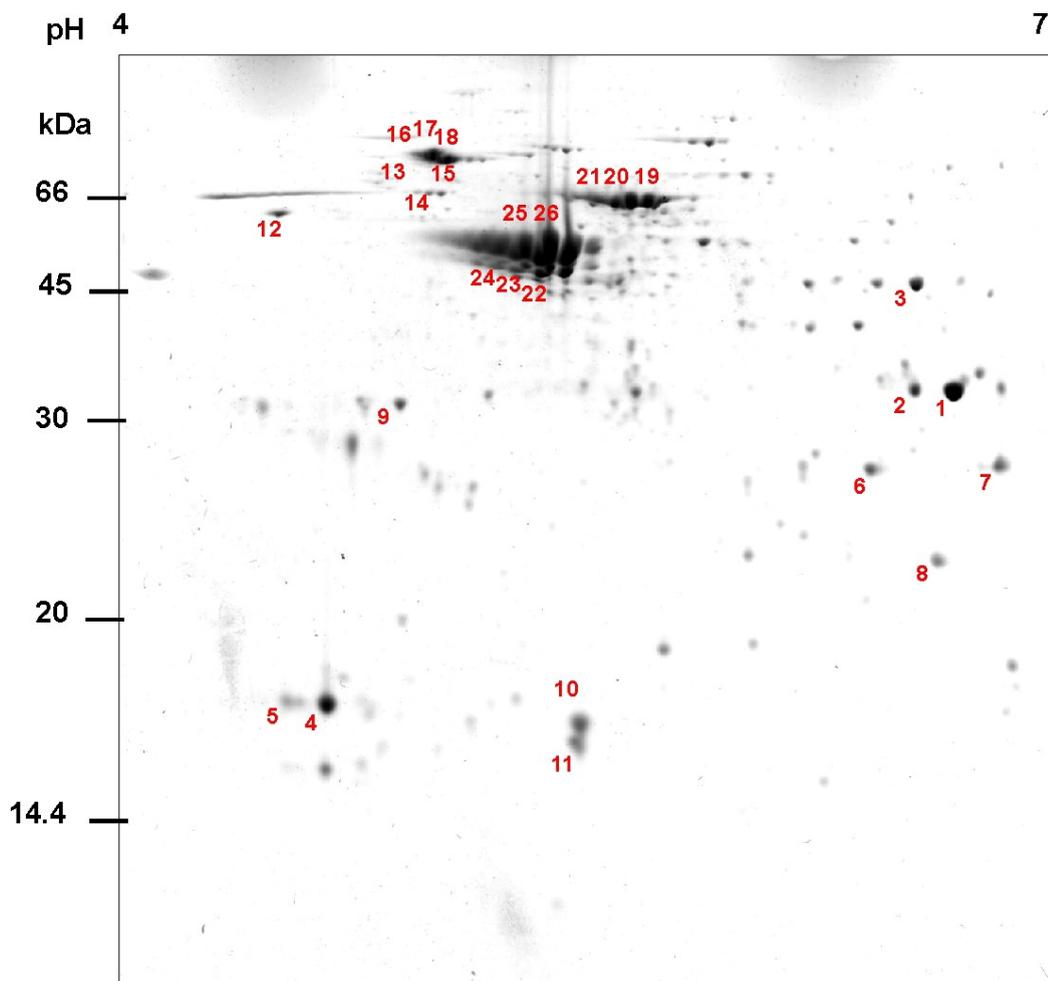


Figura VI.10. Análises das principais proteínas abundantes em sementes de feijão em 2D-PAGE. Essa análise foi feita para grãos colhidos em campos cultivados com o evento Embrapa 5.1 e Olathe convencional em Santo Antônio de Goiás, Sete Lagoas e Londrina. Foram identificadas 26 proteínas: 1: Arcelin-5B. Chain: 22-261, pI: 6.24, MW: 27055 ; 2: Glutelin type-A 1 acidic chain. Chain: 25-306, pI: 6.59, MW: 3189; 3: Isoform 2 of 12S seed storage protein CRA1 Chain: 1-368, pI: 6.62, MW: 41032; 4: Arachin 21 kDa protein. Chain: 1-176, pI: 4.29, MW: 20863 ; 5: Arachin 21 kDa protein. Chain: 1-176, pI: 4.29, MW: 20863 ; 6: Arcelin-5B. Chain: 22-261, pI: 6.24, MW: 27055 ; 7: Arcelin-5B. Chain: 22-261, pI: 6.24, MW: 27055 ; 8: Arachin 25 kDa protein. Chain: 1-201, pI: 7.12, MW: 22220 ; 9: Glycinin A2 subunit. Chain: 19-296, pI: 4.90, MW: 31623; 10: Conglutin. Chain: 22-145, pI: 5.50, MW: 14846 ; 11: Conglutin. Chain: 22-145, pI: 5.50, MW: 14846 ; 12: Beta-conglycinin, alpha chain. Chain: 63-605, pI: 4.87, MW: 63152; 13: Beta-conglycinin, alpha chain. Chain: 63-605, pI: 4.87, MW: 63152; 14: Beta-conglycinin, alpha chain. Chain: 63-605, pI: 4.87, MW: 63152; 15: Beta-conglycinin, alpha chain. Chain: 63-605, pI: 4.87, MW: 63152; 16: Glutenin, high molecular weight subunit PW212. Chain: 22-838, pI: 5.38, MW: 87008; 17: Glutenin, high molecular weight subunit PW212. Chain: 22-838, pI: 5.38, MW: 87008; 18: Glutenin, high molecular weight subunit PW212. Chain: 22-838, pI: 5.38, MW: 87008; 19: Convicilin. Chain: 29-571, pI: 6.11, MW: 63932 ; 20: Convicilin. Chain: 29-571, pI: 6.11, MW: 63932 ; 21: Convicilin. Chain: 29-571, pI: 6.11, MW: 63932 ; 22: Phaseolin. Chain: 25-428, pI: 5.25, MW: 45383; 23: Phaseolin. Chain: 25-428, pI: 5.25, MW: 45383; 24: Phaseolin. Chain: 25-428, pI: 5.25, MW: 45383; 25: Phaseolin, alpha-type. Chain: 25-436, pI: 5.13, MW: 46698; 26: Phaseolin, alpha-type. Chain: 25-436, pI: 5.13, MW: 46698

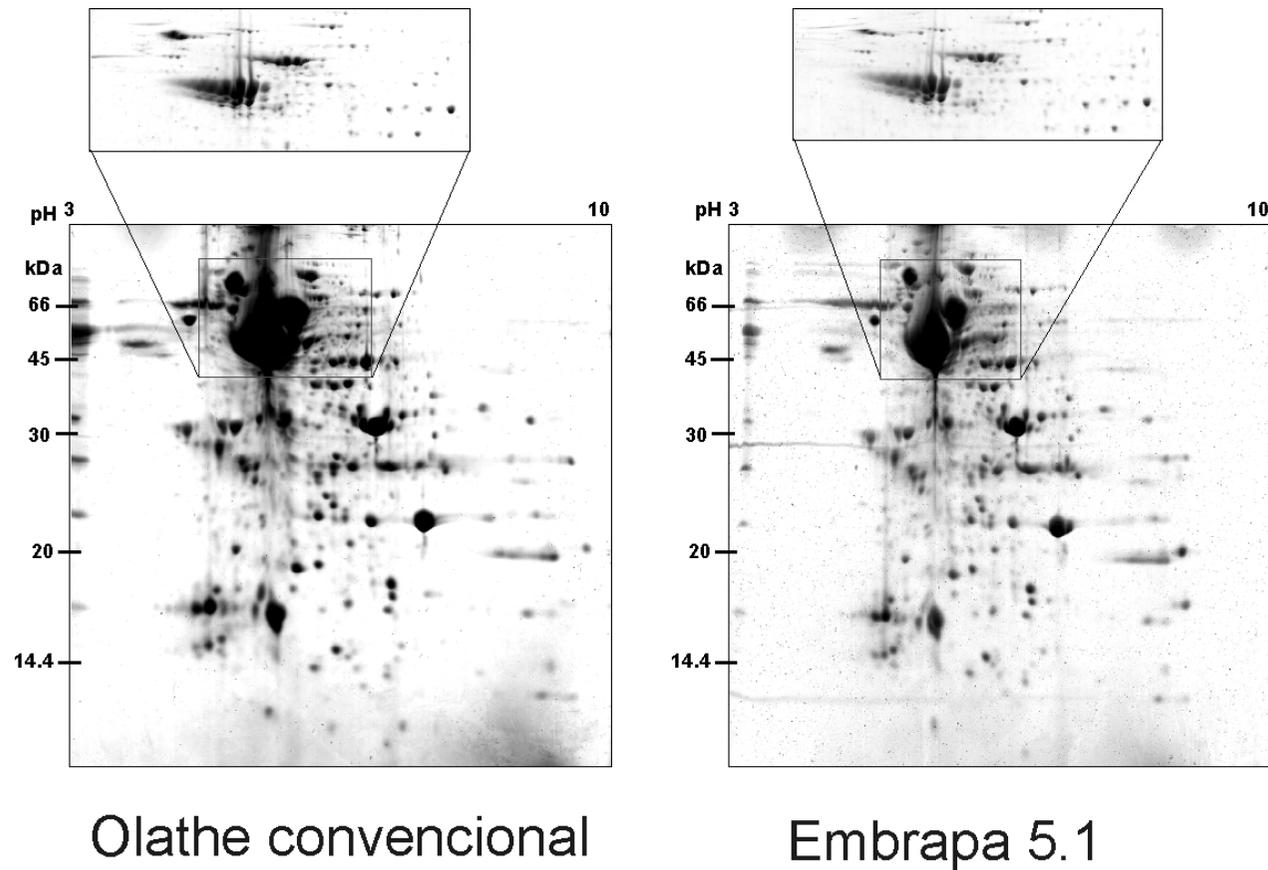


Figura VI.11. Análise em 2D-PAGE das principais proteínas abundantes em grãos de feijão (evento GM Embrapa 5.1 e o receptor dos transgenes var. Olathe) cultivados em Santo Antônio de Goiás (GO). O quadrado acima mostra outro 2D-PAGE com detalhamento das proteína entre pH 4,0 e 10,0.

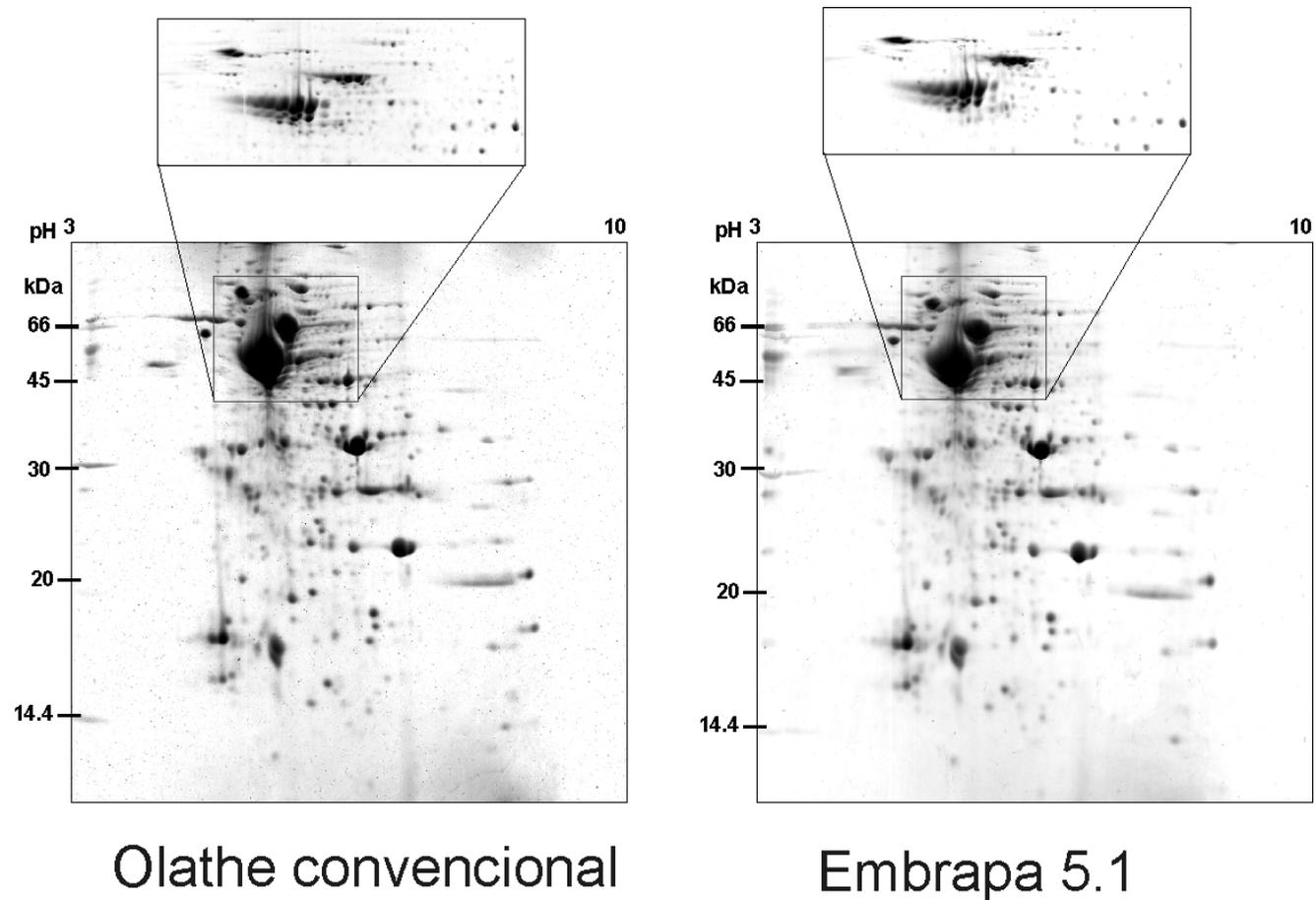


Figura VI.12. Análise em 2D-PAGE das principais proteínas abundantes em grãos de feijão (evento GM Embrapa 5.1 e o receptor dos transgenes var. Olathe) cultivados em Sete Lagoas (MG). O quadrado acima mostra outro 2D-PAGE com detalhamento das proteína entre pH 4,0 e 10,0.

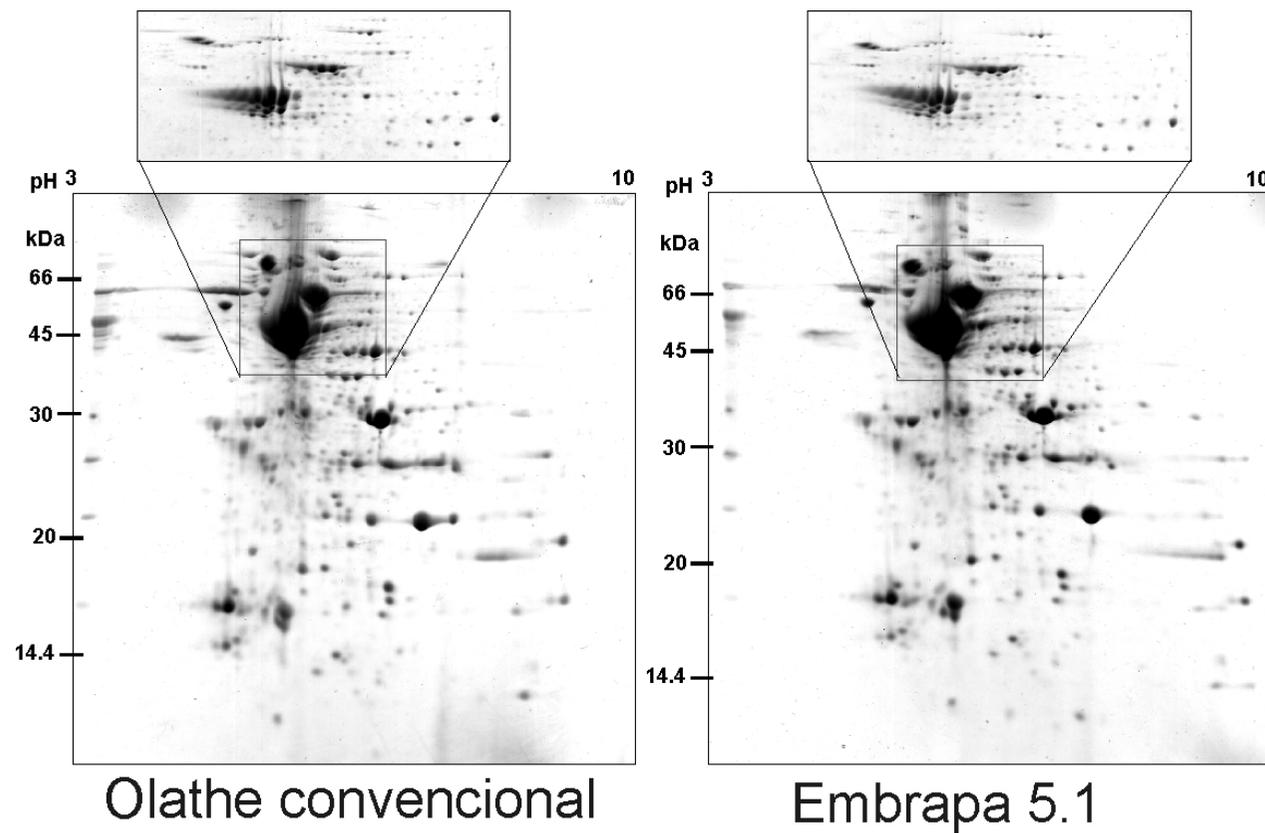


Figura VI.13. Análise em 2D-PAGE das principais proteínas abundantes em grãos de feijão (evento GM Embrapa 5.1 e o receptor dos transgenes var. Olathe) cultivados em Londrina (PR). O quadrado acima mostra outro 2D-PAGE com detalhamento das proteína entre pH 4,0 e 10,0.



VI. 4. Alterações relativas ao desempenho do animal, quando alimentado com organismos geneticamente modificados ou qualquer de suas partes, in natura ou após processamento, fornecendo, inclusive, os resultados da avaliação da nutrição em animais experimentais por duas gerações, indicando as espécies utilizadas nos testes, duração dos experimentos, variações fisiológicas e morfológicas observadas em relação aos grupos-controle e alteração da qualidade nutricional, se houver

Foram utilizados ratos Wistar (machos e fêmeas) provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Os animais foram separados e distribuídos, aleatoriamente, em quatro grupos conforme quatro diferentes tratamentos para ambas etapas de estudo: crescimento (30 dias) e exposição prolongada (180 dias). As dietas foram preparadas segundo a formulação preconizada pelo American Institute of Nutrition (Reeves et al., 1993) para a dieta AIN – 93G, com modificação no conteúdo de proteína bruta (N x 6), que era de 10% (Pellet & Young, 1980), utilizando como fonte protéica o feijão GM (var Olathe, evento Embrapa 5.1) e seu correlativo não-GM (Olathe). As amostras foram manipuladas de acordo com as especificações estabelecidas pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). As dietas experimentais ficaram assim constituídas: dieta de caseína-controle (DCas), dieta aprotéica (DA); dieta feijão transgênico evento Embrapa 5.1 (DFT) e dieta feijão convencional (DFC). As dietas contendo proteína eram isocalóricas ($382,8 \pm 2,9$ kcal/100g) e isoprotéicas ($10,3 \pm 0,4\%$) (para detalhes da metodologia ver Anexo I). Os estudos de alimentação foram conduzidos no Laboratório de Ensaio Biológicos do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Campus Botucatu, São Paulo, nas condições experimentais de rotina (ciclo de claro/ escuro de 12h, $22 \pm 5^\circ\text{C}$), sem restrição de água e dieta, com prévio período de 72h para adaptação às novas condições ambientais. O manuseio e o procedimento experimental foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Estadual Paulista - UNESP, com prévia aprovação do protocolo



experimental (Protocolo no. 67/08-CEEA), em concordância com os princípios em pesquisa animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Os resultados desses experimentos estão mostrados nas figuras VI.14 e VI.15. Foi possível observar uma diferença significativa na evolução do peso dos animais alimentados com feijoeiro (GM ou não GM) quando comparados àqueles alimentados com ração suplementada com caseína (GC). Embora o feijão seja eventualmente alimento de roedores, alimentação com grandes proporções desses grãos não são adequadas, devido ao desequilíbrio nutricional que isso provoca. No entanto não foram observadas diferenças entre os grupos alimentados com grãos de feijão do evento Embrapa 5.1 quando comparados àqueles grupos alimentados com grãos de feijão convencionais (Olathe) (Figura VI.14). Esses dados também se refletem nos índices de ganho de peso, em que também não se observaram diferenças entre os animais alimentados com feijoeiro GM ou não-GM (Figura VI.15). Cabe ressaltar ainda que animais alimentados com grãos de crus de feijão têm seu desenvolvimento fortemente comprometido, levando os animais à morte cujos eventos se iniciam cerca de 20 dias após o início do experimento.

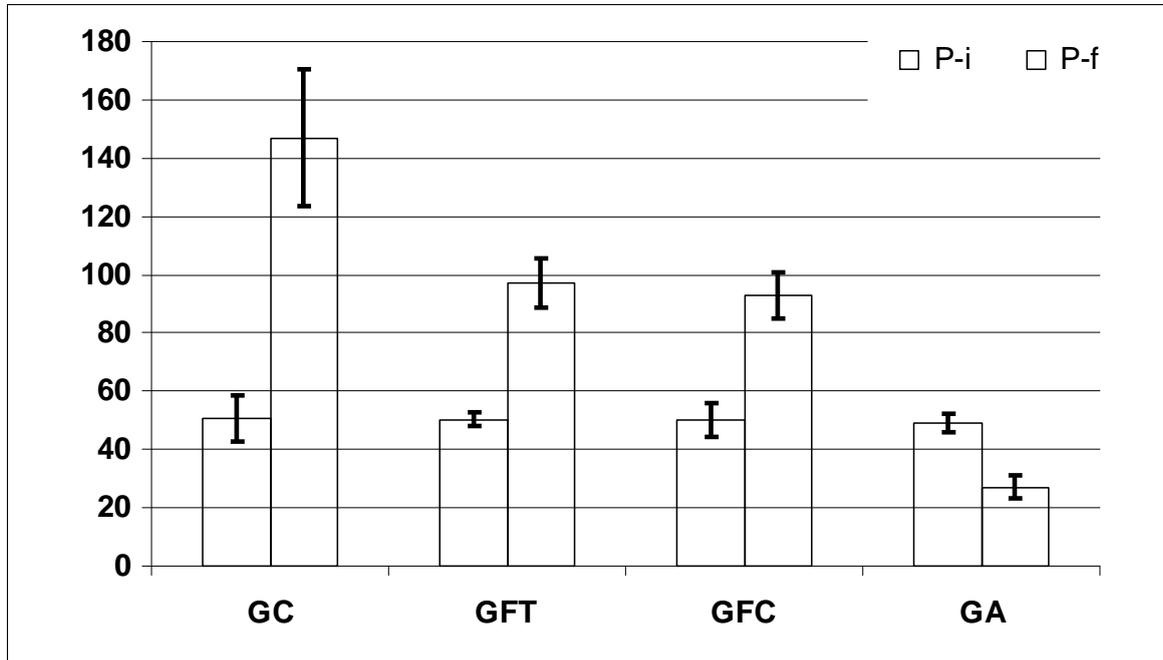


Figura VI.14. Peso inicial (P-i) e peso final (P-f) dos animais GC (controle-caseína), GFT (evento Embrapa 5.1), GFC (feijão comum) e GA (aprotéico) submetidos a 45 dias de tratamento com 10% de proteína.

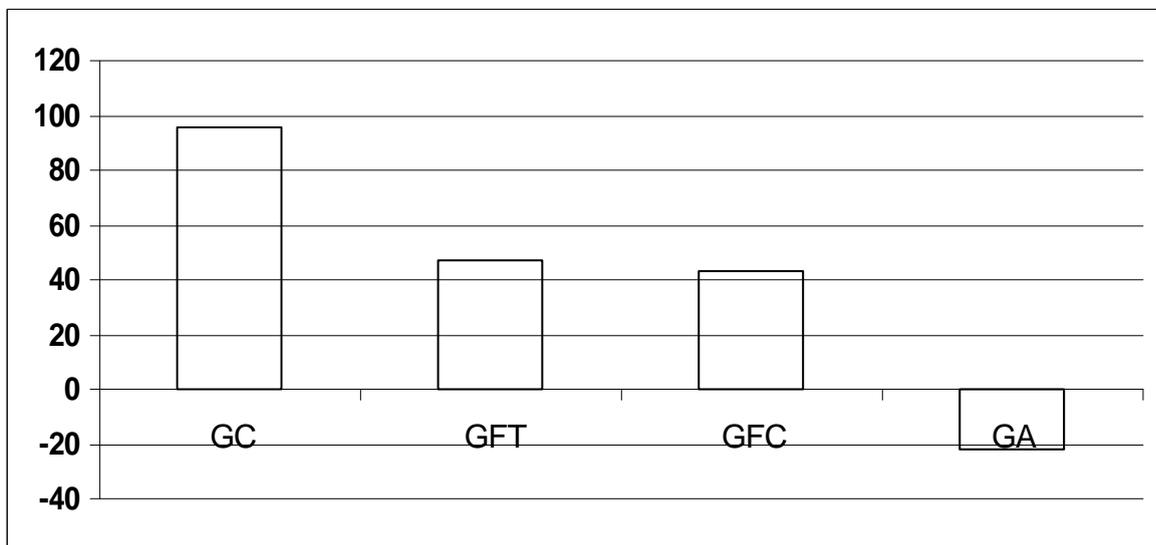


Figura VI.15. Evolução de ganho de peso dos animais GC (controle-caseína), GFT (evento Embrapa 5.1), GFC (feijão comum) e GA (aprotéico) submetidos a 45 dias de tratamento com 10% de proteína.



Alimentação com RNA total (siRNA) isolado de plantas GM

Considera-se que uma boa refeição (uma e meio a duas conchas) possui aproximadamente 35g de feijão, calculando-se um consumo diário de 70g (Bulisani, 2003). Nestas condições, caso ainda exista RNA no feijão processado, o que não foi possível de detectar, haveria a possibilidade de consumo de 200 µg/kg de RNA total (considerando-se que 2 g de sementes podem reder 400 µg de RNA total e uma pessoa que tem massa de 70 kg). Os animais foram alimentados via oral diariamente com uma solução contendo 6 mg de RNA total isolado de folhas. Isso significa que os animais ingeriram cerca de 100 vezes o valor que seria possível ser consumido considerando a relação massa/peso do indivíduo. Além disso, deve-se considerar que as folhas têm quantidades de siRNA muito superiores àquelas encontradas nas sementes (conforme demonstrado na seção V.10) o que aumenta consideravelmente a robustez desse experimento. Devemos ainda considerar que o feijão é consumido após cozimento, quando níveis de RNA totais estão abaixo do que pôde ser detectado, levando à conclusão que seria ainda mais difícil detectar siRNA em grãos de feijão cozidos. O resultado desse estudo não demonstrou qualquer alteração no desempenho dos animais bem como qualquer anomalia nos tecidos, da mesma forma que as análises apresentadas anteriormente.

VI. 5. Estabilidade à digestão e ao processamento industrial da proteína especificada pelo transgene com base nas propriedades físico-químicas.

Análises de degradabilidade da proteína AtAHAS foram realizadas com a proteína produzida em *E. coli* e extraída de folhas de plantas. Este estudo está mostrado no processo de liberação comercial apresentado à CTNBio para o evento de soja BPS-CV127-geneticamente modificada tolerante aos herbicidas do grupo químico das imidazolinonas, devido à expressão do gene *AtAhas* (mesmo cassete de expressão usado para geração do evento de feijoeiro Embrapa 5.1) (Parecer Técnico nº 2236/2009, Processo nº 01200.000010/2009-06). Os dados mostram que a proteína AtAHAS é



rapidamente degradada em fluido gástrico simulado (FGS) (FGS + pepsina + amostra) e fluido intestinal simulado (FIS) (FIS + pancreatina + amostra), sendo indetectável por Western blot no primeiro tempo analisado (30 segundos). Os resultados foram similares tanto para a proteína produzida em *E. coli* quanto em folhas de plantas. Ensaios de estabilidade térmica também demonstraram que a proteína AtAHAS é estável quando em temperaturas entre 4 e 37°C por um período de uma hora. Entretanto, em temperaturas superiores a 37°C, a proteína se mostrou não estável.

Baseados (1) nas análises realizadas com o evento de soja BPS-CV127-9 que é altamente resistente aos herbicidas do grupo químico das imidazolinonas e no fato de que o evento de feijoeiro Embrapa 5.1 (2) não apresenta tolerância significativa a esses herbicidas, portanto com níveis inferiores de expressão de *AtAhas* e (3) não é consumido sem que se faça cocção em temperaturas superiores a 60°C, podemos concluir que a proteína AtAHAS não deverá estar presente em produtos processados utilizados na alimentação gerados a partir do evento Embrapa 5.1.

VI. 6. Os possíveis efeitos deletérios do OGM em animais prenhes e seu potencial teratogênico.

A segurança do feijoeiro Embrapa 5.1 em termos de saúde humana e animal e meio ambiente foi demonstrada com base nos resultados de uma série de estudos sobre a avaliação de segurança inter-relacionados apresentados neste documento. Com base nesses resultados concluímos que estudos pra avaliar os possíveis efeitos sobre animais no período de gestação, ou com potencial teratogênico, não são pertinentes para o evento Embrapa 5.1 e o siRNA e a proteína AtAHAS expressada, pelos motivos apresentados abaixo e na seção VI.4.

A caracterização molecular do evento Embrapa 5.1 confirmou que este possui um único lócus onde os transgene estão inseridos e embora tenha 3 cópias íntegras para o gene *AtAhas*, as análises de ELISA e de tolerância aos herbicidas da classe das imizadolininas demonstraram que o nível de proteína nesse evento é muito baixo, a ponto de estar praticamente no limite da detecção (seção V.10). Além disso, os níveis de siRNA nos grãos estão também em níveis próximo de limite de detecção, como



demonstrado na seção V.10. A caracterização bioquímica da proteína AtAHAS tolerante à imidazolinona presente no feijoeiro Embrapa 5.1 mostrou que essa proteína é normal entre outras proteínas da extensa família AHAS, assim como a maioria das proteínas alimentares com histórico de uso seguro em alimentos e rações, e não tem características associadas às proteínas tóxicas ou alergênicos conhecidos. Entre as avaliações de segurança da proteína AtAHAS, foi mostrado que a proteína AtAHAS não provocou quaisquer efeitos adversos quando administrada aos ratos para engorda com nível de efeito não observável (NOEL) igual ou superior a 2.620 mg de proteína AtAHAS/kg peso corporal. Essa dosagem corresponde a um fator de segurança de mais de $1,2 \times 10^7$ vezes relativo à medida de consumo diário de feijoeiro para humanos no Brasil, supondo que todo os grãos de feijoeiro consumido contenha a proteína AtAHASL. Igualmente, o consumo direto de siRNA também não mostrou efeitos negativos em animais. A composição e a equivalência nutricional do evento Embrapa 5.1 em comparação às variedades de feijoeiro convencionais e ao parental Olathe foram demonstradas pela análise de nutrientes e antinutrientes importantes e a equivalência nutricional desse evento. Isso foi depois confirmado em estudos de alimentação de *Rattus norvegicus*. Os resultados do estudo de alimentação *R. norvegicus* demonstraram que não houve diferenças estatísticas significativas ($P > 0,05$) no peso do corpo, no ganho de peso e no consumo de ração. Além disso, nenhum efeito adverso foi observado nos animais alimentados com a dieta contendo feijão Embrapa 5.1 ou com seu parental não-GM, o que confirma as avaliações do feijão Embrapa 5.1 em animais em gestação ou com potencial teratogênico não são adequados. Com base nos resultados do estudo, conclui-se que o alimento derivado do feijão Embrapa 5.1, em bases nutricionais, é comparável aos alimentos provenientes das variedades de feijoeiro que são cultivadas comercialmente, e que ele é tão benéfico à alimentação animal quanto aos que são produzidos por meio das variedades de feijão convencional. Por fim, avaliações agronômicas e fenotípicas abrangentes, assim como as interações ecológicas do feijoeiro Embrapa 5.1, mostram que o cultivo da variedades derivadas desse evento não apresenta impacto ambiental potencial maior do que o cultivo das variedades de soja convencional.

Os resultados desses estudos mostram como o feijoeiro Embrapa 5.1 é tão seguro pra o uso em alimentos e rações e para o meio ambiente quanto o feijoeiro



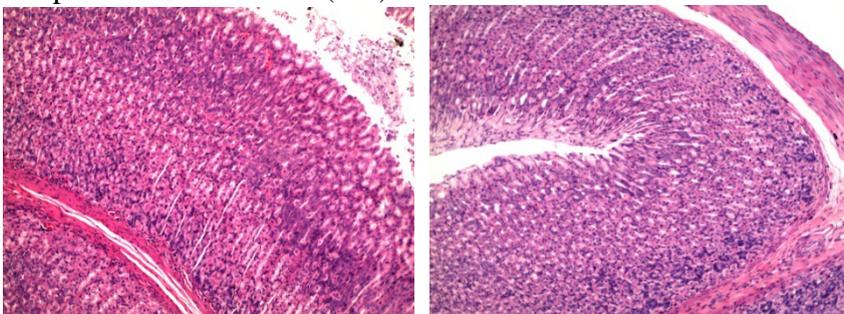
convencional e controles (banco de dados de feijoeiros cultivados em várias regiões do Brasil), e não apresentam quaisquer riscos notáveis para animais em gestação ou com potencial teratogênico, sendo como o feijão usado atualmente para produção de alimentos.

VI. 7. Conclusões de análises imunológicas e histológicas de tecidos relevantes, especialmente do trato digestivo.

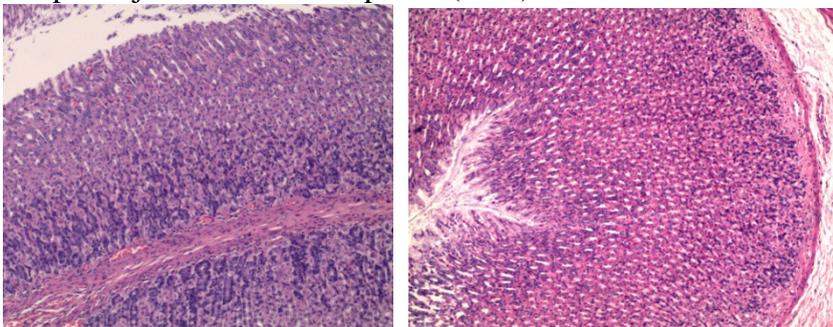
Dois estudos foram conduzidos com animais para confirmar a segurança nos alimentos. Em primeiro lugar, foi conduzido um experimento com *R. norvegicus* com o objetivo era comparar o desempenho dos animais alimentados com o feijoeiro Embrapa 5.1 ao desempenho daqueles alimentados com grãos de feijoeiro convencional. Os resultados do estudo de alimentação de animais demonstraram que não houve diferenças estatísticas significativas ($P>0,05$) no peso corpóreo, no ganho de peso, no consumo de ração e na conversão alimentar entre os animais alimentados com a ração que continha o evento Embrapa 5.1 e aqueles alimentados com a ração que continha grãos convencionais (Olathe) (seção VI. 4). Além disso, nenhum efeito adverso foi observado nos animais alimentados com a dieta de feijoeiro Embrapa 5.1. Portanto, considerando os resultados, não houve base científica para conduzir análises imunológicas.

Em um segundo estudo, foram realizadas análises morfológicas de acordo com as técnicas laboratoriais de rotina, com mensuração do peso e tamanho dos órgãos após autopsia (seção VI.4). Foram realizadas análises histológicas e realizadas medições de altura de mucosa e submucosa gástrica e das vilosidades do intestino delgado e grosso (μm). Já para o fígado e rins realizou-se análise de imagem para detecção de possíveis alterações ou lesões patológicas. Os resultados estão mostrados nas figuras VI.16, VI.17, VI.18, VI.19, VI.20, VI.21, VI.22, VI.23, VI.24, VI.25, VI.26, VI.27, VI.28 e VI.29).

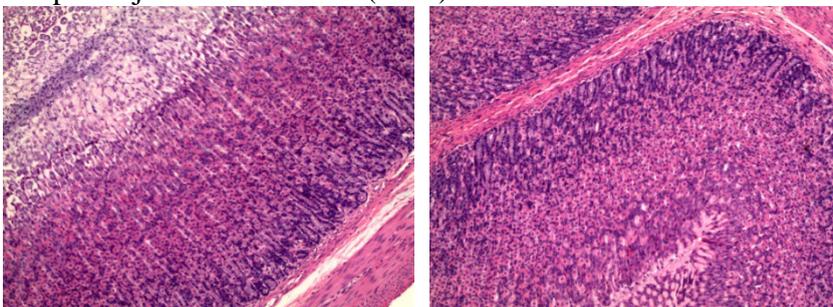
Grupo Controle-Caseína (GC):



Grupo Feijão Evento Embrapa 5.1 (GFT):



Grupo Feijão Convencional (GFC):



Grupo Aprotéico (GA):

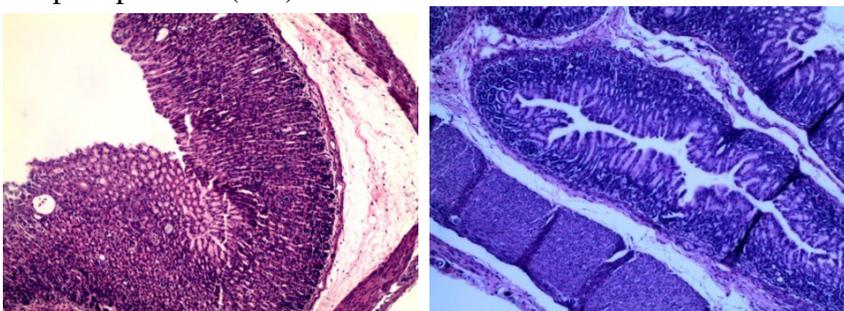


Figura VI.16. Revestimento do estômago, com ênfase na mucosa e submucosa do corpo do estômago dos animais GC (controle-caseína), GFT (evento Embrapa 5.1), GFC (feijão comum) e GA (aprotéico), submetidos a 45 dias de tratamento com 10% de proteína (lente 10x/0,25).

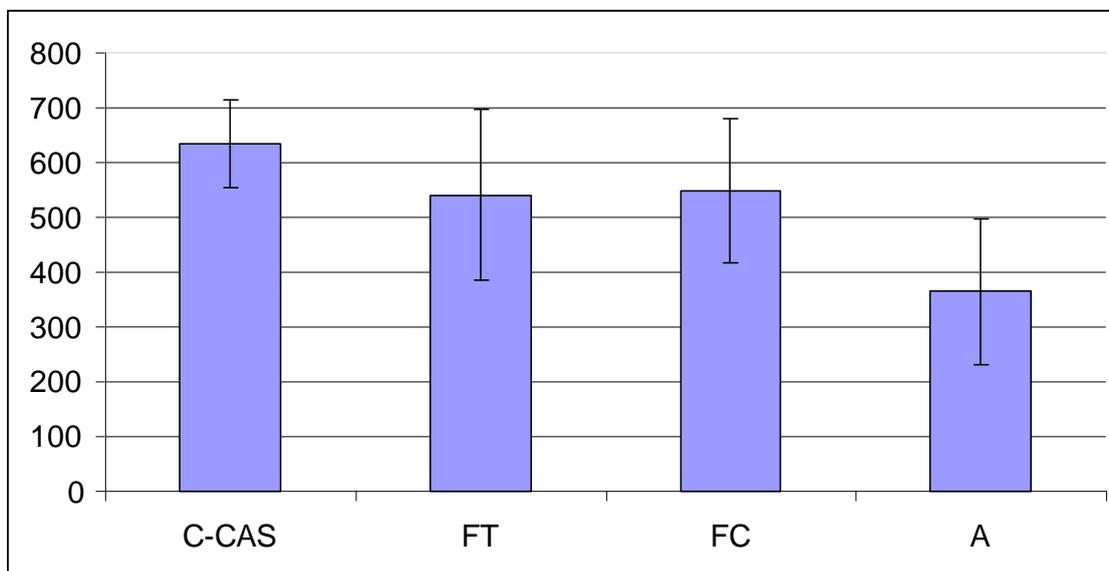
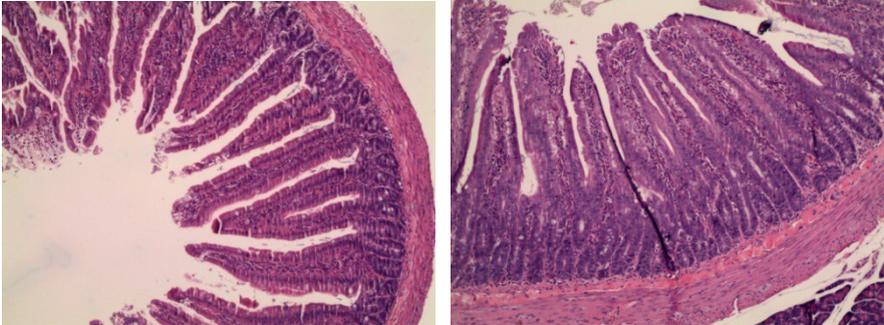


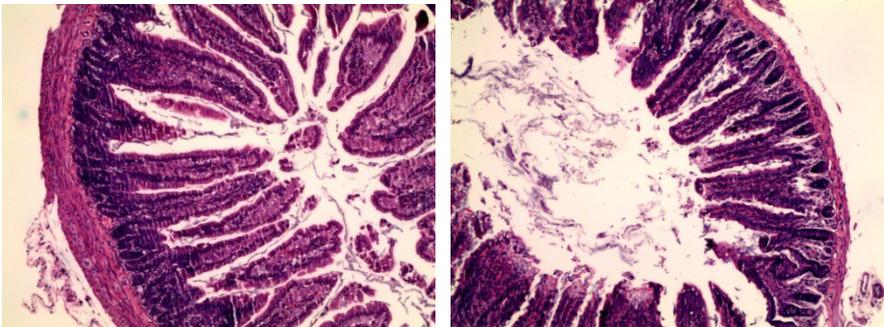
Figura VI.17. Altura (μm) das mucosas de revestimento do estômago dos animais (ratos Wistar) com 64 dias de idade, submetidos a 45 dias de tratamento: C (controle-caseína), FT (evento Embrapa 5.1), FC (feijão convencional) e A (aprotéico).

A altura média das mucosas gástricas dos tratamentos FT (evento Embrapa 5.1) e FC (feijão comum) foi, respectivamente, 540 ± 155 e $548,6 \pm 131\mu\text{m}$. O grupo controle-caseína apresentou a maior média $634 \pm 80\mu\text{m}$ e o grupo aprotéico, a menor, $364 \pm 133\mu\text{m}$. Não foi observada nenhuma evidência de alteração patológica, incidente ou severa, ou mesmo de lesões no estômago e no tecido de revestimento entre os grupos experimentais FT, FC e controle-caseína (Figuras VI.16 e VI.17)

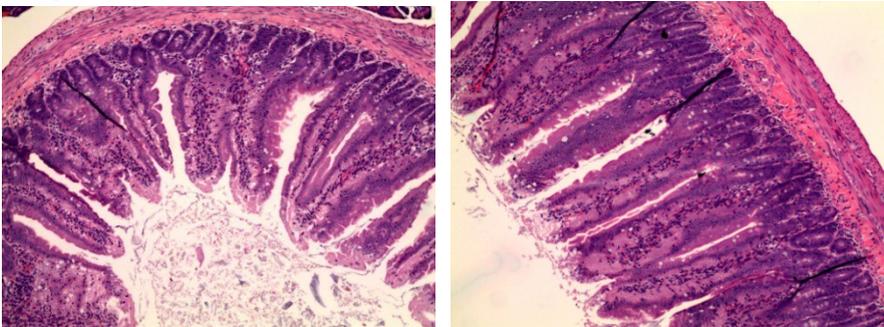
Grupo Controle-Caseína (GC):



Grupo Feijão Evento Embrapa 5.1 (GFT):



Grupo Feijão Convencional (GFC):



Grupo Aprotéico (GA):

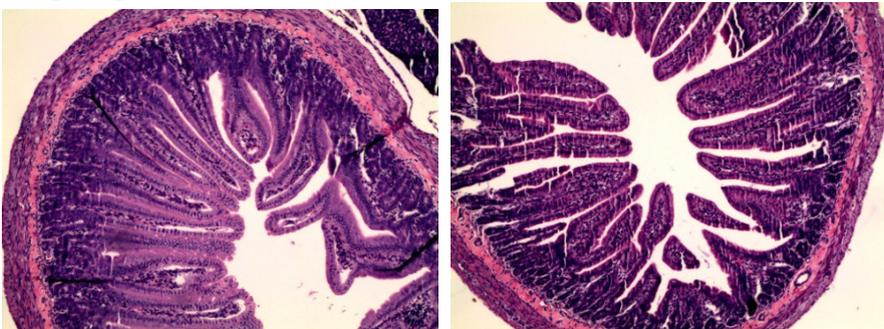


Figura VI.18. Intestino delgado, com ênfase nas vilosidades do duodeno dos animais GC (controle-caseína), GFT (evento Embrapa 5.1), GFC (feijão comum) e GA (aprotéico) submetidos a 45 dias de tratamento com 10% de proteína (lente 10x/0,25).

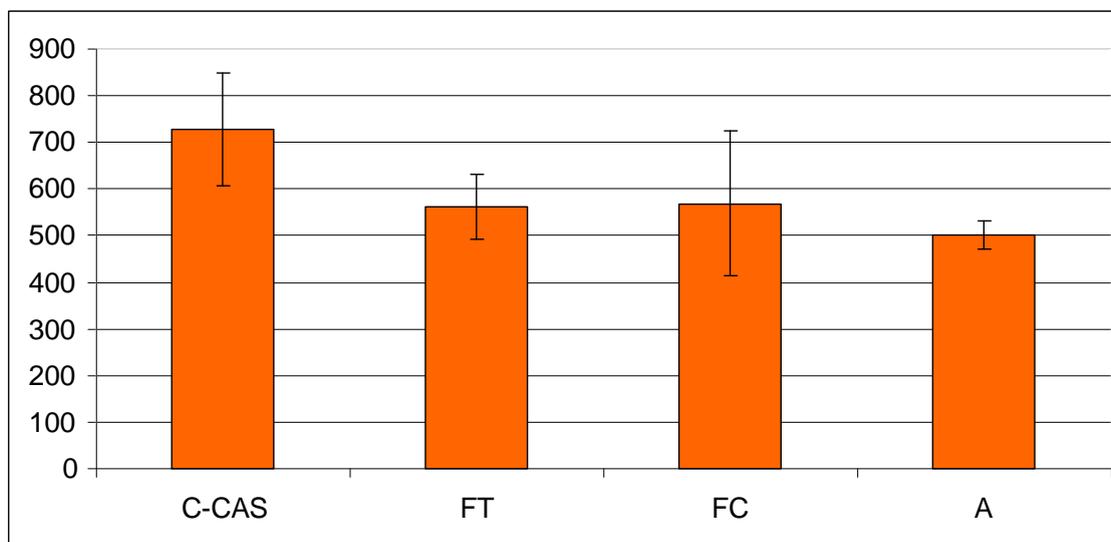


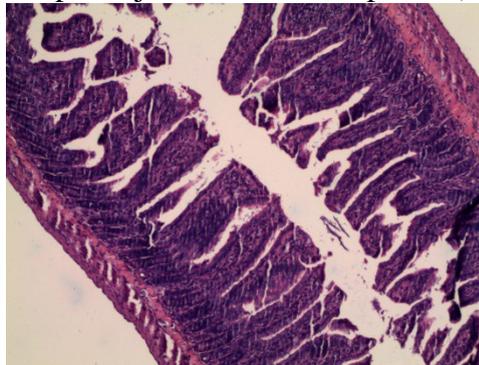
Figura VI.19. Altura (μm) das vilosidades do intestino delgado (duodeno) dos animais (ratos Wistar) com 64 dias de idade, submetidos a 45 dias de tratamento: C (controle-caseína), FT (evento Embrapa 5.1), FC (feijão convencional) e A (aprotéico).

A altura média das vilosidades do intestino delgado (duodeno) dos tratamentos FT (evento Embrapa 5.1) e FC (feijão comum) foi, respectivamente, 562 ± 70 e $568,8 \pm 155\mu\text{m}$. O grupo controle-caseína apresentou a maior média $727,8 \pm 120\mu\text{m}$ e o grupo aprotéico, a menor, $501 \pm 30\mu\text{m}$. Não foi observada nenhuma evidência de alteração patológica, incidente ou severa, ou mesmo de lesões na estrutura do etitélío do duodeno e nas vilosidades entre os grupos experimentais FT, FC e controle-caseína (Figuras VI.18 e VI.19).

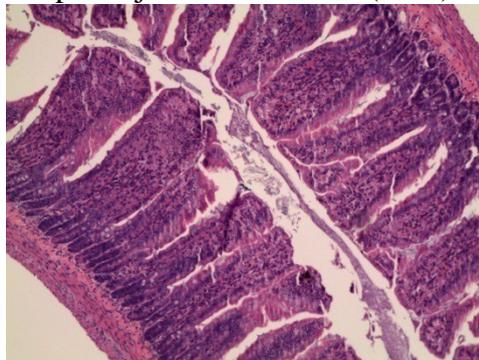
Grupo Controle-Caseína (GC):



Grupo Feijão Evento Embrapa 5.1 (GFT):



Grupo Feijão Convencional (GFC):



Grupo Aprotéico (GA):

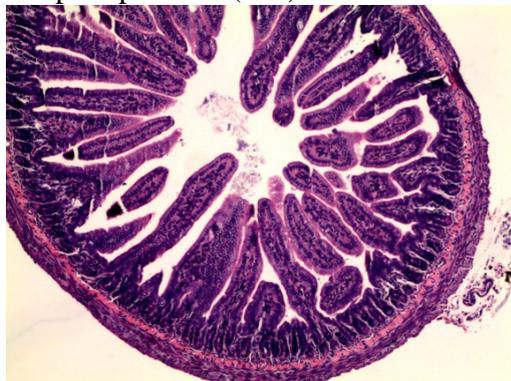


Figura VI.20. Intestino delgado, com ênfase nas vilosidades do jejuno dos animais GC (controle-caseína), GFT (evento Embrapa 5.1), GFC (feijão comum) e GA (aprotéico), submetidos a 45 dias de tratamento com 10% de proteína (lente 10x/0,25).

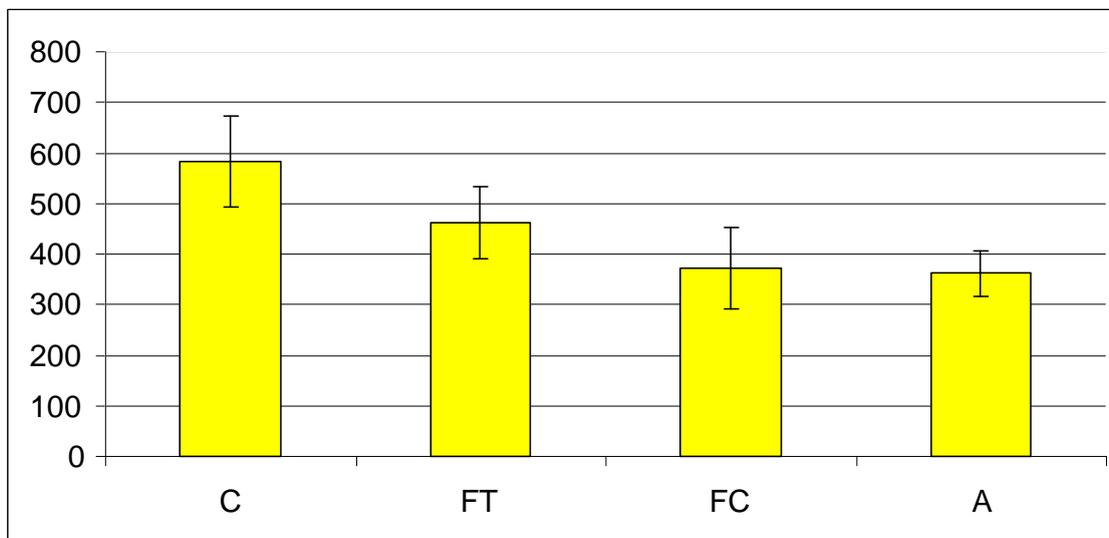
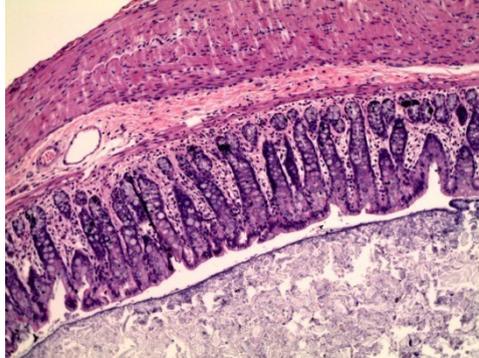


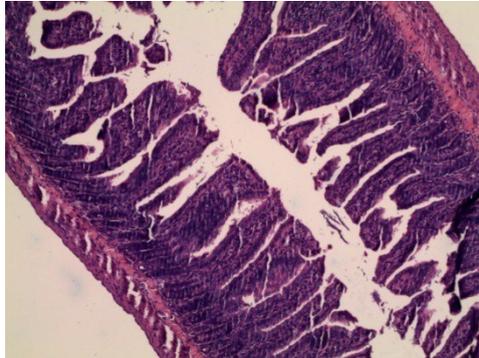
Figura VI.21. Altura (μm) das vilosidades do intestino delgado (jejuno) dos animais (ratos Wistar) com 64 dias de idade, submetidos a 45 dias de tratamento: C (controle-caseína), FT (evento Embrapa 5.1), FC (feijão convencional) e A (aprotéico).

A altura média das vilosidades do intestino delgado (jejuno) dos tratamentos FT (evento Embrapa 5.1) e FC (feijão comum) foi, respectivamente, 462 ± 71 e $373 \pm 80\mu\text{m}$. O grupo controle-caseína apresentou a maior média $582 \pm 90\mu\text{m}$ e o grupo aprotéico, a menor, $362 \pm 45\mu\text{m}$. Não foi observada nenhuma evidência de alteração patológica, incidente ou severa, ou mesmo de lesões na estrutura do etitêlio do jejuno e nas vilosidades entre os grupos experimentais FT, FC e controle-caseína (Figuras VI.20 e VI.21).

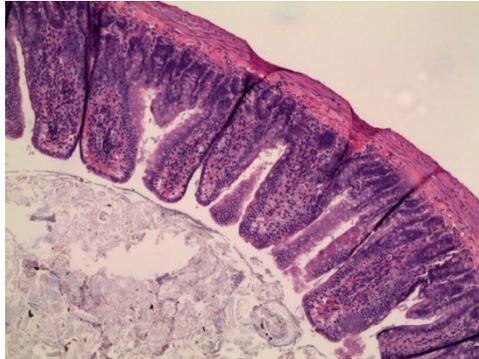
Grupo Controle-Caseína (GC):



Grupo Feijão Evento Embrapa 5.1 (GFT):



Grupo Feijão Convencional (GFC):



Grupo Aprotéico (GA):

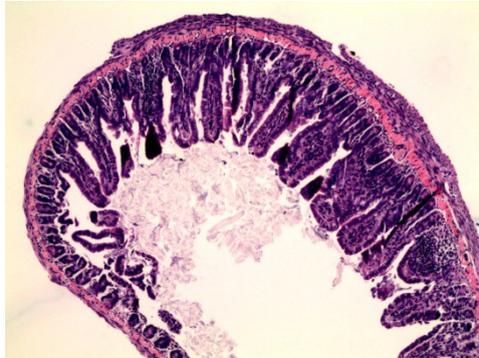


Figura VI.22. Intestino delgado, com ênfase nas vilosidades do íleo dos animais GC (controle-caseína), GFT (evento Embrapa 5.1), GFC (feijão comum) e GA (aprotéico), submetidos a 45 dias de tratamento com 10% de proteína (lente 10x/0,25)

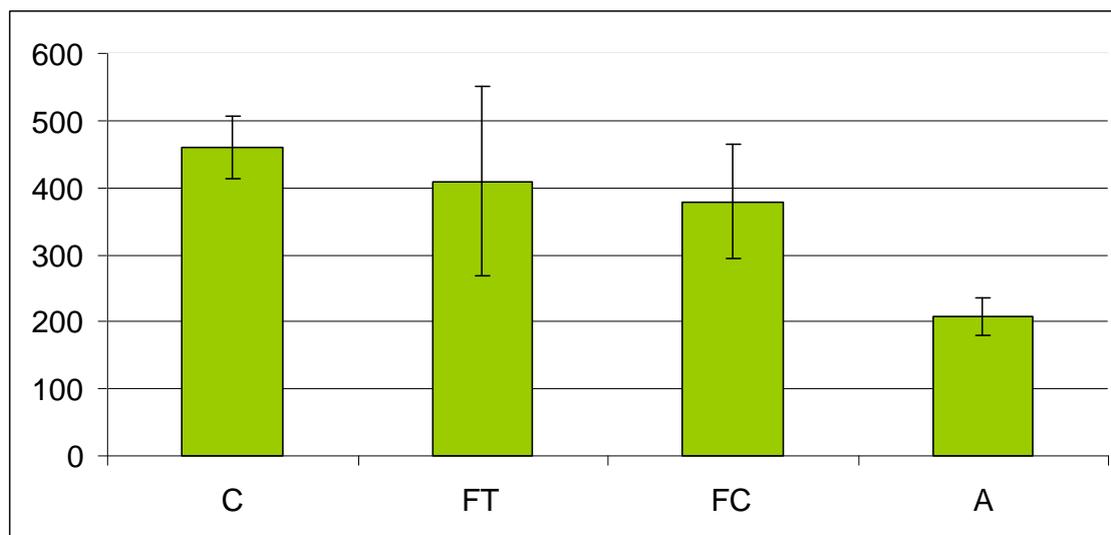
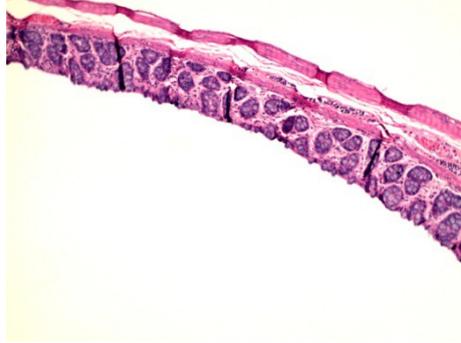


Figura VI.23. Altura (μm) das vilosidades do intestino delgado (íleo) dos animais (ratos Wistar) com 64 dias de idade, submetidos a 45 dias de tratamento: C-Cas (controle-caseína), FT (evento Embrapa 5.1), FC (feijão convencional) e A (aprotéico).

A altura média das vilosidades do intestino delgado (íleo) dos tratamentos FT (evento Embrapa 5.1) e FC (feijão comum) foi, respectivamente, 409 ± 140 e $378 \pm 85\mu\text{m}$. O grupo controle-caseína apresentou a maior média $459 \pm 47\mu\text{m}$ e o grupo aprotéico, a menor, $207 \pm 28\mu\text{m}$. Não foi observada nenhuma evidência de alteração patológica, incidente ou severa, ou mesmo de lesões na estrutura do etitêlio do íleo e nas vilosidades entre os grupos experimentais FT, FC e controle-caseína (Figuras VI.22 e VI.23).

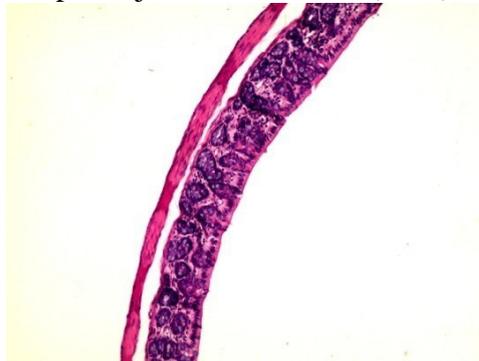
Grupo Controle-Caseína (GC):



Grupo Feijão Evento Embrapa 5.1 (GFT):



Grupo Feijão Convencional (GFC):



Grupo Aprotéico (GA):

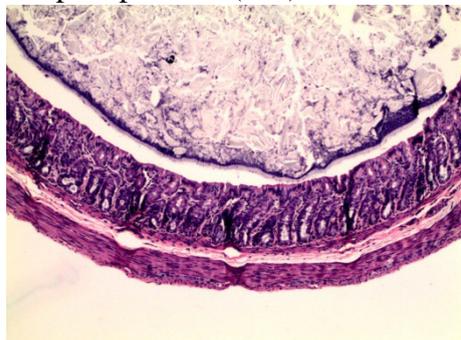


Figura VI.24. Intestino delgado, com ênfase nas vilosidades do cólon dos animais GC (controle-caseína), GFT (evento Embrapa 5.1), GFC (feijão comum) e GA (aprotéico), submettidos a 45 dias de tratamento com 10% de proteína (lente 10x/0,25).

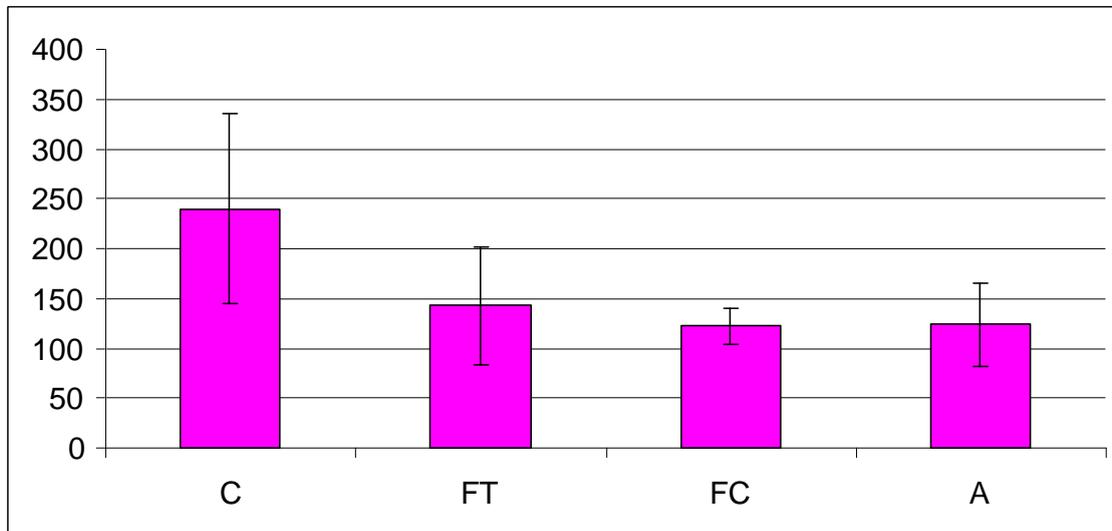
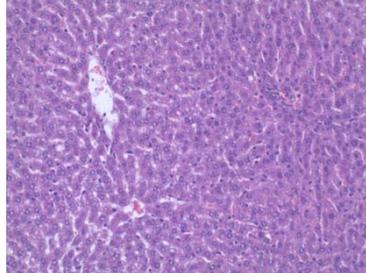
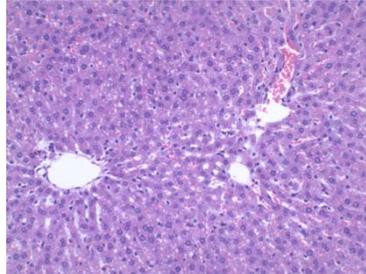


Figura VI.25. Altura (μm) das vilosidades do intestino grosso (c33lon) dos animais (ratos Wistar) com 64 dias de idade, submetidos a 45 dias de tratamento: C (controle-case33na), FT (evento Embrapa 5.1), FC (feij33o convencional) e A (aprot33ico).

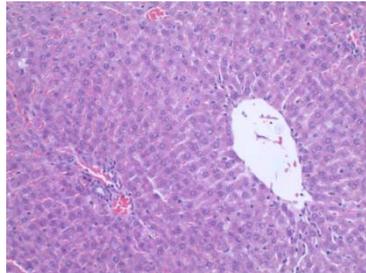
Grupo Controle-Caseína (GC):



Grupo Feijão Evento embrapa 5.1 (GFT):



Grupo Feijão Convencional (GFC):



Grupo Aprotéico (GA):

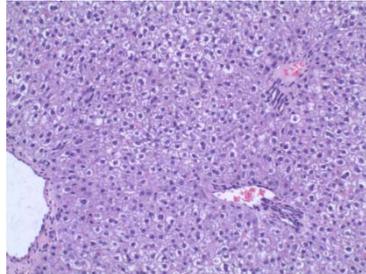


Figura VI.26. Tecido hepático, com ênfase nos hepatócitos dos animais GC (controle-caseína), GFT (evento Embrapa 5.1), GFC (feijão comum) e GA (aprotéico), submetidos a 45 dias de tratamento com 10% de proteína (lente 20x/0,25).

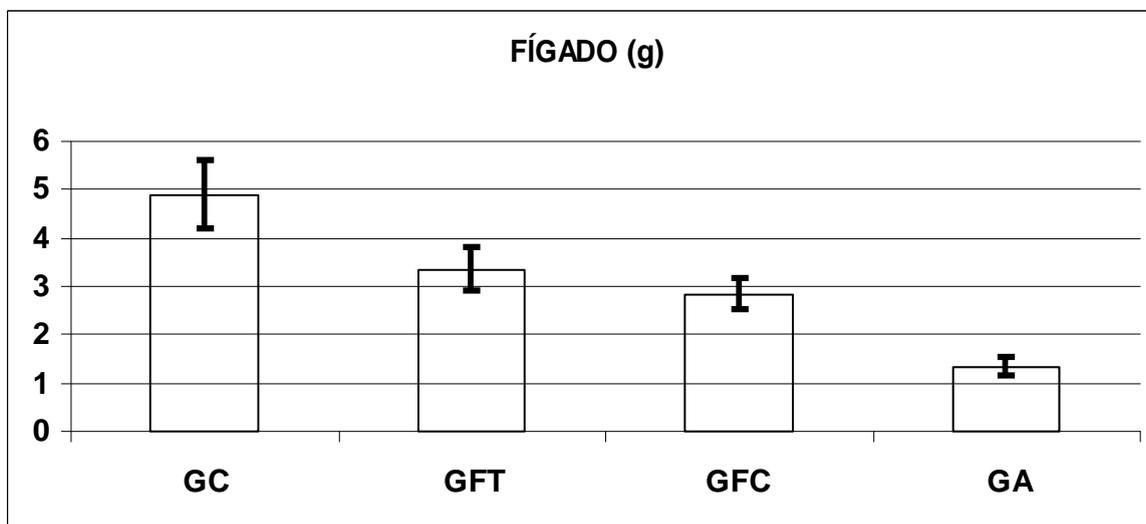
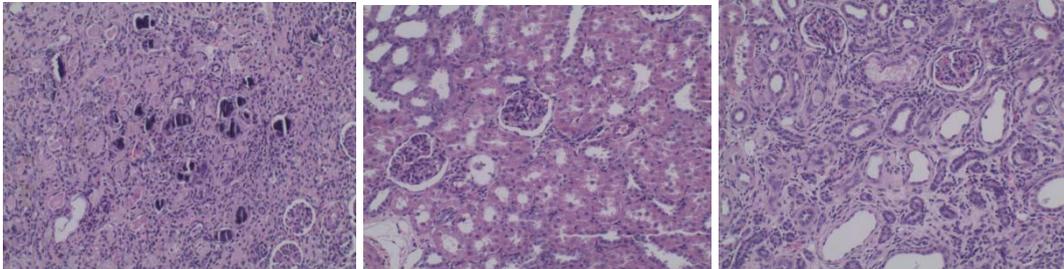


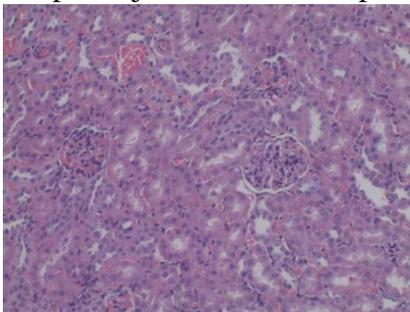
Figura VI.27. Peso (g) do fígado dos animais GC (controle-caseína), GFT (evento Embrapa 5.1), GFC (feijão comum) e GA (aprotéico) submetidos a 45 dias de tratamento com 10% de proteína.

De acordo com as figuras VI.26 e VI.27, não há alteração entre o tecido hepático dos grupos experimentais FT, FC e Controle. Apenas o grupo Aprotéico apresentou citoplasma vacuolizado em relação aos demais grupos, devido à dieta sem proteína e baixa ingestão alimentar, o que promoveu menor acúmulo de glicogênio devido à desnutrição induzida. Com relação ao peso do fígado, após autopsia, observa-se que o grupo FT apresentou maior valor em relação ao grupo FC, porém esse valor não é significativo e não ocorreram alterações patológica, incidente ou severa, ou mesmo de lesões, quando comparado com os grupos FC e controle-caseína.

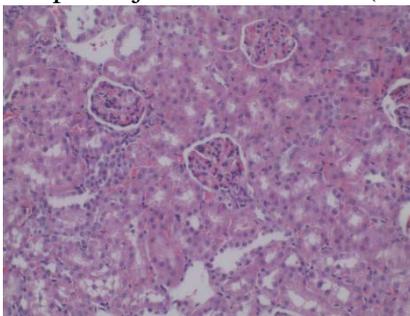
Grupo Controle-Caseína (GC):



Grupo Feijão Evento embrapa 5.1 (GFT):



Grupo Feijão Convencional (GFC):



Grupo Aprotéico (GA):

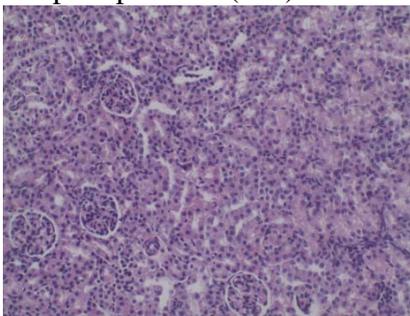


Figura VI.28. Tecido renal (região cortical), com ênfase nas células renais dos animais GC (controle-caseína), GFT (evento Embrapa 5.1), GFC (feijão comum) e GA (aprotéico), submetidos a 45 dias de tratamento com 10% de proteína (lente 20x/0,25).

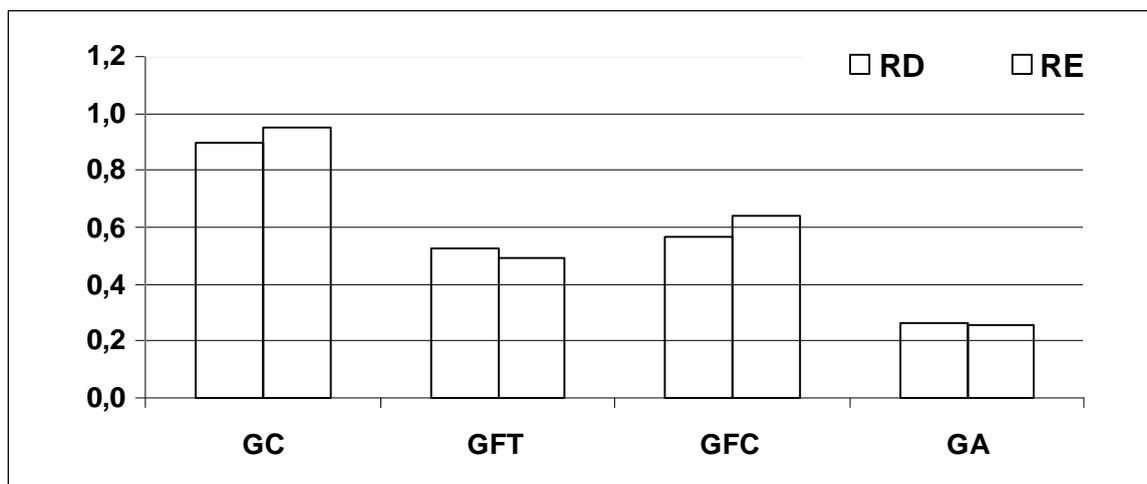


Figura VI.29. Peso (g) dos rins (RD: rim direito e RE: rim esquerdo) dos animais C (controle-caseína), A (aprotéico), FT (evento Embrapa 5.1) e FC (feijão comum) submetidos a 45 dias de tratamento com 10% de proteína.

As análises das imagens histológicas indicam que não há alterações patológicas, incidentes ou severas, ou mesmo de lesões no tecido renal dos grupos experimentais FT, FC e A (Figuras VI.28 e VI.29). Somente o grupo Controle-Caseína apresentou áreas alteradas com fibrose intersticial, atrofia tubular e dilatação tubular devido ao desenvolvimento de hidronefrose, por causa da fonte protéica utilizada na formulação da ração (AIN-93G), o que também contribuiu com o maior peso destes órgãos em relação aos demais grupos.

VI. 8. A capacidade do OGM de produzir toxinas ou metabólitos que causem efeitos adversos ao consumidor, animal ou humano, relatando as evidências experimentais.

O evento de feijão Embrapa 5.1 foi transformado com o vetor pBGMVRNAiAHAS que contém o cassete de expressão $\Delta AC1hpRNA$ e $AtAhas$ (com seu promotor e região não traduzida 3' (3'UTR) nativos).



O gene quimérico *ΔACIhpRNA* consiste de um cassete com a finalidade de expressar um RNA-grampo (hpRNA), formando estrutura de dupla fita, composto de um fragmento de 411 pb do gene *rep* do BGMV posicionado em senso e antisenso intercalados pelo intro do gene *pdk* de *Flaveria trinervia* (*Viridiplantae, Asteraceae*). O RNA fita dupla (dsRNA) desencadeia uma sequência de degradação de RNA mensageiro (mRNA) específicos, em um processo conhecido como RNA interferente (RNAi) onde o dsRNA é processado por enzimas DICER-like em pequenos RNA interferentes (siRNA) de 21 a 26 nt (Hamilton & Baulcombe, 1999). Uma fita do siRNA é relaxada e incorporada a um complexo ribonucleoprotéico (RISC), que contém um membro da família das proteínas Argonaute (AGO) (Brodersen & Voinnet, 2006), guiando esse complexo para um mRNA com uma sequência complementar, que será clivada, levando ao silenciamento gênico. O mecanismo está descrito na seção V.3 desse documento.

siRNA correspondentes aos esperados como resultado da expressão do gene quimérico *ΔACIhpRNA* foram analisados em sementes de feijoeiro em diversos estágios de desenvolvimento (10, 15, 20 e 25 dias após a polinização; estágios fonológicos de R8 a R9). Os resultados mostram que o nível de siRNA em sementes de qualquer estágio analisado é muito inferior ao observado nas folhas. Mesmo em baixo nível de estringência o nível de siRNA observado das sementes está próximo do nível de detecção (dados apresentados na seção V.10). Uma vez que há a possibilidade do consumo de sementes imaturas de feijão, os resultados mostram que não há diferença, mesmo se comparados aos das sementes secas (forma mais comum de consumo do feijão). O mesmo pode ser dito de sementes embebidas por um período de 16h, o que mimetiza uma prática comum no Brasil de embeber os grãos por o período de uma noite antes do cozimento. Tentativas de isolamento de siRNA ou mesmo RNA total de sementes maduras ou imaturas (incluindo vagens) após o cozimento resultaram sem sucesso. RNA maiores correspondentes às sequências do gene quimérico *ΔACIhpRNA* de tamanhos superiores aos dos siRNA (>24 nt) também não foram observados em qualquer situação analisada, tanto em folhas quanto em sementes.

Análises *in silico* mostraram que não existem sequências com significativo potencial de gerar silenciamento de genes em mamíferos que entrem em contato com esse evento, mesmo que fosse biologicamente possível. Além disso, cabe ressaltar que é



possível detectar os siRNAs correspondentes ao gene viral *rep* em plantas infectadas presentes no campo. Não existe qualquer evidência que um vírus capaz de infectar plantas cause qualquer efeito negativo em mamíferos.

Além disso, animais foram alimentados via oral diariamente com uma solução contendo 6 mg de RNA total isolado de folhas. Isso significa que os animais ingeriram cerca de 100 vezes o valor que seria possível ser consumido considerando a relação massa/ peso do indivíduo. Além disso, deve-se considerar que as folhas têm quantidades de siRNA muito superiores aquelas encontradas nas sementes o que aumenta consideravelmente a robustez desse experimento. Devemos ainda considerar que o feijão é consumido após cozimento, quando níveis de RNA totais estão abaixo do que pôde ser detectado, levando à conclusão que seria ainda mais difícil detectar siRNA em grãos de feijão cozidos. Apesar disso nenhum efeito negativo foi observado em machos ou fêmeas de ratos Wistar.

Existem outros exemplos de plantas geneticamente modificadas para silenciamento de um gene que foram aprovadas para comercialização: os eventos de tomate desenvolvidos pelas empresas Monsanto (Calgene) (Flavr SavrTM), Zeneca, DNA Plant Technology's 'Endless Summer e Agritope; o mamoeiro resistente ao vírus da mancha anelar (*Papaya ring spot virus*). No momento da geração desses eventos o mecanismo molecular de silenciamento era vago, uma vez que foram gerados pela estratégia de RNA antisenso ou genes trucados (<http://www.agbios.com>; <http://rasm.icgeb.org/>), análises posteriores já confirmaram a presença siRNA (Krieger et al., 2008; Frizzi & Huang, 2010). Outros eventos com construções para silenciamento gênico foram aprovadas mais recentemente, como é o caso da soja com supressão da $\delta 12$ desaturase (FAD2-1) PlenishTM (DuPont) (evento DP-305423-1). Vale ainda mencionar que sequência invertidas (IR) têm sido encontradas naturalmente em plantas. Por exemplo, em arroz a mutação LGC-1 (low glutelin content-1) gera grãos adequados para o consumo humano, uma vez que a glutelina é restritiva para uma parcela da população (Frizzi & Huang, 2010). A explicação molecular para esse fenótipo é uma deleção no alelo LGC-1 entre dois genes da glutelina altamente similares, resultando em uma sequência IR. siRNA derivados dessa IR causa o silenciamento da família multigênica da glutelina (Kusaba et al., 2003). Outro exemplo é o da soja cujo tegumento da semente é amarela, gerado por uma IR que ocorre naturalmente no gene



endógeno da chalcone sintase (CHS) silenciando todas as cópias dos genes *chs*, inibindo a pigmentação do tegumento (Tuteja et al., 2004).

O gene *AtAhas* de *Arabidopsis thaliana* codifica a subunidade maior da enzima acetohidroxiácido sintase (AtAHAS) (também chamada de acetolactato sintase (EC 4.1.3.18), que confere o fenótipo de tolerância aos herbicidas do grupo químico das imidazolinonas. A enzima AtAHAS é naturalmente encontrada em plantas e microorganismos. Essa enzima catalisa a primeira etapa da biossíntese dos aminoácidos ramificados (valina, leucina e isoleucina) (Sathasivan et al., 1990). Essa enzima catalisa a condensação de suas moléculas de piruvato para formar uma molécula de acetolactato, que é o precursor de valina e leucina. Ela catalisa também a condensação de uma molécula de piruvato com uma molécula de 2-cetobutirato para formar 2-aceto-2-hidroxi-butirato, um intermediário na biossíntese de isoleucina (Delfourne et al., 1994). O gene *AtAhas* codifica uma pré-proteína de 670 aminoácidos que inclui um peptídeo de trânsito de 55 aminoácidos na região N-terminal de endereçamento para o cloroplasto. Durante o transporte para o cloroplasto, o peptídeo de trânsito é clivado para produzir a enzima ativa de aproximadamente 64 kDa (Mazur et al., 1987). A regulação da transcrição do gene *AtAhas* no evento Embrapa 5.1 está sob o controle do seu promotor nativo de *A. thaliana*, que está localizado entre a região 5' da sequência codificante de *AtAhas*. A terminação da transcrição do gene *AtAhas* é controlada pelas sequências de terminação da transcrição do próprio gene dentro da região 3' não-traduzida (UTR) localizada a jusante da região codificante. Inicialmente a região a montante da região codificante, de 2.483 pb, foi inicialmente anotada como a região promotora do gene *AtAhas*. Entretanto, análises genômicas posteriores revelaram que este segmento também contém um gene de *Arabidopsis thaliana* até então não anotado, que codifica a subunidade gama da proteína SEC61 (*Atsec61γ*). A proteína SEC61 é uma proteína multimérica de transporte localizada no retículo endoplasmático, que está presente em todas as plantas e outros eucariontes (Hartmann et al., 1994). Experimentos de RT-PCR indicaram que a expressão do gene *Atsec61γ* não foi detectada em diversos tecidos do evento Embrapa 5.1. Esses dados estão apresentados na seção V.10. Como mencionado anteriormente, o gene *AtAhas* foi utilizado unicamente para permitir a seleção do eventos de transformação. O evento Embrapa 5.1 não apresenta tolerância significativa aos herbicidas do grupo das imidazolinonas (dados apresentados na seção



VII.11). Além disso, não foi possível detectar altos níveis da proteína AtAHAS por ELISA (dados apresentados na seção V.10). Em realidade os níveis de proteína AtAHAS estão tão baixos que os valores obtidos nas análises de ELISA estão próximos do basal encontrados em plantas de Olathe. Isso é condizente com a baixa tolerância aos herbicidas do grupo químico das imidazolinonas (dados mostrados na seção V.10 e VII.11). Também não foi possível detectar AtAHAS nas sementes do evento Embrapa 5.1.

A toxicidade potencial de AtAHAS foi avaliada por ensaios envolvendo sua administração em ratos. A proteína purificada foi administrada a grupos de cinco machos e cinco fêmeas de ratos CD – 1 em uma dose de 5.000 mg/kg do peso do corpo (que corresponde a 2.620 mg de proteína AtAHAS/kg do peso do animal). Após a administração da proteína, os animais foram mantidos em observação por 14 dias. Os animais foram examinados para verificar qualquer sinal clínico de anormalidade antes da primeira administração da proteína e em intervalos regulares a partir de então. Os pesos corpóreos foram determinados no dia da administração da substância-teste (dia 0) e nos dias de estudo 7 e 14. Os animais foram sacrificados no final do estudo com anestesia e avaliados para verificar patologias graves. Os pesos de órgãos selecionados (cérebro, baço, rins, fígado e coração) dos animais sacrificados foram determinados. Nenhum dos animais morreu durante o período dos animais sacrificados foram determinados. Nenhum dos animais morreu durante o período do estudo em consequência do tratamento com a proteína AtAHAS, portanto, a dose letal média (DL 50) não foi alcançada. Dessa forma, a DL50 pode ser considerada superior a 5.000 mg/kg do peso do corpo (ou superior a 2.620 mg de proteína AtAHASL/kg do peso do corpo) para os ratos machos e fêmeas CD-1. Nenhum dos animais apresentou sinais clínicos de toxicidade e não houve diferenças significativas no peso corpóreo dos animais tratados com a proteína AtAHAS em comparação ao grupo de controle. Não houve diferenças relevantes nos pesos absolutos médios dos diferentes órgãos selecionados entre o grupo teste e o controle. Em comparação com o controle, os machos tratados com a proteína AtAHAS tiveram um aumento estatisticamente significativo de 6% no peso relativo do fígado. No entanto, essa descoberta não foi considerada como relacionada ao tratamento já que os pesos absolutos dos fígados não estavam alterados no grupo tratado, se comparado ao grupo controle, e nenhum efeito foi observado nas



fêmeas. E também, os pesos relativos dos fígados, nos dois tratamentos e nos dois sexos, foram considerados dentro da faixa de valores biológicos normais dos animais teste daquela idade. Para todos os outros órgãos, não houve diferenças relevantes nos parâmetros de peso relativo entre o grupo tratamento e controle. Além disso, nenhuma lesão grave relacionada ao tratamento foi observada no estudo. Portanto, conclui-se que nenhuma descoberta relacionada à proteína AtAHAS foi observada. Como tal, o nível de efeito não observável foi a dose limite de 5.000 mg/kg do peso do corpo (2.620 mg de proteína AtAHAS/kg do peso do corpo) para os ratos machos e fêmeas CD-1. Esses resultados confirmam a natureza atóxica da proteína AtAHAS nos mamíferos. Isso é esperado uma vez que essas proteínas são consumidas regularmente por mamíferos, pois estão presentes em todos os vegetais utilizados na alimentação.

O gene *ahas* de *Phaseolus vulgaris* (*PvAhas*) foi também clonado para a composição desse processo (acesso do GenBank No. GQ466185) e possui uma similaridade de sequência de 75% com o gene *AtAhas* e uma similaridade na sequência de aminoácidos de 83%. A similaridade nas regiões catalíticas, encontradas na superfamília das enzimas dependentes de tiamina difosfato (ThDP), é entre 98-100%.

Análises de RT-PCR semi-quantitativas foram realizadas para detectar transcritos correspondentes aos genes *AtAhas* e *Atsec61* presentes no genoma do evento Embrapa 5.1. Os resultados mostraram não foi possível detectar transcritos do gene *Atsec61*. De qualquer forma essa proteína é extremamente similar a várias outras proteínas presentes em plantas consumidas pelo homem, tanto cruas quanto cozidas.

O feijão é consumido essencialmente cozido, uma vez que grãos de feijão crus causam efeitos negativos em mamíferos devido à presença de proteína antinutricionais. Experimentos realizados com animais não mostraram qualquer efeito negativo após o consumo sistemático de feijoeiro Embrapa 5.1 durante toda a vida.

Os resultados das análises *in silico*, *in vitro* e *in vivo* demonstram claramente que o evento de feijoeiro Embrapa 5.1 é tão seguro para o consumo humano ou de animais quanto o seu parental. Nas análises moleculares não foram encontradas razões para a ocorrência de metabólitos não esperados além daqueles já mencionados. A exceção se dá para a possibilidade de ocorrência de um peptídeo de 11 resíduos de amino ácidos (MAHGSGREVSC). No entanto as análises por RT-PCR não mostraram a ocorrência dos transcritos correspondentes. Além disso, análises ideacionais mostram que não há



similaridade de sequência ou de parâmetros físico-químicos entre esse peptídeo teórico e os peptídeos conhecidos que podem ter efeitos negativos em células animais.

VI. 9. as avaliações toxicológicas e farmacológicas realizadas em animais experimentais, descrevendo os resultados.

Para determinar possíveis efeitos sobre mamíferos alimentados com grãos de feijão do evento Embrapa 5.1 foram realizadas as análises químicas e bioquímicas do sangue de cada animal para determinação de uréia (U) e creatinina (Cr) para avaliação de disfunção renal; ALT-TGP (alanina aminotransferase - transaminase glutamicopirúvica) e AST-TGO (aspartato aminotransferase – transaminase glutamico oxalacética) para avaliar injúria hepática; fosfatase alcalina (FA) e proteína total sérica (PTs) para avaliar disfunção hepática. Todas estas análises foram realizadas pelo Laboratório de Patologia Clínica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP Campus Botucatu, SP.

Tabela VI.10. Valores médios dos índices bioquímicos do soro para ratos Wistar machos recém-desmamados, submetidos a 45 dias de tratamento com 10% de proteína: GC (controle-caseína), GFT (evento Embrapa 5.1), GFC (feijão comum) e GA (aprotéico).

Tratamentos	U mg/dL	Cr mg/dL	ALT-TGO UI/L	AST-TGO UI/L	FA UI/L	PTs g/dL
GC	52,7	0,8	14	126	180,5	6,1
GFT	16,25	0,5	30	283,2	172,5	8,8
GFC	27	0,4	23,5	154,7	157	7,9
GA	22,5	0,6	12,5	180,7	190	6,0

De acordo com a tabela VI.10 acima, os valores médios de uréia e creatinina foram maiores para o grupo GC devido à injúria renal já detectada nas análises histológicas. Comparando os resultados entre os grupos GFT e GFC, observa-se que apesar do grupo GFT ter tido valores médios maiores para a maioria dos índices bioquímicos, os mesmos não se correlacionam com as imagens histológicas do fígado que não apresentou alterações patológicas ou lesões. A dificuldade em encontrar valores de referência para estes índices na literatura limita a comparação destes resultados, mesmo que tenha sido incluído um grupo controle, pois o mesmo apresentou alterações



histológicas significativas no tecido renal, comprometendo o metabolismo em geral. De forma geral os dados não mostraram diferenças significativas entre os animais que se alimentaram do feijoeiro Embrapa 5.1 (GFT) e aqueles que se alimentaram com seu parental não-GM (GFC; Olathe).

Além disso, um estudo foi conduzido para avaliar a toxicidade potencial da proteína AtAHA para mamíferos. Uma dose exagerada da proteína AtAHAS purificada (substância-teste) foi administrada a ratos por gavagem (administração oral, ingestão forçada). O método de gavagem foi escolhido para avaliar a segurança da proteína AtAHAS uma vez que as proteínas tóxicas são conhecidas por agir de maneira aguda (Jones & Maryanski, 1991; Sjoblad et al., 1992) e a exposição é por via oral. Além disso, não há relatos de proteínas que sejam mutagênicas nem carcinógenas (Pariza & Foster, 1983; Jones & Maryanski, 1991). A proteína AtAHASL foi produzida e purificada em sistema de super expressão em *Escherichia coli*. A proteína produzida em *E. coli* foi caracterizada bioquimicamente e demonstrada como equivalente à proteína AtAHAS produzida pelo evento Embrapa 5.1. A proteína AtAHAS purificada produzida em sistema de expressão de *E. coli* foi administrada por gavagem a grupos de cinco machos e cinco fêmeas de ratos CD®-1 em uma dose de 5.000 mg/kg do peso do corpo (corresponde a 2.620 mg de proteína AtAHAS/kg do peso do corpo). A dose foi dada em duas partes iguais de 2.500 mg/kg do peso corpóreo em um intervalo de aproximadamente uma hora. Essa dose representa a dose mais alta praticável com base na capacidade do sistema de teste e na solubilidade da proteína de teste. Os animais do grupo controle receberam água para beber com 0,5% de carboximetilcelulose por gavagem. Após a administração da substância-teste, os animais foram mantidos em observação por 14 dias. Os animais foram examinados para verificar qualquer sinal clínico de anormalidade antes da primeira administração da substância-teste e em intervalo de 15 minutos a seis horas depois disso. Em seguida, os animais foram observados diariamente para verificar qualquer sinal clínico de anormalidade. Os pesos dos corpos foram determinados no dia da administração da substância-teste (dia 0) e nos dias de estudo 7 e 14. Os animais foram sacrificados ao final do estudo com anestesia e avaliados para verificar patologias graves. Os pesos dos órgãos selecionados (cérebro, baço, rins, fígado e coração) dos animais sacrificados foram determinados.



Nenhum dos animais morreu durante o período do estudo em consequência do tratamento dos ratos com a substância-teste, portanto, uma dose mediana letal (DL₅₀) não foi alcançada. Dessa forma, DL₅₀ pode ser considerada superior a 5.000 mg/kg do peso do corpo (ou superior a 2.620 mg de proteína AtAHAS/kg do peso do corpo) para os ratos machos e fêmeas CD ®-1. Nenhum dos animais mostrou sinais clínicos de toxicidade e não houve diferenças significativas no peso corpóreo dos animais tratados com a proteína AtAHAS em comparação com o grupo de controle. Não houve diferenças relevantes nos pesos absolutos médios dos diferentes órgãos selecionados entre o grupo teste e o controle

Conclusões gerais para os dados mostrados nas seções VI.4 a VI.9

Para avaliar esta nova fonte alimentar protéica é importante identificar os principais fatores que podem interferir com a biodisponibilidade de seus nutrientes, neste caso específico, de seus aminoácidos essenciais. Alguns destes fatores são:

- Desequilíbrio da proporção de aminoácidos essenciais: como todas as leguminosas, existe a limitação da concentração adequada de aminoácidos essenciais sulfurados que dificulta o uso completo das proteínas para promover o devido crescimento e desenvolvimento animal. Para o evento Embrapa 5.1 não foram encontradas diferenças significativas nos teores de aminoácidos que possam levar a diferenças nas concentrações destes nutrientes em alimentos preparados com o evento Embrapa 5.1.
- Presença de compostos antinutricionais: os inibidores de proteases se definem como aqueles compostos que estão presentes de forma natural em alguns alimentos e atuam provocando uma perda de nutrientes essenciais, ou interferindo em sua utilização e função metabólica. São substâncias de natureza protéica que interferem na atividade de sistemas enzimáticos do trato digestivo, inibindo especialmente proteases, que são enzimas que hidrolisam as ligações peptídicas como primeiro passo para a assimilação das proteínas. Esta inibição se traduz, *in vivo*, numa redução da digestão protéica e consequentemente da assimilação de proteínas das leguminosas cruas. Estudos mostram que a baixa



digestibilidade no feijão cru é atribuída à atividade dos inibidores de proteases e o cozimento elimina em larga escala estes inibidores tanto nos grãos inteiros como nos cotilédones. Amostras de feijão cozido apresentaram 0,012 a 0,362mg de tripsina inibida/g, sugerindo assim, que o aquecimento pelo qual os feijões foram submetidos durante o seu preparo, foi eficaz na inativação de grande parte dos inibidores de tripsina.

- Relação proteínas / calorias: em baixas concentrações de proteína (10%), para cada caloria protéica que se subministra, haverá 6 ou mais calorias de outra origem. A medida que aumenta a concentração protéica, cada vez menos energia de origem não-protéica ficará disponível, de tal forma que o organismo começa a queimar energia proveniente das proteínas, investindo assim as suas próprias proteínas para fixar proteínas.

Identificando estas possíveis interferências que podem diminuir a eficiência da utilização da proteína dos feijões em geral e mais especificamente do feijoeiro geneticamente modificado, foi realizado o estudo *in vivo* para avaliar comparativamente a qualidade nutricional do feijão (*P. vulgaris*) geneticamente modificado Evento Embrapa 5.1 (FT) com o feijão-comum cv. Olathe Pinto (FC), no crescimento e desenvolvimento de ratos Wistar, no Laboratório de Ensaios Biológicos do departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Campus Botucatu, São Paulo, nas condições experimentais de rotina (ciclo de claro/ escuro de 12h, 22±5°C), sem restrição de água e dieta, com prévio período de 72h para adaptação às novas condições ambientais. O manuseio e o procedimento experimental foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Estadual Paulista - UNESP, com prévia aprovação do protocolo experimental (Protocolo no. 67/08-CEEA), em concordância com os princípios em pesquisa animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Com os estudos descritos nas seções VI 4 a VI.9 e no Anexo I, podemos concluir que: o uso do feijão geneticamente modificado como fonte alimentar protéica, não diferiu em comparação ao seu correlativo convencional no desenvolvimento animal nem provocou alterações patológicas ou lesões nos órgãos vitais estudados. Dessa maneira,



este estudo comprova o uso seguro desta fonte alimentar de acordo com o modelo experimental adotado.

VI. 10. A similaridade dos produtos de expressão do OGM com alérgenos conhecidos, relatando possíveis reações alérgicas identificadas após ingestão do OGM nas avaliações em animais experimentais, descrevendo os resultados.

Proteínas

O potencial de alergenicidade de uma proteína é dependente da diversidade genética e da variabilidade da resposta a imunoglobulinas do tipo E específicas (IgEs). Consequentemente a previsibilidade do potencial alergênico de uma proteína não é trivial. Tem-se proposto realizar um processo de análises mediante um mecanismo de acessar riscos compostos de diversos passos (Davies, 2005; Shewry et al., 2006; Selgrade et al., 2009; Singh et al., 2009). O Codex Alimentarius Commission (FAO/OMS) recomenda que a predição de alergenicidade seja baseada na totalidade de informação disponível que inclui os dados e evidências que possam classificar a proteína como potencialmente alergênica (FAO, 2001). A análise bioinformática das sequências é fundamental para detectar e prever propriedades estruturais, reações adversas e o potencial de alergenicidade e toxicidade dessas proteínas. A FAO e a OMS recomendam uma padronização nas metodologias utilizadas para a árvore de decisão. O protocolo do Codex Alimentarius prescreve um procedimento em duas partes. Uma proteína seria considerada alergênica se houver identidade de aminoácidos maior a 35%, numa sequência de 80 resíduos, ou se houver coincidências consecutivas num segmento de seis aminoácidos. Uma larga quantidade de serviços de bioinformática disponibiliza a predição de similaridade para testes de alergenicidade/toxidez. Os protocolos *in silico* seguem as recomendações da FAO/OMS, tais como AllerPredict, Structural Database of Allergenic Proteins (SDAP) (Ivanciuc et al., 2003), AllerMatch (Fiers et al., 2004), Allergen Database for Food Safety (ADFS) (Nakamura et al., 2005) e outros. A comparação das sequências de interesse com bancos de dados de alergênicos como o Structural Database of Allergenic Proteins – SDAP (<http://fermi.utmb.edu/SDAP/index.html>), e outros servidores disponíveis, usando



algoritmos de buscas comparativas como os programas FASTA e BLAST, é o método internacionalmente reconhecido para tal detecção. O método atual permite encontrar medidas de similaridade e/ou identidade com proteínas conhecidas como alergênicas. Similaridades em sequências primárias podem sugerir reações alérgicas decorrentes do aparecimento de regiões específicas de apresentação às imuno-globulinas epitopos 2. A avaliação das sequências através das ferramentas da bioinformática auxiliam na predição de reações cruzadas e de eventuais reconhecimentos pelas imunoglobulinas do tipo IgE. Procedimentos adicionais vêm sendo desenvolvidos, baseados em similaridade de regiões inter-alergênicas. Outra evolução é a predição de epitopos de imunoglobulinas E juntamente com descritores de aminoácidos (Fiers et al., 2004). Quanto à análise de homologia em sequências de proteínas introduzidas, recomenda-se o uso de bancos de dados internacionalmente conhecidos como o SwissProt, TrEMBL, que contêm sequências de aminoácidos da grande maioria dos alérgenos dos quais se conhecem as reações alérgicas. Soeria-Atmadja et al. (2006) publicaram a ferramenta DFLAP que consiste num conjunto matemático de aprendizado e tomada de decisão baseado na tecnologia de inteligência artificial. O algoritmo do DFLAP extrai variáveis como o tamanho da sequência alergênica ou fragmentos, aplicando técnicas de aprendizado de máquina de modo a suportar os vetores de cálculo. O detector mostrou-se inespecífico quando desafiado com o repositório de proteínas alergênicas do banco de dados do Swiss-Prot, sem apresentar perda de sensibilidade. O descritor DFLAP foi relatado como uma ferramenta poderosa na discriminação entre proteínas alérgenas e não alérgenas que ocorrem na mesma família, sendo capaz de diferenciar características entre grupos de proteínas. O DFLAP opera avaliando todo o banco de proteínas do Swiss-Prot, detectando resultados similaridades entre proteínas. Em seguida o detector assume as características de um conjunto menor de alérgenos na fase de aprendizagem e aplica as sequências teste, discriminando proteínas potencialmente alérgenas. Por essa metodologia o DFLAP foi o primeiro software capaz de distinguir proteínas alérgenas dentro da mesma família, mais especificamente as tropomiosinas. Hileman et al. (2002), que buscavam identidades em segmentos contíguos de 6, 7 e 8 aminoácidos idênticos, compararam, usando o algoritmo FASTA, sequências de seis endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*, três sequências de proteínas alimentares não alergênicas e 50 proteínas de milho selecionadas aleatoriamente. Os autores concluíram que o algoritmo usado é o



mais eficiente e o que melhor prediz para reações cruzadas entre proteínas alergênicas, e sugere que o segmento de oito aminoácidos estabeleça uma margem maior de segurança para a predição de alergenicidade. Além disso, os autores apontaram que o segmento de seis aminoácidos idênticos foi o que produziu um maior número de falsos positivos. Diversos autores tem proposto metodologias adaptadas as características moleculares de proteínas alergênicas e sua interação com IgE. Os novos métodos associam características como flexibilidade estrutural, associações cruzadas com respectivos cálculos de valores aplicados para definir diferentes membros de famílias de proteínas alergênicas ou tóxicas, acessibilidade e características estruturais. São igualmente consideradas as informações sobre o arranjo espacial das proteínas candidatas e seus domínio de interação com IgEs, denominados motivos alergênicos (Ivanciuc et al., 2003; Zhang et al., 2007). Os motivos são usados para identificar e escalonar proteínas e peptídeos candidatos por um protocolo automatizado. Essa metodologia foi demonstrada por Tariq et al. (2005) e denominada WebAllergen.

Análises *in silico* foram realizadas para a predição de potencial alergênico de proteínas AtAHAS e SEC61 (mesmo com a não detecção de transcritos para essa sequência) usando as ferramentas: AllerPredict (<http://research.i2r.a-star.edu.sg/Templar/DB/Allergen/Predict/Predict.html>); SDAP (http://fermi.utmb.edu/SDAP/sdap_who.html); AllerMatch (<http://www.allermatch.org/>); ADFS (<http://allergen.nihs.go.jp/ADFS/>); WebAllergen (<http://weballergen.bii.a-star.edu.sg/>); AllerTool (<http://research.i2r.a-star.edu.sg/AllerTool/>); AlgPred (<http://www.imtech.res.in/raghava/algpred/>), Saha & Raghava (2006); APPEL (<http://jing.cz3.nus.edu.sg/cgi-bin/APPEL>), Cui et al. (2007); AlgPred (<http://www.imtech.res.in/raghava/algpred/index.html>), Saha & Raghava (2006), Nature Protocols em http://www.natureprotocols.com/2007/11/14/prediction_of_allergenic_prote.php; e EVALLER (<http://bioinformatics.bmc.uu.se/evaller/>), Soeria-Atmadja et al. (2006). Os resultados desta busca não mostraram nenhuma identidade com alérgenos conhecidos.

Além disso, recentemente a CTNBio aprovou o evento de soja BPS-CV127-geneticamente modificada tolerante aos herbicidas do grupo químico das imidazolinonas, devido à expressão do gene *AtAhas* (mesmo cassete de expressão usado para geração do evento de feijoeiro Embrapa 5.1) (Parecer Técnico nº 2236/2009,



Processo nº 01200.000010/2009-06). Neste processo, ficou demonstrado experimentalmente que as proteínas AtAHAS e SEC61 não têm características de proteínas tóxicas e alergênicas. Em adição, essas proteínas estão presentes em plantas (de uma forma geral) e não existe histórico de alergenicidade para o doador do gene (*A. thaliana*).

RNA interferente (RNAi)

A construção criada para a expressão de um dsRNA correspondente a uma região do gene *rep* (*AC1*) do BGMV sob o controle do 35SCaMV não codifica para qualquer proteína, uma vez que não possui sequência aberta de leitura (ORF) em qualquer das 3 janelas (*frames*) 5'-3' possíveis (*frame* 1: EDTLEIVRCDVINDVILS-Met-I-Stop; *frame* 2: RTRSR-Stop; *frame* 3: GHARDSAVRCHQ-Stop). Além disso, como é uma estrutura altamente estável termodinamicamente para formação de grampos, não se espera que tenha potencial para tradução antes do processamento pela maquinaria celular de silenciamento. Desta forma uma análise *in silico* foi realizada com o produto da transcrição (ds-mRNA).

Muitos genes eucarióticos podem ser regulados tanto por silenciamento gênico transcricional ou pós-transcricional (TGS ou PTGS, respectivamente), tendo como alvo os genes com base na especificidade de sequência. Ambos TGS e PTGS são dependentes de similaridade de sequências nucleotídicas, no entanto, os genes silenciados transcionalmente têm similaridades em regiões regulatórias e o silenciamento ocorre no núcleo, enquanto os genes-alvo para PTGS têm similaridade com regiões transcritas e que ocorrem no citoplasma (Ding, 2000).

PTGS não só foi observado em plantas, mas também em fungos, onde é conhecido como sufocar (Romano & Macino, 1992), e em animais, conhecido como interferência de RNA (Fire et al., 1998). Ambos quelling e compartilham similaridades interferência de RNA com silenciamento gênico em plantas (Ding, 2000; Llave et al., 2002; Agrawal et al., 2003; Small, 2007). Todos estes mecanismos são referidos coletivamente como métodos de silenciamento RNA, mas como parte de homologia nas reações do núcleo, foram também chamados métodos de interferência de RNA (RNAi).



Uma das vantagens do uso de (“small interfering RNA”) siRNA como uma ferramenta em genômica funcional é a sua habilidade de silenciar genes de forma sequência-específica. Entretanto, a especificidade dos siRNA não é absoluta. Uma vez que RNAi é baseada no reconhecimento de sequência pelos siRNA, pode também levar ao silenciamento de outros genes com sequências similares. Este fenômeno é conhecido como efeito “off-target”, e existem evidências crescentes, em experimentos de silenciamento em larga escala, que indicam que o silenciamento “off-target” é induzida pela base de emparelhamento entre posições 2-8 a partir do final 5' dos siRNA incorporados à (“RNA induced silencing complex”) RISC, e as sequências complementares no 3' UTR dos mRNA (Jackson et al., 2003, 2006; Scacheri et al., 2004; Lin et al., 2005; Birmingham et al., 2006; Ui-Tei et al., 2008). Assim há ainda uma preocupação em se saber se os genes alvos podem ser especificamente silenciados. Isso é especialmente importante para o desenvolvimento de tecnologias terapêuticas. Para evitar os efeitos off-target, uma estratégia é selecionar siRNA cujas sequências (*seed sequences*) não são complementares a qualquer sequência na região 3' UTR de todos os genes não-alvo. Entretanto essa estratégia é problemática porque se tem previsto que uma sequência de 7 nucleotídeos pode ser encontrada no genoma em média a cada 16.384 pb (Naito et al., 2009). Embora até o momento não existam evidências diretas de existência de um mecanismo de RNAi em humanos onde se administrou siRNA local os sistemicamente, tem sido possível realizar testes clínicos em pacientes portadores de câncer nos quais se administrou nanopartículas carreadoras de siRNA (Davis et al., 2010).

Recentemente, têm-se demonstrado que a capacidade dos siRNA para induzir efeitos “off-target” é altamente correlacionado com a estabilidade termodinâmica do duplex formado entre a região-semente da fita-guia do siRNA e seu mRNA alvo (Naito et al., 2009). A temperatura de anelamento (T_m) do duplex mostra uma correlação extremamente positiva com a indução de efeito “off-target” dependente da região-semente (Figura VI.30). Os resultados mostram que uma T_m de 21.5°C pode servir como um parâmetro para discriminar a grande maioria das sequências que geram ou não efeito “off-target” Assim, pela seleção de siRNAs com duplex alvo-semente com baixa T_m deve minimizar os efeitos do silenciamento “off-target” (Naito et al., 2009). Baseado nessas informações, uma série de programas têm sido produzidos para prever o

efeito “off-target” e minimizar essa possibilidade com o desenho de siRNA/dsRNA de forma mais apropriada. Esses programas vêm sendo validados *in vivo*, com a desvantagem de que podem ser aplicados apenas a organismos para os quais se conhece o genoma completo.

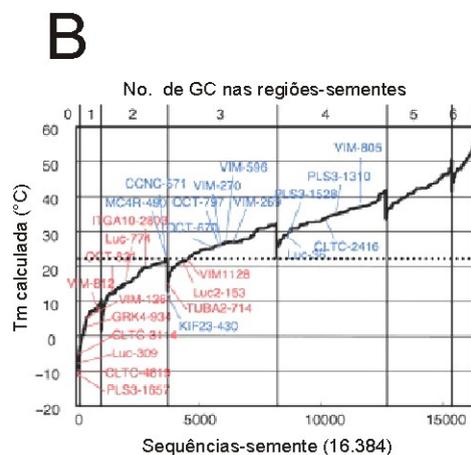
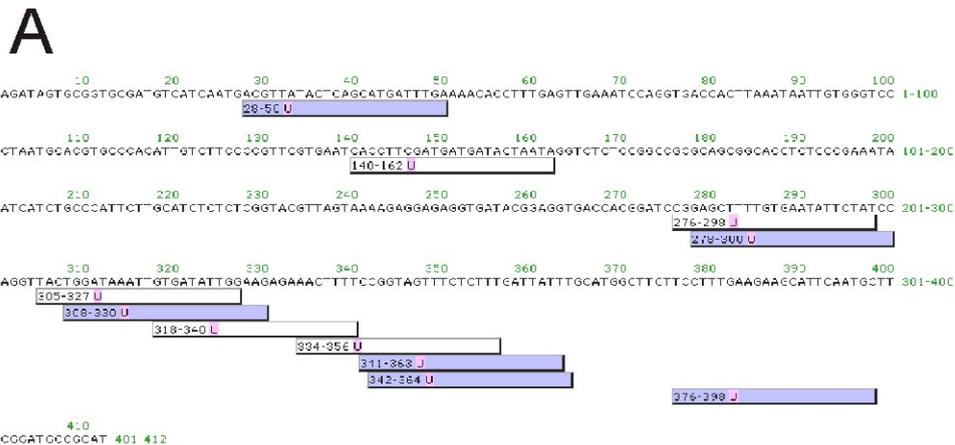


Figura VI.30. Busca por moléculas de siRNA possivelmente geradas nas plantas transgênicas do evento 5.1 com potencial de silenciamento de genes do genoma de *Homo sapiens*. (A) Apesar de alguns possíveis siRNA mostrarem similaridades de sequência (como é esperado de acontecer pelo menos a cada 16.384 bp. Essas sequências têm um potencial extremamente baixo de apresentarem um efeito “off-target” (baseado em parâmetros de similaridade de sequência e parâmetros termodinâmicos para 7 nt). (B) Nenhuma sequência foi encontrada com características termodinâmicas para que se pudesse prever algum potencial de efeito “off-target” em células de humanos, camundongos, ratos ou *C. elegans*.



Uma análise *in silico* extensiva foi realizada para identificação de sequências de siRNA potencialmente geradas no evento Embrapa 5.1 que poderiam gerar efeitos “off-target”. As análises foram realizadas utilizando os algoritmos (siDirect v.2.0) desenvolvidos por Ui-Tei et al. (2004, 2008) e analisando todas as possíveis sequências de 7 nt. Não foram encontradas moléculas com significativo potencial de efeito “off-target” (seed Tm abaixo de 20°C) no genoma de *Homo sapiens* e *Rattus norvegicus*. Também não foram encontradas moléculas de siRNA potencialmente geradas no evento de Embrapa 5.1 que apresentassem potencial efeito significativo de silenciamento [com base em similaridade de sequência e parâmetros termodinâmicos (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003)] de genes em *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Caenorhabditis elegans* e *Rattus norvegicus*. Essas análises foram conduzidas utilizando os programas siRNA at Whitehead (Yuan et al., 2004), DEQOR (Hensche et al., 2004), Silencer® (Ambion, Applied Biosystems; http://www.ambion.com/techlib/tb/tb_506.html), siDESIGN (Dharmacon RNAi Technologies; <http://www.dharmacon.com/PopUpTemplate.aspx?id=2078>), DSIR (Vert et al., 2006), SiDRM (Gong et al., 2006, 2008; Ren et al., 2006, 2009), siRNA selector (Levenkova et al., 2004). Além disso, usando o algoritmo do programa SiDRM (Gong et al., 2006, 2008; Ren et al., 2006, 2009) não foram identificados siRNA com motivos com potencial de serem causadores de resposta imune ou efeitos tóxicos em células de mamíferos.

SEÇÃO VII - Avaliação de Risco ao Meio Ambiente

O feijoeiro Embrapa 5.1 foi cultivado em três áreas escolhidas por serem representativas em termos edafo-climáticos das principais áreas de cultivo do feijoeiro no Brasil (Santo Antônio de Goiás, Goiás; Londrina, Paraná e Sete Lagoas, Minas Gerais) nos anos agrícolas de 2008 e 2009. A avaliação de risco ao meio ambiente desse evento foi realizada nesses campos em um sistema de produção convencional.

VII.1. Área de ocorrência natural do organismo parental do OGM, seus ancestrais e parentes silvestres – centros de origem e de diversidade genética – e espécies ancestrais ou parentes silvestres, existentes em algum ecossistema brasileiro do mesmo gênero da espécie parental não-modificada

Segundo Debouck (1988), foram identificados três centros de diversidade genética do gênero nas Américas: mesoamericano, norte e sul dos Andes. Evidências indicam que o feijão comum foi domesticado independentemente em dois centros primários, América Central e México e sul dos Andes, e em um centro secundário ao norte dos Andes (Gepts & Debouck, 1991). No Brasil, que não é centro de origem do feijoeiro, foram introduzidas as espécies *P. vulgaris* e *P. lunatus*, cultivadas em todo o país, especialmente o feijoeiro comum, do qual o Brasil é o maior produtor e consumidor mundial. De acordo com Zimmermann & Teixeira (1996), o feijoeiro teve sua origem no Novo Mundo, provavelmente desde o México até a Argentina. Os autores citam três hipóteses relativas à origem das formas cultivadas da espécie: a) Teria sido domesticado na Mesoamérica e transportado para a América do Sul. Há evidências favoráveis e contrárias a esta proposta, entre as quais as de que remanescentes silvestres de *P. vulgaris* não foram encontrados nos locais onde deveriam ocorrer; b) O feijoeiro teria sido domesticado na América do Sul e transportado para a América do Norte. Evidências arqueológicas da existência de feijão domesticado na América do Sul

(Andes, sítio de Guitarrero), datadas de 10.000 a.C., foram encontradas no Peru; c) O feijoeiro teria sofrido domesticações independentes ao longo da área de ocorrência do tipo silvestre (Peru e México). As evidências favoráveis a estas hipóteses são as áreas de ocorrência de feijões silvestres, as características dos tipos domesticados que são diferentes e o fato de que as domesticações ocorreram em períodos anteriores ao período em que contatos formais entre os continentes fossem conhecidos. Ainda, com relação ao Brasil, sugere-se que os feijões de grãos pequenos, mesoamericanos, originários do México, tenham seguido para o Caribe, Colômbia, Venezuela e daí para o Brasil; Já os feijões de grãos grandes, com faseolina tipo “T”, devem ser oriundos dos Andes, Peru. E, finalmente, há os feijões que foram trazidos por imigrantes, constituindo-se nas introduções mais recentes, como o tipo Carnaval, preferido pelos imigrantes italianos (Gepts et al., 1988).

São cultivados no Brasil o feijoeiro comum (*P. vulgaris* L.) e a fava (*P. lunatus* L.), espécies que foram introduzidas. Não há registros de espécies silvestres destes gêneros no Brasil, uma vez que não se trata de um centro de diversidade (Debouck, 1988). A maioria das espécies do gênero *Phaseolus* são predominantemente autógamas, podendo ser observadas baixas taxas de cruzamento natural, que são geralmente consideradas irrelevantes. Entretanto, dependendo das condições do local de plantio e das características das plantas, a polinização cruzada pode causar alguns efeitos indesejáveis, como a desuniformidade das cultivares, no caso de produção de sementes (Pacova & Rocha, 1975; Tucker & Harding, 1975).

VII.2. A história de cultivo e de uso do organismo parental em termos de segurança para o meio ambiente, para o consumo humano e animal, informando sobre a possibilidade de hibridação introgressiva com as espécies sexualmente compatíveis e sobre a possível vantagem seletiva do transgene.

O gênero *Phaseolus* possui aproximadamente 55 espécies, das quais apenas cinco são cultivadas: *P. vulgaris* L., *P. lunatus* L., *P. coccineus* L., *P. polyanthus* Greenman e *P. acutifolius* A.Gray. O feijoeiro (*P. vulgaris*) é a espécie mais importante deste gênero, cobrindo 95% da produção mundial de *Phaseolus*.

Tanto as cultivares meso-americanas, quanto as andinas foram disseminadas para a América do Sul (Brasil) e África. No continente africano teria sido introduzido através do Brasil ou da Península Ibérica, durante o período colonial (Purseglove, 1976). Atualmente, sua produção é conduzida nos mais diferentes ecossistemas, na América Latina, África, Oriente Médio, China, Europa, Estados Unidos e Canadá.

Mais informações sobre o uso seguro e continuado de feijão no Brasil estão detalhadas nas seções V.1 e VI.1 desse documento.

O pool gênico primário constitui-se do próprio cultigen e das formas selvagens que não apresentam barreiras para o cruzamento. O pool gênico secundário constitui-se de outras espécies das quais o fluxo de genes é possível através de hibridizações interespecíficas. O pool gênico terciário é formado por espécies com as quais se pode obter híbridos, mas estes são inférteis ou inviáveis, não permitindo o fluxo de genes através dos processos introgressivos normais. Para *P. vulgaris*, o pool gênico primário constitui-se de variedades domesticadas e selvagens do próprio cultigen, e o secundário, constitui-se principalmente de *P. coccineus* e *P. polyanthus* (Smartt 1981, 1984). A hibridização interespecífica, em geral é limitada dentro de gênero *Phaseolus*, onde a maioria dos cruzamentos não produzem híbridos viáveis. Entretanto, apesar da baixa eficiência, existem alguns casos de sucesso de cruzamento de *P. vulgaris*, usado como parental feminino, com *P. polyanthus*, *P. formosus* (Baudoin et al., 1985), *P. coccineus* (Smartt, 1979), *P. lunatus* (Honma & Heeckt, 1959), e muito dificilmente com *P. acutifolius* (Andrade-Aguilar & Jackson, 1988) e *P. ritensis* (Belivanis & Doré, 1986). Como parental masculino, *P. vulgaris* pode ser cruzado com *P. formosus* (Baudoin et al., 1985) e muito raramente com *P. polyanthus* (Baudoin et al., 1986), *P. coccineus* (Alvarez et al., 1981) e *P. accutifolius* (Thomas & Waines, 1984).

O feijoeiro comum apresenta flor perfeita, com pedicelo, cálice, corola, androceu e gineceu. A corola é pentâmera, com três pétalas livres e duas menores, soldadas na base, formando a denominada “quilha”, a qual protege os órgãos de reprodução. Englobada na quilha e seguindo as suas circunvoluções encontram-se os filamentos de nove estames fusionados e um livre, envolvendo o ovário. O pistilo tem um ovário com cinco a oito óvulos, podendo chegar a dez. O estilete é encurvado e o estigma é achatado, ligeiramente deprimido. Os filamentos acompanham o estilete de tal modo que os sacos polínicos são comprimidos sobre o estigma. Assim, o pólen é

liberado diretamente sobre a superfície estigmática, resultando na autopolinização (Bliss, 1980). Ainda de acordo com o mesmo autor, a deiscência das anteras e autopolinização ocorrem em estágio tardio do desenvolvimento das flores, usualmente à noite, e o tubo polínico se desenvolve imediatamente. A deiscência dos sacos polínicos depende da maturação do pólen, sendo favorecida pela queda de umidade relativa do ar. As flores se abrem na parte da manhã, provavelmente em resposta à temperatura e à luz. Este tipo de flor favorece a autopolinização. Sendo o feijoeiro uma planta autógama, em termos aplicados os cruzamentos são feitos através de polinização manual, mas esse processo tem uma porcentagem de sucesso relativamente baixa (20-60%) mesmo em *P. vulgaris*.

Devido ao fato da domesticação ter, provavelmente, ocorrido em área distintas das Américas, a partir de populações distintas de feijoeiros selvagens, o feijão apresenta uma grande variabilidade morfológica e bioquímica nas diferentes áreas onde é cultivado (Gepts & Bliss, 1986; Singh, 1991). Este fato se reflete na existência de duas diferentes composições genômicas: cultivares com sementes pequenas (América Central) e de sementes grandes (América do Sul) (Singh & Gutiérrez, 1984; Gepts, 1988). Em consequência disso, observa-se a presença de incompatibilidades genéticas entre algumas cultivares destes grupos. Estas incompatibilidades se evidenciam na formação de híbridos anões, devido à repressão do desenvolvimento das raízes (pelo gene *D11*) e da parte aérea (pelo gene *D12*) (Shii et al., 1981; Gepts & Bliss, 1985). Além disso ocorrem virescências e variegação foliar (genes recessivos *vir f*) (Grafton et al., 1983), clorose sub-letal e distorção foliar (gene dominante *Ld*, cuja expressão é suprimida por outro gene dominante, o *Ds*) (Rabakoarihanta & Baggett, 1983).

No caso de transferência dos transgenes para outras espécies ou *P. vulgaris* (de forma artificial ou natural) espera-se que a resistência ao BGMV seja transferida. No entanto, caso ocorra a geração de híbridos estes serão hemizigotos, que, na ocorrência de uma epidemia, terão uma probabilidade que pode ultrapassar 30% para serem infectados pelo vírus, dependendo da população de moscas brancas virulíferas. Mesmo sendo fortemente improvável, a transferência dos transgenes para outras espécies de *Phaseolus* não acarretaria em vantagem seletiva. Não se espera que os híbridos tenham resistência significativa a imazapir ou qualquer outra alteração fenotípica decorrente da transferência do locus transgênico presente no evento Embrapa 5.1.

VII.3. Possíveis efeitos em organismos indicadores relevantes (simbiontes, predadores, polinizadores, parasitas ou competidores do OGM) nos ecossistemas onde se pretende efetuar o seu cultivo, em comparação com o organismo parental do OGM em um sistema de produção convencional.

Efeito do feijoeiro geneticamente modificado evento Embrapa 5.1 na flutuação populacional de artrópodes na parte aérea e na superfície do solo.

Foi determinada a flutuação populacional e a estrutura das populações de artrópodes associados ao feijoeiro Embrapa 5.1 e convencional na parte aérea e na superfície do solo, em experimentos de campo. Os experimentos foram conduzidos em Santo Antônio de Goiás, GO, Londrina, PR e Sete Lagoas, MG. As amostragens dos artrópodes foram realizadas semanalmente nos experimentos conduzidos em Santo Antônio de Goiás. Em Londrina e em Sete Lagoas os levantamentos dos artrópodes foram realizados em três épocas de desenvolvimento das plantas de feijão [início (V3), florescimento (R6) e enchimento/maturação de vagens (R8/R9)].

As espécies conhecidas como pragas e inimigos naturais mais comuns nos sistemas de produção do feijoeiro foram identificadas visualmente utilizando manuais de identificação de pragas e inimigos naturais (Hoffmann-Campo et al., 2000; Quintela, 2002; Cruz, 2008) . As demais espécies foram identificadas ao nível de ordem e família pelo estudo das chaves de identificação das famílias e numeradas para posterior identificação das espécies (Borror & DeLong, 1969; Gallo et al., 2002). Os artrópodes coletados foram etiquetados e armazenados na coleção do Laboratório de Entomologia da Embrapa Arroz e Feijão.

Os dados referente as espécies coletadas foram transformados em $\sqrt{x+1}$ e submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste T a 5% de probabilidade.

Foram coletados um total de 8277 artrópodes da superfície do solo no evento Embrapa 5.1 e no convencional no primeiro ano de plantio em 2008, nas sete coletas semanais realizadas na Embrapa Arroz e Feijão (Tabela VII.1). Em 2009, foram coletados 6.989 artrópodes nos dois tratamentos (Tabela VII.1). Em um total de 67 indivíduos amostradas nos dois anos de plantio, 59 espécies pertenceram a classe Insecta distribuídas em 11 ordens, da classe Arachnida foram amostradas cinco espécies de duas ordens e algumas morfoespécies para as classes Collembola, Chilopoda e Diplopoda (Tabela VII.1).

Não foram observadas diferenças significativas para o número total de indivíduos capturados nas armadilhas entre o evento Embrapa 5.1 e o convencional em 2008 e em 2009 (Tabela VII.1). Em 2008 e 2009, não foram observadas diferenças significativas entre o evento Embrapa 5.1 e o convencional para o total de indivíduos de cada espécie da classe Insecta (Tabela VII.1). Diferença significativa entre o evento Embrapa 5.1 e o convencional foi observada somente para uma morfoespécie de ácaro (ácaro n° 1) em 2008, possivelmente devido a distribuição dos ácaros ocorrer em reboleiras (Tabela VII.1) (Wallwork, 1959, 1985, Silva 2002). No segundo ano, maior número médio de uma morfoespécie de aranha (aranha n° 1) foi observado no Olathe convencional em comparação com o evento Embrapa 5.1, com 13 e quatro aranhas, respectivamente (Tabela VII.1).

Tabela VII.1. Número médio, total e frequência (F) (%) de artrópodes da superfície do solo capturados em armadilhas de queda em parcelas de feijoeiro Olathe Pinto 5.1 (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional plantados em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

Ordem, Gênero/Espécie (Família)	Ano 2008						Ano 2009					
	Feijoeiro Convencional			Evento Embrapa 5.1			Feijoeiro Convencional			Evento Embrapa 5.1		
CLASSE INSECTA	Total	F (%)	Média (n=56)	Total	F (%)	Média (n=56)	Total	F (%)	Média (n=56)	Total	F (%)	Média (n=56)
Ordem Blattodea												
<i>Periplaneta sp.</i> (Blattidae)	2	0,045	0,036 a	1	0,026	0,018 a	0	0	0 a	1	0,027	0,018 a
Ordem Coleoptera												
Byrydae	7	0,156	0,125 a	8	0,211	0,143 a	3	0,091	0,054 a	0	0	0 a
<i>Callida sp.</i> (Carabidae)	0	0	0 a	0	0	0 a	0	0	0 a	1	0,027	0,018 a
<i>Calosoma sp.</i> (Carabidae)	0	0	0 a	0	0	0 a	1	0,03	0,018 a	0	0	0 a
Carabidae n°1	0	0	0 a	0	0	0 a	0	0	0 a	1	0,027	0,018 a
Carabidae n°3	5	0,112	0,089 a	4	0,105	0,071 a	6	0,183	0,107 a	10	0,27	0,179 a
<i>Cerotoma arcuata</i> (Crysomelidae)	1	0,022	0,018 a	3	0,079	0,054 a	13	0,396	0,232 a	10	0,27	0,179 a
<i>Chaetocnema sp.</i> (Crysomelidae)	0	0	0 a	0	0	0 a	17	0,518	0,304 a	14	0,378	0,25 a
Coleoptero n°3	8	0,178	0,143 a	3	0,079	0,054 a	8	0,244	0,143 a	6	0,162	0,107 a
Coleoptero n°6	2	0,045	0,036 a	6	0,158	0,107 a	2	0,061	0,036 a	0	0	0 a
Crysomelidae (Larva)	1	0,022	0,018 a	0	0	0 a	0	0	0 a	1	0,027	0,018 a
Curculionidae (Curculionidae)	0	0	0 a	0	0	0 a	1	0,03	0,018 a	0	0	0 a
<i>Cycloneda sanguinea</i> (Coccinellidae)	1	0,022	0,018 a	0	0	0 a		0	0 a	0	0	0
<i>Diabrotica speciosa</i> (Crysomelidae)	1	0,022	0,018 a	0	0	0 a	5	0,152	0,089 a	8	0,216	0,143 a
Elateridae (Larva)	0	0	0 a	0	0	0 a	0	0	0 a	1	0,027	0,018 a
<i>Lagria villosa</i> (Lagriidae)	1	0,022	0,018 a	1	0,026	0,018 a	1	0,03	0,018 a	6	0,162	0,107 a
<i>Lebia sp.</i> (Carabidae)	0	0	0 a	1	0,026	0,018 a	1	0,03	0,018 a	0	0	0 a
<i>Maecolaspis sp.</i> (Crysomelidae)	2	0,045	0,036 a	0	0	0 a	1	0,03	0,018 a	2	0,054	0,036 a
Nitidulidae	5	0,112	0,089 a	6	0,158	0,107 a	0	0	0 a	0	0	0 a
Scarabaeidae (Larva)	0	0	0 a	0	0	0 a	1	0,03	0,018 a	0	0	0 a

Continua na próxima página

Continuação da tabela VII.1

Ordem, Gênero/Espécie (Família)	Ano 2008						Ano 2009					
	Feijoeiro Convencional			Evento Embrapa 5.1			Feijoeiro Convencional			Evento Embrapa 5.1		
CLASSE INSECTA	Total	F (%)	Média (n=56)	Total	F (%)	Média (n=56)	Total	F (%)	Média (n=56)	Total	F (%)	Média (n=56)
Scarabaeidae n° 1	4	0,089	0,071a	2	0,053	0,036 a	2	0,061	0,036 a	7	0,189	0,125 a
Scarabaeidae n°3	25	0,558	0,446 a	21	0,554	0,375 a	15	0,457	0,268 a	19	0,513	0,339 a
Staphylinidae n° 1	12	0,268	0,214 a	7	0,185	0,125 a	0	0	0 a	0	0	0 a
Staphylinidae n° 2	1	0,022	0,018 a	0	0	0 a	3	0,091	0,054 a	8	0,216	0,143 a
Ordem Diptera												
Agromyzidae	2	0,044	0,036 a	0	0	0 a	1	0,03	0,018 a	0	0	0 a
Agromyzidae (Larva)	0	0	0 a	0	0	0 a	1	0,03	0,018 a	0	0	0 a
Díptero (Pupa)	0	0	0 a	0	0	0 a	2	0,061	0,036 a	0	0	0 a
Ordem Hemiptera												
Aphididae	7	0,156	0,125 a	3	0,079	0,054 a	16	0,487	0,286 a	10	0,27	0,179 a
Cicadellidae	16	0,357	0,286 a	14	0,369	0,25 a	5	0,152	0,089 a	5	0,135	0,089 a
Cydnidae	7	0,156	0,125 a	9	0,237	0,161 a	17	0,518	0,304 a	29	0,783	0,518 a
Delphacidae	2	0,045	0,036 a	0	0	0 a	0	0	0 a	0	0	0 a
Hemiptera n° 1	1	0,022	0,018 a	1	0,026	0,018 a	0	0	0 a	0	0	0 a
Hemiptera n° 2	1	0,022	0,018 a	1	0,026	0,018 a	0	0	0 a	1	0,027	0,018 a
<i>Neomegalotomus simplex</i> (Alydidae)	48	1,071	0,857 a	55	1,45	0,982 a	12	0,365	0,214 a	10	0,27	0,179 a
<i>Piezodorus guildinii</i> (Pentatomidae)	4	0,089	0,071 a	1	0,026	0,018 a	0	0	0 a	3	0,081	0,054 a
Ordem Hymenoptera												
Apidae n°1	0	0	0 a	1	0,026	0,018 a	0	0	0 a	0	0	0 a
Apidae n°2	0	0	0 a	0	0	0 a	0	0	0 a	1	0,027	0,018 a
<i>Atta spp.</i> (Formicidae)	26	0,58	0,464 a	28	0,738	0,5 a	48	1,461	0,857 a	56	1,512	1 a
Formicidae n°1	0	0	0 a	0	0	0 a	6	0,183	0,107 a	0	0	0 a
Formicidae n°2	23	0,513	0,411 a	43	1,133	0,768 a	3	0,091	0,054 a	6	0,162	0,107 a

Continua na próxima página

Continuação da Tabela VII.1

Ordem, Gênero/Espécie (Família)	Ano 2008						Ano 2009					
	Feijoeiro Convencional			Evento Embrapa 5.1			Feijoeiro Convencional			Evento Embrapa 5.1		
CLASSE INSECTA	Total	F (%)	Média (n=56)	Total	F (%)	Média (n=56)	Total	F (%)	Média (n=56)	Total	F (%)	Média (n=56)
Hymenoptera n° 1	19	0,424	0,339 a	20	0,527	0,357 a	10	0,304	0,179 a	9	0,243	0,161 a
Hymenoptera n° 2	1	0,022	0,018 a	0	0	0 a	2	0,061	0,036 a	3	0,081	0,054 a
Hymenoptera n° 3	5	0,112	0,089 a	5	0,132	0,089 a	0	0	0 a	0	0	0 a
Hymenoptera n° 4	1	0,022	0,018 a	1	0,026	0,018 a	0	0	0 a	0	0	0 a
Mutillidae	3	0,067	0,054 a	6	0,158	0,107 a	2	0,061	0,036 a	2	0,054	0,036 a
<i>Solenopsis spp.</i> (Formicidae)	1137	25,362	20,30 a	1058	27,886	18,89 a	1032	31,416	18,43 a	1114	30,076	19,89 a
Ordem Lepidoptera												
Hesperiidae (Lagarta)	0	0	0 a	1	0,026	0,018 a	0	0	0 a	0	0	0 a
Lepidoptera (Lepidoptera)	1	0,022	0,018 a	0	0	0 a	0	0	0 a	1	0,027	0,018 a
<i>Maruca sp.</i> (Pyalidae)	1	0,022	0,018 a	0	0	0 a	0	0	0 a	0	0	0 a
<i>Spodoptera sp.</i> (Lagarta)	2	0,045	0,036 a	0	0	0 a	1	0,03	0,018 a	2	0,054	0,036 a
<i>Spodoptera sp.</i> (Noctuidae)	1	0,022	0,018 a	1	0,026	0,018 a	0	0	0 a	0	0	0 a
Ordem Neuroptera												
Chrysopidae (Chrysopidae)	2	0,045	0,036 a	0	0	0 a	0	0	0 a	0	0	0 a
Ordem Isoptera												
Termitidae	3	0,067	0,054 a	2	0,053	0,036 a	4	0,122	0,071 a	3	0,081	0,054 a
Ordem Orthoptera												
Acrididae (Acrididae)	27	0,602	0,482 a	20	0,527	0,357 a	5	0,152	0,089 a	3	0,081	0,054 a
Gryllidae	7	0,156	0,125 a	13	0,343	0,232 a	1	0,03	0,018 a	0	0	0 a
Ordem Thysanoptera												
Thripidae n°1	4	0,089	0,071 a	4	0,105	0,071 a	2	0,061	0,036 a	4	0,108	0,071 a
Thripidae n°2	0	0	0 a	0	0	0 a	2	0,061	0,036 a	0	0	0 a
Thripidae n°3	2	0,045	0,036 a	1	0,026	0,018 a	0	0	0 a	0	0	0 a

Continua na próxima página

Continuação da Tabela VII.1

Ordem, Gênero/Espécie (Família)	Ano 2008						Ano 2009					
	Feijoeiro Convencional			Evento Embrapa 5.1			Feijoeiro Convencional			Evento Embrapa 5.1		
	Total	F (%)	Média (n=56)	Total	F (%)	Média (n=56)	Total	F (%)	Média (n=56)	Total	F (%)	Média (n=56)
CLASSE INSECTA												
Ordem Trichoptera												
Trichoptera (Larva)	2	0,045	0,036 a	0	0	0 a	0	0	0 a	0	0	0 a
CLASSE ARACHNIDA												
Ordem Araneae												
Aranha n°1	27	0,602	0,482 a	28	0,738	0,5 a	13	0,396	0,232 a	4	0,108	0,071 b
Aranha n°2	2	0,045	0,036 a	2	0,053	0,036 a	0	0	0 a	0	0	0 a
Ordem Acarina												
Acaro n°1	42	0,937	0,75 a	22	0,58	0,393 b	28	0,852	0,5 a	32	0,864	0,571 a
Acaro n°2	753	16,797	13,46 a	628	16,552	11,21 a	583	17,747	10,41 a	680	18,359	12,14 a
Acaro n°3	1	0,022	0,018 a	0	0	0 a	0	0	0 a	0	0	0 a
CLASSE COLLEMBOLA												
Ordem Collembola												
Morfoespécies de Colêmbolos	2224	49,61	39,71 a	1757	46,31	31,37 a	1406	42,801	25,11 a	1625	43,871	29,01 a
CLASSE CHILOPODA												
Chilopoda	1	0,022	0,018 a	0	0	0 a	0	0	0 a	0	0	0 a
CLASSE DIPLOPODA												
Ordem Juliformia												
Juliformia	0	0	0 a	0	0	0 a	3	0,091	0,054 a	6	0,162	0,107 a
TOTAL DE INDIVÍDUOS	4483	100	80,05 a	3794	100	67,75 a	3285	100	64,3 a	3704	100	60,5 a

Tabela VII.2. Valores de $P > F$ para o número médio: do ácaro n° 2, de colêmbolos, de *Solenopsis* sp. e do total dos artrópodes coletados em armadilhas de queda em diferentes datas de amostragem em 2008 e 2009. Santo Antônio de Goiás, GO

Data	Número médio do Ácaro n° 2	Número médio Collembola	Número médio Solenopsis sp.	Número total médio dos Artrópodes
16/04/08	$P > 0,3652$	$P > 0,6961$	$P > 0,9166$	$P > 0,7434$
23/04/08	$P > 0,4512$	$P > 0,8300$	$P > 0,6270$	$P > 0,9192$
30/04/08	$P > 0,1760$	$P > 0,2691$	$P > 0,1428$	$P > 0,0732$
07/05/08	$P > 0,6228$	$P > 0,2986$	$P > 0,8534$	$P > 0,3457$
14/05/08	$P > 0,1919$	$P > 0,5431$	$P > 0,4686$	$P > 0,6228$
21/05/08	$P > 0,1442$	$P > 0,7795$	$P > 0,9545$	$P > 0,9486$
28/05/08	$P > 0,5247$	$P > 0,3029$	$P > 0,6298$	$P > 0,2728$
07/04/09	$P > 0,8979$	$P > 0,4028$	$P > 0,9248$	$P > 0,6647$
15/04/09	$P > 0,9069$	$P > 0,4570$	$P > 0,9344$	$P > 0,6416$
22/04/09	$P > 0,8365$	$P > 0,9601$	$P > 0,1367$	$P > 0,4976$
28/04/09	$P > 0,4755$	$P > 0,4671$	$P > 0,5619$	$P > 0,6316$
06/05/09	$P > 0,8936$	$P > 0,7355$	$P > 0,5008$	$P > 0,3205$
13/05/09	$P > 0,4804$	$P > 0,9283$	$P > 0,4022$	$P > 0,9547$
20/05/09	$P > 0,7747$	$P > 0,8557$	$P > 0,9378$	$P > 0,9450$

Os indivíduos capturados em maior número foram as formigas do gênero *Solenopsis*, com aproximadamente 25 e 30% de frequência no 1° e 2° anos de plantio, respectivamente; o ácaro n° 2 com aproximadamente 18% de frequência nos dois anos; os colêmbolos com aproximadamente 50% e 40% de frequência em 2008 e 2009, respectivamente (Tabela VII.1). Para estas espécies e para o número total de indivíduos foram plotados gráficos com o número médio coletado semanalmente (Figuras de VII.1 a VII.4).

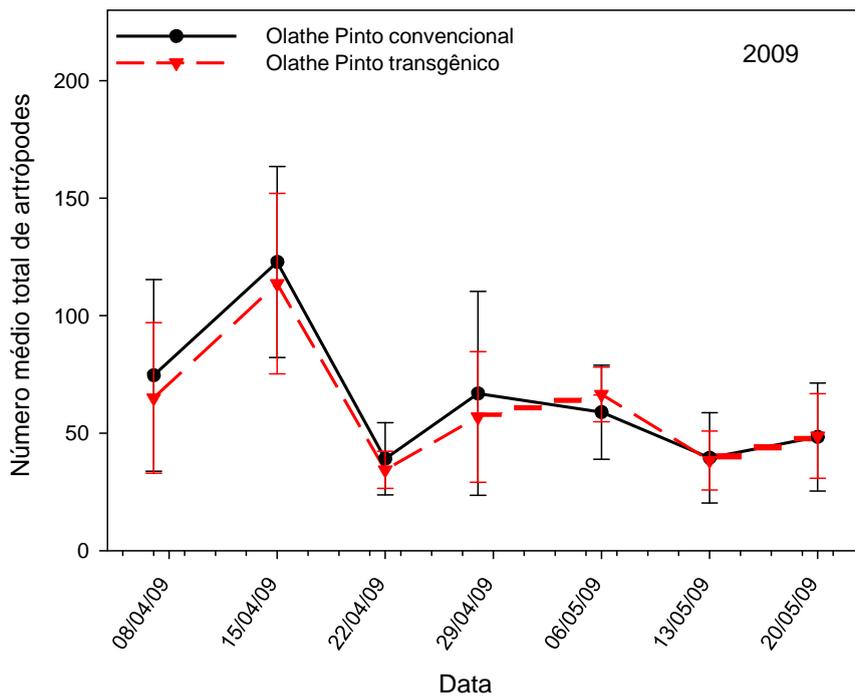
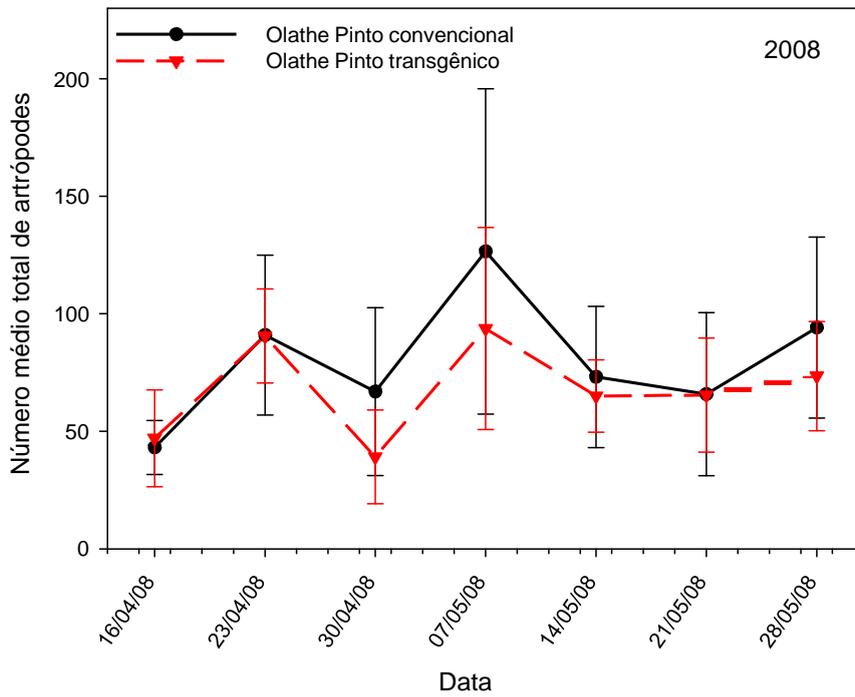


Figura VII.1. Número médio total de artrópodes da superfície do solo capturados em armadilha de queda em parcelas de feijoeiro Olathe transgênico (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional plantados em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

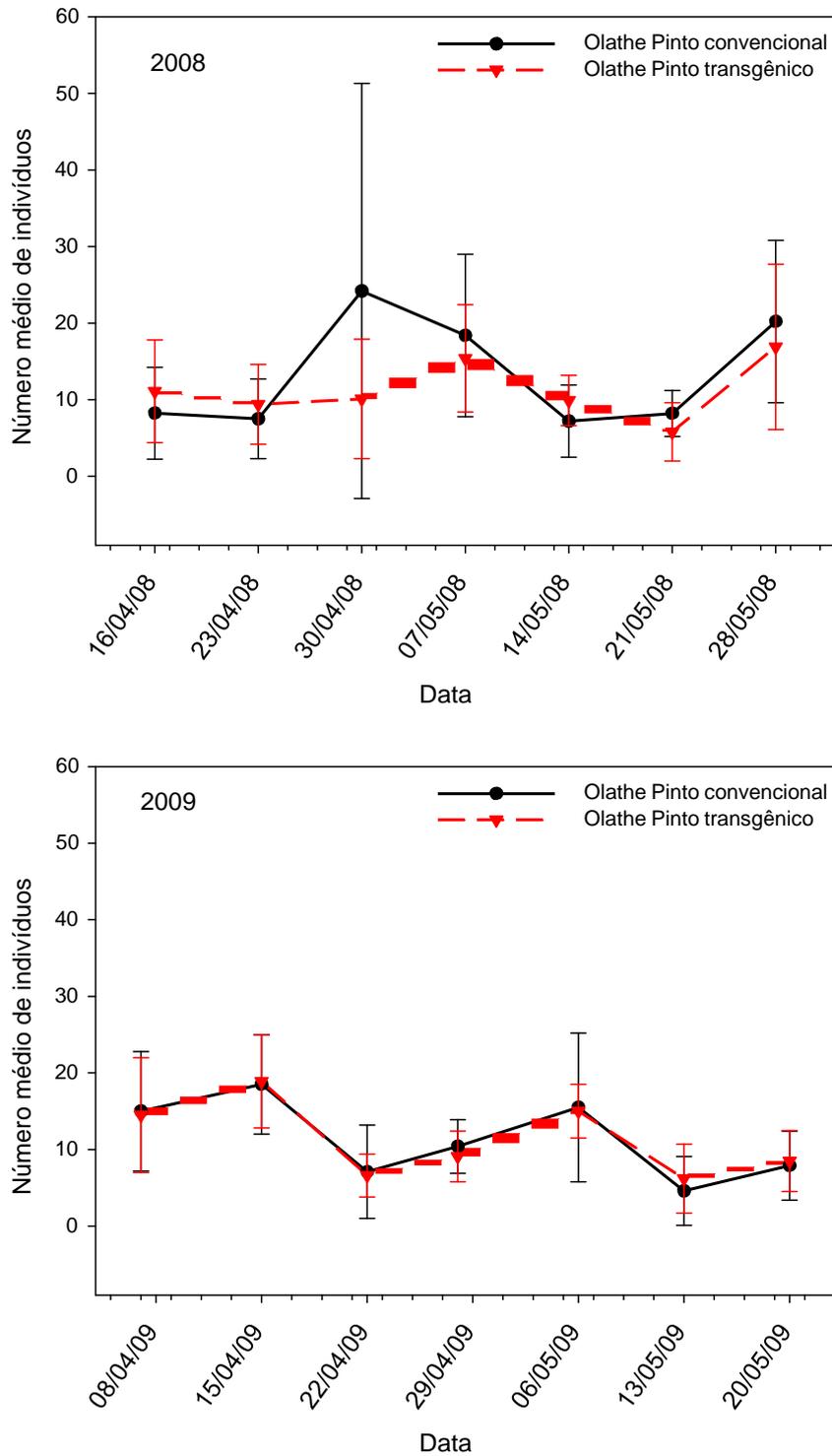


Figura VII.2. Número médio de uma morfoespécie de ácaro (ácaro nº 2) capturado em armadilha de queda em parcelas de feijoeiro Olathe transgênico (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional plantados em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

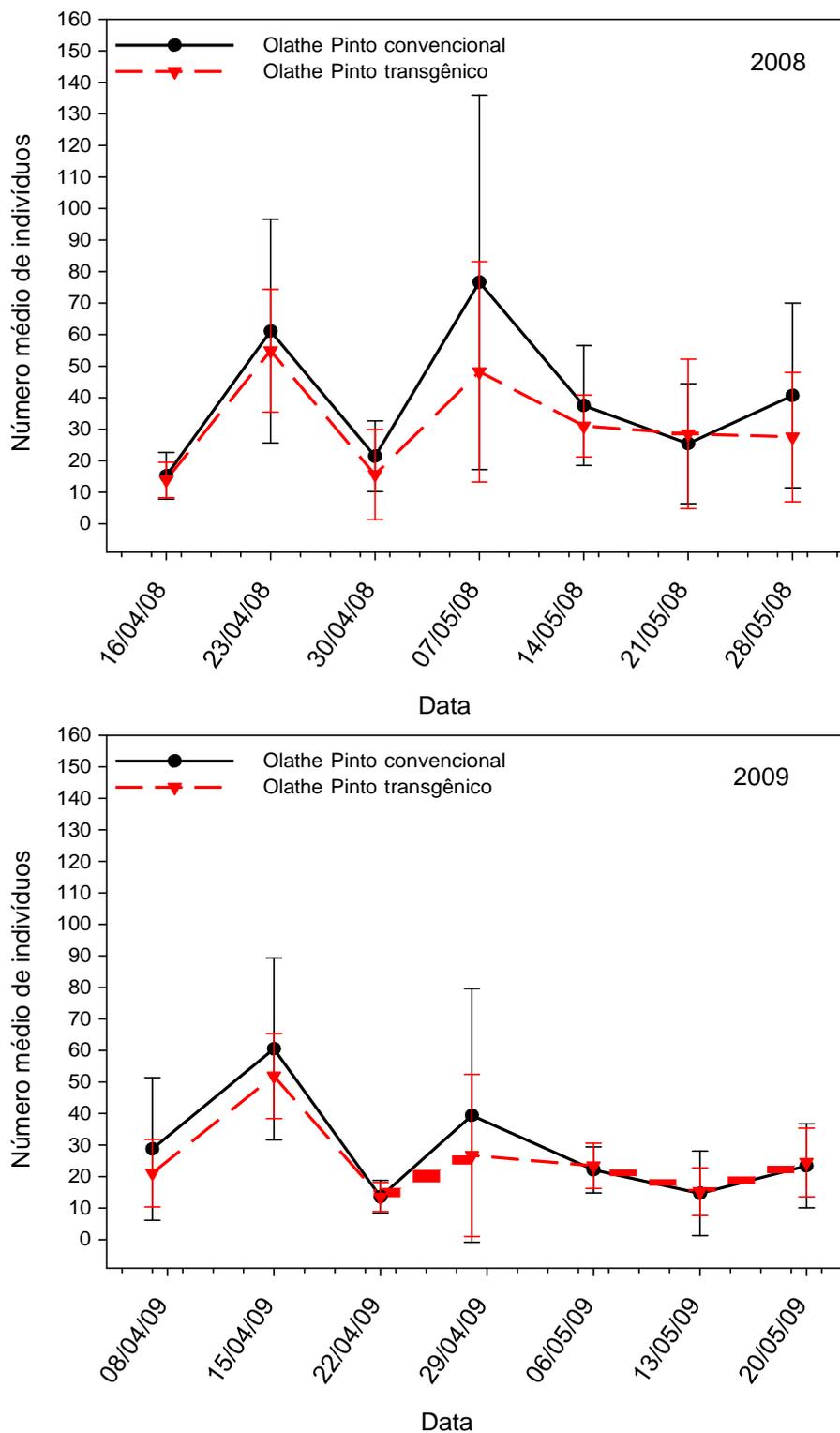


Figura VII.3. Número médio de morfoespécies de colêmbolos capturado em armadilha de queda em parcelas de feijoeiro Olathe transgênico (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional plantados em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

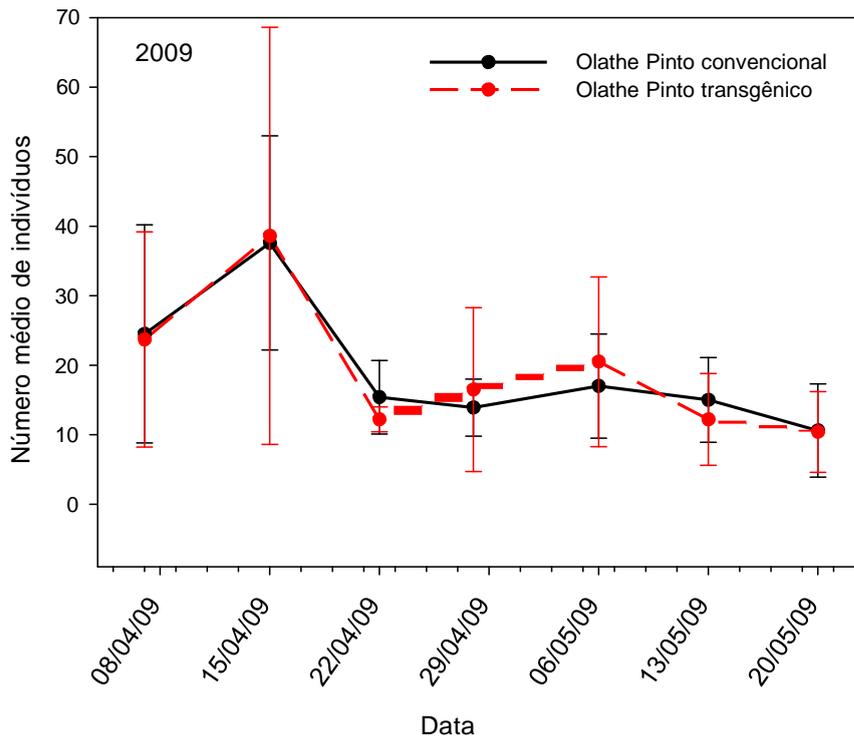
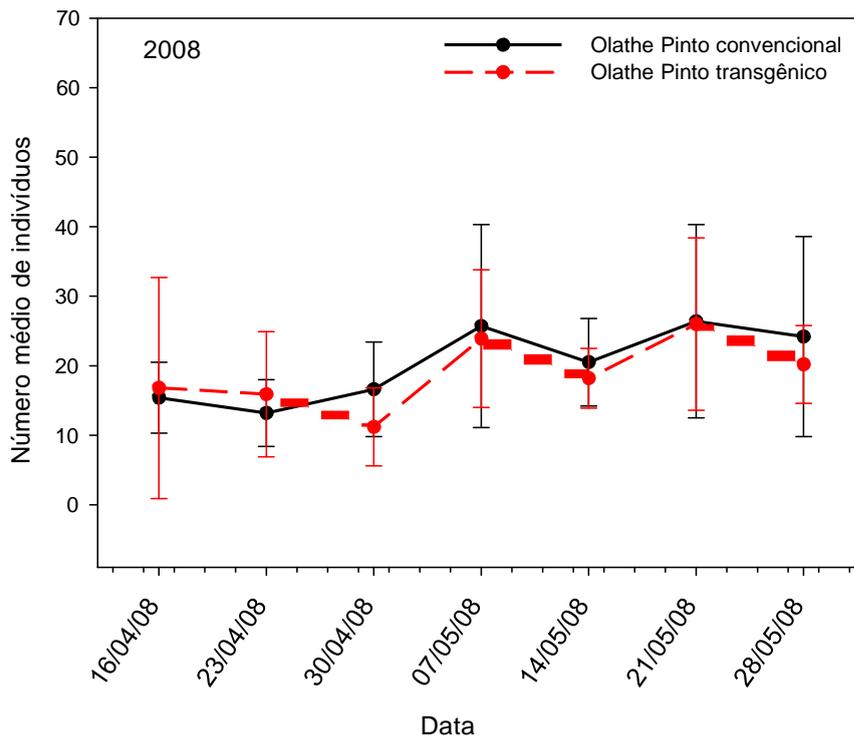


Figura VII.4. Número médio de *Solenopsis* spp. capturado em armadilha de queda em parcelas de feijoeiro Olathe transgênico (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional plantados em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

O número médio total dos artrópodes capturados foi significativamente semelhante para o evento Embrapa 5.1 e o convencional nas sete datas de coletas em 2008 e 2009 (Figura VII.1, Tabela VII.2). As flutuações das curvas para a morfoespécie do ácaro n° 2, para a formiga *Solenopsis* spp e para os colêmbolos foram muito semelhantes para os dois tratamentos, não sendo observadas diferenças significativas entre o evento Embrapa 5.1 e o convencional nas sete datas de amostragem em 2008 e 2009 (Figuras VII.2 a VII.4, Tabela VII.2).

O ácaro n° 2 amostrado possivelmente pertence à ordem Oribatida, uma vez que nos solos das regiões tropicais são os ácaros mais abundantes e diversos. A maioria deles concentra-se entre zero e cinco cm de profundidade e são conhecidos principalmente por se alimentarem de matéria orgânica (Wallwork, 1983).

Os colêmbolos são comumente encontrados próximos à superfície do solo, em locais com alta umidade. São observados no solo humoso, entre musgos, sobre ou sob folhas caídas, na bainha de folhas de plantas e no meio de detritos vegetais em decomposição (Buzzi, 2002). São conhecidas aproximadamente 6000 espécies distribuídas em 20 famílias (Daly et al., 1998; Corseuil, 2000).

O complexo de espécies *Solenopsis saevissima* (F. Smith), conhecida como formiga lava-pés, é uma das espécies mais variáveis e mais espalhadas da fauna de formigas sul-americanas (Wilson, 1952). A sistemática do grupo tem uma longa história de confusões sobre o número de espécies válidas (Buren, 1972), até que Trager (1991) fez uma extensa revisão do grupo. O estudo apontou a ocorrência para a América do Sul de 17 espécies (*S. bruesi* Creighton, *S. gayi* Spinola, *S. geminata* Fabricius, *S. weyrauchi* Trager, *S. electra* Forel, *S. interrupta* Santschi, *S. invicta*, *S. macdonaghi* Santschi, *S. megergates* Trager, *S. pusillignis* Trager, *S. pythia* Santschi, *S. quinquecuspis* Forel, *S. richteri*, *S. saevissima* F. Smith, *S. substituta* Santschi, *S. tridens* Forel, *S. virulens* F. Smith).

Londrina, PR

Em 2008, foram coletados um total de 2951 artrópodes da superfície do solo no evento Embrapa 5.1 e no convencional, nas três coletas com as armadilhas de queda realizadas na Embrapa Soja (Tabela VII.3). Em 2009, 2844 artrópodes foram coletados nos dois tratamentos (Tabela VII.1). Foram amostrados um total de 62 espécies (Tabela

VII.1). Em 53 espécies de insetos distribuídas em 11 ordens, foram observadas diferenças significativas entre o evento Embrapa 5.1 e o convencional somente para a *Periplaneta* sp e o carabidae nº 3 em 2009 (Tabela VII.3). Para as quatro espécies da classe Arachnida, as morfoespécies de colêmbolos, as espécies da classe Gastropoda e Chilopoda, não foram observadas diferenças significativas entre o evento Embrapa 5.1 e o convencional (Tabela VII.3). O número total de indivíduos capturados nas armadilhas foi significativamente semelhante para o evento Embrapa 5.1 e o convencional em 2008 e em 2009 (Tabela VII.4).

Semelhante ao observado nas coletas realizadas em Santo Antônio de Goiás, os indivíduos capturados em maior número foram: as formigas lava-pés *Solenopsis* sp com aproximadamente 20% e 30% de frequência em 2008 e 2009, respectivamente; o ácaro nº 2, com aproximadamente 30% e 5% de frequência em 2008 e 2009, respectivamente; as morfoespécies de colêmbolos com 35% e 40% de frequência em 2008 e 2009, respectivamente.

Tabela VII.3. Número médio, total e frequência (F %) de artrópodes da superfície do solo capturados em armadilhas de queda em parcelas de feijoeiro Olathe Pinto 5.1 (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional plantados em 2008 e 2009 em Londrina, PR.

Gênero/Espécie (Ordem/Família)	Ano 2008						Ano 2009					
	Feijoeiro convencional			Evento Embrapa 5.1			Feijoeiro convencional			Evento Embrapa 5.1		
CLASSE INSECTA	Total	F (%)	Média (n=24)	Total	F (%)	Média (n=24)	Total	F (%)	Média (n=24)	Total	F (%)	Média (n=24)
Ordem Blattodea												
Periplaneta sp. (Blattidae)	0	0	0 a	0	0	0 a	5	0,365	0,208 a	0	0	0 b
Ordem Coleoptera												
Astylus sp. (Dasytidae)	2	0,131	0,083 a	0	0	0 a	0	0	0 a	0	0	0 a
Byrridae	3	0,196	0,125 a	10	0,703	0,417 a	0	0	0 a	0	0	0 a
<i>Calosoma sp.</i> (Carabidae)	0	0	0 a	0	0	0 a	0	0	0 a	1	0,068	0,042 a
Carabidae n°1	1	0,065	0,042 a	0	0	0 a	1	0,073	0,042 a	1	0,068	0,042 a
Carabidae n°2	0	0	0 a	0	0	0 a	1	0,073	0,042 a	3	0,204	0,125 a
Carabidae n°3	1	0,065	0,042 a	2	0,141	0,083 a	7	0,511	0,292 a	0	0	0 b
Cicindelidae	0	0	0 a	0	0	0 a	6	0,438	0,25 a	6	0,407	0,25 a
Coleoptera (Larva)	0	0	0 a	0	0	0 a	2	0,146	0,083 a	1	0,068	0,042 a
Coleoptero n°3	3	0,196	0,125 a	1	0,07	0,042 a	2	0,146	0,083 a	1	0,068	0,042 a
Curculionidae n°2	0	0	0 a	0	0	0 a	1	0,073	0,042 a	2	0,136	0,083 a
Curculionidae	10	0,654	0,417 a	15	1,054	0,625 a	0	0	0 a	0	0	0 a
Diabrotica speciosa (Crysomelidae)	1	0,065	0,042 a	0	0	0 a	7	0,511	0,292 a	4	0,272	0,167 a
Elateridae	0	0	0 a	0	0	0 a	0	0	0 a	3	0,204	0,125 a
<i>Lagria villosa</i> (Lagriidae)	8	0,524	0,333 a	5	0,351	0,208 a	9	0,656	0,375 a	7	0,475	0,292 a
<i>Lebia sp.</i> (Carabidae)	0	0	0 a	0	0	0 a	2	0,146	0,083 a	0	0	0 a
<i>Maecolaspis sp.</i> (Crysomelidae)	0	0	0 a	0	0	0 a	1	0,073	0,042 a	2	0,136	0,083 a
Nitidulidae	8	0,524	0,333 a	11	0,773	0,458 a	40	2,918	1,667 a	45	3,055	1,875 a
<i>Percolaspis sp.</i> (Crysomelidae)	0	0	0 a	0	0	0 a	1	0,073	0,042 a	1	0,068	0,042 a
Scarabaeidae n° 1	0	0	0 a	1	0,07	0,042 a	32	2,334	1,333 a	21	1,426	0,875 a

Continua na próxima página

Continuação da Tabela VII.3

Gênero/Espécie (Ordem/Família)	Ano 2008						Ano 2009					
	Feijoeiro convencional			Evento Embrapa 5.1			Feijoeiro convencional			Evento Embrapa 5.1		
	Total	F (%)	Média (n=24)	Total	F (%)	Média (n=24)	Total	F (%)	Média (n=24)	Total	F (%)	Média (n=24)
CLASSE INSECTA												
Scarabaeidae n°2	0	0	0 a	0	0	0 a	4	0,292	0,167 a	2	0,136	0,083 a
Scarabaeidae n°3	1	0,065	0,042 a	3	0,211	0,125 a	28	2,042	1,167 a	26	1,765	1,083 a
Scarabaeidae (Larva)	1	0,065	0,042 a	0	0	0 a	0	0	0 a	0	0	0 a
Staphylinidae n° 2	1	0,065	0,042 a	2	0,141	0,083 a	5	0,365	0,208 a	8	0,543	0,333 a
Ordem Diptera												
Diptera	1	0,065	0,042 a	1	0,07	0,042 a	0	0	0 a	0	0	0 a
Ordem Dermoptera												
Forficulidae	0	0	0 a	0	0	0 a	7	0,511	0,292 a	2	0,136	0,083 a
Ordem Ephemeroptera												
Ephemeroptera	0	0	0 a	0	0	0 a	1	0,073	0,042 a	2	0,136	0,083 a
Ordem Hemiptera												
Aphididae	19	1,243	0,792 a	7	0,492	0,292 a	0	0	0 a	0	0	0 a
Cicadellidae	1	0,065	0,042 a	3	0,211	0,125 a	12	0,875	0,5 a	10	0,679	0,417 a
Cydnidae	1	0,065	0,042 a	3	0,211	0,125 a	2	0,146	0,083 a	1	0,068	0,042 a
<i>Euchistus heros</i> (Pentatomidae)	0	0	0 a	0	0	0 a	5	0,365	0,208 a	4	0,272	0,167 a
Hemiptera (Ninfa)	1	0,065	0,042 a	0	0	0 a	0	0	0 a	0	0	0 a
Hemiptera n° 1	3	0,196	0,125 a	0	0	0 a	0	0	0 a	0	0	0 a
Hemiptera n° 2	1	0,065	0,042 a	0	0	0 a	0	0	0 a	0	0	0 a
<i>Neomegalotomus simplex</i> (Alydidae)	18	1,178	0,75 a	8	0,562	0,333 a	0	0	0 a	3	0,204	0,125 a
Pentatomidae	3	0,196	0,125 a	4	0,281	0,167 a	0	0	0 a	0	0	0 a
<i>Piezodorus guildinii</i> (Pentatomidae)	1	0,065	0,042 a	0	0	0 a	1	0,073	0,042 a	1	0,068	0,042 a
Reduviidae	0	0	0 a	0	0	0 a	1	0,073	0,042 a	0	0	0 a

Continua na próxima página

Continuação da Tabela VII.3

Gênero/Espécie (Ordem/Família)	Ano 2008						Ano 2009					
	Feijoeiro convencional			Evento Embrapa 5.1			Feijoeiro convencional			Evento Embrapa 5.1		
	Total	F (%)	Média (n=24)	Total	F (%)	Média (n=24)	Total	F (%)	Média (n=24)	Total	F (%)	Média (n=24)
CLASSE INSECTA												
Ordem Hymenoptera												
Apidae n° 1	2	0,131	0,083 a	1	0,07	0,042 a	0	0	0 a	0	0	0 a
<i>Atta spp.</i> (Formicidae)	0	0	0 a	0	0	0 a	13	0,948	0,542 a	15	1,018	0,625 a
Braconidae	0	0	0 a	0	0	0 a	1	0,073	0,042 a	0	0	0 a
Formicidae n° 2	0	0	0 a	1	0,07	0,042 a	0	0	0 a	0	0	0 a
Hymenoptera n° 1	0	0	0 a	0	0	0 a	6	0,438	0,25 a	2	0,136	0,083 a
Hymenoptera n° 3	3	0,196	0,125 a	1	0,07	0,042 a	0	0	0 a	0	0	0 a
Mutillidae	0	0	0 a	1	0,07	0,042 a	0	0	0 a	2	0,136	0,083 a
<i>Solenopsis spp.</i> (Formicidae)	332	21,728	13,83 a	324	22,769	13,5 a	392	28,592	16,33 a	511	34,691	21,29 a
Ordem Lepidoptera												
Lepidoptera	1	0,065	0,042 a	2	0,141	0,083 a	13	0,948	0,542 a	13	0,883	0,542 a
<i>Spodoptera spp.</i> (Lagarta)	2	0,131	0,083 a	2	0,141	0,083 a	3	0,219	0,125 a	1	0,068	0,042 a
Ordem Orthoptera												
Acrididae	6	0,393	0,25 a	6	0,422	0,25 a	5	0,365	0,208 a	8	0,543	0,333 a
Gryllidae	17	1,113	0,708 a	15	1,054	0,625 a	10	0,729	0,417 a	6	0,407	0,25 a
Ordem Thysanoptera												
Thripidae n° 1	3	0,196	0,125 a	1	0,07	0,042 a	1	0,073	0,042 a	4	0,272	0,167 a
Thripidae n° 3	1	0,065	0,042 a	0	0	0 a	0	0	0 a	0	0	0 a
Ordem Trichoptera												
Trichoptera (Larva)	1	0,065	0,042 a	0	0	0 a	0	0	0 a	0	0	0 a

Continua na próxima página

Continuação da Tabela VII.3

Gênero/Espécie (Ordem/Família)	Ano 2008						Ano 2009					
	Feijoeiro convencional			Evento Embrapa 5.1			Feijoeiro convencional			Evento Embrapa 5.1		
	Total	F (%)	Média (n=24)	Total	F (%)	Média (n=24)	Total	F (%)	Média (n=24)	Total	F (%)	Média (n=24)
CLASSE INSECTA												
CLASSE ARACHINIDA												
Ordem Araneae												
Araneae n°1	21	1,374	0,875 a	26	1,827	1,083 a	10	0,729	0,417 a	20	1,358	0,833 a
Ordem Acarina												
Acari n°1	16	1,047	0,667 a	13	0,914	0,542 a	24	1,751	1 a	32	2,172	1,333 a
Acari n°2	486	31,806	20,25 a	426	29,937	17,75 a	99	7,221	4,125 a	73	4,956	3,042 a
Acari n°3	2	0,131	0,083 a	0	0	0 a	0	0	0 a	0	0	0 a
CLASSE COLLEMBOLA												
Ordem Collembola												
Morfoespécies de Colêmbolos	535	35,013	22,29 a	519	36,472	21,62 a	605	44,128	25,29 a	623	42,295	25,96 a
CLASSE GASTROPODA												
Ordem Pulmonata												
Pulmonata	2	0,131	0,083 a	1	0,07	0,042 a	0	0	0 a	0	0	0 a
CLASSE CHILOPODA												
Chilopoda	2	0,131	0,083 a	2	0,141	0,083 a	1	0,073	0,042 a	1	0,068	0,042 a
CLASSE OLIGOCHAETA												
Oligochaeta	0	0	0 a	0	0	0 a	0	0	0 a	1	0,068	0,042 a
CLASSE DIPLOPODA												
Ordem Juliformia												
Juliformia	7	0,458	0,292 a	6	0,422	0,25 a	5	0,365	0,208 a	4	0,272	0,167 a
TOTAL DE INDIVÍDUOS	1528	100		1423	100		1371	100		1473	100	

Tabela VII.4. Valores de $P > F$ para o número médio: do ácaro n° 2, de colêmbolos, de *Solenopsis* sp. e do total dos artrópodes coletados em armadilhas de queda em diferentes datas de amostragem em 2008 e 2009. Londrina, PR

Data	Número médio Ácaro n° 2	Número médio Collembola	Número médio <i>Solenopsis</i> sp.	Número total médio dos Artrópodes
09/04/08	$P > 0,8157$	$P > 0,8176$	$P > 0,1723$	$P > 0,8289$
22/04/08	$P > 0,9733$	$P > 0,7795$	$P > 0,1809$	$P > 0,7990$
15/05/08	$P > 0,0537$	$P > 0,8538$	$P > 0,8997$	$P > 0,3230$
07/10/09	$P > 0,8944$	$P > 0,4625$	$P > 0,2292$	$P > 0,1864$
03/11/09	$P > 0,9719$	$P > 0,6927$	$P > 0,9522$	$P > 0,9154$
24/11/09	$P > 0,3190$	$P > 0,7708$	$P > 0,3540$	$P > 0,2288$

Nas três datas de coleta, o número médio total de artrópodes, o número médio de *Solenopsis* sp, o número médio do ácaro n° 2 e os colêmbolos foi significativamente semelhante para evento Embrapa 5.1 e o convencional (Tabela VII.4, Figuras VII.5 a VII.8).

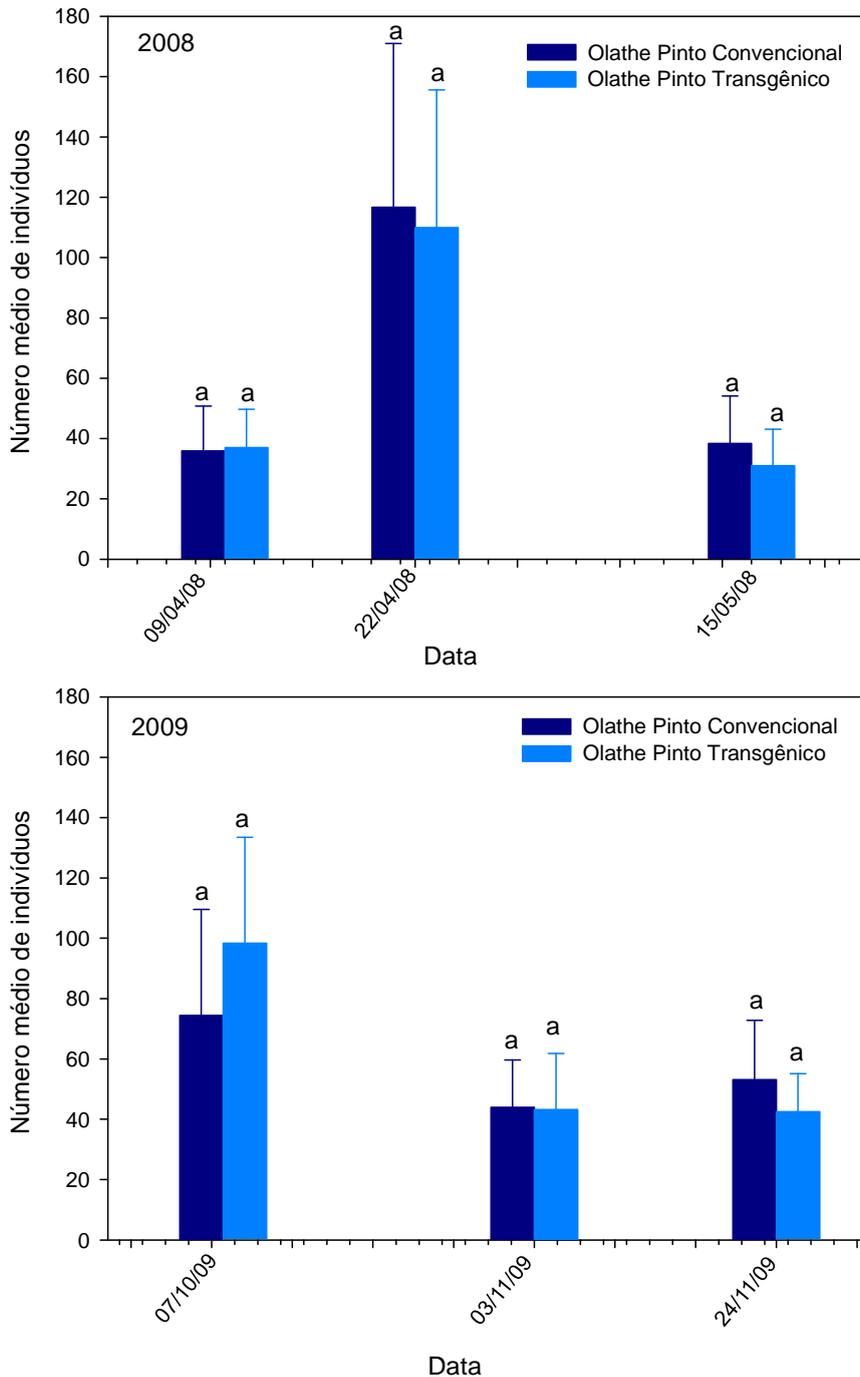


Figura VII.5. Número médio total de artrópodes da superfície do solo capturados em armadilhas de queda em parcelas de feijoeiro Olathe transgênico (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional plantados em 2008 e 2009 em Londrina, PR.

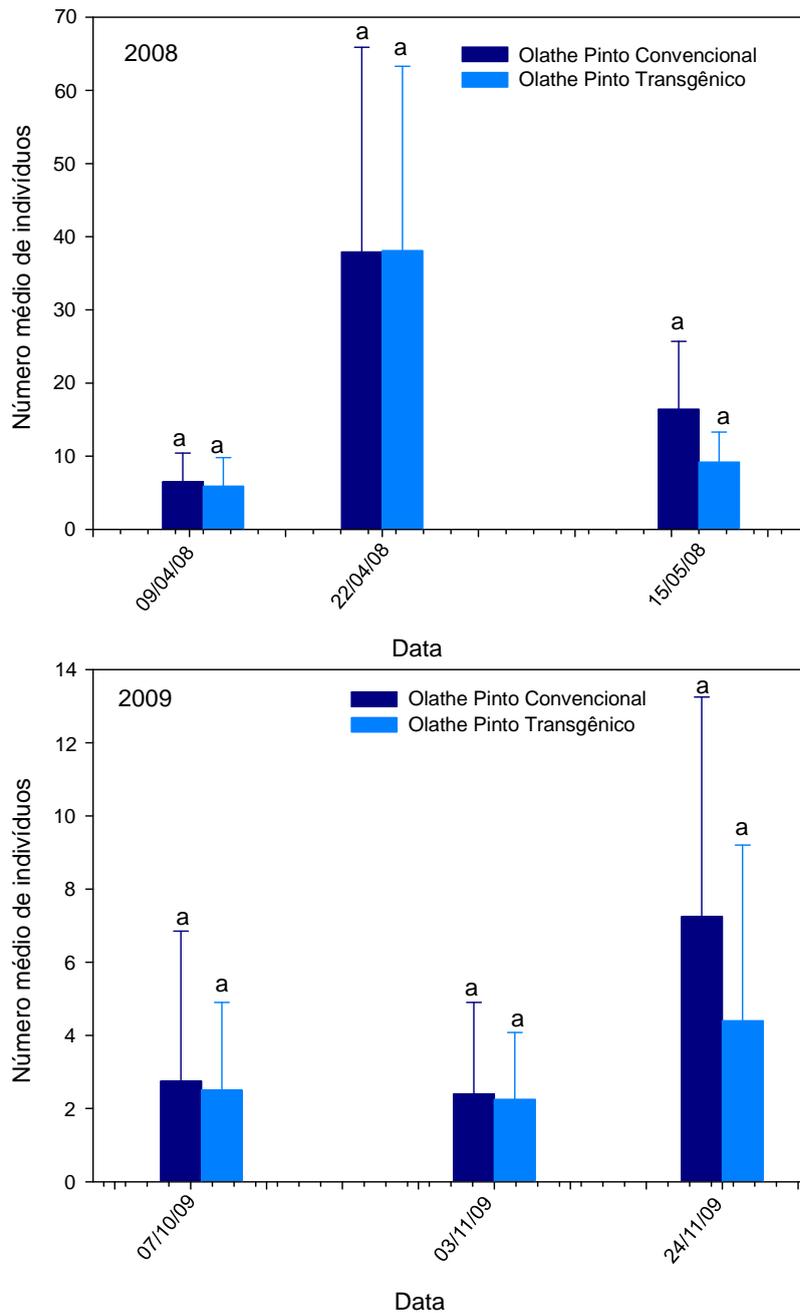


Figura VII.6. Número médio de uma morfoespécie de ácaro (ácaro n° 2) capturado em armadilhas de queda em parcelas de feijoeiro Olathe transgênico (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional plantados em 2008 e 2009 em Londrina, PR.

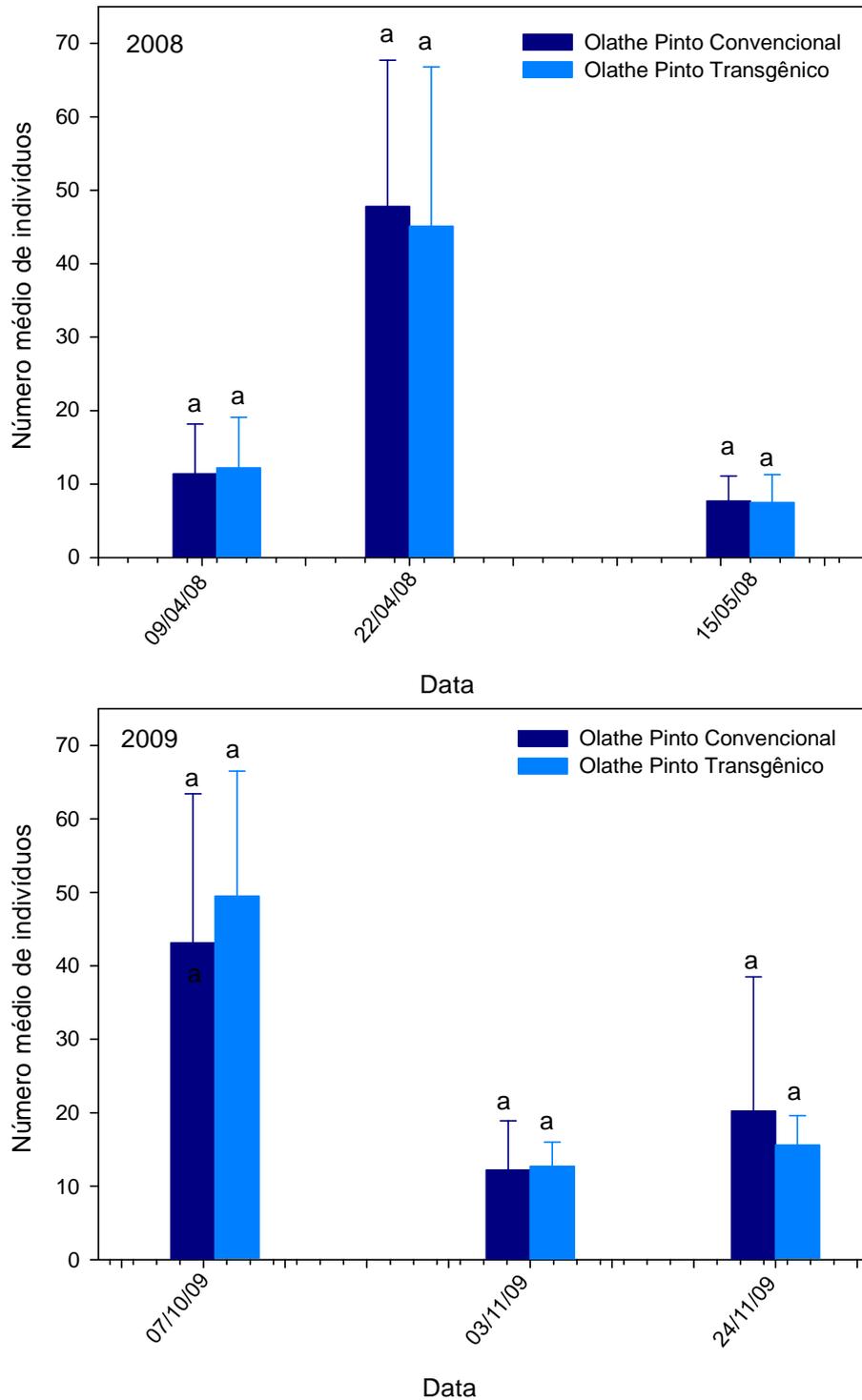


Figura VII.7. Número médio de morfoespécies de colêmbolos capturado em armadilhas de queda em parcelas de feijoeiro Olathe transgênico (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional plantados em 2008 e 2009 em Londrina, PR.

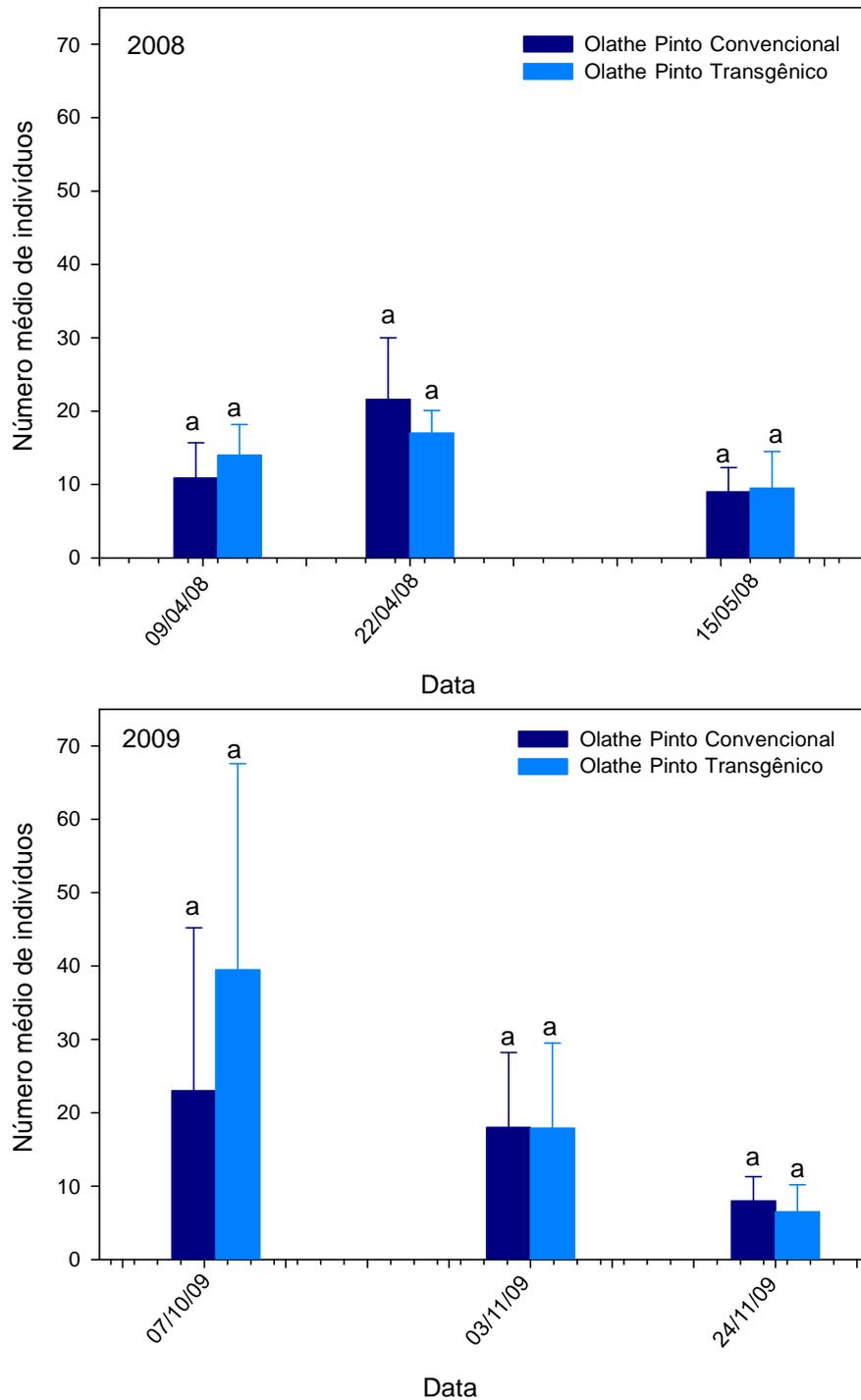


Figura VII.8. Número médio de *Solenopsis* spp. capturado em armadilhas de queda em parcelas de feijoeiro Olathe transgênico (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional plantados em 2008 e 2009 em Londrina, PR.

Sete Lagoas, MG

Na Embrapa Milho e Sorgo foram coletados um total de 1390 artrópodes na superfície do solo no evento Embrapa 5.1 e no convencional no primeiro ano de plantio em 2008, nas três datas de coleta (Tabela VII.5). A quantidade de artrópodes coletada foi menor que os 2951 indivíduos amostrados em Londrina, provavelmente porque a área experimental em Sete Lagoas não foi cultivada anteriormente com o feijoeiro ou outra leguminosa (Tabelas VII.3 e VII.5). Já em 2009, foram coletados 2697 artrópodes nos dois tratamentos, semelhante aos 2844 coletados em Londrina (Tabelas VII.3 e VII.5). Num total de 47 indivíduos amostradas nos dois anos de plantio, 41 espécies pertenceram a classe Insecta distribuídas em sete ordens (Tabela VII.5). Da classe Arachnida foram amostrados uma espécie de aranha e duas espécies de ácaro (Tabela VII.5). Para as classes Collembola, Chilopoda e Diplopoda foram coletadas uma morfoespécie de cada (Tabela VII.1).

Não foram observadas diferenças significativas para o número total de indivíduos capturados nas armadilhas entre o evento Embrapa 5.1 e o convencional em 2008 e em 2009 (Tabela VII.6). Foi observado significativamente maior número de uma morfoespécie de formiga (formicidae n^o 1) no evento Embrapa 5.1 em comparação ao convencional (Tabela VII.5). Entretanto, isso foi observado apenas em um ano, não sendo observado em qualquer outro local nos dois anos estudados. Para as demais 46 espécies, não foram observadas diferenças significativas entre os dois tratamentos (Tabela VII.5).

Tabela VII.5. Número médio, total e frequência de ocorrência (FO, %) de artrópodes da superfície do solo capturados em armadilhas de queda em parcelas de feijoeiro Olathe Pinto 5.1 (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional plantados em 2008 e 2009 em Sete Lagoas, MG.

(Gênero/Espécie)	Ano 2008						Ano 2009					
	Feijoeiro convencional			Evento Embrapa 5.1			Feijoeiro convencional			Evento Embrapa 5.1		
Ordem/Família	Total	F (%)	Média (n=24)	Total	F (%)	Média (n=24)	Total	F (%)	Média (n=24)	Total	F (%)	Média (n=24)
CLASSE INSECTA												
Ordem Blattodea												
<i>Periplaneta sp.</i> (Blattidae)	0	0	0 a	0	0	0 a	0	0	0 a	1	0,08	0,042 a
Ordem Coleoptera												
Byrydae	5	0,724	0,208 a	2	0,286	0,083 a	0	0	0 a	0	0	0 a
Carabidae n°1	0	0	0 a	1	0,143	0,042 a	2	0,14	0,083 a	3	0,24	0,125 a
Carabidae n°3	0	0	0 a	0	0	0 a	1	0,07	0,042 a	2	0,16	0,083 a
<i>Cerotoma arcuata</i> (Crysolmelidae)	2	0,289	0,083 a	3	0,429	0,125 a	0	0	0 a	0	0	0 a
Coleoptera n°3	0	0	0 a	0	0	0 a	6	0,419	0,25 a	5	0,4	0,208 a
Coccinellidae (Larva)	0	0	0 a	0	0	0 a	1	0,07	0,042 a	0	0	0 a
<i>Diabrotica speciosa</i> (Crysolmelidae)	1	0,145	0,042 a	0	0	0 a	1	0,07	0,042 a	0	0	0 a
Elateridae (Larva)	1	0,145	0,042 a	0	0	0 a	0	0	0 a	0	0	0 a
Elateridae	0	0	0 a	0	0	0 a	3	0,209	0,125 a	0	0	0 a
Eriopis sp. (Coccinellidae)	0	0	0 a	0	0	0 a	0	0	0 a	1	0,08	0,042 a
<i>Lagria villosa</i> (Lagriidae)	1	0,145	0,042 a	0	0	0 a	37	2,584	1,542 a	36	2,85	1,5 a
<i>Lebia sp.</i> (Carabidae)	0	0	0 a	0	0	0 a	1	0,07	0,042 a	0	0	0 a
Nitidulidae	0	0	0 a	0	0	0 a	59	4,12	2,458 a	80	6,32	3,333 a
<i>Percolaspis sp.</i> (Crysolmelidae)	0	0	0 a	0	0	0 a	4	0,279	0,167 a	1	0,08	0,042 a
Scarabaeidae n° 1	0	0	0 a	0	0	0 a	10	0,698	0,417 a	27	2,13	1,125 a
Scarabaeidae n°3	6	0,868	0,25 a	7	1,001	0,292 a	8	0,559	0,333 a	2	0,16	0,083 a
Staphylinidae n° 2	4	0,579	0,167 a	1	0,143	0,042 a	17	1,187	0,708 a	14	1,11	0,583 a
Ordem Hemiptera												
Aphididae	1	0,145	0,042 a	4	0,572	0,167 a	17	1,187	0,708 a	11	0,87	0,458 a

Continua na próxima página

Continuação da Tabela VII.5

(Gênero/Espécie)	Ano 2008						Ano 2009					
	Feijoeiro convencional			Evento Embrapa 5.1			Feijoeiro convencional			Evento Embrapa 5.1		
Ordem/Família	Total	F (%)	Média (n=24)	Total	F (%)	Média (n=24)	Total	F (%)	Média (n=24)	Total	F (%)	Média (n=24)
CLASSE INSECTA												
Cicadellidae	2	0,289	0,083 a	4	0,572	0,167 a	8	0,559	0,333 a	7	0,55	0,292 a
Cydnidae	0	0	0 a	0	0	0 a	4	0,279	0,167 a	3	0,24	0,125 a
Delphacidae	0	0	0 a	0	0	0 a	0	0	0 a	1	0,08	0,042 a
<i>Geocoris sp.</i> (Lygaeidae)	0	0	0 a	0	0	0 a	1	0,07	0,042 a	1	0,08	0,042 a
<i>Neomegalotomus simplex</i> (Alydidae)	2	0,289	0,083 a	1	0,143	0,042 a	0	0	0 a	0	0	0 a
Ordem Hymenoptera												
Apidae n°1	2	0,289	0,083 a	2	0,286	0,083 a	1	0,07	0,042 a	0	0	0 a
Apidae n°2	2	0,289	0,083 a	3	0,429	0,125 a	1	0,07	0,042 a	2	0,158	0,083 a
<i>Atta spp.</i> (Formicidae)	21	3,039	0,875 a	19	2,718	0,792 a	9	0,628	0,375 a	11	0,87	0,458 a
Braconidae	0	0	0 a	0	0	0 a	0	0	0 a	1	0,08	0,042 a
Formicidae n°1	5	0,724	0,208 a	17	2,432	0,708 b	0	0	0 a	0	0	0 a
Formicidae n°2	0	0	0 a	0	0	0 a	6	0,419	0,25 a	3	0,24	0,125 a
Formicidae n°3	0	0	0 a	0	0	0 a	0	0	0 a	1	0,08	0,042 a
Hymenoptera n° 1	1	0,145	0,042 a	1	0,143	0,042 a	7	0,489	0,292 a	2	0,16	0,083 a
Hymenoptera n° 2	0	0	0 a	0	0	0 a	0	0	0 a	1	0,08	0,08 a
Hymenoptera n° 3	3	0,434	0,125 a	5	0,715	0,208 a	0	0	0 a	0	0	0 a
Mutillidae	0	0	0 a	1	0,143	0,042 a	6	0,419	0,25 a	3	0,24	0,125 a
<i>Solenopsis spp.</i> (Formicidae)	313	45,297	13,04 a	292	41,774	12,17 a	534	37,291	22,25 a	374	29,6	15,58 a
Ordem Lepidoptera												
Lepidoptera	0	0	0 a	0	0	0 a	1	0,07	0,042 a	0	0	0 a
Ordem Orthoptera												
Acrididae	2	0,289	0,083 a	0	0	0 a	1	0,07	0,042 a	0	0	0 a

Continua na próxima página

Continuação da Tabela VII.5

(Gênero/Espécie)	Ano 2008						Ano 2009					
	Feijoeiro convencional			Evento Embrapa 5.1			Feijoeiro convencional			Evento Embrapa 5.1		
Ordem/Família	Total	F (%)	Média (n=24)	Total	F (%)	Média (n=24)	Total	F (%)	Média (n=24)	Total	F (%)	Média (n=24)
CLASSE INSECTA												
Gryllidae	3	0,434	0,125 a	5	0,715	0,208 a	5	0,349	0,208 a	11	0,87	0,458 a
Ordem Thysanoptera												
Thripidae n°1	7	1,013	0,292 a	6	0,858	0,25 a	1	0,07	0,042 a	0	0	0 a
Thripidae n°3	1	0,145	0,042 a	3	0,429	0,125 a	0	0	0 a	0	0	0 a
CLASSE ARACHNIDA												
Ordem Araneae												
Araneae n°1	10	1,447	0,417 a	9	1,288	0,375 a	9	0,628	0,375 a	8	0,63	0,333 a
Ordem Acari												
Acari n°1	30	4,342	1,25 a	35	5,007	1,458 a	18	1,257	0,75 a	21	1,66	0,875 a
Acari n°2	106	15,34	4,417 a	108	15,451	4,5 a	171	11,941	7,125 a	200	15,8	8,333 a
CLASSE COLLEMBOLA												
Ordem Collembola												
Morfoespécies de Colêmbolos	158	22,865	6,583 a	169	24,177	7,042 a	482	33,659	20,08 a	431	34,1	17,96 a
CLASSE DIPLOPODA												
Ordem Juliformia												
Juliformia	0	0	0 a	0	0	0 a	0	0	0 a	1	0,08	0,042 a
CLASSE OLIGOCHAETA												
Oligochaeta	2	0,289	0,083 a	1	0,143	0,042 a	0	0	0 a	0	0	0 a
TOTAL DE INDIVÍDUOS	691	100	28,80 a	699	100	29,10 a	1432	100	56,70 a	1265	100	52,71 a

Tabela VII.6. Valores de $P > F$ para o número médio: do ácaro n° 2, de colêmbolos, de *Solenopsis* sp. e do total dos artrópodes coletados em armadilhas de queda em diferentes datas de amostragem em 2008 e 2009. Sete Lagoas, MG

Data	Número médio do ácaro n° 2	Número médio de Colêmbolos	Número médio de <i>Solenopsis</i> sp.	Número médio total dos Artrópodes
06/05/08	$P > 0,2085$	$P > 0,3574$	$P > 0,1330$	$P > 0,2216$
20/05/08	$P > 0,7693$	$P > 0,2103$	$P > 0,0642$	$P > 0,1897$
05/06/08	$P > 0,8026$	$P > 0,8039$	$P > 0,7432$	$P > 0,8600$
09/09/09	$P > 0,7395$	$P > 0,7757$	$P > 0,3235$	$P > 0,3507$
29/09/09	$P > 0,4802$	$P > 0,5972$	$P > 0,1250$	$P > 0,8517$
16/10/09	$P > 0,6368$	$P > 0,5252$	$P > 0,4405$	$P > 0,6637$

As espécies mais frequentes nas amostragens em Sete Lagoas foram as mesmas amostradas em Santo Antônio de Goiás (GO) e em Londrina (PR) (Figuras VII.4 a VII.8). Como observado nos dois outros locais, o número total de artrópodes, de *Solenopsis* sp, do ácaro n° 2 e os colêmbolos foi significativamente semelhante para evento Embrapa 5.1 e o convencional, nas três datas de coleta (Tabelas VII.5 e VII.6, Figuras VII.9 a VII.12).

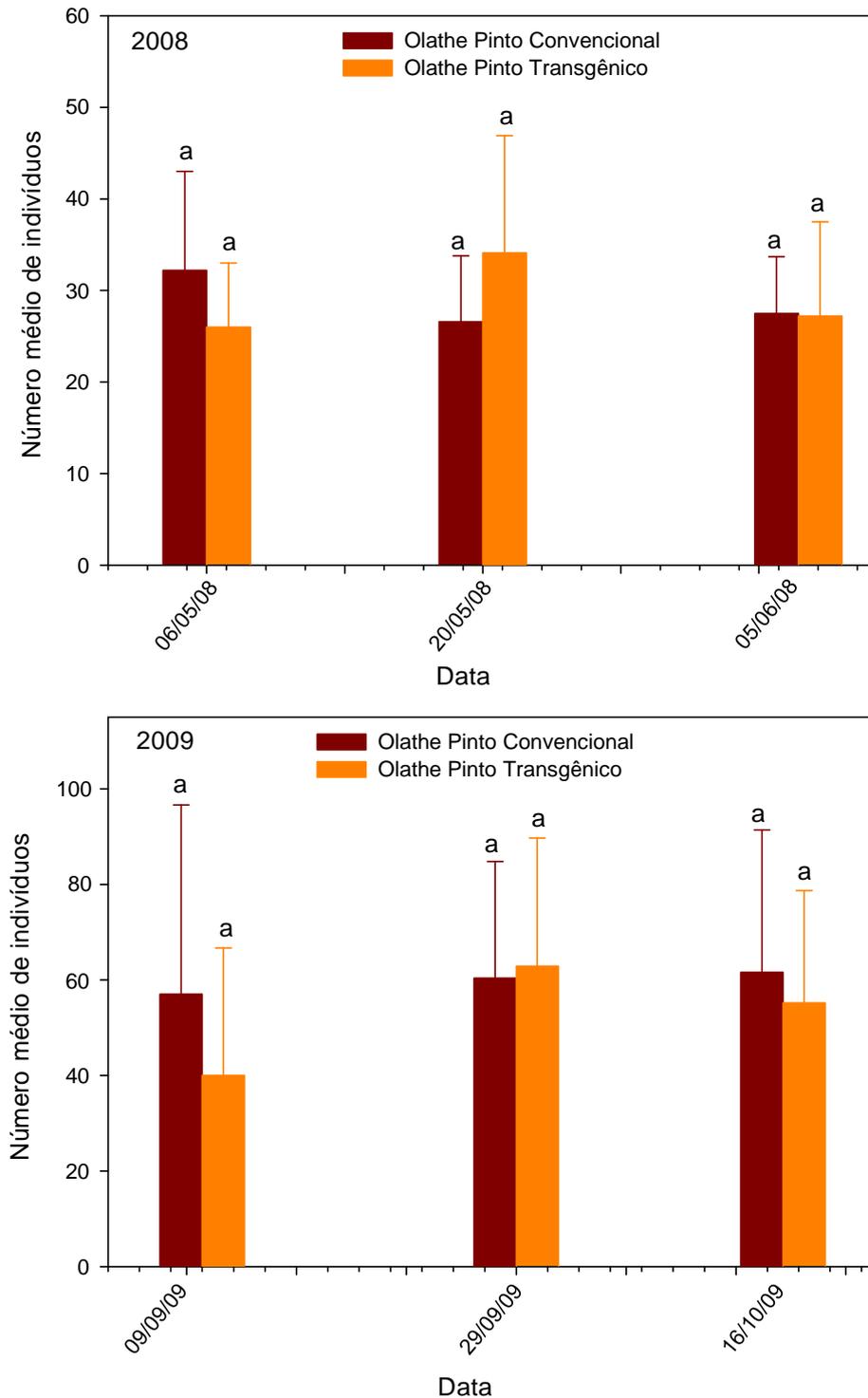


Figura VII.9. Número médio total de artrópodes da superfície do solo capturados em armadilhas de queda em parcelas de feijoeiro Olathe transgênico (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional plantados em 2008 e 2009 em Sete Lagoas, MG.

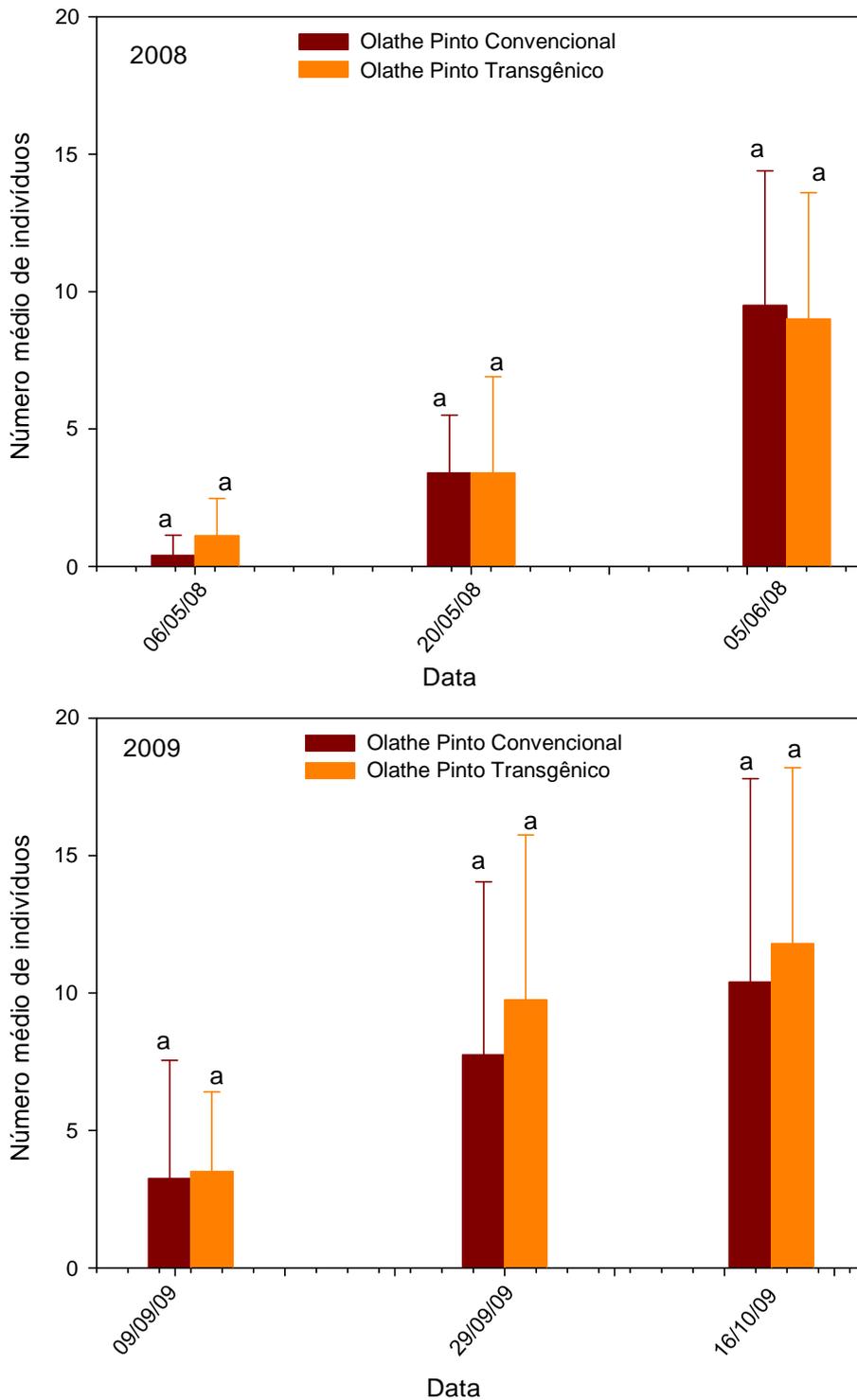


Figura VII.10. Número médio de uma morfoespécie de ácaro (ácaro n° 2) capturado em armadilhas de queda em parcelas de feijoeiro Olathe transgênico (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional plantados em 2008 e 2009 em Sete Lagoas, MG.

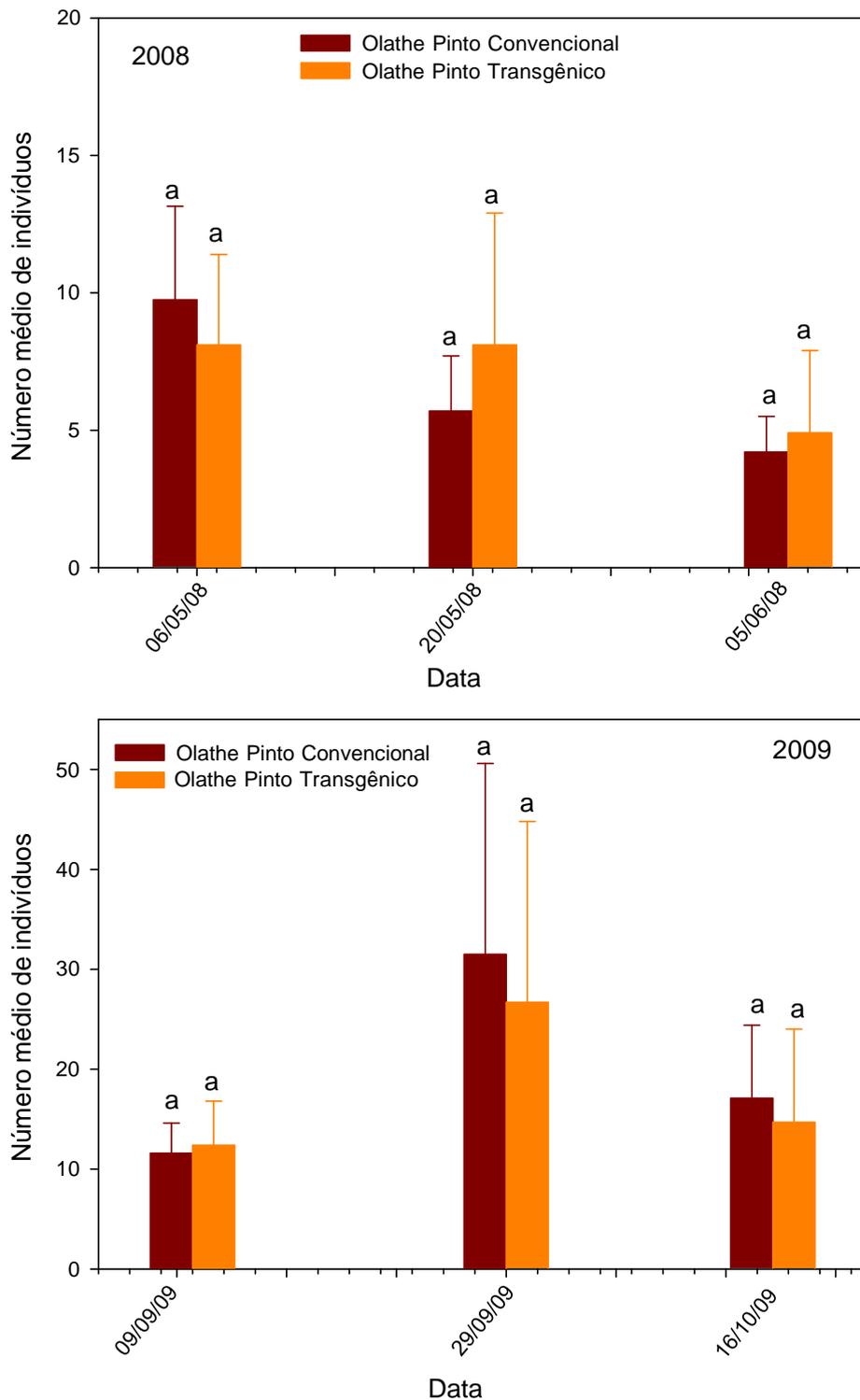


Figura VII.11. Número médio de morfoespécies de colêmbolos capturado em armadilhas de queda em parcelas de feijoeiro Olathe transgênico (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional plantados em 2008 e 2009 em Sete Lagoas, MG.

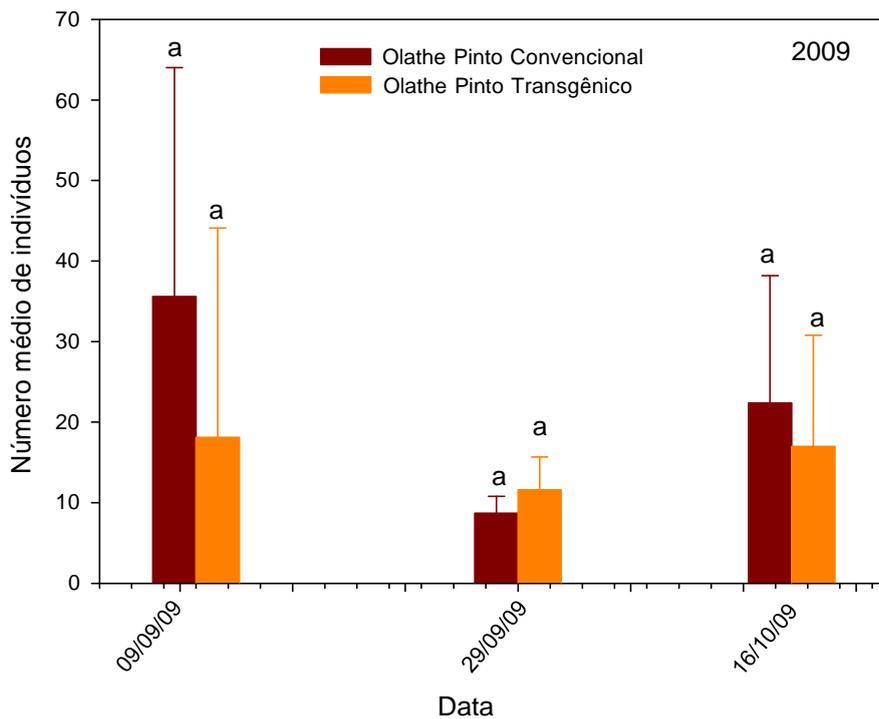
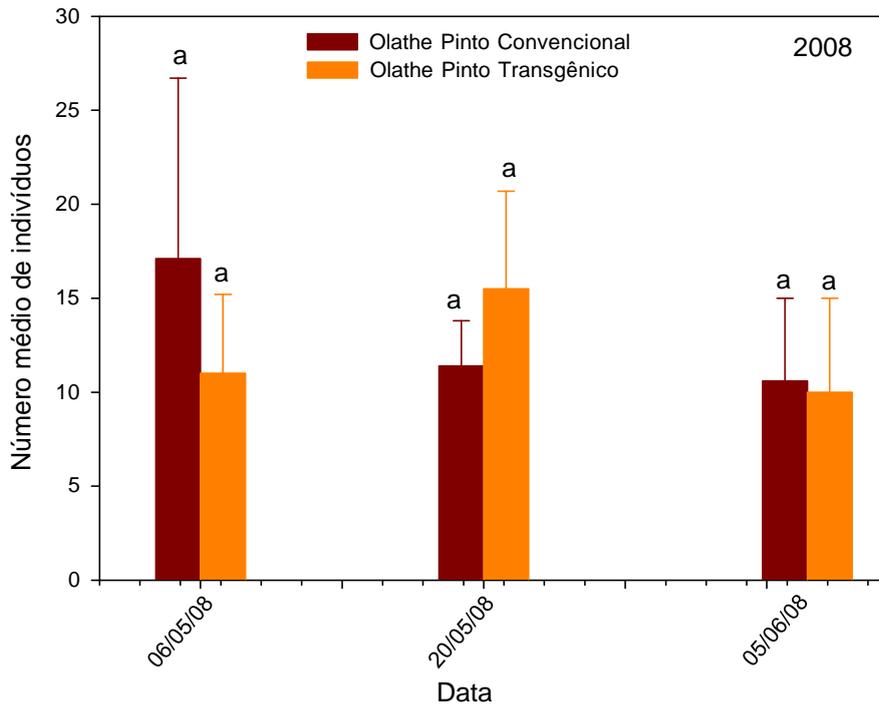


Figura VII.12. Número médio de *Solenopsis* spp. capturado em armadilhas de queda em parcelas de feijoeiro Olathe transgênico (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional plantados em 2008 e 2009 em Sete Lagoas, MG.

Conclusões

No estudo conduzido em duas safras (2008 e 2009) de plantio do feijoeiro Olathe Pinto transgênico (evento Embrapa 5.1) e convencional em três locais, foram observadas poucas diferenças na comunidade de artrópodes da superfície do solo entre os dois tratamentos. Em 176 espécies amostradas em Santo Antônio de Goiás, GO, Londrina, PR e Sete Lagoas, MG foram observadas diferenças entre o evento Embrapa 5.1 e convencional somente para cinco espécies. Estes resultados permitem concluir que o evento Embrapa 5.1 não causa nenhum efeito sobre a diversidade de artrópodes presentes na superfície do solo.

Comparação dos Artrópodes e dos Danos na Parte Aérea do Feijoeiro Embrapa 5.1 e seu parental Olathe

Os experimentos de campo para determinar a flutuação populacional de artrópodes da parte aérea e danos associados ao feijoeiro GM e convencional foram conduzidos durante dois anos em Santo Antônio de Goiás, GO, Londrina, PR e Sete Lagoas, MG.

Foram utilizados diferentes métodos de amostragem de artrópodes para que fosse coletada a maioria de espécies de artrópodes associadas ao feijoeiro. A amostragem de artrópodes da emergência até o estágio de três a quatro folhas trifolioladas foi realizada medindo-se dois metros na linha de plantio com o auxílio de uma vara de dois metros de comprimento. A amostragem foi realizada em dois pontos por parcela registrando na planilha de amostragem: o número de plantas avaliadas, o número de plantas mortas por pragas de solo e o número de insetos nas plantas. Para não dispersar os insetos, a face superior e inferior das folhas foi virada lentamente.

Após o estágio de três a quatro folhas trifolioladas até a maturação do feijoeiro, as amostragens foram realizadas com o pano de batida branco (1 m de comprimento por 0,5 m de largura), com um suporte de cada lado. O pano foi inserido cuidadosamente entre duas filas de feijão, para não perturbar os artrópodes presentes nas plantas. As plantas foram batidas vigorosamente sobre o pano para deslocar os artrópodes.

Os adultos da mosca-branca foram amostrados em 10 folhas primárias ou trifolioladas por parcela. Para a amostragem, a face inferior das folhas localizadas no terço superior das plantas foi virada lentamente para não dispersar os adultos.

Para a amostragem de tripes, as plantas foram batidas sobre uma placa branca de poliondas (0,5 m de comprimento, 0,5 m de largura). Foram realizadas duas batidas por parcela.

No florescimento das plantas, a amostragem dos polinizadores (principalmente abelhas) foi realizada com uma rede entomológica. A rede entomológica foi passada sobre as plantas do feijoeiro por cinco vezes, em movimentos horizontais duplos de aproximadamente um metro de largura. Neste estágio de crescimento, as flores foram retiradas das plantas e amostrados os tripes pretos, amarelos e outros artrópodes presentes em 10 flores, escolhidas aleatoriamente na parcela.

Para a avaliação de artrópodes (mosca branca, tripes, ácaros, larva minadora) e dano por vaquinhas (*Cerotoma arcuata* e *Diabrotica speciosa*), em cada data de amostragem foram coletadas aleatoriamente 10 folhas por parcela. Na primeira e segunda semana de avaliação foram coletadas as folhas primárias, na terceira semana a 1^a trifoliolada, na 4^a semana a 2^a trifoliolada e assim por diante, nesta ordem até a última amostragem. As folhas foram armazenadas em caixas tipo Gerbox (11 cm comprimento, 11 cm de largura, 3,5 cm de altura) que foram etiquetadas e fechadas com atílio de borracha. As caixas foram acondicionadas em caixa de isopor com gelo, onde permaneceram até a chegada no laboratório. A amostragem de ovos e ninfas de mosca branca, ácaros, tripes, minadora e dos demais artrópodes presentes nas folhas foram realizadas com auxílio de um contador manual e um microscópio estereoscópico no aumento de 40×. Logo após, o número de orifícios de alimentação das vaquinhas nas folhas foi contado e medido os comprimentos (menor e maior) de cada orifício com auxílio de uma régua.

Santo Antônio de Goiás, GO.

Na amostragem dos artrópodes da parte aérea em dois metros de plantio do evento Embrapa 5.1 e do convencional foram coletados um total de 3294 indivíduos em 2008, nas sete coletas semanais realizadas na Embrapa Arroz e Feijão (Tabela VII.6). Em 2009, foram coletados 2529 artrópodes nos dois tratamentos em sete amostragens (Tabela VII.6).

Não foram observadas diferenças significativas para o número total de pragas e predadores amostrados na parte aérea entre o evento Embrapa 5.1 e o convencional em 2008 e 2009 (Tabela VII.6). Foram amostradas 44 espécies da classe Insecta e morfoespécies de aranhas da classe Arachnida (Tabela VII.6). Para nenhuma das espécies de artrópodes foi observada diferença significativa entre o evento Embrapa 5.1 e o convencional nas amostragens realizadas em 2008 e 2009.

Os indivíduos capturados com frequência superior a 5% foram as vaquinhas, *Cerotoma arcuata* e *Diabrotica speciosa*, a cigarrinha verde, *Empoasca kraemeri*, as morfoespécies de aranhas e as formigas (Tabela VII.6). Para estas espécies e para o número total de pragas e predadores foram plotados gráficos com o número médio amostrado semanalmente.

As flutuações das curvas dos adultos de *C. arcuata* foram muito semelhantes para os dois tratamentos, não sendo observadas diferenças significativas entre o evento Embrapa 5.1 e o convencional nas oito datas de amostragem em 2008 e 2009 (Figura VII.13, Tabela VII.7). Para a outra espécie de vaquinha, *D. speciosa*, foram observadas diferenças entre os dois tratamentos somente em uma data de amostragem em 2008 (21/05) e em 2009 (28/04), com maior número de insetos amostrados no convencional (Figura VII.14, Tabela VII.7). O adulto de *C. arcuata* é um besouro de coloração castanha, com manchas escuras no dorso e mede 5-6 mm de comprimento. O adulto de *Diabrotica speciosa* apresenta coloração verde com três manchas amarelas no dorso e mede cerca de 6 mm de comprimento (Cardona, 1994; Quintela, 2002). Os adultos das vaquinhas se alimentam das folhas do feijoeiro, causando perfurações nas folhas semelhantes para as duas espécies. O número de orifícios nas folhas devido a alimentação das duas espécies de vaquinhas foi semelhante para o evento Embrapa 5.1 e o convencional nas oito datas de amostragem em 2008 (Figura VII.15, Tabela VII.8). Em 2009, foi observado maior número de orifícios de alimentação no Olathe convencional em comparação ao evento Embrapa 5.1 somente em 13/05 (Figura VII.15, Tabela VII.8). A medida do comprimento menor do orifício de alimentação foi significativamente menor no convencional em 16/04/08 e 30/04/08 e maior em 28/05/08 quando comparado ao evento Embrapa 5.1 (Figura VII.16, Tabela VII.8). Em 2009, a medida do comprimento menor do orifício de alimentação foi maior no evento Embrapa 5.1 em 08/04 e menor em 13/05 em comparação ao convencional (Figura VII.16, Tabela VII.8). Para a medida do comprimento maior do orifício de alimentação, foram

observadas diferenças entre o evento Embrapa 5.1 e o convencional em duas datas em 2008 (30/04 e 28/05) e em uma data em 2009 (08/04) (Figura VII.17, Tabela VII.8).

Para a população da cigarrinha-verde, *Empoasca kraemeri*, amostrada na parte aérea em dois metros, não foi observada diferença significativa entre o evento Embrapa 5.1 e o convencional em todas as datas de amostragem nos dois anos de plantio (Figura VII.18, Tabela VII.7). Nas amostragens semanais desta espécie nas folhas, com o uso do microscópio estereoscópico, maior e menor número da cigarrinha verde foi observado no feijoeiro convencional em 14/05/2008 e 22/04/2009, respectivamente, em comparação ao evento Embrapa 5.1 (Figura VII.19, Tabela VII.9). Na soma total da população da cigarrinha verde das sete amostragens não foram observadas diferenças entre os dois tratamentos (Tabela VII.10). Os adultos da *E. kraemeri* apresentam coloração verde e medem cerca de 3 mm. As ninfas são de coloração esverdeada semelhantes aos adultos, mas não possuem asas e locomovem lateralmente. Os adultos e ninfas localizam-se normalmente na face inferior das folhas. O dano é causado pelas ninfas e adultos que se alimentam do floema da planta do feijoeiro, sugando a seiva, podendo provocar amarelecimento seguido de um secamento nas margens das folhas (Cardona, 1994; Quintela, 2002).

As formigas amostradas na parte aérea do feijoeiro foi semelhante para o evento Embrapa 5.1 e o convencional nas amostragens semanais realizadas em 2008 e 2009 (Figura VII.20, Tabela VII.7).

O número de morfoespécies de aranhas foi significativamente maior no feijoeiro convencional em comparação ao evento Embrapa 5.1 somente em 16/04/08 e 15/04/09 (Figura VII.21, Tabela VII.7). Esta diferença na população de aranhas resultou em diferenças também nestas datas para o número total de predadores (Figura VII.22, Tabela VII.7).

Não foram observadas diferenças significativas entre o evento Embrapa 5.1 e o convencional para o número total de insetos pragas amostrados na parte aérea do feijoeiro, nos dois anos de plantio (Figura VII.23, Tabela VII.7).

O número de adultos da mosca-branca, *Bemisia tabaci*, amostrados em 10 folhas por parcela, foi semelhante para evento Embrapa 5.1 e o convencional em todas as datas, exceto em 20/05/09 (Figura VII.24, Tabela VII.9). A contagem de ovos e ninfas da mosca-branca nas folhas mostrou diferenças significativas entre os dois tratamentos somente para o número total de ovos em 2009 (Tabela VII.10). A flutuação das curvas para o número de ovos, embora muito semelhante para os dois tratamentos, foi

significativamente maior no evento Embrapa 5.1 em 28/05/08, 22/04/09 e 28/04/09 (Figura VII.25, Tabela VII.9). Em relação as ninfas da mosca-branca, não foram observadas diferenças significativas entre os dois tratamentos em todas as datas de amostragem (Figura VII.26, Tabela VII.9).

O número de tripes amarelos, amostrado na folha com o microscópio estereoscópico, foi significativamente maior no evento Embrapa 5.1 em comparação ao convencional em somente duas datas em dois anos de plantio (Figura VII.27, Tabela VII.9). Na soma total da população do tripes amarelos das sete amostragens não foram observadas diferenças entre os dois tratamentos (Tabela VII.10). Nas amostragens com a placa branca de poliondas (específica para tripes), a população de tripes pretos, amarelos e do predador *Orius* sp. foi semelhante para os dois tratamentos (Tabela VII.11). Em flores do feijoeiro, também não foram observadas diferenças entre os dois tratamentos para os tripes, a lagarta da vagem (*Maruca vitrata*) e para o *Orius* sp. (Tabela VII.12). Não é possível dizer quais são as espécies dos tripes amarelos e pretos coletados nas amostras, uma vez que a identificação dos tripes em nível de espécie é bastante complicada, geralmente é baseada em caracteres morfológicos como número e posicionamento de setas. Para a correta classificação destas espécies é necessário a montagem dos adultos em lâminas e observações em microscópio. Deve-se ressaltar que a coloração do inseto não é um parâmetro confiável de classificação, pois é altamente influenciada pela planta hospedeira e condições ambientais (Moraes & Flechtmann, 2008). Entretanto, existem várias espécies de tripes na cultura do feijoeiro, havendo atualmente uma predominância para o *Thrips palmi* (Quintela, 2002). A espécie de tripes amarelos é provavelmente o *T. palmi*, que foi introduzido no Brasil em 1992, ocorrendo sua rápida dispersão e estabelecimento favorecido por suas características biológicas e à resistência a um grande número de produtos químicos (Monteiro, 2001).

Não foram observadas diferenças significativas entre o evento Embrapa 5.1 e o convencional para o número dos demais insetos amostrados nas folhas com o uso do microscópio estereoscópico (Tabela VII.10). Na classe Arachnida, o número de larvas e de adultos do ácaro branco, *Polyphagotarsonemus latus*, foi significativamente maior e menor no feijoeiro convencional em 2008 e 2009, respectivamente, em comparação ao evento Embrapa 5.1 (Tabela VII.10). Observou-se, através das amostragens semanais, presença do ácaro branco em maior número em somente uma data em 2008 (21/05) e uma data em 2009 (22/04), quando foram observadas diferenças significativas entre o evento Embrapa 5.1 e o convencional (Figura VII.28, Tabela VII.9). É comum observar

diferenças entre tratamentos para a população do ácaro branco, uma vez que a sua distribuição espacial no campo é agregada, que se caracteriza por formar “focos” ou “reboleiras” (Moraes & Flechtmann, 2008). Este ácaro localiza-se na página inferior das folhas do feijoeiro e é praticamente invisível a olho nu. A coloração varia de branca, âmbar ou verde claro, com o tegumento brilhante (Cardona, 1994; Quintela, 2002).

O número total dos artrópodes amostrados nas folhas foi maior no feijoeiro convencional no primeiro ano e maior no evento Embrapa 5.1 no segundo ano de plantio, devido ao maior número de ácaros brancos coletados nestes tratamentos (Tabela VII.10). Nas avaliações semanais, diferenças entre os dois tratamentos para o número total de artrópodes foi observado somente em duas datas em 2008 e uma data em 2009 (Figura VII.29, Tabela VII.9).

Foi observado baixo número de insetos polinizadores no primeiro ano de plantio nos dois tratamentos (Tabela VII.13). Não foram observadas diferenças para os polinizadores, tanto para as abelhas quanto para as vespas, entre os dois tratamentos nos dois anos de plantio (Tabela VII.13).

Tabela VII.6. Número médio, total e frequência (F, %) de artrópodes amostrados na parte aérea em dois metros de plantio do feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) e seu parental não-GM (Olathe) em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

Espécie (Ordem:Familia)	Estágios	2008						2009					
		Olathe			Embrapa 5.1			Olathe			Embrapa 5.1		
		Σ	F (%)	Média (n=128)	Σ	F (%)	Média (n=128)	Σ	F (%)	Média (n=128)	Σ	F (%)	Média (n=128)
PRAGAS													
<i>Acanthoscelides obtectus</i> (Coleoptera: Bruchidae)	Adulto	0	0	0 a	0	0	0 a	1	0,077	0,008 a	0	0	0 a
<i>Cerotoma arcuata</i> (Coleoptera:Chrysomelidae)	Adulto	137	8,238	1,070 a	135	8,277	1,055 a	236	18,224	1,844 a	213	17,260	1,690 a
<i>Chaetocnema sp.</i> (Coleoptera:Chrysomelidae)	Adulto	10	0,601	0,078 a	7	0,429	0,055 a	0	0	0 a	0	0	0 a
<i>Chrysomelidae</i> (Coleoptera:Chrysomelidae)	Adulto	0	0	0 a	1	0,061	0,008 a	0	0	0 a	1	0,081	0,008 a
<i>Diabrotica speciosa</i> (Coleoptera:Chrysomelidae)	Adulto	110	6,614	0,859 a	99	6,069	0,773 a	121	9,344	0,945 a	117	9,481	0,928 a
<i>Lagria villosa</i> (Coleoptera: Lagriidae)	Adulto	4	0,240	0,031 a	3	0,184	0,023 a	9	0,695	0,070 a	8	0,648	0,063 a
<i>Maecolaspis sp.</i> (Coleoptera: Chrysomelidae)	Adulto	8	0,481	0,062 a	8	0,490	0,062 a	13	1,004	0,101 a	10	0,810	0,079 a
<i>Liriomyza huidobrensis</i> (Diptera: Agromyzidae)	Adulto	0	0	0	0	0	0	9	0,695	0,070 a	15	1,215	0,119 a
Grilo (Orthoptera: Gryllidae)	Adulto	0	0	0 a	3	0,184	0,023 a	0	0	0 a	0	0	0 a
<i>Acrosternum sp.</i> (Hemiptera: Pentatomidae)	Adulto	2	0,120	0,016 a	0	0	0 a	0	0	0 a	1	0,081	0,008 a
Pulgão (Hemiptera: Aphididae)	Ninfa, adulto	3	0,180	0,023 a	4	0,245	0,031 a	5	0,386	0,039 a	3	0,243	0,024 a
<i>Bemisia tabaci</i> (Hemiptera:Aleyrodidae)	Adulto	73	4,389	0,570 a	68	4,169	0,531 a	252	19,459	1,969 a	226	18,314	1,794 a

Continua na próxima página

Continuação da tabela VII.6

Espécie (Ordem:Familia)	Estágios	2008						2009					
		Olathe			Embrapa 5.1			Olathe			Embrapa 5.1		
		Σ	F (%)	Média (n=128)	Σ	F (%)	Média (n=128)	Σ	F (%)	Média (n=128)	Σ	F (%)	Média (n=128)
Cigarrinha cinza (Hemiptera: Cicadellidae)	Adulto	51	3,067	0,398 a	57	3,494	0,445 a	18	1,389	0,140 a	13	1,053	0,103 a
<i>Collaria sp.</i> (Hemiptera: Miridae)	Adulto	3	0,180	0,023 a	2	0,123	0,016 a	0	0	0 a	0	0	0 a
<i>Dalbulus sp.</i> (Hemiptera: Cicadellidae)	Adulto	2	0,120	0,016 a	1	0,061	0,008 a	0	0	0	0	0	0
<i>Edessa meditabunda</i> (Hemiptera: Pentatomidae)	Adulto	0	0	0 a	0	0	0 a	1	0,077	0,008 a	2	0,162	0,016 a
<i>Empoasca kraemeri</i> (Hemiptera: Cicadellidae)	Ninfa, adulto	301	18,099	2,351 a	280	17,167	2,187 a	111	8,571	0,867 a	148	11,993	1,175 a
<i>Euchistus heros</i> (Hemiptera: Pentatomidae)	Adulto	1	0,060	0,008 a	0	0	0 a	0	0	0	0	0	0
<i>Gargaphia sp.</i> (Hemiptera: Tingidae)	Adulto	0	0	0 a	1	0,061	0,008 a	0	0	0	0	0	0
<i>Leptoglossus sp.</i> (Hemiptera: Coreidae)	Adulto	0	0	0 a	5	0,306	0,039 a	0	0	0 a	0	0	0 a
Neomegalotomus simplex (Hemiptera: Alydidae)	Adulto	67	4,029	0,523 a	74	4,537	0,578 a	25	1,930	0,195 a	19	1,539	0,151 a
Percevejo vermelho (Hemiptera)	Adulto	1	0,060	0,008 a	1	0,061	0,008 a	0	0	0 a	0	0	0 a
<i>Piezodorus guildini</i> (Hemiptera: Pentatomidae)	Adulto	54	3,247	0,422 a	55	3,372	0,429 a	31	2,394	0,242 a	39	3,160	0,309 a
<i>Proxys sp.</i> (Hemiptera: Pentatomidae)	Adulto	0	0	0 a	0	0	0 a	1	0,077	0,008 a	10	0,810	0,079 a

Continua na próxima página

Continuação da tabela VII.6

Espécie (Ordem:Familia)	Estágios	2008						2009					
		Olathe			Embrapa 5.1			Olathe			Embrapa 5.1		
		Σ	F (%)	Média (n=128)	Σ	F (%)	Média (n=128)	Σ	F (%)	Média (n=128)	Σ	F (%)	Média (n=128)
<i>Anticarsia gemmatalis</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	Lagarta	11		0,086 a	16		0,125 a	13	1,004	0,101 a	15	1,215	0,119 a
<i>Maruca vitrata</i> (Lepidoptera: Pyraustidae)	Lagarta	1	0,060	0,008 a	0	0	0 a	0	0	0 a	0	0	0 a
<i>Mocis latipes</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	Lagarta	1	0,060	0,008 a	0	0	0 a	0	0	0 a	0	0	0 a
<i>Omiodes indicata</i> (Lepidoptera: Pyralidae)	Lagarta	8	0,481	0,062 a	5	0,306	0,039 a	1	0,077	0,008 a	5	0,405	0,039 a
<i>Pseudoplusia includens</i> (Lepidoptera: Noctuide)	Lagarta	0	0	0 a	1	0,061	0,008 a	1	0,077	0,008 a	0	0	0 a
<i>Spodoptera sp.</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	Lagarta	23	1,383	0,179 a	13	0,797	0,101 a	11	0,849	0,086 a	11	0,891	0,087 a
<i>Urbanus proteus</i> (Lepidoptera: Hesperiiidae)	Ovo	6	0,361	0,047 a	2	0,123	0,016 a	0	0	0 a	0	0	0 a
Trips n° 1 (Thysanoptera: Thripidae)	Ninfa, adulto	4	0,240	0,031 a	5	0,306	0,039 a	0	0	0 a	0	0	0 a
TOTAL DE PRAGAS		881	52,97	6,89 a	846	51,86	6,61 a	859	66,33	6,71 a	856	69,36	6,82 a
PREDADORES													
Aranhas (Araneae)													
<i>Callida sp.</i> (Coleoptera: Carabidae)	Adulto	3	0,180	0,023 a	0	0	0 a	0	0	0 a	0	0	0 a

Continua na próxima página

Continuação da tabela VII.6

Espécie (Ordem:Familia)	Estágios	2008						2009					
		Olathe			Embrapa 5.1			Olathe			Embrapa 5.1		
		Σ	F (%)	Média (n=128)									
<i>Joaninhas (Eriopis sp, Colleomegilla sp, Hippodamia sp)</i> (Coleoptera: Coccinellidae)	Adulto	11	0,661	0,086 a	11	0,674	0,086 a	4	0,308	0,031 a	4	0,324	0,032 a
<i>Lebia sp.</i> (Coleoptera: Carabidae)	Adulto	2	0,120	0,016 a	4	0,245	0,031 a	16	1,235	0,125 a	17	1,378	0,135 a
Estafilínídeo (Coleoptera: Sthaphylinidae)	Adulto	0	0	0 a	1	0,061	0,008 a	0	0	0 a	0	0	0 a
<i>Doru luteipes</i> (Dermaptera:Forficulidae)	Adulto	3	0,180	0,023 a	0	0	0 a	1	0,077	0,008 a	0	0	0 a
<i>Geocoris sp.</i> (Hemiptera: Lygaeidae)	Adulto	0	0	0	0	0	0	0	0	0 a	1	0,081	0,008 a
<i>Nabis sp.</i> (Hemiptera: Nabidae)	Adulto	2	0,120	0,016 a	2	0,123	0,016 a	0	0	0 a	0	0	0 a
<i>Orius sp.</i> (Hemiptera: Anthocoridae)	Adulto	6	0,360	0,047 a	3	0,184	0,023 a	0	0	0 a	0	0	0 a
<i>Zelus sp</i> (Hemiptera: Reduviidae)	Adulto	0	0	0 a	0	0	0 a	1	0,077	0,008 a	1	0,081	0,008 a
<i>Podisus sp.</i> (Hemiptera: Pentatomidae)	Adulto	1	0,060	0,008 a	0	0	0 a	0	0	0 a	0	0	0 a
Formiga (Hymenoptera:Formicidae)	Adulto	549	33,012	4,289 a	585	35,867	4,570 a	282	21,776	2,203 a	252	20,421	2 a
<i>Chrysoperla sp.</i> (Neuroptera: Chrysopidae)	Adulto	0	0	0 a	1	0,061	0,008 a	0	0	0 a	1	0,081	0,008 a
TOTAL DE PREDADORES		782	47,03	6,10 a	785	48,14	6,13 a	436	33,67	3,40 a	378	30,64	2,98 a
TOTAL GERAL		1663	100	-	1631	100	-	1295	100	-	1234	100	-

Tabela VII.7. Valores de P > F para o número médio das vaquinhas (*Diabrotica speciosa* e *Cerotoma arcuata*), cigarrinha verde (*Empoasca kraemeri*), morfoespécies de aranhas, formigas, total de artrópodes e de predadores amostrados em dois metros na parte aérea do feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional (Olathe) em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

Data	<i>Diabrotica speciosa</i> (N=16)	<i>Cerotoma arcuata</i> (N=16)	<i>Empoasca kraemeri</i> (N=16)	Morfoespécies de aranhas (N=16)	Formiga (N=16)	Total de pragas (N=16)	Total de predadores (N=16)
16/04/08	P > 0,0061	P > 0,7878	P > 0,1536	P > 0,0379	P > - ¹	P > 0,4805	P > 0,0379
23/04/08	P > 0,1536	P > 0,4970	P > 0,2481	P > 0,4437	P > - ¹	P > 0,1301	P > 0,1911
30/04/08	P > 0,2748	P > 0,5337	P > 0,3238	P > 0,0779	P > 0,7334	P > 0,6376	P > 0,6801
07/05/08	P > 0,1855	P > 0,6604	P > 0,5273	P > 0,3832	P > 0,3592	P > 0,8254	P > 0,3204
14/05/08	P > 0,7139	P > 1,0000	P > 0,5259	P > 0,5625	P > 0,8603	P > 0,4748	P > 0,9781
21/05/08	P > 0,0271	P > 0,5361	P > 0,5943	P > 0,5526	P > 0,9353	P > 0,4458	P > 0,5839
28/05/08	P > 0,9187	P > 0,5349	P > 0,0829	P > 0,5455	P > 0,1624	P > 0,4247	P > 0,6435
07/04/09	P > 0,4811	P > 0,1345	P > 0,0521	P > 0,6843	P > - ¹	P > 0,6921	P > 0,9399
15/04/09	P > 0,0628	P > 0,3754	P > 0,7083	P > 0,0114	P > - ¹	P > 0,9754	P > 0,0315
22/04/09	P > 0,9157	P > 0,4427	P > 0,6950	P > 0,0685	P > 0,4260	P > 0,5523	P > 0,1184
28/04/09	P > 0,0274	P > 0,7264	P > 0,4001	P > 0,8635	P > 0,8934	P > 0,7532	P > 0,8695
06/05/09	P > 0,1495	P > 0,7323	P > 0,1453	P > 0,4975	P > 0,9463	P > 0,1365	P > 0,8864
13/05/09	P > 0,3632	P > 0,7756	P > - ¹	P > 0,1152	P > 0,5592	P > 0,5465	P > 0,1264
20/05/09	P > 0,5698	P > 0,8746	P > - ¹	P > 0,6578	P > 0,7389	P > 0,7412	P > 0,5146

¹ Não foram observados indivíduos nas amostras nestas datas.

Tabela VII.8. Valores de $P > F$ para medida do comprimento maior e menor dos orifícios de alimentação de vaquinhas (*Diabrotica speciosa* e *Cerotoma arcuata*) em folhas de feijoeiro geneticamente modificado e convencional em 2008 e 2009. Santo Antônio de Goiás, GO.

Data	Comprimento menor (N=variável)	Comprimento maior (N=variável)	Número de orifícios de alimentação (N=80)
16/04/08	$P > 0,0354$	$P > 0,2289$	$P > 0,7510$
23/04/08	$P > 0,7231$	$P > 0,8093$	$P > 0,5287$
30/04/08	$P > 0,0258$	$P > 0,0094$	$P > 0,5706$
07/05/08	$P > 0,1577$	$P > 0,5257$	$P > 0,2835$
14/05/08	$P > 0,8467$	$P > 0,3811$	$P > 0,9791$
21/05/08	$P > 0,1837$	$P > 0,3505$	$P > 0,2930$
28/05/08	$P > 0,0001$	$P > 0,0001$	$P > 0,6026$
07/04/09	$P > 0,0001$	$P > 0,0001$	$P > 0,5235$
15/04/09	$P > 0,4644$	$P > 0,6637$	$P > 0,7021$
22/04/09	$P > 0,0949$	$P > 0,6017$	$P > 0,6380$
28/04/09	$P > 0,1727$	$P > 0,5753$	$P > 0,6765$
06/05/09	$P > 0,1817$	$P > 0,7963$	$P > 0,5189$
13/05/09	$P > 0,0001$	$P > 0,0635$	$P > 0,0225$
20/05/09	$P > 0,8864$	$P > 0,1924$	$P > 0,5548$

Tabela VII.9. Valores de $P > F$ para o número médio de adultos, ovos e ninfas da mosca-branca (*Bemisia tabaci*), ácaro branco (*Polyphagotarsonemus latus*), cigarrinha verde (*Empoasca kraemeri*), tripes amarelos, artrópodes total amostrados com o uso de microscópio estereoscópico (exceto para mosca-branca) em folhas de feijoeiro geneticamente modificado e convencional em 2008 e 2009. Santo Antônio de Goiás, GO.

Data	Número médio de adultos da mosca branca ¹ (N=80)	Número médio de ovos da mosca-branca (N=80)	Número médio de ninfas da mosca branca (N=80)	Número médio do ácaro branco (N=80)	Número médio de cigarrinha verde (N=80)	Número médio de tripes amarelos (N=80)	Número médio de artrópodes total (N=80)
16/04/08	P > 0,6520	P > 0,4422	P > 1,0000	- ¹	- ¹	P > 1,000	P > 0,1932
23/04/08	P > 0,2325	P > 0,6071	P > 0,0764	P > 0,0809	- ¹	P > 0,1414	P > 0,0313
30/04/08	P > 0,8327	P > 0,8231	P > 0,0964	P > 0,3188	P > 0,1888	P > 0,6997	P > 0,6463
07/05/08	P > 0,7335	P > 0,6951	P > 0,9090	- ¹	P > 0,3795	P > 0,3510	P > 0,8054
14/05/08	P > 0,7740	P > 0,3188	P > 0,4273	P > 0,2881	P > 0,0136	P > 0,8486	P > 0,5463
21/05/08	P > 0,4713	P > 0,3182	P > 0,2916	P > 0,0051	P > 0,0940	P > 0,2009	P > 0,0012
28/05/08	P > 0,6520	P > 0,0354	P > 0,6914	P > 0,9495	P > 0,5403	P > 0,0029	P > 0,5374
07/04/09	P > 0,6108	P > 0,7351	- ¹	P > 0,1750	- ¹	P > 0,3142	P > 0,8124
15/04/09	P > 0,4156	P > 0,9603	P > 0,6873	P > 0,1566	P > 0,2293	P > 0,6385	P > 0,9482
22/04/09	P > 0,5629	P > 0,0136	P > 0,6186	P > 0,0036	P > 0,0428	P > 0,8999	P > 0,0045
28/04/09	P > 0,4713	P > 0,0375	P > 0,5695	P > 0,2727	P > 0,8940	P > 0,0255	P > 0,4815
06/05/09	P > 0,0873	- ¹	P > 0,2075	P > 0,3759	P > 0,1119	P > 0,8702	P > 0,0742
13/05/09	P > 1,0000	P > 0,1566	P > 0,6418	P > 0,1008	P > 0,3142	P > 0,7013	P > 0,8577
20/05/09	P > 0,0431	- ¹	P > 0,8828	P > 0,0881	P > 0,4161	- ¹	P > 0,9480

¹ Mosca-branca amostrada visualmente em 10 folhas por parcela em cada data.

² Não foram observados indivíduos nas amostras nestas datas.

Tabela VII.10. Número médio, total e frequência (F, %) de artrópodes amostrados em folhas com o uso de microscópio estereoscópico em feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional (Olathe) plantados em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

Gênero/Espécie (Ordem:Família)	Estágio	Ano 2008						Ano 2009					
		Olathe			Embrapa 5.1			Olathe			Embrapa 5.1		
		Total	F (%)	Média (n=560)	Total	F (%)	Média (n=560)	Total	F (%)	Média (n=560)	Total	F (%)	Média (n=560)
CLASSE INSECTA													
<i>Bemisia tabaci</i> (Hemiptera: Aleyrodidae)	Ovos	89	3,844	0,159 a	103	5,29	0,184 a	91	5,15	0,162 a	161	7,707	0,288 b
<i>Bemisia tabaci</i> (Hemiptera:Aleyrodidae)	Ninfas	1188	51,317	2,12 a	1037	53,261	1,852 a	1061	60,045	1,894 a	1127	53,949	2,012 a
<i>Empoasca kraemeri</i> (Hemiptera: Cicadellidae)	Ninfas	141	6,091	0,252 a	124	6,369	0,221 a	61	3,452	0,109 a	85	4,069	0,152 a
Trips amarelos (Thysanoptera:Thripidae)	Ninfas e adultos	404	17,451	0,721 a	399	20,493	0,712 a	363	20,543	0,648 a	461	22,068	0,823 a
Trips pretos (Thysanoptera:Thripidae)	Ninfas e adultos	8	0,346	0,014 a	8	0,411	0,025 a	26	1,471	0,046 a	20	0,957	0,036 a
<i>Liriomyza huidobrensis</i> (Diptera:Agromyzidae)	Larvas e pupas	40	1,728	0,071 a	29	1,489	0,052 a	19	1,075	0,034 a	29	1,388	0,052 a

Continua na próxima página

Continuação da tabela VII.10

Gênero/Espécie (Ordem:Família)	Estágio	Ano 2008						Ano 2009					
		Olathe			Embrapa 5.1			Olathe			Embrapa 5.1		
		Total	F (%)	Média (n=560)	Total	F (%)	Média (n=560)	Total	F (%)	Média (n=560)	Total	F (%)	Média (n=560)
<i>Urbanus proteus</i> (Lepidoptera: Hesperiiidae)	Ovos	37	1,598	0,066 a	37	1,9	0,066 a	23	1,302	0,041 a	14	0,67	0,025 a
Pulgão (Hemiptera: Aphididae)	Formas jovens, adultos	47	2,03	0,084 a	57	2,928	0,101 a	79	4,471	0,141 a	87	4,165	0,155 a
<i>Spodoptera spp.</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	Lagarta	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0 a	3	0,144	0,005 a
<i>Omiodes indicata</i> (Lepidoptera: Pyralidae)	Lagarta	2	0,086	0,004 a	3	0,154	0,005 a	8	0,453	0,014 a	4	0,191	0,007 a
<i>Neomegalotomus simplex</i> (Hemiptera: Alydidae)	Ovo	2	0,086	0,004 a	2	0,103	0,004 a	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudoplusia includens</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	Lagarta	1	0,043	0,002 a	0	0	0,0 a	0	0	0 a	1	0,048	0,002 a
<i>Chrysoperla spp</i> (Neuroptera: Chrysopidae)	Ovo	0	0	0,0 a	1	0,051	0,042 a	0	0	0	0	0	0

Continua na próxima página

Continuação da tabela VII.10

Gênero/Espécie (Ordem:Família)	Estágio	Ano 2008						Ano 2009					
		Olathe			Embrapa 5.1			Olathe			Embrapa 5.1		
		Total	F (%)	Média (n=560)	Total	F (%)	Média (n=560)	Total	F (%)	Média (n=560)	Total	F (%)	Média (n=560)
CLASSE ARACHNIDA											0		
<i>Polyphagotarsonemus latus</i> (Acari: Tarsonemidae)	Ninfas, adultos	351	15,162	0,627 a	140	7,191	0,250 b	33	1,868	0,059 a	95	4,548	0,170 b
<i>Tetranychus urticae</i> (Acari: Tetranychidae)	Ninfas, adultos	1	0,043	0,002 a	7	0,36	0,012 b	3	0,17	0,005 a	2	0,096	0,004 a
<i>Tetranychus ludeni</i> (Acari: Tetranychidae)	Ninfas, adultos	4	0,173	0,007 a	0	0	0,0 a	0	0	0	0	0	0
Total		2315	100	4,134 a	1947	100	3,489 b	1767 a	100	3,15	2089	100	3,73 b

Tabela VII.11. Número total e médio de insetos amostrados com placas brancas de poliondas (0,5 x 0,5 m) em feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) e seu parental não-GM (Olathe) plantados em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

Gênero/Espécie (Ordem:Família)	Estágio	Ano 2008				Ano 2009			
		Olathe		Embrapa 5.1		Olathe		Embrapa 5.1	
		Número total	Média (N=256)	Número total	Média (N=256)	Número total	Média (N=192)	Número total	Média (N=192)
Tripes amarelos (Thysanoptera:Thripidae)	Ninfas, adultos	30	0,1172 a	36	0,1406 a	16	0,0833 a	12	0,0625 a
Tripes pretos (Thysanoptera:Thripidae)	Ninfas, adultos	112	0,4375 a	112	0,4375 a	67	0,3489 a	44	0,2292 a
<i>Orius sp.</i> (Hemiptera: Anthocoridae)	Adultos	3	0,0117 a	2	0,0078 a	1	0,0052 a	0	0,0 a

Tabela VII.12. Número total e médio de insetos amostrados em flores do feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional (Olathe) plantados em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

Gênero/Espécie (Ordem:Família)	Estágio	Ano 2008				Ano 2009			
		Olathe		Embrapa 5.1		Olathe		Embrapa 5.1	
		Número total	Média (N=400)	Número total	Média (N=400)	Número total	Média (N=200)	Número total	Média (N=200)
Tripes amarelos (Thysanoptera:Thripidae)	Ninfas, adultos	18	0,045 a	20	0,05 a	6	0,03 a	8	0,04 a
Tripes pretos (Thysanoptera:Thripidae)	Ninfas, adultos	40	0,10 a	39,2	0,098 a	12	0,06 a	21	0,105 a
<i>Maruca vitrata</i> (Lepidoptera: Pyraustidae)	Lagarta	2	0,005 a	0	0,0 a	10	0,05 a	0,0	0,00 a
<i>Orius sp.</i> (Hemiptera: Anthocoridae)	Adultos	3	0,0075 a	3	0,0075 a	0,0	0,0 a	2	0,01 a

Tabela VII.13. Número total e médio de insetos polinizadores amostrados com rede entomológica em feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional (Olathe) plantados em 2008 e 2009. Santo Antônio de Goiás, GO.

Gênero/Espécie (Ordem:Família)	Ano 2008				Ano 2009			
	Olathe		Embrapa 5.1		Olathe		Embrapa 5.1	
	Número total	Média (N=16)	Número total	Média (N=16)	Número total	Média (N=16)	Número total	Média (N=16)
<i>Paratrigona</i> sp (Hymenoptera: Apidae)	2	0,125 a	4	0,25 a	41	2,5625 a	24	1,50 a
Abelha no. 2 (Hymenoptera: Apidae)	0	0	0	0	1	0,0625 a	0	0,0 a
<i>Apis</i> sp (Hymenoptera: Apidae)	2	0,125 a	0	0 a	0	0,0	1	0,0625
<i>Trigona</i> sp (Hymenoptera: Apidae)	0	0	0	0	6	0,375 a	4	0,25 a
Abelha no. 3 (Hymenoptera: Apidae)	2	0,125 a	0	0 a	0	0	0	0
Total de Abelhas	6	0,375 a	4	0,25 a	48	3,0 a	29	1,8125 a

Continua na próxima página

Continuação da tabela VII.13

Gênero/Espécie (Ordem:Família)	Ano 2008				Ano 2009			
	Olathe		Embrapa 5.1		Olathe		Embrapa 5.1	
	Número total	Média (N=16)	Número total	Média (N=16)	Número total	Média (N=16)	Número total	Média (N=16)
Vespa no. 1 (Hymenoptera: Vespidae)	0	0 a	2	0,125 a	0	0	0	0
Vespa no. 2 (Hymenoptera: Vespidae)	4	0,25 a	2	0,125 a	0	0 a	3	0,1875 a
Vespa no. 3 (Hymenoptera: Vespidae)	0	0	0	0	1	0,0625 a	2	0,125 a
Total de Hymenoptera	4	0,25 a	4	0,25 a	1	0,0625 a	5	0,3125 a

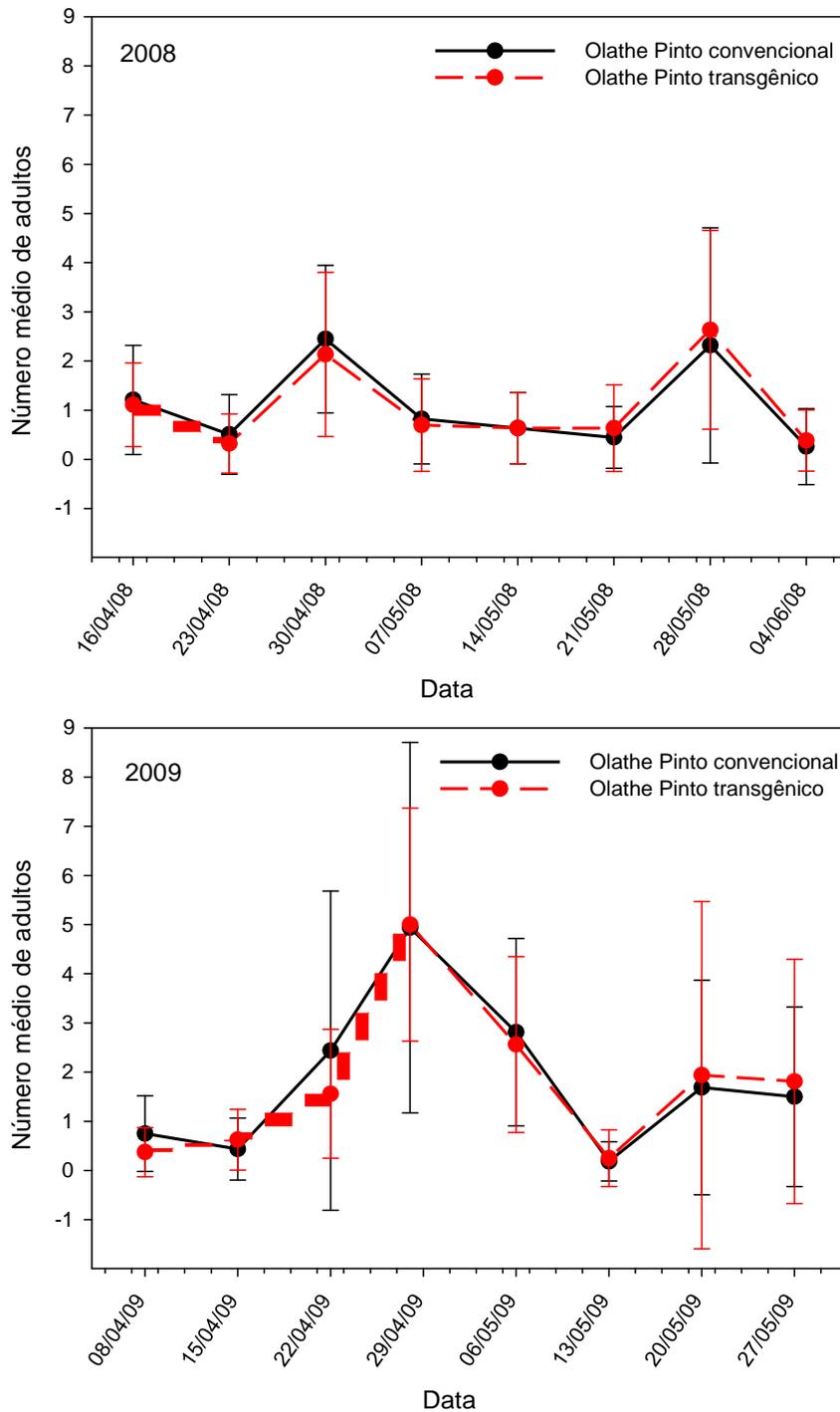


Figura VII.13. Número médio de adultos da vaquinha, *Cerotoma arcuata*, amostrado na parte aérea em dois metros de plantio do feijoeiro Olathe (convencional) e feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

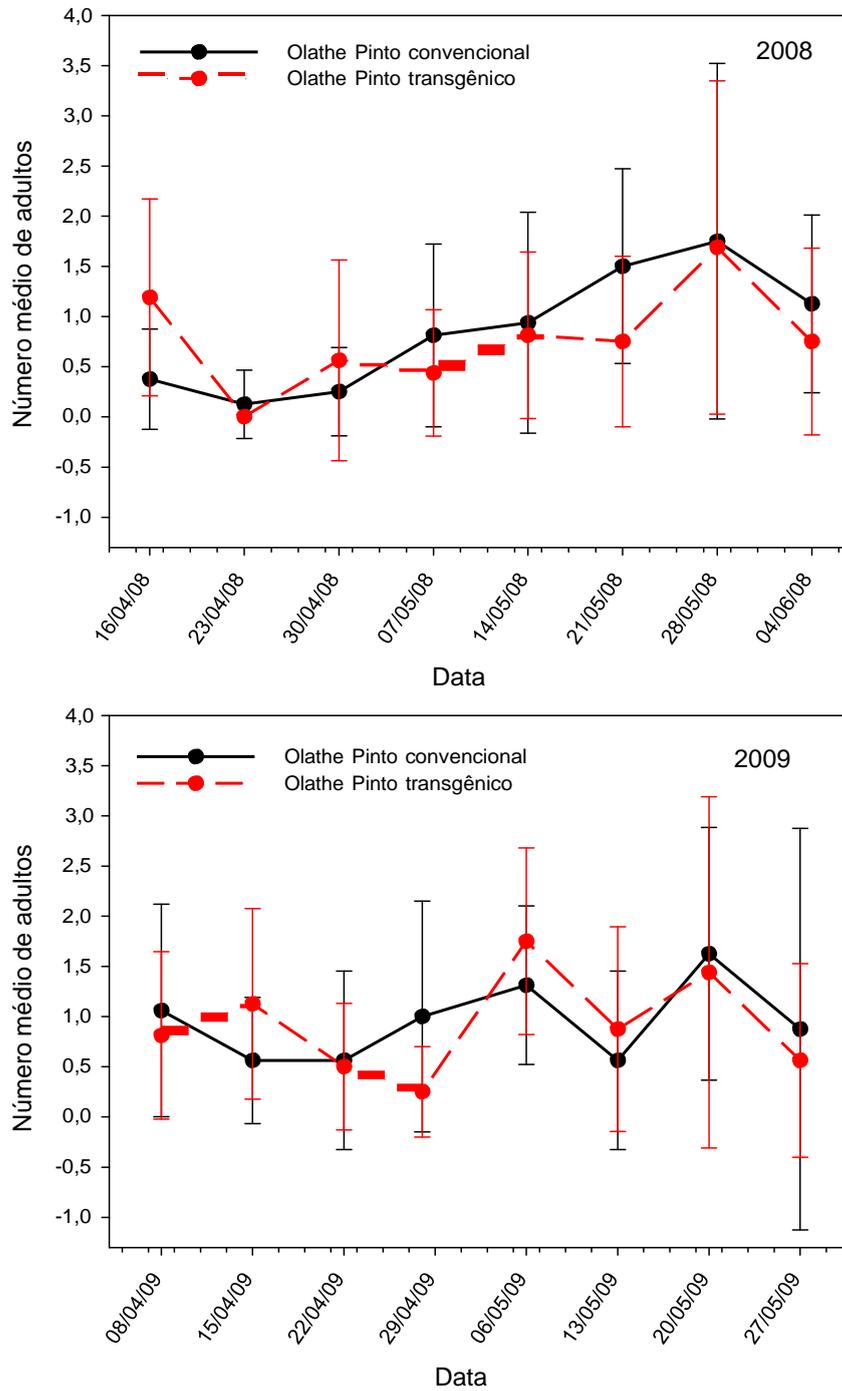


Figura VII.14. Número médio de adultos da vaquinha *Diabrotica speciosa* amostrado na parte aérea em dois metros de plantio feijoeiro Olathe (convencional) e feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) plantados em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

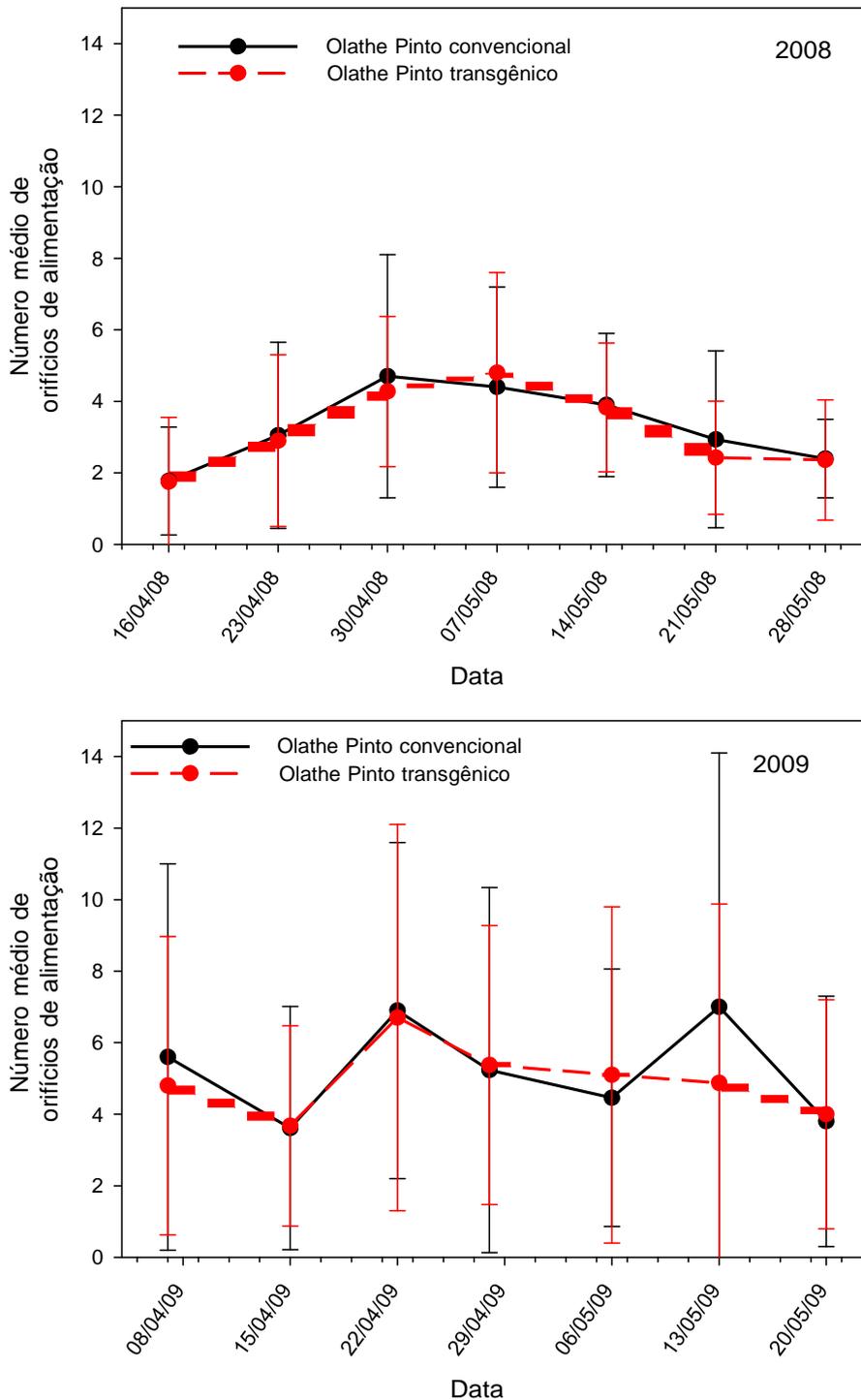


Figura VII.15. Número médio de orifícios de alimentação de vaquinhas (*Diabrotica speciosa* e *Cerotoma arcuata*) por folha de feijoeiro Olathe (convencional) e feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) plantados em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

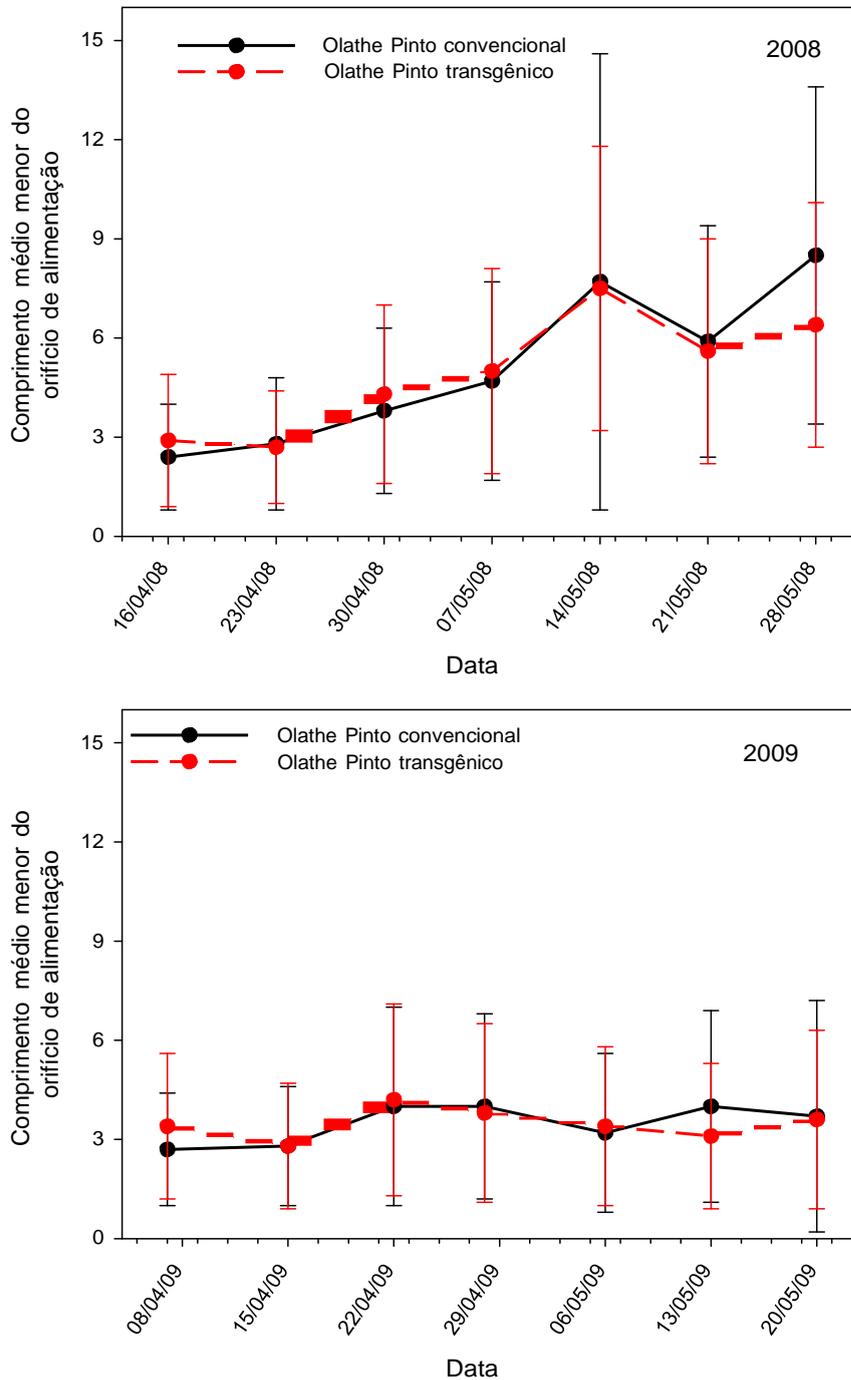


Figura VII.16. Comprimento médio menor do orifício de alimentação de vaquinhas (*Diabrotica speciosa* e *Cerotoma arcuata*) em folhas de feijoeiro Olathe (convencional) e feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) plantados em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

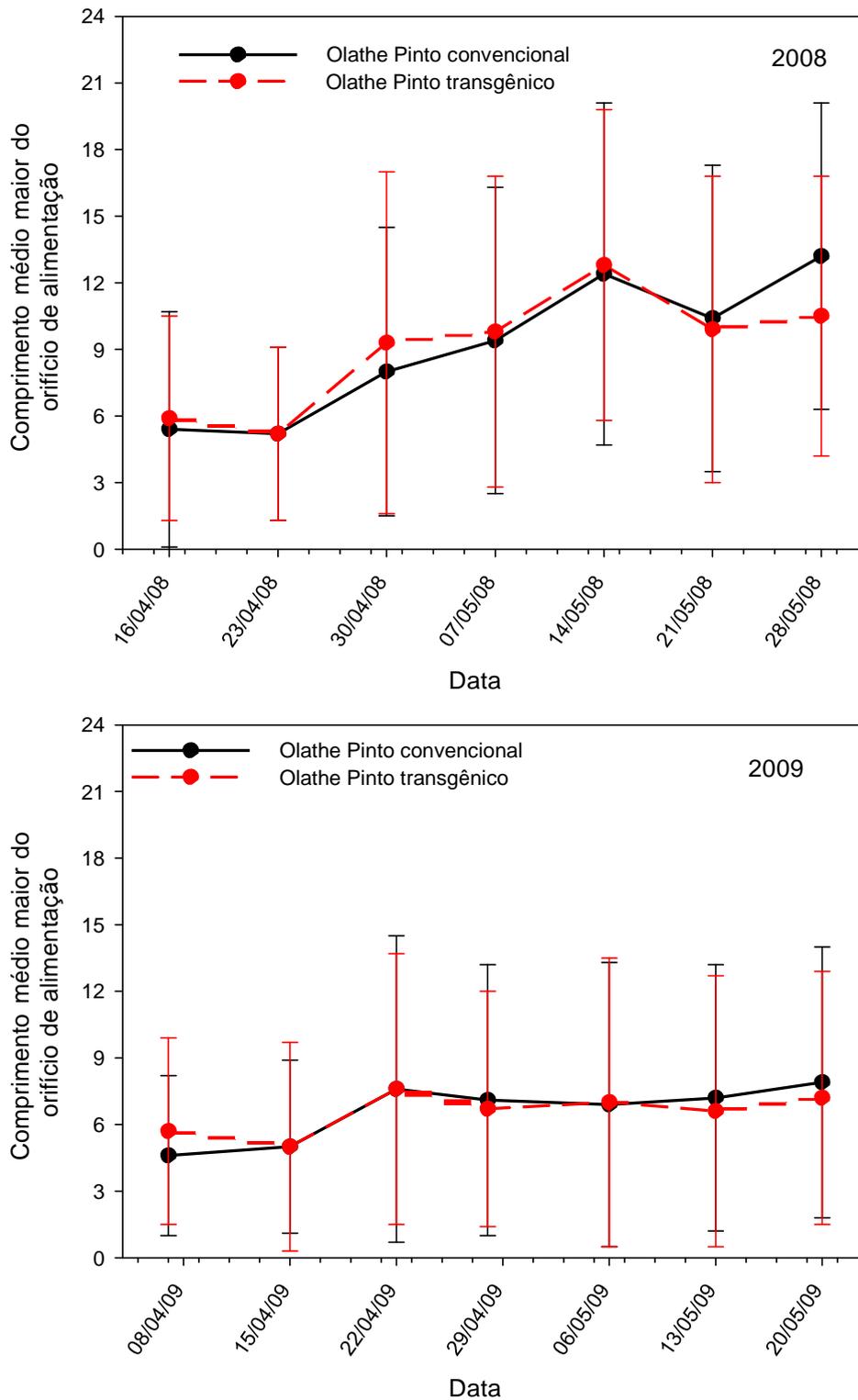


Figura VII.17. Comprimento médio maior do orifício de alimentação de vaquinhas (*Diabrotica speciosa* e *Cerotoma arcuata*) em folhas de feijoeiro Olathe (convencional) e feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) plantados em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

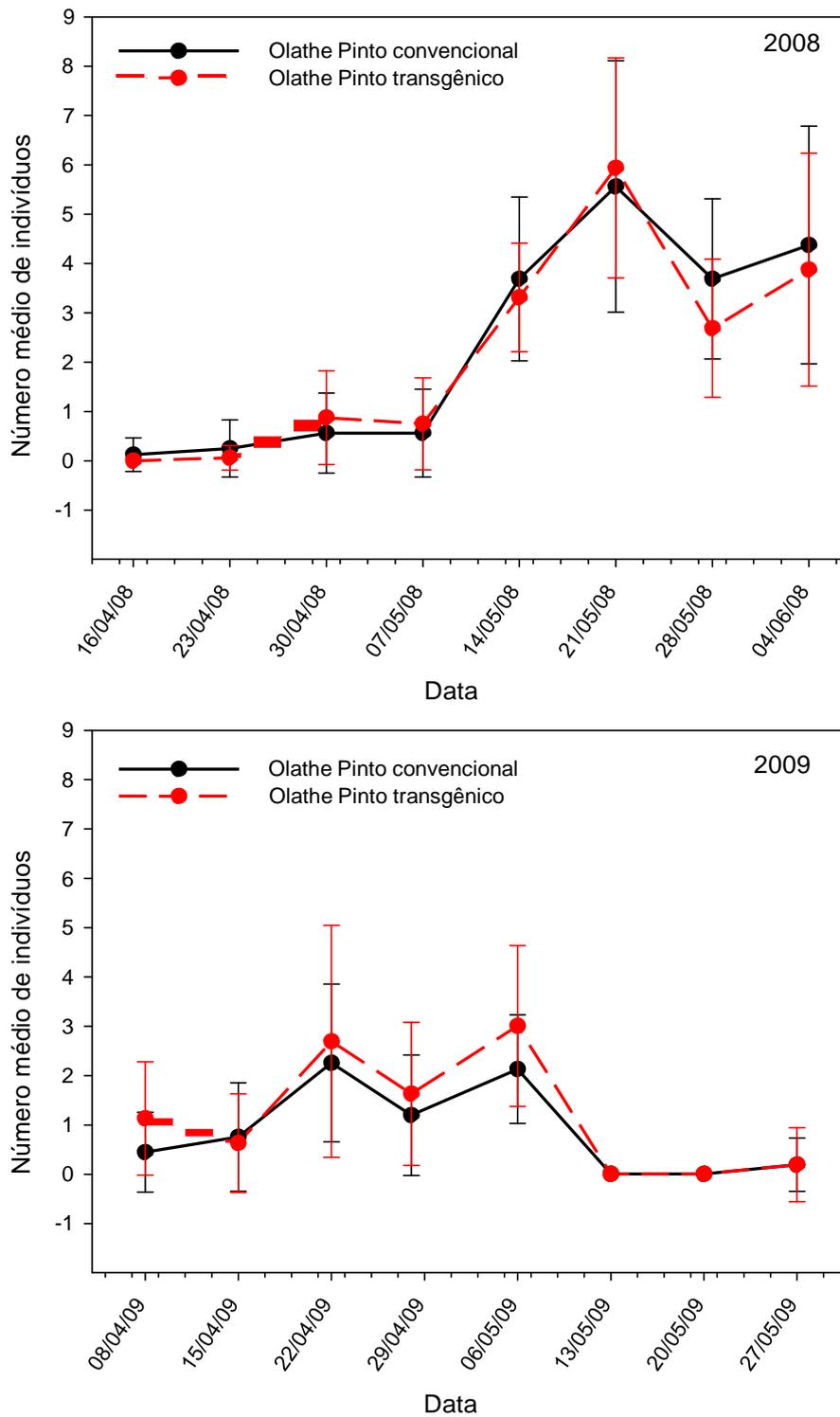


Figura VII.18. Número médio de ninfas e adultos da cigarrinha-verde *Empoasca kraemeri* amostrado na parte aérea em dois metros de plantio do feijoeiro Olathe (convencional) e feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) plantados em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

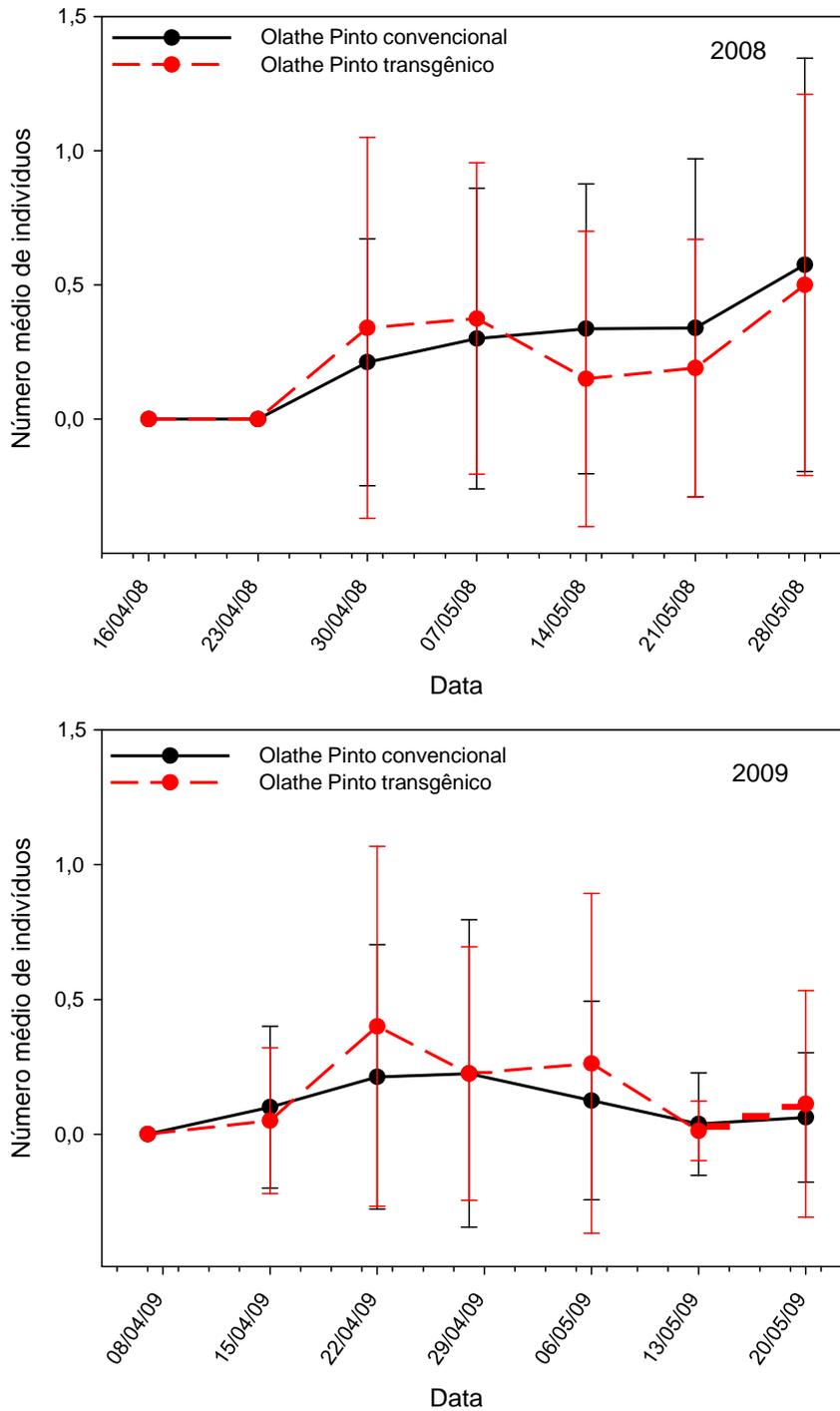


Figura VII.19. Número médio de ninfas e adultos da cigarrinha verde *Empoasca Kraemeri* por folha avaliado com o uso de microscópio estereoscópico em feijoeiro Olathe (convencional) e feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) plantados em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

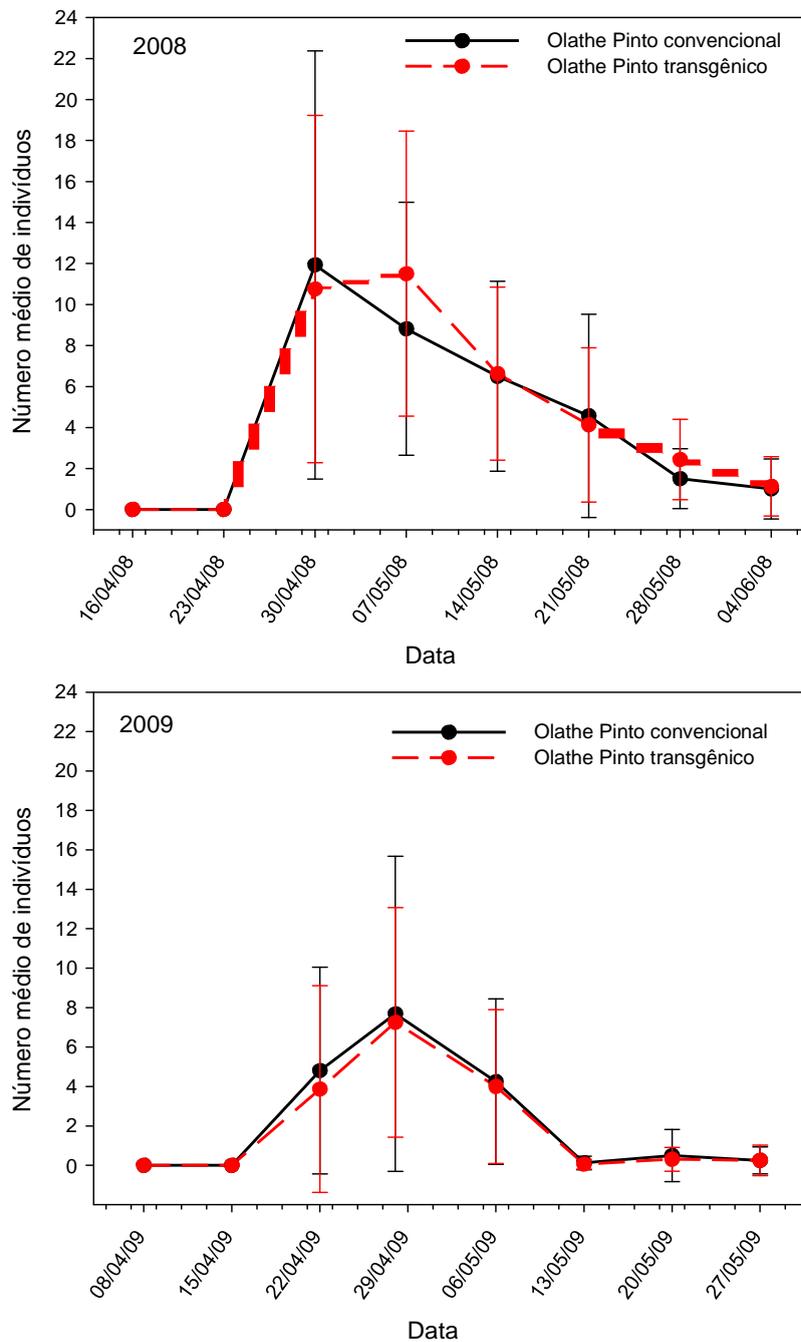


Figura VII.20. Número médio de formigas amostrado na parte aérea em dois metros de plantio do feijoeiro Olathe (convencional) e feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

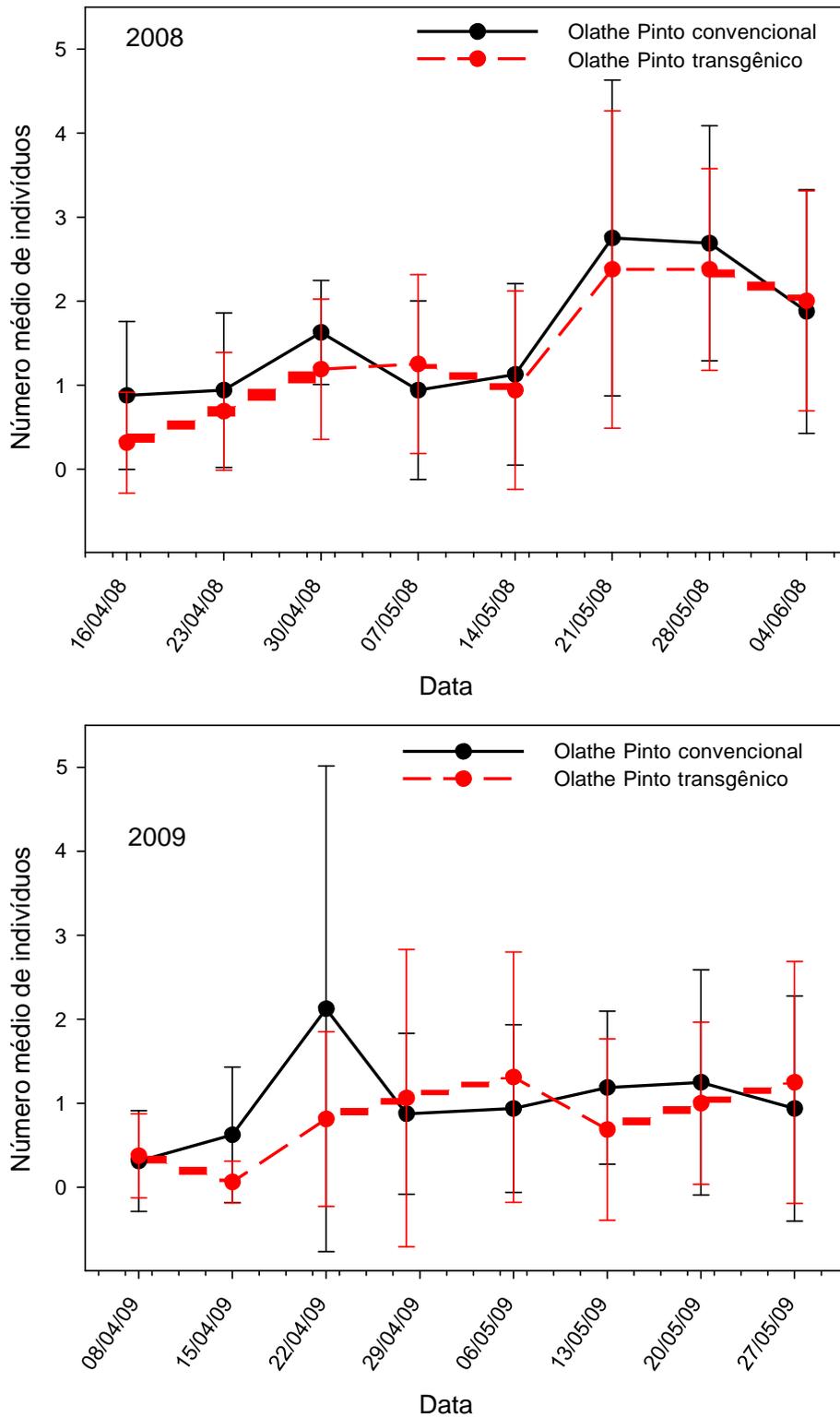


Figura VII.21. Número médio de morfoespécies de aranhas amostrado na parte aérea em dois metros de plantio do feijoeiro Olathe (convencional) e feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

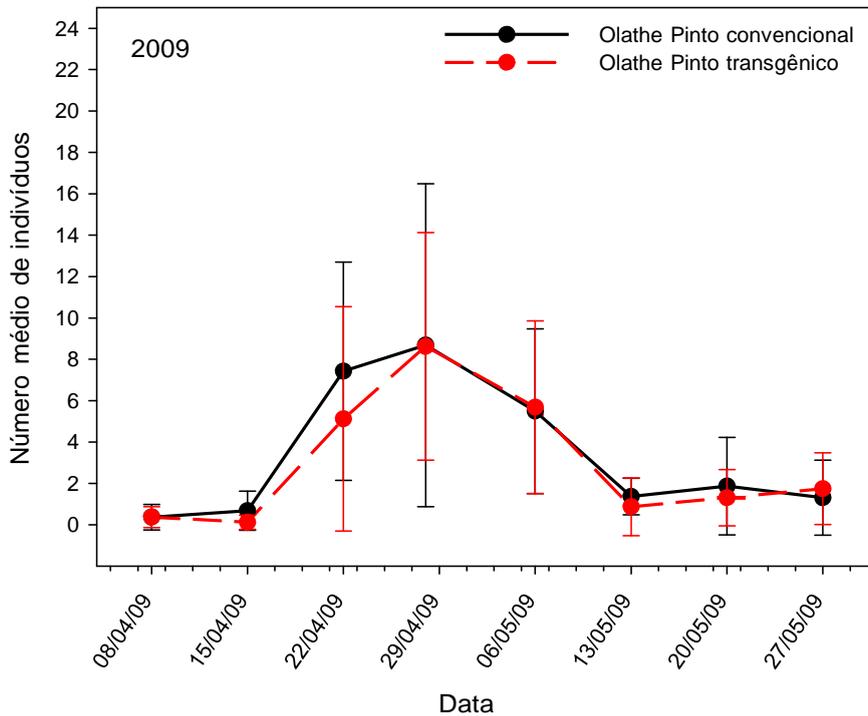
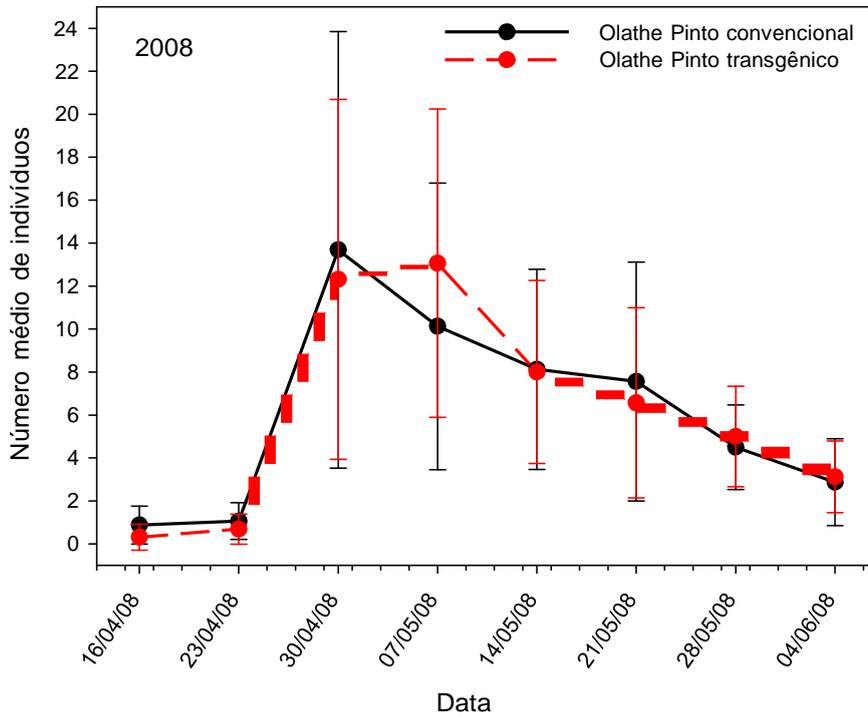


Figura VII.22. Número médio total de predadores amostrado na parte aérea em dois metros de plantio do feijoeiro Olathe (convencional) e feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

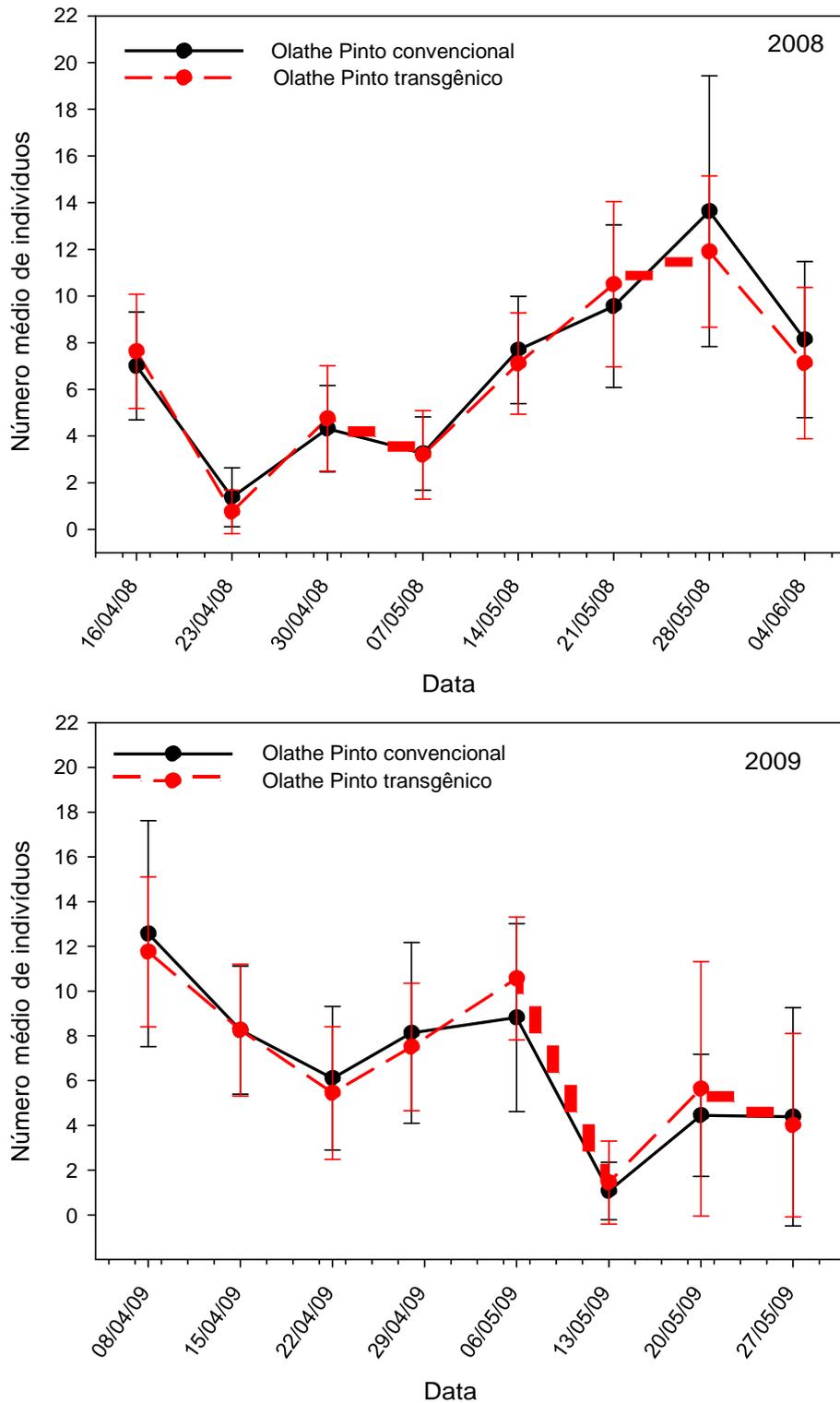


Figura VII.23. Número médio total de artrópodes amostrado na parte aérea em dois metros de plantio do feijoeiro Olathe (convencional) e feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

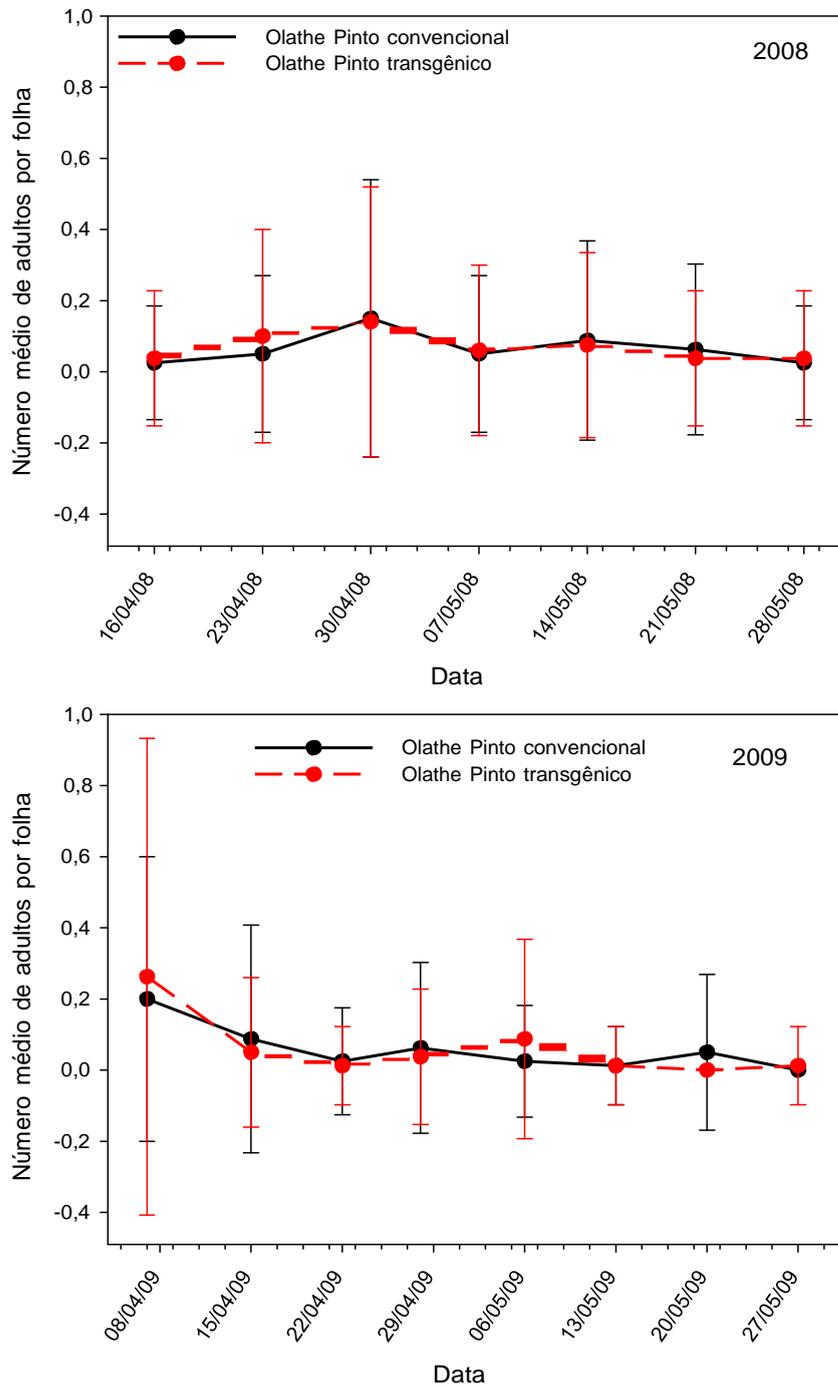


Figura VII.24. Número médio de adultos da mosca-branca *Bemisia tabaci* por folha de feijoeiro Olathe (convencional) e feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) plantados em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO (n= 80).

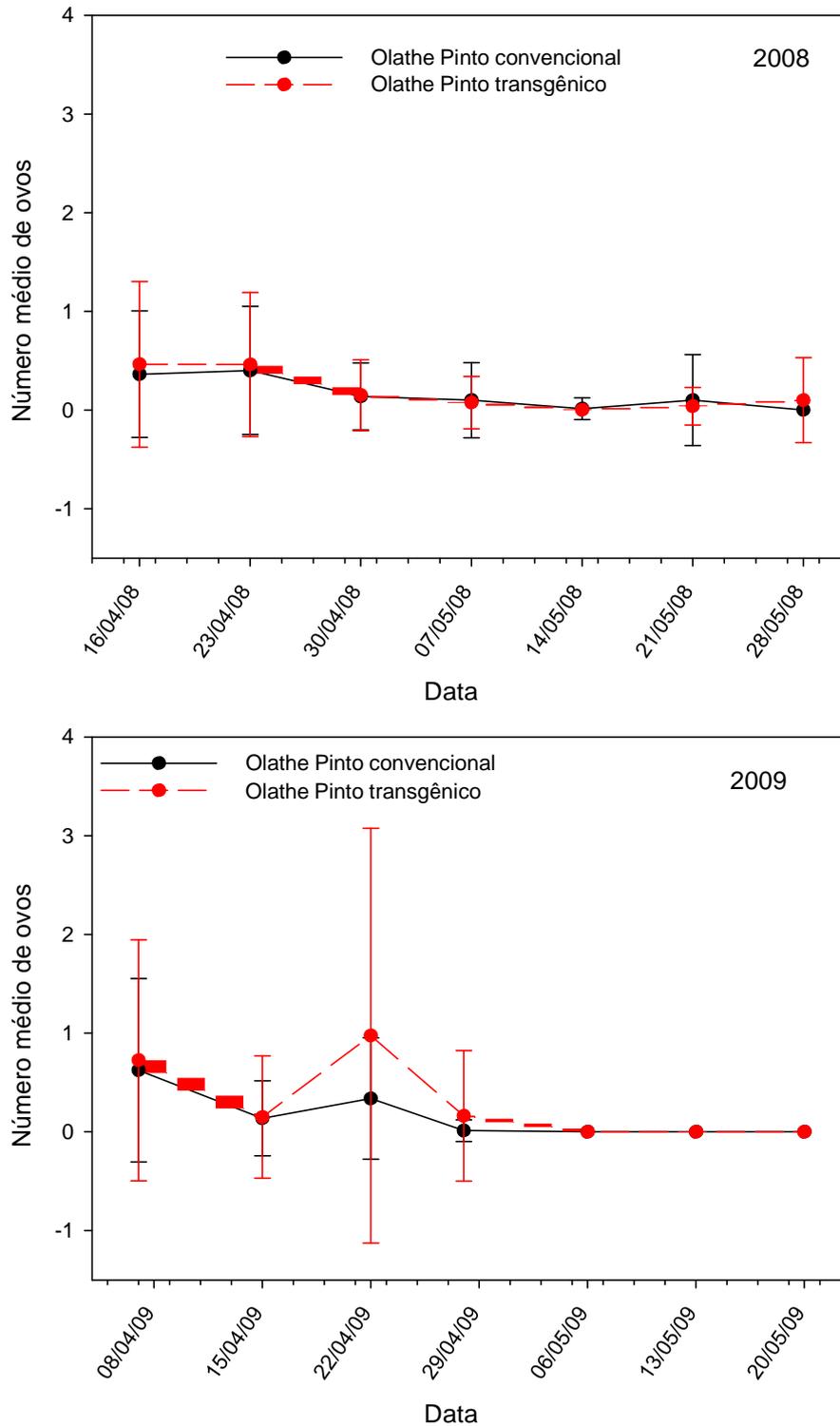


Figura VII.25. Número médio de ovos de *Bemisia tabaci* por folha amostrado com o uso de microscópio estereoscópico em feijoeiro Olathe (convencional) e feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) plantados em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

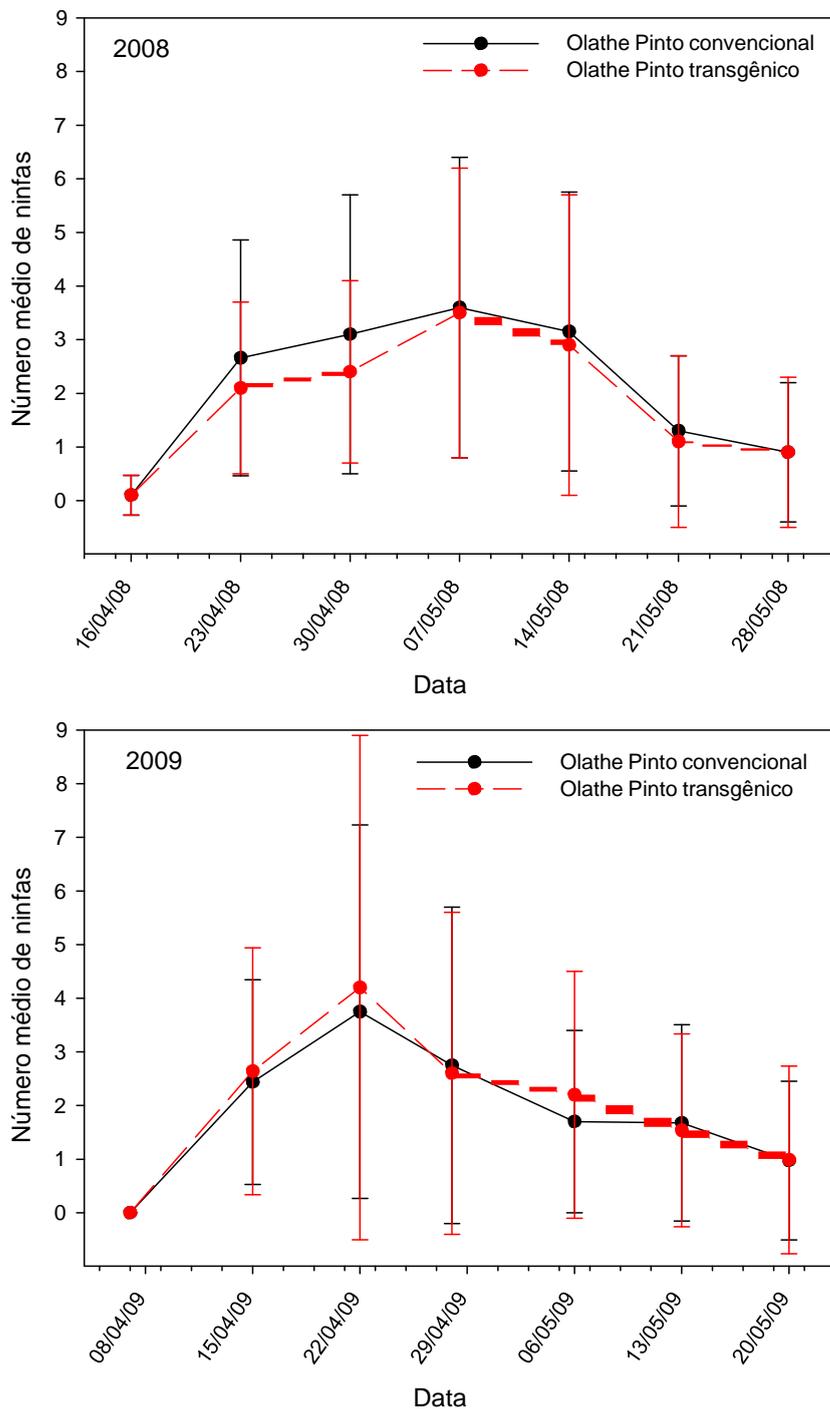


Figura VII.26. Número médio de ninfas de *Bemisia tabaci* por folha amostrado com o uso de microscópio estereoscópico em feijoeiro Olathe (convencional) e feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) plantados em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

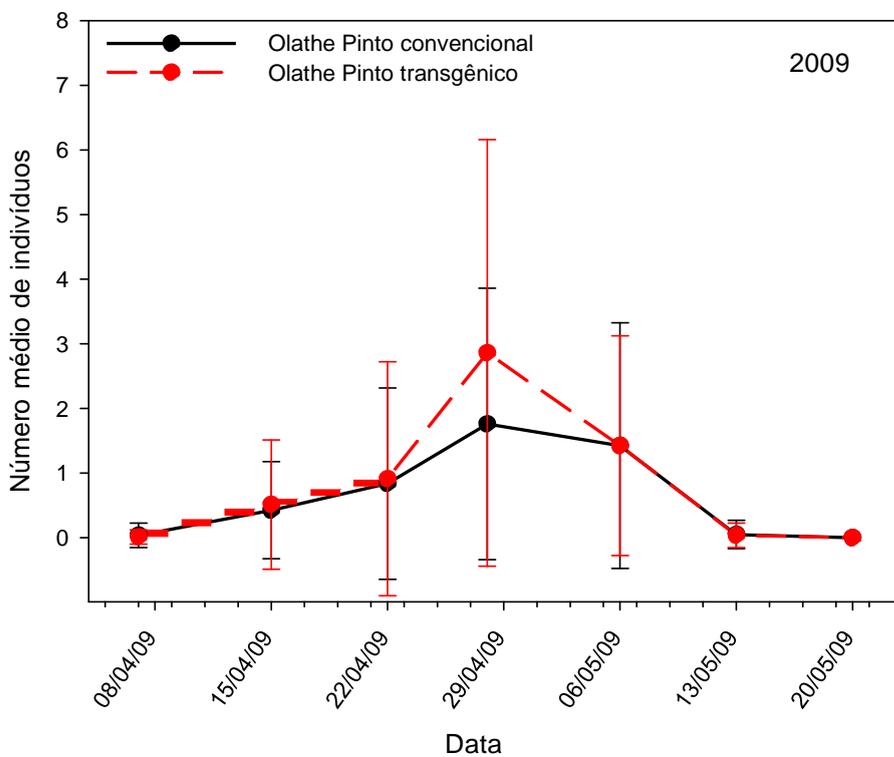
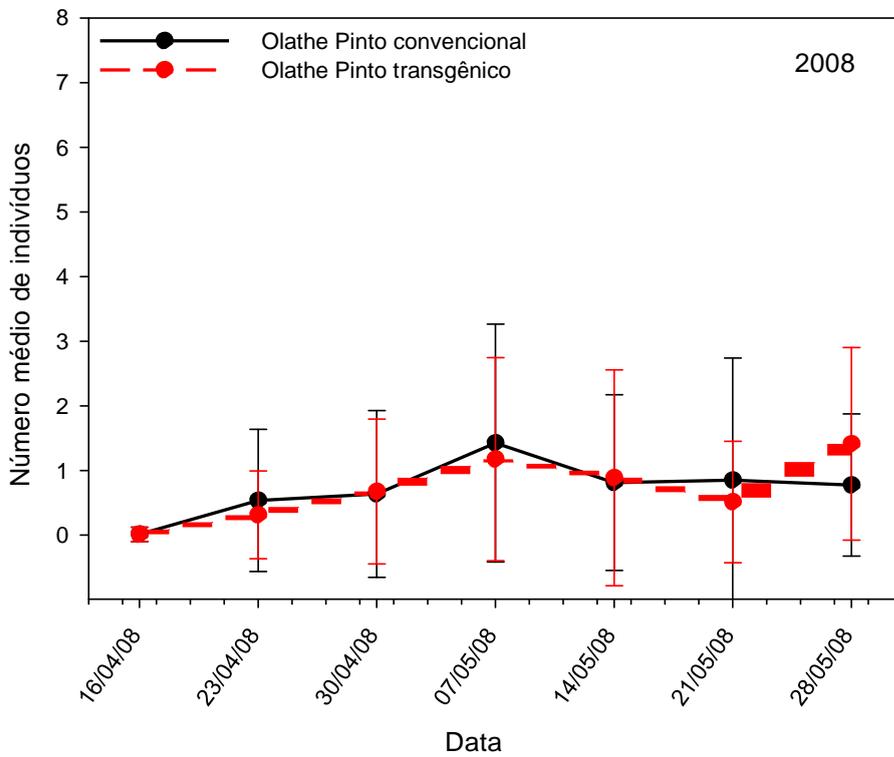


Figura VII.27. Número médio de ninfas e adultos do tripses amarelos por folha amostrado com o uso de microscópio estereoscópico em feijoeiro Olathe (convencional) e feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) plantados em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

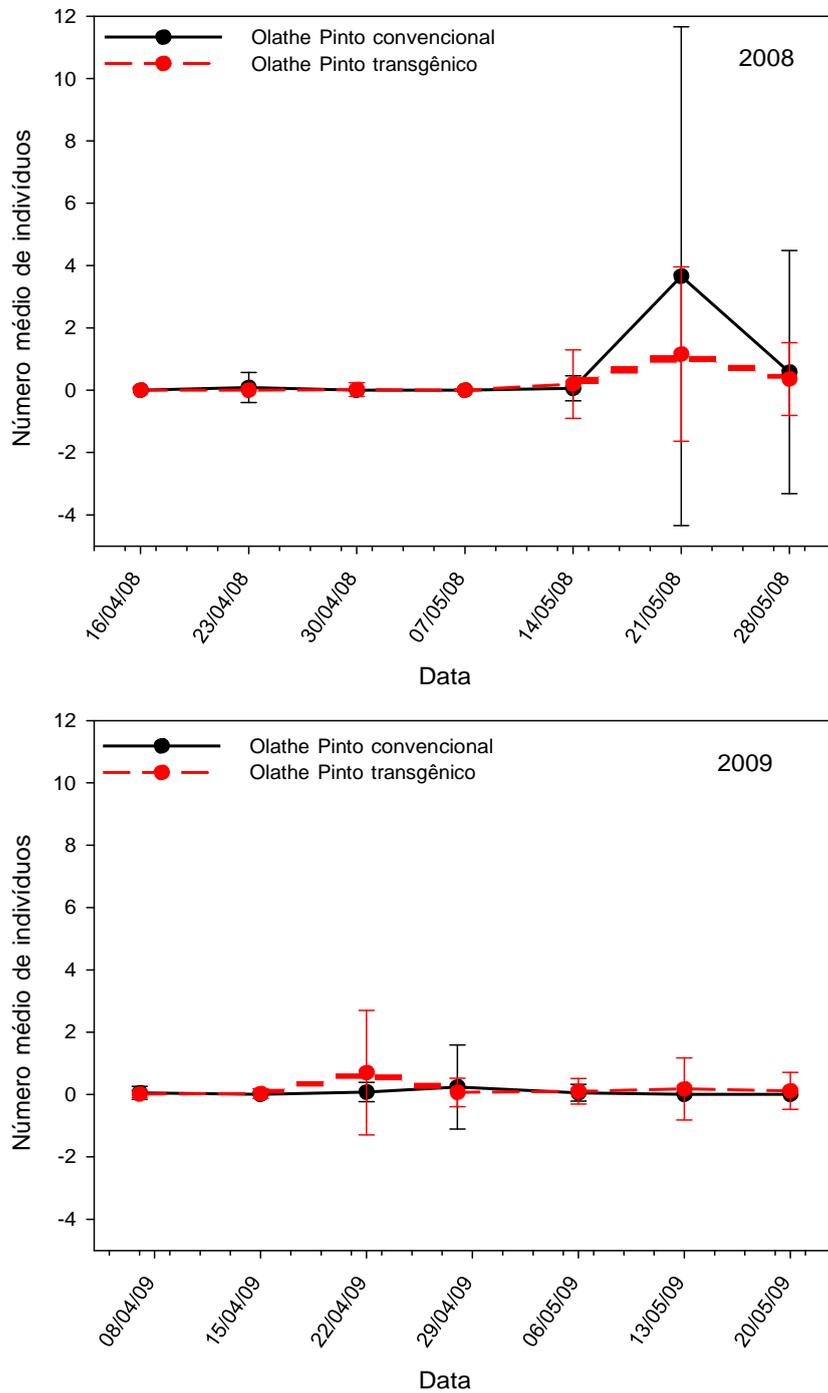


Figura VII.28. Número médio de ninfas e adultos do ácaro branco, *Polyphagotarsonemus latus*, por folha amostrado com o uso de microscópio estereoscópico em feijoeiro Olathe (convencional) e feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) plantados em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

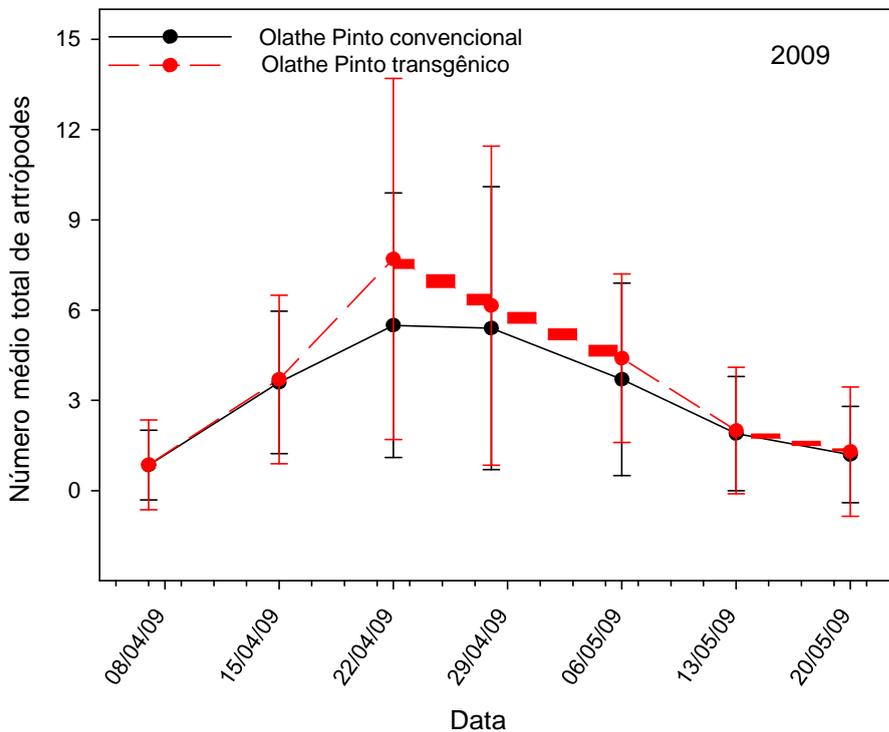
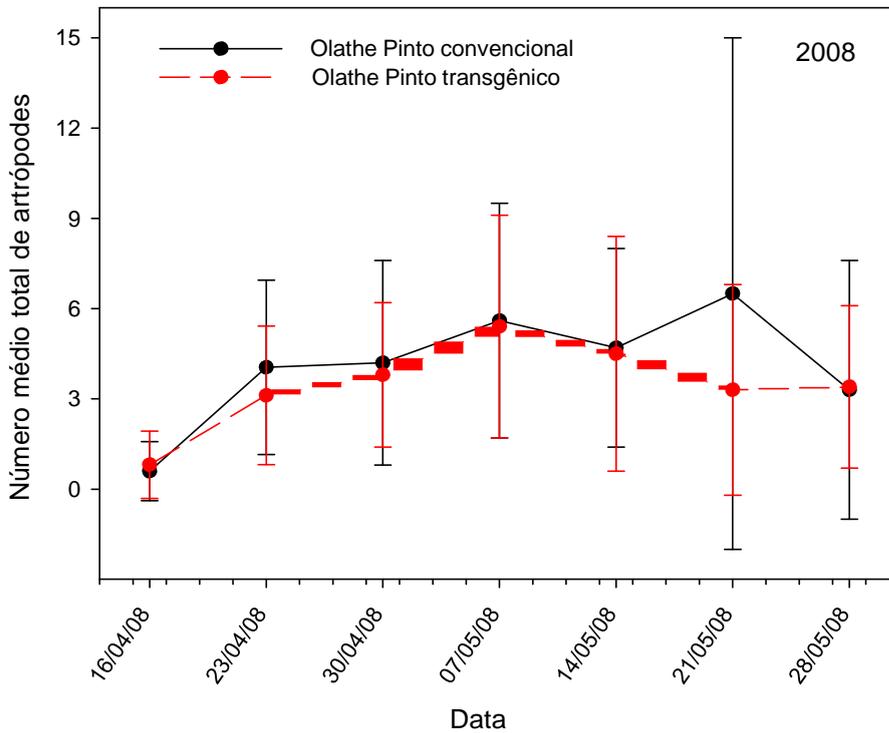


Figura VII.29. Número médio total de artrópodes por folha amostrado com o uso de microscópio estereoscópico em feijoeiro Olathe (convencional) e feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) plantados em 2008 e 2009 em Santo Antônio de Goiás, GO.

Londrina, PR.

Em 2008, foram coletados um total de 1811 artrópodes indivíduos na amostragem dos artrópodes da parte aérea em dois metros de plantio do evento Embrapa 5.1 e do convencional nas três coletas realizadas na Embrapa Soja (Tabela VII.14). Em 2009, o número total de artrópodes amostrados foi de 1255 no evento Embrapa 5.1 e no convencional em três amostragens (Tabela VII.14).

Não foram observadas diferenças significativas para o número total de pragas e predadores amostrados na parte aérea entre o evento Embrapa 5.1 e o convencional em 2008 e 2009 (Tabela VII.14). Foram amostradas 41 espécies de artrópodes da classe Insecta, uma espécie de molusco da classe Gastropoda e morfoespécies de aranhas da classe Arachnida (Tabela VII.14). Foi observada diferença significativa entre o feijoeiro convencional e o evento Embrapa 5.1 somente para duas espécies de insetos nos dois anos de plantio (Tabela VII.14). Em 2008, foi observado maior número do predador *Geocoris* sp no feijoeiro convencional em comparação ao evento Embrapa 5.1 (Tabela VII.14). Em 2009, maior número do idi amim, *Lagria villosa*, foi coletado nas amostragens no evento Embrapa 5.1 (Tabela VII.14).

Nas amostragens de artrópodes nas folhas com o uso do microscópio estereoscópico foram coletados um total de 9806 e 799 artrópodes em 2008 e 2009, respectivamente (Tabela VII.15). O maior número de indivíduos amostrados em 2008 foi devido a presença do ácaro branco, *Polyphagotarsonemus latus*, que representou aproximadamente 88 e 92% da amostra no feijoeiro convencional e no evento Embrapa 5.1, respectivamente (Tabela VII.15). Das 10 espécies amostradas nas folhas, foi observada diferença significativa entre os dois tratamentos somente para o número de ovos da *Urbanus proteus* em 2009 (Tabela VII.15).

Sete Lagoas, MG

Na Embrapa Milho e Sorgo foram coletadas um total de 24 espécies de artrópodes da parte aérea em dois metros de plantio do feijoeiro convencional e no evento Embrapa 5.1 em 2008 e 2009 (Tabela VII.16). Em 2008, foram amostrados um total de 3322 indivíduos nos dois tratamentos nas três datas de amostragem (Tabela VII.16). Em 2009, 1908 indivíduos foram observados na parte aérea do feijoeiro convencional e no evento Embrapa 5.1 (Tabela VII.16).



Não foram observadas diferenças significativas entre o feijoeiro convencional e o evento Embrapa 5.1 para as 14 espécies de pragas amostradas (Tabela VII.16). Para os predadores, maior número de morfoespécies de aranhas e de *Orius* sp foi observado no o evento Embrapa 5.1 em comparação ao convencional (Tabela VII.16).

Nas amostragens de artrópodes nas folhas com o uso do microscópio estereoscópico foram coletados 1951 e 2256 indivíduos nos dois tratamentos em 2008 e 2009, respectivamente (Tabela VII.17). Foram amostrados um total de 16 espécies, com significativamente maior número de ovos de *B. Tabaci* e de ninfas de *E. kraemeri* no evento Embrapa 5.1 quando comparado com o convencional (Tabela VII.17). Para as demais espécies de artrópodes não foram observadas diferenças significativas entre os dois tratamentos (Tabela VII.17).

Conclusões

Nas avaliações de artrópodes da parte aérea com diferentes métodos de amostragem, em dois anos de plantio do feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) e seu parental não-GM em Santo Antônio de Goiás, GO, Sete Lagoas, MG e Londrina, PR, foram observadas poucas diferenças na comunidade de artrópodes entre os dois tratamentos. Estes resultados permitem concluir que o evento Embrapa 5.1 não causa nenhum efeito sobre a diversidade de artrópodes presentes na parte aérea do feijoeiro.

Tabela VII.14. Número médio, total e frequência (F, %) de artrópodes amostrados em dois metros na parte aérea do feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional em 2008 e 2009 em Londrina, PR.

Espécie (Ordem:Familia)	Estágios	2008						2009					
		Feijoeiro convencional			Embrapa 5.1			Feijoeiro convencional			Embrapa 5.1		
		Σ	%	Média (n=48)	Σ	%	Média (n=48)	Σ	%	Média (n=48)	Σ	%	Média (n=48)
PRAGAS													
<i>Cerotoma arcuata</i> (Coleoptera:Chrysomelidae)	Adulto	0	0	0	0	0	0	1	0,158	0,021 ^a	0	0	0a
Besouro (Coleoptera:Curculionidae)	Adulto	0	0	0a	1	0,106	0,021a	0	0	0	0	0	0
<i>Diabrotica speciosa</i> (Coleoptera:Chrysomelidae)	Adulto	58	6,705	1,208a	72	7,611	1,5 ^a	130	20,57	2,708 ^a	122	19,583	2,652a
<i>Epicauta sp.</i> (Coleoptera: Meloidae)	Adulto	1	0,116	0,021a	2	0,211	0,042a	0	0	0	0	0	0
<i>Lagria villosa</i> (Coleoptera: Lagriidae)	Adulto	23	2,659	0,479a	14	1,48	0,292a	19	3,006	0,396 ^a	36	5,778	0,783 ^b
<i>Maecolaspis sp.</i> (Coleoptera:Chrysomelidae)	Adulto	6	0,694	0,125a	6	0,634	0,125a	6	0,949	0,125 ^a	5	0,803	0,109a
<i>Bemisia tabaci</i> (Hemiptera: Aleyrodidae)	Adulto	174	20,116	3,625a	158	16,702	3,292a	11	1,741	0,229 ^a	12	1,926	0,261a
<i>Acrosternum sp.</i> (Hemiptera: Pentatomidae)	Adulto	1	0,116	0,021a	0	0	0a	0	0	0	0	0	0
Pulgão (Hemiptera: Aphididae)	Adulto	13	1,503	0,271a	10	1,057	0,208a	0	0	0	0	0	0

Continua na próxima página



Continuação da tabela VII.14

Espécie (Ordem:Familia)	Estágios	2008						2009					
		Feijoeiro convencional			Embrapa 5.1			Feijoeiro convencional			Embrapa 5.1		
		Σ	%	Média (n=48)	Σ	%	Média (n=48)	Σ	%	Média (n=48)	Σ	%	Média (n=48)
Cigarrinha cinza (Hemiptera: Cicadellidae)	Adulto	4	0,462	0,083a	1	0,106	0,021a	26	4,114	0,542 ^a	18	2,889	0,391a
Cigarrinha (Hemiptera: Cicadellidae)	Adulto	2	0,231	0,042a	1	0,106	0,021a	0	0	0	0	0	0
<i>Collaria sp.</i> (Hemiptera: Miridae) <i>Dichelops</i>	Adulto	2	0,231	0,042a	4	0,423	0,083a	0	0	0	0	0	0
<i>melacanthus</i> (Hemiptera: Pentatomidae) <i>Edessa</i>	Adulto	1	0,116	0,021a	5	0,529	0,104a	1	0,158	0,021 ^a	1	0,161	0,022a
<i>meditabunda</i> (Hemiptera: Pentatomidae) <i>Empoasca</i>	Adulto	0	0	0	0	0	0	0	0	0a	3	0,482	0,065a
<i>kraemeri</i> (Hemiptera: Cicadellidae) <i>Euchistus</i>	Adulto	26	3,006	0,542a	23	2,431	0,479a	24	3,797	0,5 ^a	18	2,889	0,391a
<i>heros</i> (Hemiptera: Pentatomidae) <i>Leptoglossus</i>	Adulto	19	2,197	0,396a	27	2,854	0,563a	26	4,114	0,542 ^a	29	4,655	0,63a
<i>sp.</i> (Hemiptera: Coreidae) <i>Neomegalotomus simplex</i>	Adulto	0	0	0a	1	0,106	0,021a	0	0	0	0	0	0
(Hemiptera: Alydidae) <i>Nezara viridula</i>	Adulto	1	0,116	0,021a	3	0,317	0,063a	3	0,475	0,063 ^a	5	0,803	0,109a
(Hemiptera: Pentatomidae) Percevejo	Adulto	0	0	0a	0	0	0a	1	0,158	0,021 ^a	5	0,803	0,109a
(Hemiptera: Pentatomidae)	Ninfa	1	0,116	0,021a	0	0	0a	0	0	0	0	0	0

Continua na próxima página



Continuação da tabela VII.14

Espécie (Ordem:Familia)	Estágios	2008						2009					
		Feijoeiro convencional			Embrapa 5.1			Feijoeiro convencional			Embrapa 5.1		
		Σ	%	Média (n=48)	Σ	%	Média (n=48)	Σ	%	Média (n=48)	Σ	%	Média (n=48)
<i>Piezodorus sp.</i> (Hemiptera:Pentatomidae)	Adulto	0	0	0	0	0	0	116	18,354	2,417 ^a	100	16,051	2,174a
<i>Thyanta sp.</i> (Hemiptera:Pentatomidae)	Adulto	0	0	0a	2	0,211	0,042a	0	0	0	0	0	0
<i>Anticarsia sp.</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	Lagarta	8	0,925	0,167a	7	0,74	0,146a	30	4,747	0,625 ^a	28	4,494	0,609a
Lagarta (não identificada)	Lagarta	1	0,116	0,021a	1	0,106	0,021a	0	0	0	0	0	0
Lagarta verde peluda (não identificada)	Lagarta	0	0	0a	1	0,106	0,021a	0	0	0	0	0	0
<i>Urbanus proteus</i> (Lepidoptera: Hesperidae)	Ovo	2	0,231	0,042a	0	0	0a	0	0	0a	0	0	0a
<i>Pseudoplusia sp.</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	Adulto	0	0	0a	1	0,106	0,021a	0	0	0a	0	0	0a
Gafanhoto (Orthoptera: Acrididae)	Adulto	1	0,116	0,021a	2	0,211	0,042a	0	0	0a	0	0	0a
Grilo (Orthoptera: Gryllidae)	Adulto	0	0	0a	2	0,211	0,042a	0	0	0a	0	0	0a
Caramujo (Pulmonata)	Adulto	4	0,462	0,083a	2	0,211	0,042a	0	0	0a	0	0	0a
TOTAL DE PRAGAS		348	40,234	7,250a	346	36,575	7,208a	394	62,341	8,21 a	382	61,317	8,1 a

Continua na próxima página

Continuação da tabela VII.14

Espécie (Ordem:Familia)	Estágios	2008						2009					
		Feijoeiro convencional			Embrapa 5.1			Feijoeiro convencional			Embrapa 5.1		
		Σ	%	Média (n=48)	Σ	%	Média (n=48)	Σ	%	Média (n=48)	Σ	%	Média (n=48)
PREDADORES													
Morfoespécies de aranhas (Araneae)	Adulto	66	7,63	1,375a	71	7,505	1,479a	87	13,766	1,813	83	13,323	1,804a
<i>Callida sp.</i> (Coleoptera: Carabidae)	Adulto	0	0	0a	1	0,106	0,021a	2	0,316	0,042 ^a	0	0	0a
Joaninhas (<i>Eriopis sp.</i> , <i>Cycloneda sp.</i> , <i>Hippodamia sp.</i>) (Coleoptera:Coccinellidae)	Adulto	3	0,347	0,063a	0	0	0a	2	0,316	0,042 ^a	1	0,161	0,022a
<i>Lebia sp.</i> (Coleoptera: Carabidae)	Adulto	1	0,116	0,021a	0	0	0a	21	3,323	0,438 ^a	13	2,087	0,283a
Microjoaninha (Coleoptera:Coccinellidae)	Adulto	0	0	0	0	0	0	69	10,918	1,438 ^a	82	13,162	1,783a
Estafilínideo (Coleoptera:Sthaphylinidae)	Adulto	0	0	0	0	0	0	1	0,158	0,021 ^a	3	0,482	0,065a
<i>Dorus luteipes</i> Dermaptera: forficulidae)	Adulto	0	0	0a	1	0,106	0,021a	0	0	0	0	0	0
<i>Geocoris sp.</i> (Hemiptera: Lygaeidae)	Adulto	5	0,578	0,104a	0	0	0b	13	2,057	0,271 ^a	13	2,087	0,283a
<i>Nabis sp.</i> (Hemiptera: Nabidae)	Adulto	0	0	0	0	0	0	3	0,475	0,063 ^a	6	0,963	0,13a
<i>Orius sp.</i> (Hemiptera: Anthocoridae)	Adulto	6	0,694	0,125a	18	1,903	0,375a	16	2,532	0,333 ^a	9	1,445	0,196a

Continua na próxima página

Continuação da tabela VII.14

Espécie (Ordem:Familia)	Estágios	2008						2009					
		Feijoeiro convencional			Embrapa 5.1			Feijoeiro convencional			Embrapa 5.1		
		Σ	%	Média (n=48)	Σ	%	Média (n=48)	Σ	%	Média (n=48)	Σ	%	Média (n=48)
<i>Zelus</i> sp. (Dermaptera: Forficulidae)	Adulto	0	0	0	0	0	0	5	0,791	0,104 ^a	5	0,803	0,109a
Formiga (Hymenoptera: Formicidae)	Adulto	436	50,405	9,083a	508	53,7	10,583a	19	3,006	0,396 ^a	26	4,173	0,565a
TOTAL DE PREDADORES		517	59,77	10,771 a	599	63,32	12,479 a	238	37,658	4,95 a	241	38,686	5,1 a
POLINIZADOR													
<i>Trigona</i> sp (Hymenoptera: Apidae)	Adulto	0	0	0 a	1	0,106	0,021 a	0	0	0	0	0	0
TOTAL GERAL		865	100	-	946	100	-	632	100	-	623	100	-

Tabela VII.15. Número médio, total e frequência (F, %) de artrópodes amostrados em folhas com o uso de microscópio estereoscópico em feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional plantados em 2008 e 2009 em Londrina, PR.

Gênero/Espécie (Ordem:Família)	Estágio	Ano 2008						Ano 2009					
		Feijoeiro Convencional			Feijoeiro Transgênico			Feijoeiro Convencional			Feijoeiro Transgênico		
		Total	F (%)	Média (n=240)	Total	F (%)	Média (n=240)	Total	F (%)	Média (n=240)	Total	F (%)	Média (n=240)
CLASSE INSECTA													
<i>Bemisia tabaci</i> (Hemiptera: Aleyrodidae)	Ovos	117	2,852	0,488a	155	2,718	0,646a	11	2,902	0,046a	16	3,81	0,067a
<i>Bemisia tabaci</i> (Hemiptera: Aleyrodidae)	Ninfas	210	5,118	0,875a	140	2,455	0,583a	22	5,805	0,092a	27	6,429	0,113a
<i>Empoasca kraemeri</i> (Hemiptera: Cicadellidae)	Ninfas, adultos	4	0,097	0,017a	7	0,123	0,029a	18	4,749	0,075a	22	5,238	0,092a
Trips amarelo (Thysanoptera: Thripidae)	Ninfa, adultos	26	0,634	0,108a	27	0,473	0,113a	95	25,066	0,396a	127	30,238	0,529a
Trips preto (Thysanoptera: Thripidae)	Ninfa, adultos	6	0,146	0,025a	4	0,07	0,017a	12	3,166	0,05a	3	0,714	0,013a
<i>Liriomyza huidobrensis</i> (Diptera: Agromyzidae)	Larva	9	0,219	0,038a	6	0,105	0,025a	17	4,485	0,071a	18	4,286	0,075a
<i>Liriomyza huidobrensis</i> (Diptera: Agromyzidae)	Pupa	1	0,024	0,004a	1	0,018	0,004a	6	1,583	0,025a	4	0,952	0,017a
<i>Liriomyza huidobrensis</i> (Diptera: Agromyzidae)	Adulto	29	0,707	0,121a	17	0,298	0,071a	80	21,108	0,333a	57	13,571	0,238a
<i>Urbanus proteus</i> (Lepidoptera: Hesperidae)	Ovo	16	0,39	0,067a	7	0,123	0,029a	4	1,055	0,017a	0	0	0b

Continua na próxima página

Continuação da tabela VII.15

Gênero/Espécie (Ordem:Família)	Estágio	Ano 2008						Ano 2009					
		Feijoeiro Convencional			Feijoeiro Transgênico			Feijoeiro Convencional			Feijoeiro Transgênico		
		Total	F (%)	Média (n=240)	Total	F (%)	Média (n=240)	Total	F (%)	Média (n=240)	Total	F (%)	Média (n=240)
Pulgão (Hemiptera: Aphididae)	Formas jovens, Adultos	6	0,146	0,025a	4	0,07	0,017a	6	1,583	0,025a	2	0,476	0,008a
<i>Anticarsia gemmatalis</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	Lagarta	0	0	0a	1	0,018	0,004a	0	0	0a	3	0,714	0,013a
CLASSE ARACHNIDA													
<i>Polyphagotarsonemus latus</i> (Acari: Tarsonemidae)		3613	88,058	15,054a	5258	92,197	21,908a	105	27,704	0,438a	141	33,571	0,588a
Total		4103	100	17,097	5703	100	23,763	379	100	1,581	420	100	1,753

Tabela VII.16. Número médio, total e frequência (F, %) de artrópodes amostrados em dois metros na parte aérea do feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional em 2008 e 2009 em Sete Lagoas, MG.

Espécie (Ordem:Família)	Estágios	2008						2009					
		Feijoeiro convencional			Embrapa 5.1			Feijoeiro convencional			Embrapa 5.1		
		Σ	%	Média (n=48)	Σ	%	Média (n=48)	Σ	%	Média (n=48)	Σ	%	Média (n=48)
PRAGAS													
<i>Cerotoma arcuata</i> (Coleoptera:Chrysomelidae)	Adulto	36	2,163	0,75a	49	2,955	1,021a	16	1,788	0,333a	7	0,691	0,146a
<i>Chaetocnema sp.</i> (Coleoptera:Chrysomelidae)	Adulto	0	0	0a	1	0,06	0,021a	0	0	0	0	0	0
<i>Diabrotica speciosa</i> (Coleoptera:Chrysomelidae)	Adulto	23	1,382	0,479a	21	1,267	0,438a	27	3,017	0,563a	31	3,06	0,646a
<i>Epicauta sp.</i> (Coleoptera: Meloidae)	Adulto	1	0,06	0,021a	0	0	0a	0	0	0	0	0	0
<i>Lagria Villosa</i> (Coleoptera: Lagriidae)	Adulto	4	0,24	0,083a	4	0,241	0,083a	16	1,788	0,333a	28	2,764	0,583a
Pulgão (Hemiptera: Aphididae)	Forma jovem, Adulto	48	2,885	1a	57	3,438	1,188a	44	4,916	0,917a	39	3,85	0,813a
Cigarrinha cinza (Hemiptera: Cicadellidae)	Adulto	133	7,993	2,771a	140	8,444	2,917a	103	11,508	2,146a	102	10,069	2,125a
<i>Collaria sp.</i> (Hemiptera: Miridae)	Adulto	0	0	0a	1	0,06	0,021a	0	0	0	0	0	0
<i>Edessa meditabunda</i> (Hemiptera:Pentatomidae)	Adulto	0	0	0	0	0	0	0	0	0a	2	0,197	0,042a

Continua na próxima página



Continuação da tabela VII.16

Espécie (Ordem:Familia)	Estágios	2008						2009					
		Feijoeiro convencional			Embrapa 5.1			Feijoeiro convencional			Embrapa 5.1		
		Σ	%	Média (n=48)	Σ	%	Média (n=48)	Σ	%	Média (n=48)	Σ	%	Média (n=48)
<i>Empoasca kraemeri</i> (Hemiptera: Cicadellidae)	Adulto	78	4,688	1,625a	78	4,704	1,625a	427	47,709	8,896a	523	51,629	10,89a
<i>Euchistus heros</i> (Hemiptera: Pentatomidae)	Adulto	0	0	0	0	0	0	1	0,112	0,021a	0	0	0a
<i>Piezodorus sp.</i> (Hemiptera: Pentatomidae)	Adulto	1	0,06	0,021a	0	0	0a	33	3,687	0,688a	27	2,665	0,563a
<i>Pseudoplusia includens</i> (Lepidoptera: Noctuide)	Lagarta	2	0,12	0,042a	1	0,06	0,021a	14	1,564	0,292a	23	2,27	0,479a
Gafanhoto (Orthoptera: Acrididae)	Adulto	1	0,06	0,021a	0	0	0a	0	0	0	0	0	0
TOTAL DE PRAGAS		327	19,651	6,812a	352	21,229	7,333a	681	76,089	14,19a	782	77,195	16,29a
PREDADORES													
Morfoespécies de aranhas (Araneae)	Adulto	95	5,709	1,979a	114	6,876	2,375b	88	9,832	1,833a	101	9,97	2,104a
Carábideo (Coleoptera: Carabidae)	Adulto	1	0,06	0,021a	0	0	0a	0	0	0a	0	0	0a
Joaninhas (<i>Eriopis sp.</i> , <i>Cycloneda sp.</i> , <i>Hippodamia sp.</i>) (Coleoptera:Coccinellidae)	Adulto	1	0,06	0,021a	0	0	0a	0	0	0a	0	0	0a
Microjoaninha (Coleoptera:Coccinellidae)	Adulto	1	0,06	0,021a	2	0,121	0,042a	10	1,117	0,208a	11	1,086	0,229a

Continua na próxima página



Continuação da tabela VII.16

Espécie (Ordem:Familia)	Estágios	2008						2009					
		Feijoeiro convencional			Embrapa 5.1			Feijoeiro convencional			Embrapa 5.1		
		Σ	%	Média (n=48)	Σ	%	Média (n=48)	Σ	%	Média (n=48)	Σ	%	Média (n=48)
Estafilínídeo (Coleoptera:Sthaphylinidae)	Adulto	0	0	0a	1	0,06	0,021a	0	0	0a	0	0	0a
<i>Dorus luteipes</i> Dermaptera: forficulidae)	Adulto	0	0	0a	0	0	0 a	6	0,67	0,125a	1	0,099	0,021a
Formiga (Hymenoptera: Formicidae)	Adulto	1236	74,279	25,75a	1176	70,929	24,5a	61	6,816	1,271a	68	6,713	1,417a
<i>Geocoris sp.</i> (Hemiptera: Lygaeidae)	Adulto	0	0	0a	0	0	0a	4	0,447	0,083a	9	0,888	0,188a
<i>Nabis sp.</i> (Hemiptera: Nabidae)	Adulto	1	0,06	0,021a	1	0,06	0,021a	20	2,235	0,417a	10	0,987	0,208a
<i>Orius sp.</i> (Hemiptera: Anthocoridae)	Adulto	2	0,12	0,042a	12	0,724	0,25b	25	2,793	0,521a	31	3,06	0,646a
TOTAL DE PREDADORES		1337	80,348	27,86a	1306	78,77	27,21a	214	23,91	4,458a	231	22,803	4,813a
TOTAL GERAL		1664	100		1658	100		895	100		1013	100	

Tabela VII.17. Número médio, total e frequência (F, %) de artrópodes amostrados em folhas com o uso de microscópio estereoscópico em feijoeiro GM (evento Embrapa 5.1) e feijoeiro convencional plantados em 2008 e 2009 em Sete Lagoas, MG.

Gênero/Espécie (Ordem:Família)	Estágio	Ano 2008						Ano 2009					
		Feijoeiro Convencional			Feijoeiro Embrapa 5.1			Feijoeiro Convencional			Feijoeiro Embrapa 5.1		
		Total	F (%)	Média (n=240)	Total	F (%)	Média (n=240)	Total	F (%)	Média (n=240)	Total	F (%)	Média (n=240)
CLASSE INSECTA													
<i>Bemisia tabaci</i> (Hemiptera: Aleyrodidae)	Ovo	51	5,162	0,213a	92	9,553	0,383b	36	3,066	0,15a	33	3,05	0,138a
<i>Bemisia tabaci</i> (Hemiptera: Aleyrodidae)	Ninfa	190	19,231	0,792a	156	16,199	0,65a	136	11,584	0,567a	112	10,351	0,467a
<i>Empoasca kraemeri</i> (Hemiptera: Cicadellidae)	Ovo, ninfa	14	1,417	0,058a	32	3,323	0,133b	215	18,313	0,896a	155	14,325	0,646a
Trips amarelo (Thysanoptera: Thripidae)	Ninfa, adulto	579	58,603	2,413a	584	60,644	2,433a	542	46,167	2,258a	523	48,336	2,179a
Trips preto (Thysanoptera: Thripidae)	Ninfa, adulto	3	0,304	0,013a	7	0,727	0,029a	3	0,256	0,013a	6	0,555	0,025a
<i>Liriomyza huidobrensis</i> (Diptera: Agromyzidae)	Larva	5	0,506	0,021a	12	1,246	0,05a	2	0,17	0,008a	7	0,647	0,029a
<i>Liriomyza huidobrensis</i> (Diptera: Agromyzidae)	Pupa	1	0,101	0,004a	2	0,208	0,008a	4	0,341	0,017a	3	0,277	0,013a
<i>Liriomyza huidobrensis</i> (Diptera: Agromyzidae)	Adulto	17	1,721	0,071a	23	2,388	0,096a	45	3,833	0,188a	41	3,789	0,171a
<i>Urbanus proteus</i> (Lepidoptera: Hesperiiidae)	Ovo	1	0,101	0,004a	2	0,208	0,008a	12	1,022	0,05a	6	0,555	0,025a
<i>Urbanus proteus</i> (Lepidoptera: Hesperiiidae)	Lagarta	0	0	0a	1	0,104	0,004a	0	0	0	0	0	0

Continua na próxima página

Continuação da tabela VII.17

Gênero/Espécie (Ordem:Família)	Estágio	Ano 2008						Ano 2009					
		Feijoeiro Convencional			Feijoeiro Embrapa 5.1			Feijoeiro Convencional			Feijoeiro Embrapa 5.1		
		Total	F (%)	Média (n=240)	Total	F (%)	Média (n=240)	Total	F (%)	Média (n=240)	Total	F (%)	Média (n=240)
Pulgão (Hemiptera: Aphididae)	Forma jovem, adulto	50	5,061	0,208a	45	4,673	0,188a	21	1,789	0,088a	11	1,017	0,046a
<i>Omiodes indicata</i> (Lepidoptera: Pyralidae)	Lagarta	1	0,101	0,004a	1	0,104	0,004a	0	0	0a	1	0,092	0,004a
<i>Anticarsia gemmatalis</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	Lagarta	0	0	0	0	0	0	1	0,085	0,004a	1	0,092	0,004a
<i>Chrysoperla</i> spp (Neuroptera: Chrysopidae)	Ovo	0	0	0	0	0	0	0	0	0a	1	0,092	0,004a
<i>Orius sp.</i> (Hemiptera: Anthocoridae)	Ninfa	2	0,202	0,008a	0	0	0a	0	0	0	0	0	0
CLASSE ARACHNIDA													
<i>Polyphagotarsonemus latus</i> (Acari: Tarsonemidae)	Ninfa, adulto	71	7,186	0,296a	4	0,415	0,017a	40	3,407	0,167a	24	2,218	0,1a
<i>Tetranychus urticae</i> (Acari: Tetranychidae)	Ninfa, adulto	2	0,202	0,008a	2	0,208	0,008a	62	5,281	0,258a	80	7,394	0,333a
<i>Tetranychus ludeni</i> (Acari: Tetranychidae)	Ninfa, adulto	1	0,101	0,004a	0	0	0a	55	4,685	0,229a	78	7,209	0,325a
Total	-	988	100	4,117	963	100	4,011	1174	100	4,893	1082	100	4,509

Efeito do feijoeiro geneticamente modificado evento Embrapa 5.1 no desenvolvimento biológico de *Zabrotes subfasciatus*.

O *Z. subfasciatus* é o principal caruncho de grãos do feijão armazenado nas regiões mais quentes dos trópicos (Cardona, 1994). Esta praga causa danos aos grãos devido as galerias feitas pelas larvas, destruindo os cotilédones, reduzindo o peso da semente, facilitando a entrada de microorganismos e ácaros e favorecendo o aquecimento dos grãos (Quintela, 2002). Também afetam a germinação da semente pela destruição do embrião e depreciam a qualidade comercial dos grãos pela presença de insetos, ovos e excrementos.

Foi avaliado o efeito do feijoeiro geneticamente modificado Embrapa 5.1 sobre o desenvolvimento biológico de 10 gerações do caruncho *Z. subfasciatus*. O experimento foi conduzido no laboratório de Entomologia da Embrapa Arroz e Feijão, em Santo Antônio de Goiás, GO. Os adultos do *Z. subfasciatus* utilizados no experimento foram obtidos da 1ª. geração da criação massal do laboratório de Entomologia.

Os tratamentos avaliados foram: 1) Evento Embrapa 5.1 (GM); 2) Cultivar Olathe convencional (não GM); 3) Cultivar Jalo Precoce (padrão de comparação como cultivar suscetível, grão utilizado na criação massal deste inseto); 4) Cultivar Pérola (padrão de comparação como cultivar suscetível); 5) Cultivar de feijão carioca contendo o alelo arcelina 1 (ARC 1), proteína encontrada em feijões silvestres (*Phaseolus vulgaris*) que confere resistência ao caruncho (Schoonhoven et al., 1983). Utilizou-se o delineamento inteiramente ao acaso, com cinco tratamentos e cinco repetições.

De forma geral, o evento Embrapa 5.1 não interferiu no desenvolvimento biológico de 10 gerações do caruncho *Z. subfasciatus* (Tabelas VII.18, VII.19 e VII.20). Diferenças significativas entre o evento Embrapa 5.1 e o convencional para alguns parâmetros biológicos de 10 gerações do caruncho *Z. subfasciatus* foram observadas em somente algumas gerações (Tabelas VII.18, VII.19 e VII.20). Semelhantemente, diferenças significativas foram observadas também entre o Cv. Jalo Precoce e o Pérola em algumas gerações.

Na 1ª. geração, não foram observadas diferenças entre os tratamentos para o número de ovos, número de orifícios de emergência de adultos, número médio de machos e fêmeas, porcentagem de emergência dos adultos e razão sexual (Tabela VII.18).

Diferença significativa entre o feijoeiro evento Embrapa 5.1 e o convencional para o número total de ovos colocados por fêmeas nos grãos foi observada somente na 3^a. geração, com maior número de ovos no evento Embrapa 5.1 (Tabela VII.18). Foi observada diferença significativa entre os cultivares Jalo Precoce e o Pérola para o número de ovos colocados somente na 9^a. geração (Tabela VII.18). O número de ovos no cv. Carioca Arc 1, foi significativamente menor em comparação aos cultivares Jalo Precoce e o Pérola nas 3^a. e 4^a. gerações (Tabela VII.18). A partir da 5^a. geração, a emergência de adultos nos grãos do Cv. Carioca contendo a proteína Arcelina diminuiu significativamente, impossibilitando a infestação de novos grãos com os adultos (Tabela VII.18).

O número de orifícios de emergência de adultos foi significativamente menor no Olathe convencional em relação ao evento Embrapa 5.1 na 3^a. geração, devido ao menor número de ovos depositados no grão do Olathe convencional (Tabela VII.18). Na 6^a. geração, o número de orifícios de emergência de adultos foi significativamente menor no evento Embrapa 5.1 em comparação ao convencional. Nas demais gerações não foram observadas diferenças significativas entre estes tratamentos (Tabela VII.18). Em todas as gerações, o número de orifícios de emergência foi significativamente menor na cv. Carioca Arc-1 quando comparado aos outros tratamentos (Tabela VII.18, Figura VII.30). Foi observada diferença significativa entre os cultivares Jalo Precoce e o Pérola para o número de orifícios de emergência somente na 9^a. geração (Tabela VII.18).

O número médio de fêmeas e o total de fêmeas + machos foi significativamente maior no evento Embrapa 5.1 na 3^a. geração em relação ao convencional, devido a maior quantidade de ovos depositados nos grãos do transgênico (Tabela VII.18). Diferença significativa para o número de machos entre o evento Embrapa 5.1 e o convencional foi observada somente na 8^a. geração (Tabela VII.18). A partir da 2^a. geração, o número de machos e fêmeas foi significativamente menor no tratamento com Arcelina em comparação aos outros tratamentos, exceto para as fêmeas na 4^a. geração (Tabela VII.18). Para o Pérola e o Jalo Precoce, o número de fêmeas foi significativamente diferente na 4^a. geração e para machos e fêmeas na 9^a. geração (Tabela VII.18).

A porcentagem de emergência de adultos em relação ao número de ovos depositados nos grãos, foi significativamente maior no Olathe convencional em relação ao evento Embrapa 5.1 na 4^a. e 7^a. gerações (Tabela VII.18). Para o Jalo Precoce e o

Pérola, diferenças para a emergência de adultos foram observadas na 7^{a.}, 8^{a.} e 10^{a.} gerações, com maior número de adultos emergidos no Jalo Precoce (Tabela VII.18). A emergência de adultos foi significativamente menor no Carioca Arc 1 em relação aos demais tratamentos a partir da 2^{a.} geração.

Não foi observada diferença significativa para a razão sexual do *Zabrotes* entre os tratamentos evento Embrapa 5.1, Olathe convencional e o Jalo Precoce em todas as gerações avaliadas (Tabela VII.18). O Carioca Arc 1, diferiu significativamente dos outros tratamentos na 4^{a.} geração, com a emergência de maior número de fêmeas em relação a machos (Tabela VII.18).

O período de desenvolvimento médio de ovo a adulto do *Z. subfasciatus* foi semelhante nos grãos do evento Embrapa 5.1, Olathe não transgênico, Jalo Precoce e o Pérola até a 5^{a.} geração (Tabela VII.19). O período de desenvolvimento dos insetos nos grãos do evento Embrapa 5.1 foi significativamente maior em comparação ao Olathe convencional somente para machos e fêmeas na 7^{a.} geração e para machos na 8^{a.} e 9^{a.} gerações (Tabela VII.19). Entretanto, na 7^{a.} geração o tempo de desenvolvimento de 34,7 e 35,2 dias para fêmeas e machos, respectivamente em grãos do feijão evento Embrapa 5.1 foram muito próximos ao Olathe convencional de 32,6 e 32,7 dias para fêmeas e machos, respectivamente. Na 8^{a.} e 9^{a.} gerações, o período de desenvolvimento dos machos no evento Embrapa 5.1 foi de 34,0 e 33,9, respectivamente e muito próximo ao desenvolvimento no Olathe convencional de 32,6 e 33,0 dias, respectivamente. Na 6^{a.}, 7^{a.} e 8^{a.} gerações, o período de desenvolvimento de machos e fêmeas foi significativamente maior no Cv. Pérola quando comparado com o cv. Olathe convencional e o Jalo Precoce (Tabela VII.19). Na 9^{a.} geração, o ciclo total dos machos e fêmeas na Cv. Pérola foi significativamente maior em relação ao Cv. Jalo Precoce e aos demais tratamentos na 10^{a.} geração. Resultados semelhantes de tempo para completar o ciclo total de *Z. subfasciatus* em cultivares de feijão, variando entre 29,8 a 37,6 dias, foram observados por Cardona (1994), Dendy & Credland (1991), Credland & Dendy (1992), Mazzoneto & Vendramim (2002).

Nos grãos do feijão cv. Carioca contendo a proteína Arcelina, o período de desenvolvimento dos machos e fêmeas foi significativamente maior em comparação aos demais tratamentos nas cinco gerações avaliadas (Tabela VII.19). Estudos conduzidos por outros pesquisadores demonstraram que a Arcelina aumentou significativamente o período de desenvolvimento do inseto, reduziu o número e o peso dos adultos

emergidos, causando um efeito deletério na biologia do inseto (Cardona, 1994; Pereira et al., 1995; Lara, 1997; Barbosa et al., 2000a, 2000b; Mazzoneto & Vendramim, 2002).

A massa média das fêmeas no evento Embrapa 5.1 foi significativamente maior em comparação ao convencional na 2^a. geração e significativamente menor na 6^a. geração (Tabela VII.19). Para machos, a massa média foi significativamente maior no evento Embrapa 5.1 em comparação ao convencional na 2^a. e 4^a. gerações e menor na 1^a. e 5^a. gerações (Tabela VII.19). O Jalo Precoce e o Pérola diferiram significativamente em relação a massa média de machos e fêmeas na 2^a. geração e para machos na 6^a. e 7^a. gerações (Tabela VII.19). A partir da 2^a. geração, a massa média de fêmeas e machos criados nos grãos contendo Arcelina foi significativamente menor em comparação aos demais tratamentos, exceto na 3^a. geração para as fêmeas (Tabela VII.19).

A longevidade média das fêmeas foi significativamente maior no evento Embrapa 5.1 em comparação ao Olathe convencional e o Jalo Precoce somente na 7^a. geração (Tabela VII.19). No Olathe convencional a longevidade de fêmeas e machos foi significativamente maior quando comparada com o evento Embrapa 5.1 e o Pérola somente na 10^a. geração (Tabela VII.19). A longevidade de adultos no Jalo Precoce foi significativamente maior que o Pérola na 5^a., 6^a., 8^a., 9^a. e 10^a. gerações (Tabela VII.19) e vice versa na 7^a. geração (Tabela VII.19). A longevidade das fêmeas variou de 8,5 a 12,8 dias e para machos de 8,1 a 13,7 dias, resultados que foram semelhantes aos obtidos por Sari et al. (2003), Golob & Kilminster (1982), Marteleto et al. (2009), Mazzoneto & Vendramim (2002).

Diferenças significativas para a porcentagem de consumo dos grãos por larvas de *Z. subfasciatus* entre evento Embrapa 5.1 e convencional foi observada na 6^a. e 7^a. gerações, com maior consumo dos grãos do Olathe convencional (Tabela VII.20). Maior porcentagem de consumo dos grãos por larvas no Cv. Pérola em comparação ao Jalo Precoce foi observada na 1^a. e 6^a. gerações (Tabela VII.20). Embora a porcentagem de consumo dos grãos com arcelina pelas larvas tenha sido menor do que os outros tratamentos nas cinco gerações, diferença significativa entre a arcelina e os demais tratamentos foi observada somente na 4^a. geração (Tabela VII.20).



Conclusões

Pelos resultados obtidos pode-se concluir que o evento Embrapa 5.1 não interfere nos parâmetros de desenvolvimento biológico do *Z. subfasciatus*. Em 10 gerações foram observadas algumas diferenças significativas para os parâmetros avaliados entre o evento Embrapa 5.1 e o convencional, que hora favorecia o evento transgênico e outra hora favorecia o convencional.

Tabela VII.18. Efeito do feijoeiro Embrapa 5.1 geneticamente modificado e outros cultivares sobre parâmetros de desenvolvimento biológico de *Zabrotes subfasciatus*, caruncho do feijão.

Tratamento	Número de ovos ± DP ^a	Número de orifícios emergência ± DP ^a	Número médio ± DP ^a			Emergência de Adultos (%)	Razão sexual ± DP
			Fêmea	Macho	Total		
1ª Geração							
Embrapa 5.1	58,0 ± 9,9 a	52,8 ± 11,7 a	27,2 ± 6,6 a	27,6 ± 7,4 a	54,8 ± 11,4 a	94,0 ± 5,4 a	0,50 ± 0,07 a
Olathe Conv.	53,0 ± 11,3 a	44,8 ± 11,0 a	24,8 ± 5,6 a	23,6 ± 5,7 a	48,4 ± 11,0 a	91,0 ± 5,6 a	0,51 ± 0,03 a
Jalo Precoce	58,2 ± 12,8 a	42,2 ± 16,5 a	22,6 ± 8,7 a	22,4 ± 9,6 a	45,0 ± 17,8 a	75,4 ± 16,3 a	0,51 ± 0,05 a
Pérola	59,2 ± 8,7 a	47,2 ± 9,5 a	30,2 ± 6,1 a	25,6 ± 6,9 a	55,8 ± 12,4 a	93,6 ± 9,9 a	0,54 ± 0,04 a
Arcelina	66,4 ± 15,5 a	38,8 ± 6,4 a	23,8 ± 2,3 a	28,4 ± 3,8 a	52,2 ± 4,1 a	81,1 ± 13,5 a	0,46 ± 0,04 a
2ª Geração							
Embrapa 5.1	107,0 ± 15,4 ab	100,2 ± 14,9 ab	50,8 ± 4,1 ab	50,2 ± 10,7 a	101,0 ± 13,3 ab	94,6 ± 5,0 a	0,50 ± 0,04 a
Olathe Conv.	87,6 ± 9,5 bc	79,0 ± 10,2 b	38,8 ± 7,4 b	47,2 ± 2,9 a	86,0 ± 9,3 b	98,2 ± 0,6 a	0,44 ± 0,04 a
Jalo Precoce	126,2 ± 14,5 a	116,4 ± 17,2 a	58,2 ± 8,0 a	58,4 ± 5,8 a	116,6 ± 9,1 a	92,8 ± 6,0 a	0,50 ± 0,04 a
Pérola	102,0 ± 6,4 abc	94,0 ± 6,7 ab	48,2 ± 6,3 ab	52,2 ± 8,0 a	100,4 ± 9,9 ab	98,4 ± 6,8 a	0,48 ± 0,05 a
Arcelina	76,8 ± 21,4 c	49,2 ± 13,2 c	24,4 ± 7,0 c	25,4 ± 7,6 b	49,8 ± 14,2 c	64,6 ± 3,4 b	0,50 ± 0,03 a
3ª Geração							
Embrapa 5.1	101,2 ± 14,9 ab	91,2 ± 12,7 a	49,0 ± 6,0 a	49,6 ± 10,7 ab	98,6 ± 14,3 a	97,5 ± 3,3 a	0,50 ± 0,05 a
Olathe Conv.	65,0 ± 7,9 c	56,8 ± 9,8 b	29,0 ± 2,9 b	35,0 ± 5,7 b	64,0 ± 7,5 b	98,5 ± 1,0 a	0,45 ± 0,03 a
Jalo Precoce	121,2 ± 14,9 a	105,6 ± 11,1 a	51,6 ± 4,5 a	57,4 ± 6,4 a	109,0 ± 8,6 a	90,4 ± 6,1 a	0,47 ± 0,03 a
Pérola	123,8 ± 18,0 a	91,4 ± 20,3 a	57,6 ± 12,3 a	55,8 ± 6,0 a	113,4 ± 15,5 a	91,8 ± 6,1 a	0,50 ± 0,04 a
Arcelina	76,0 ± 28,4 bc	33,4 ± 16,0 c	19,6 ± 5,2 b	18,6 ± 9,6 c	38,2 ± 14,2 c	50,4 ± 6,6 b	0,53 ± 0,08 a
4ª Geração							
Embrapa 5.1	94,8 ± 15,2 ab	80,6 ± 12,2 a	37,8 ± 5,8 b	38,0 ± 3,4 b	75,8 ± 8,9 b	80,6 ± 8,1 b	0,50 ± 0,02 b
Olathe Conv.	92,4 ± 13,2 ab	77,0 ± 13,7 a	43,6 ± 7,7 ab	46,0 ± 7,9 ab	89,6 ± 15,0 ab	96,7 ± 5,1 a	0,48 ± 0,02 b
Jalo Precoce	111,6 ± 3,8 a	101,0 ± 5,5 a	46,2 ± 3,3 b	55,4 ± 4,0 a	101,6 ± 1,3 a	91,9 ± 2,2 a	0,45 ± 0,03 b
Pérola	113,6 ± 12,2 a	104,0 ± 10,8 a	50,4 ± 3,1 a	55,4 ± 8,9 a	105,8 ± 9,6 a	93,3 ± 2,1 a	0,48 ± 0,04 b
Arcelina	71,8 ± 20,6 b	34,2 ± 16,4 b	15,2 ± 5,5 c	12,0 ± 5,2 c	27,2 ± 10,5 c	36,9 ± 6,8 c	0,57 ± 0,60 a
5ª Geração							
Embrapa 5.1	82,0 ± 13,7 a	70,8 ± 9,5 ab	37,4 ± 8,3 ab	31,4 ± 6,9 bc	68,8 ± 14,6 ab	83,6 ± 9,0 a	0,54 ± 0,03 a
Olathe Conv.	77,6 ± 22,0 a	67,6 ± 22,5 ab	33,0 ± 12,8 ab	36,0 ± 14,5 abc	69,0 ± 25,4 ab	86,9 ± 10,2 a	0,48 ± 0,06 ab
Jalo Precoce	109,6 ± 17,4 a	96,2 ± 13,2 a	45,4 ± 5,8 a	51,8 ± 8,5 a	97,2 ± 12,8 a	89,1 ± 5,1 a	0,47 ± 0,03 ab

Continua na próxima página

Continuação da Tabela VII.18

Tratamento	Número de ovos ± DP ^a	Número de orifícios emergência ± DP ^a	Número médio ± DP ^a			Emergência de Adultos (%)	Razão sexual ± DP
			Fêmea	Macho	Total		
Pérola	104,2 ± 21,0 a	92,4 ± 21,2 a	41,8 ± 11,1 a	49,6 ± 10,2 ab	91,4 ± 20,4 a	87,4 ± 2,7 a	0,45 ± 0,04 b
Arcelina	91,0 ± 9,9 a	36,5 ± 0,7 b	17,0 ± 0,0 b	18,0 ± 4,2 c	35,0 ± 4,2 b	38,4 ± 0,5 b	0,49 ± 0,06 ab
6 ^a Geração							
Embrapa 5.1	86,4 ± 19,0 a	60,0 ± 13,6 b	33,8 ± 8,9 a	30,8 ± 5,9 b	64,6 ± 14,2 b	76,4 ± 15,5 a	0,52 ± 0,04 a
Olathe Conv.	95,0 ± 17,4 a	87,0 ± 19,6 a	44,4 ± 11,9 a	43,2 ± 16,3 ab	87,6 ± 27,7 ab	90,8 ± 11,9 a	0,51 ± 0,04 a
Jalo Precoce	83,8 ± 10,8 a	77,6 ± 9,6 ab	35,4 ± 8,8 a	39,6 ± 4,5 ab	75,0 ± 7,4 ab	89,9 ± 7,3 a	0,47 ± 0,08 a
Pérola	103,0 ± 15,4 a	94,8 ± 9,5 a	47,8 ± 3,8 a	49,4 ± 9,6 a	97,2 ± 8,7 a	95,0 ± 6,2 a	0,49 ± 0,06 a
7 ^a Geração							
Embrapa 5.1	82,4 ± 13,5 a	45,0 ± 14,8 b	22,0 ± 6,7 b	28,0 ± 11,1 b	50,0 ± 17,1 b	60,3 ± 16,2 c	0,44 ± 0,05 ab
Olathe Conv.	84,6 ± 9,9 a	64,8 ± 12,5 ab	30,2 ± 10,3 ab	41,2 ± 4,4 ab	71,4 ± 12,5 ab	84,0 ± 6,0 ab	0,41 ± 0,07 b
Jalo Precoce	92,8 ± 14,2 a	87,6 ± 12,8 a	41,8 ± 7,4 a	48,6 ± 6,5 a	90,4 ± 13,1 a	97,5 ± 1,7 a	0,46 ± 0,02 ab
Pérola	83,8 ± 20,8 a	60,8 ± 20,5 ab	32,0 ± 10,1 ab	30,0 ± 12,1 b	62,0 ± 21,6 b	72,4 ± 11,1 bc	0,52 ± 0,07 a
8 ^a Geração							
Embrapa 5.1	105,4 ± 18,9 ab	75,8 ± 17,5 ab	37,2 ± 11,9 ab	40,8 ± 9,6 b	78,0 ± 19,6 ab	73,2 ± 6,6 ab	0,47 ± 0,05 a
Olathe Conv.	125,8 ± 14,7 a	96,8 ± 10,8 a	48,2 ± 8,7 a	56,4 ± 6,8 a	104,6 ± 13,9 a	83,3 ± 8,3 a	0,46 ± 0,03 a
Jalo Precoce	89,2 ± 22,9 b	68,8 ± 17,3 ab	32,2 ± 8,7 ab	39,2 ± 9,7 b	71,4 ± 18,0 b	80,2 ± 6,3 a	0,45 ± 0,03 a
Pérola	94,6 ± 17,3 ab	55,8 ± 13,6 b	27,0 ± 9,1 b	32,8 ± 7,1 b	59,8 ± 13,5 b	63,4 ± 10,4 b	0,44 ± 0,07 a
9 ^a Geração							
Embrapa 5.1	108,2 ± 22,4 ab	85,0 ± 20,1 ab	39,8 ± 9,1 ab	51,0 ± 13,2 ab	90,8 ± 21,9 ab	83,6 ± 5,7 ab	0,44 ± 0,03 a
Olathe Conv.	93,2 ± 11,5 ab	71,6 ± 13,1 b	35,8 ± 8,0 b	38,2 ± 8,8 b	74,0 ± 12,8 b	79,1 ± 7,3 b	0,48 ± 0,07 a
Jalo Precoce	121,6 ± 22,9 b	108,4 ± 21,5 a	51,0 ± 5,2 a	60,4 ± 15,1 a	111,4 ± 19,5 a	91,8 ± 6,0 a	0,46 ± 0,04 a
Pérola	79,0 ± 9,2 b	63,4 ± 9,8 b	31,4 ± 2,3 b	37,2 ± 6,9 b	68,6 ± 8,2 b	87,0 ± 6,2 ab	0,46 ± 0,05 a
10 ^a Geração							
Embrapa 5.1	110,4 ± 10,4 ab	73,2 ± 11,0 a	47,0 ± 8,7 a	49,8 ± 7,6 a	96,8 ± 14,5 a	87,3 ± 5,7 a	0,48 ± 0,04 a
Olathe Conv.	83,2 ± 21,4 a	62,2 ± 11,5 a	32,8 ± 9,1 a	36,2 ± 8,7 ab	69,0 ± 16,3 ab	83,5 ± 4,8 a	0,47 ± 0,05 a
Jalo Precoce	75,8 ± 20,3 b	63,2 ± 15,9 a	32,4 ± 9,8 a	33,2 ± 8,9 b	65,6 ± 17,7 b	86,5 ± 2,2 a	0,49 ± 0,04 a
Pérola	91,4 ± 11,9 ab	58,6 ± 10,0 a	31,8 ± 8,3 a	30,4 ± 6,0 b	62,2 ± 13,3 b	67,9 ± 9,8 b	0,51 ± 0,04 a

^a Médias seguidas da mesma letra na coluna por geração não diferem entre si pelo teste de "Tukey" a 5%.

Tabela VII.19. Efeito do feijoeiro Embrapa 5.1 geneticamente modificado e outros cultivares sobre o período de desenvolvimento médio (ovo a adulto), massa média (mg) e longevidade média de machos e fêmeas de *Zabrotes subfasciatus*, caruncho do feijão.

Tratamento	Desenvolvimento médio (Dias ± DP) ^a			Massa média (mg ± DP) ^a			Longevidade media (Dias ± DP)		
				Fêmea	Macho	Média	Fêmea	Macho	Média
	Fêmea	Macho	Média						
1ª Geração									
Embrapa 5.1	33,6 ± 0,2 b	33,6 ± 0,2 b	33,6 ± 0,2 b	7,0 ± 0,3 ab	4,7 ± 0,2 b	5,8 ± 0,23 b	12,2 ± 0,18 a	13,3 ± 0,28 a	12,7 ± 0,16 a
Olathe Conv.	33,5 ± 0,1 b	33,6 ± 0,0 b	33,5 ± 0,1 b	7,4 ± 0,5 a	5,0 ± 0,1 a	6,2 ± 0,24 a	12,2 ± 0,24 a	13,5 ± 0,45 a	12,8 ± 0,28 a
Jalo Precoce	33,6 ± 0,3 b	33,4 ± 0,1 b	33,5 ± 0,1 b	6,9 ± 0,2 ab	4,9 ± 0,8 ab	5,9 ± 0,09 ab	12,4 ± 0,43 a	13,7 ± 0,48 a	13,1 ± 0,34 a
Pérola	33,7 ± 0,8 b	33,8 ± 0,1 b	33,7 ± 0,1 b	6,7 ± 0,3 b	5,0 ± 0,2 ab	5,8 ± 0,21 ab	12,1 ± 0,17 a	13,5 ± 0,29 a	12,8 ± 0,22 a
Arcelina	49,7 ± 0,2 a	49,6 ± 0,6 a	49,6 ± 0,6 a	7,2 ± 0,4 ab	4,9 ± 0,2 ab	6,0 ± 0,22 ab	12,5 ± 0,11 a	13,7 ± 0,48 a	13,0 ± 0,44 a
2ª Geração									
Embrapa 5.1	32,0 ± 0,4 b	32,2 ± 0,5 b	32,1 ± 0,3 b	6,8 ± 0,3 ab	4,6 ± 0,1 ab	5,7 ± 0,15 b	11,1 ± 0,12 a	11,7 ± 0,46 ab	11,4 ± 0,25 a
Olathe Conv.	31,9 ± 0,2 b	32,1 ± 0,1 b	32,0 ± 0,1 b	6,1 ± 0,4 c	4,0 ± 0,08 c	5,0 ± 0,20 c	11,2 ± 0,28 a	11,5 ± 0,08 ab	11,3 ± 0,12 a
Jalo Precoce	31,2 ± 0,2 b	31,3 ± 0,1 b	31,3 ± 0,2 b	7,4 ± 0,3 a	5,0 ± 0,2 a	6,1 ± 0,11 a	11,4 ± 0,34 a	11,5 ± 0,21 ab	11,4 ± 0,34 a
Pérola	32,0 ± 0,2 b	31,9 ± 0,1 b	31,9 ± 0,1 b	6,6 ± 0,1 bc	4,3 ± 0,2 b	5,5 ± 0,08 b	11,1 ± 0,26 a	12,0 ± 0,36 a	11,6 ± 0,12 a
Arcelina	45,8 ± 2,9 a	45,1 ± 1,2 a	45,5 ± 2,0 a	4,6 ± 0,3 d	3,5 ± 0,1 d	4,0 ± 0,24 d	10,6 ± 0,18 b	11,2 ± 0,21 b	10,9 ± 0,17 b
3ª Geração									
Embrapa 5.1	32,4 ± 0,2 b	32,4 ± 0,2 b	32,4 ± 0,2 b	5,6 ± 2,7 a	4,8 ± 0,08 a	5,2 ± 1,37 a	11,9 ± 0,28 a	12,2 ± 0,18 a	12,1 ± 0,21 a
Olathe Conv.	32,1 ± 0,1 b	32,3 ± 0,3 b	32,2 ± 0,2 b	6,7 ± 0,1 a	4,7 ± 0,1 a	5,7 ± 0,11 a	12,1 ± 0,29 a	12,3 ± 0,40 a	12,2 ± 0,33 a
Jalo Precoce	31,8 ± 0,1 b	31,8 ± 0,1 b	31,8 ± 0,1 b	6,9 ± 0,2 a	5,0 ± 0,1 a	5,9 ± 0,12 a	11,8 ± 0,27a	12,0 ± 0,30 a	11,9 ± 0,22 a
Pérola	32,4 ± 0,2 b	32,2 ± 0,2 b	32,3 ± 0,1 b	6,6 ± 0,2 a	4,7 ± 0,2 a	5,6 ± 0,16 a	12,0 ± 0,28 a	12,7 ± 0,68 a	12,3 ± 0,45 a
Arcelina	48,0 ± 1,3 a	47,6 ± 0,1 a	47,8 ± 1,3 a	4,8 ± 0,1 a	3,4 ± 0,2 b	4,1 ± 0,15 a	10,9 ± 0,87 b	11,0 ± 0,75 b	10,9 ± 0,79 b
4ª Geração									
Embrapa 5.1	31,4 ± 0,3 b	31,1 ± 0,4 b	31,3 ± 0,3 b	6,4 ± 0,2 c	4,5 ± 0,05 b	5,5 ± 0,09 b	8,8 ± 0,19 b	9,9 ± 0,51 ab	9,4 ± 0,30 ab
Olathe Conv.	31,7 ± 0,7 b	31,7 ± 0,6 b	31,7 ± 0,6 b	6,5 ± 0,2 bc	4,1 ± 0,09 c	5,3 ± 0,12 c	9,4 ± 0,52 ab	10,7 ± 0,37 a	10,1 ± 0,29 a
Jalo Precoce	30,2 ± 0,1 b	30,1 ± 0,2 b	30,1 ± 0,1 b	7,0 ± 0,1 a	4,8 ± 0,1 a	5,9 ± 0,11 a	8,5 ± 0,54 b	8,6 ± 0,29 c	8,5 ± 0,31 c
Pérola	31,5 ± 0,3 b	31,2 ± 0,2 b	31,3 ± 0,2 b	6,8 ± 0,2 ab	4,6 ± 0,1 ab	5,7 ± 0,13 a	8,8 ± 0,41 b	9,3 ± 0,29 bc	9,0 ± 0,22 bc
Arcelina	46,8 ± 2,2 a	46,7 ± 3,1 a	46,7 ± 2,5 a	4,7 ± 0,1 d	3,5 ± 0,2 d	4,1 ± 0,09 d	9,8 ± 0,74 a	10,0 ± 0,71 ab	9,9 ± 0,68 a

Continua na próxima página

Continuação da Tabela VII.19

Tratamento	Desenvolvimento médio (Dias ± DP) ^a				Massa média (mg ± DP) ^a			Longevidade média (Dias ± DP)		
	Fêmea		Macho		Média	Fêmea	Macho	Média		
	Fêmea	Macho	Média							
5ª Geração										
Embrapa 5.1	33,6 ± 0,3 b	33,4 ± 0,5 b	33,5 ± 0,4 b	6,0 ± 0,1 b	3,8 ± 0,3 c	4,9 ± 0,13 c	10,4 ± 0,52 bc	10,6 ± 0,69 a	10,5 ± 0,56 ab	
Olathe Conv.	33,6 ± 0,4 b	33,6 ± 0,4 b	33,6 ± 0,4 b	6,4 ± 0,07 b	4,3 ± 0,1 b	5,3 ± 0,06 b	11,3 ± 0,23 ab	11,1 ± 0,27 a	11,2 ± 0,11 ab	
Jalo Precoce	32,8 ± 0,3 b	32,7 ± 0,4 b	32,7 ± 0,3 b	7,1 ± 0,2 a	4,7 ± 0,2 a	5,9 ± 0,13 a	11,4 ± 0,47 a	11,6 ± 0,71 a	11,5 ± 0,33 a	
Pérola	33,5 ± 0,3 b	33,4 ± 0,3 b	33,4 ± 0,3 b	6,9 ± 0,3 a	4,5 ± 0,2 ab	5,7 ± 0,24 ab	10,3 ± 0,51 c	10,4 ± 0,39 a	10,3 ± 0,38 b	
Arcelina	48,4 ± 0,7 a	48,4 ± 2,3 a	48,4 ± 1,5 a	4,8 ± 0,07 c	3,3 ± 0,07 c	4,0 ± 0,07 d	10,3 ± 0,92 abc	10,0 ± 2,4 a	10,2 ± 1,66 ab	
6ª Geração										
Embrapa 5.1	33,3 ± 0,1 ab		33,0 ± 0,4 ab	31,2 ± 0,3 ab	6,5 ± 0,2 b	4,6 ± 0,2 a	5,6 ± 0,11 b	11,1 ± 0,45 a	10,8 ± 0,30 ab	10,9 ± 0,20 a
Olathe Conv.	32,6 ± 0,9 bc		32,5 ± 0,9 bc	32,6 ± 0,9 bc	6,9 ± 0,1 a	4,8 ± 0,07 a	5,8 ± 0,07 a	12,8 ± 0,33 ab	11,0 ± 0,19 ab	10,9 ± 0,15 a
Jalo Precoce	31,7 ± 0,3 c		31,7 ± 0,4 c	31,7 ± 0,3 c	7,0 ± 0,09 a	4,7 ± 0,1 a	5,9 ± 0,12 a	10,9 ± 0,31 a	11,1 ± 0,40 a	11,0 ± 0,30 a
Pérola	34,0 ± 0,8 a		33,7 ± 0,7 a	33,9 ± 0,7 a	6,7 ± 0,2 ab	4,4 ± 0,2 b	5,6 ± 0,28 b	10,22 ± 0,19 b	10,6 ± 0,26 b	10,4 ± 0,22 b
7ª Geração										
Embrapa 5.1	34,7 ± 1,0 a	35,2 ± 0,8 a	35,0 ± 0,8 a	6,4 ± 0,2 a	4,4 ± 0,1 b	5,4 ± 0,07 a	10,2 ± 0,34 a	10,4 ± 0,37 ab	10,3 ± 0,26 a	
Olathe Conv.	32,6 ± 0,5 b	32,7 ± 0,3 b	32,7 ± 0,3 b	6,6 ± 0,08 a	4,3 ± 0,08 b	5,4 ± 0,05 a	9,3 ± 0,16 b	11,0 ± 0,41 a	10,2 ± 0,17 ab	
Jalo Precoce	31,9 ± 0,5 b	31,8 ± 0,5 b	31,9 ± 0,4 b	7,2 ± 0,3 a	5,0 ± 0,2 a	6,1 ± 0,23 a	9,5 ± 0,23 b	10,2 ± 0,14 b	9,8 ± 0,15 b	
Pérola	35,2 ± 0,2 a	34,7 ± 0,6 a	34,9 ± 0,4 a	6,7 ± 0,01 a	4,5 ± 0,1 b	5,6 ± 0,11 a	10,5 ± 0,33 a	9,9 ± 0,45 b	10,2 ± 0,19 ab	

Continua na próxima página

Continuação da Tabela VII.19

Tratamento	Desenvolvimento médio (Dias ± DP) ^a			Massa média (mg ± DP) ^a			Longevidade média (Dias ± DP)		
				Fêmea	Macho	Média	Fêmea	Macho	Média
	Fêmea	Macho	Média						
8ª Geração									
Embrapa 5.1	34,1 ± 1,5 ab	34,0 ± 1,4 b	34,0 ± 1,4 b	6,3 ± 0,2 b	4,3 ± 0,2 a	5,3 ± 0,16 b	10,0 ± 0,47 a	9,8 ± 0,54 b	9,9 ± 0,47 b
Olathe Conv.	32,7 ± 0,6 b	32,6 ± 0,5 c	32,6 ± 0,5 c	6,6 ± 0,08 ab	4,3 ± 0,1 a	5,5 ± 0,06 ab	10,3 ± 0,37 a	10,4 ± 0,26 ab	10,3 ± 0,30 ab
Jalo Precoce	33,5 ± 0,3 b	33,6 ± 0,2 bc	33,5 ± 0,2 bc	6,8 ± 0,5 ab	4,4 ± 0,1 a	5,6 ± 0,27 ab	10,6 ± 0,24 a	10,6 ± 0,32 a	10,6 ± 0,20 a
Pérola	35,5 ± 0,1 a	35,6 ± 0,3 a	35,5 ± 0,1 a	7,0 ± 0,2 a	4,5 ± 0,1 a	5,7 ± 0,13 a	8,6 ± 0,35 b	8,1 ± 0,22 c	8,4 ± 0,27 c
9ª Geração									
Embrapa 5.1	33,8 ± 0,6 a	33,9 ± 0,4 a	33,9 ± 0,5 a	6,4 ± 0,1 ab	4,2 ± 0,1 a	5,3 ± 0,09 a	11,2 ± 0,48 a	11,3 ± 0,47 ab	11,2 ± 0,46 a
Olathe Conv.	33,2 ± 0,8 a	33,0 ± 0,4 b	33,1 ± 0,6 a	6,6 ± 0,08 a	4,3 ± 0,05 a	5,5 ± 0,03 a	11,1 ± 0,12 a	12,0 ± 0,29 a	11,5 ± 0,18 a
Jalo Precoce	31,0 ± 0,4 b	30,8 ± 0,4 c	30,9 ± 0,4 b	6,2 ± 0,1 b	4,3 ± 0,2 a	5,3 ± 0,13 a	10,7 ± 0,32 a	11,2 ± 0,24 bc	10,9 ± 0,22 a
Pérola	33,7 ± 0,6 a	33,8 ± 0,6 ab	33,8 ± 0,6 a	6,4 ± 0,2 ab	4,3 ± 0,2 a	5,4 ± 0,17 a	9,9 ± 0,57 b	10,7 ± 0,32 c	10,3 ± 0,41 b
10ª Geração									
Embrapa 5.1	32,4 ± 1,2 b	32,2 ± 1,0 b	32,3 ± 1,1 b	6,4 ± 0,1 a	4,3 ± 0,1 a	5,4 ± 0,07 a	10,2 ± 0,34 b	10,6 ± 0,77 b	10,4 ± 0,53 b
Olathe Conv.	32,1 ± 0,6 b	31,9 ± 0,8 b	32,0 ± 0,7 b	6,5 ± 0,2 a	4,4 ± 0,1 a	5,5 ± 0,15 a	11,5 ± 0,30 a	11,7 ± 0,32 a	11,6 ± 0,25 a
Jalo Precoce	32,1 ± 0,7 b	32,1 ± 0,6 b	32,0 ± 0,6 b	6,4 ± 0,1 a	4,3 ± 0,08 a	5,4 ± 0,09 a	11,1 ± 0,30 a	11,5 ± 0,22 a	11,3 ± 0,18 a
Pérola	34,5 ± 1,2 a	34,1 ± 1,3 a	34,3 ± 1,3 a	6,6 ± 0,1 a	4,4 ± 0,1 a	5,5 ± 0,03 a	10,3 ± 0,42 b	10,2 ± 0,35 b	10,3 ± 0,35 b

^a Médias seguidas da mesma letra na coluna por geração não diferem entre si pelo teste “Tukey” a 5%

Tabela VII.20. Massa média inicial e final dos grãos, consumo dos grãos e porcentagem de consumo dos grãos do feijoeiro Embrapa 5.1 geneticamente modificado e outros cultivares por *Zabrotes subfasciatus*, caruncho do feijão.

Tratamento	Massa média dos Grãos ^a		Consumo ^a (g)	% Consumo ^a
	Inicial	Final		
1ª. Geração				
Embrapa 5.1	3,4 ± 0,1 b	2,9 ± 0,2 b	0,5 ± 0,1 a	15,6 ± 4,4 ab
Olathe Conv.	3,9 ± 0,2 a	3,5 ± 0,3 a	0,4 ± 0,1 ab	11,0 ± 2,9 abc
Jalo Precoce	3,2 ± 0,1 b	3,0 ± 0,2 b	0,3 ± 0,2 b	8,9 ± 5,2 bc
Pérola	3,2 ± 0,1 b	2,6 ± 0,1 b	0,6 ± 0,1 a	17,9 ± 3,9 a
Arcelina	3,8 ± 0,1 b	3,5 ± 0,1 a	0,3 ± 0,0 b	7,0 ± 1,6 c
2ª. Geração				
Embrapa 5.1	3,3 ± 0,1 a	2,3 ± 0,2 b	1,0 ± 0,2 ab	29,4 ± 6,0 bc
Olathe Conv.	3,5 ± 0,1 a	2,7 ± 0,1 a	0,8 ± 0,1 bc	21,8 ± 3,7 cd
Jalo Precoce	3,0 ± 0,1 b	1,7 ± 0,2 b	1,2 ± 0,2 a	41,1 ± 6,2 a
Pérola	2,6 ± 0,1 c	1,6 ± 0,1 c	1,0 ± 0,1 ab	38,3 ± 4,2 ab
Arcelina	2,9 ± 0,2 b	2,4 ± 0,2 ab	0,5 ± 0,1 c	17,6 ± 4,3 d
3ª. Geração				
Embrapa 5.1	3,9 ± 0,0 a	3,0 ± 0,1 a	0,9 ± 0,1 a	23,2 ± 3,9 ab
Olathe Conv.	3,6 ± 0,0 b	3,2 ± 0,1 a	0,5 ± 0,1 b	13,3 ± 3,0 b
Jalo Precoce	3,2 ± 0,0 a	2,3 ± 0,4 a	0,9 ± 0,3 a	29,2 ± 11,2 a
Pérola	2,9 ± 0,1 d	1,8 ± 0,2 c	1,0 ± 0,2 a	36,0 ± 6,9 a
Arcelina	2,8 ± 0,0 d	2,5 ± 0,2 b	0,4 ± 0,2 b	13,1 ± 6,3 b
4ª. Geração				
Embrapa 5.1	3,5 ± 0,0 a	2,6 ± 0,1 a	0,9 ± 0,1 b	25,1 ± 4,1 c
Olathe Conv.	3,4 ± 0,0 a	2,5 ± 0,2 a	0,9 ± 0,2 ab	25,9 ± 5,0 bc
Jalo Precoce	3,4 ± 0,1 a	2,3 ± 0,1 b	1,1 ± 0,1 a	32,8 ± 3,2 ab
Pérola	2,9 ± 0,0 c	1,8 ± 0,1 c	1,1 ± 0,1 a	39,0 ± 3,3 a
Arcelina	3,0 ± 0,0 b	2,8 ± 0,1 a	0,2 ± 0,1 c	8,5 ± 4,0 d
5ª. Geração				
Embrapa 5.1	3,2 ± 0,0 b	2,6 ± 0,1 a	0,7 ± 0,1 ab	21,1 ± 4,5 ab
Olathe Conv.	3,2 ± 0,0 b	2,6 ± 0,2 a	0,7 ± 0,2 ab	20,7 ± 7,4 ab
Jalo Precoce	3,5 ± 0,0 a	2,6 ± 0,1 a	0,9 ± 0,1 a	25,9 ± 3,9 a
Pérola	2,8 ± 0,0 d	1,9 ± 0,2 b	0,9 ± 0,2 a	31,1 ± 8,1 a
Arcelina	3,1 ± 0,1 c	2,9 ± 0,1 a	0,2 ± 0,0 b	6,9 ± 0,4 b
6ª. Geração				
Embrapa 5.1	3,4 ± 0,1 a	3,0 ± 0,2 a	0,4 ± 0,1 b	12,2 ± 4,5 c
Olathe Conv.	3,4 ± 0,0 a	2,6 ± 0,3 b	0,8 ± 0,3 a	23,1 ± 8,7 ab
Jalo Precoce	3,1 ± 0,0 b	2,5 ± 0,1 b	0,6 ± 0,1 ab	19,2 ± 3,2 bc
Pérola	2,7 ± 0,1 c	1,9 ± 0,1 c	0,8 ± 0,1 a	29,5 ± 4,3 a
7ª. Geração				
Embrapa 5.1	3,1 ± 0,2 b	2,9 ± 0,3 a	0,2 ± 0,1 c	7,4 ± 4,6 b
Olathe Conv.	3,1 ± 0,3 b	2,5 ± 0,4 ab	0,5 ± 0,1 ab	16,8 ± 5,9 a
Jalo Precoce	3,5 ± 0,2 a	2,7 ± 0,2 a	0,8 ± 0,1 a	21,8 ± 3,6 a
Pérola	2,6 ± 0,1 c	2,2 ± 0,1 b	0,4 ± 0,2 bc	15,5 ± 5,9 ab
8ª. Geração				
Embrapa 5.1	3,4 ± 0,0 a	2,9 ± 0,2 a	0,5 ± 0,1 ab	16,0 ± 4,7 ab
Olathe Conv.	3,4 ± 0,0 a	2,6 ± 0,1 b	0,8 ± 0,1 a	23,7 ± 4,1 a
Jalo Precoce	3,2 ± 0,1 b	2,6 ± 0,2 b	0,6 ± 0,2 ab	18,3 ± 6,4 ab
Pérola	2,8 ± 0,1 c	2,4 ± 0,1 b	0,3 ± 0,1 b	11,9 ± 3,9 b

Continua na próxima página

Continuação da Tabela VII.20

Tratamento	Massa média dos Grãos ^a		Consumo ^a (g)	% Consumo ^a
	Inicial	Final		
9ª. Geração				
Embrapa 5.1	3,6 ± 0,1 a	2,9 ± 0,2 a	0,7 ± 0,2 ab	19,8 ± 5,2 b
Olathe Conv.	3,4 ± 0,1 b	2,8 ± 0,1 a	0,6 ± 0,1 b	18,0 ± 3,4 b
Jalo Precoce	3,2 ± 0,0 c	2,2 ± 0,2 b	0,9 ± 0,2 a	29,3 ± 6,0 a
Pérola	2,7 ± 0,1 d	2,1 ± 0,1 b	0,6 ± 0,1 b	21,9 ± 3,4 ab
10ª. Geração				
Embrapa 5.1	3,6 ± 0,1 a	2,7 ± 0,1 a	0,9 ± 0,1 a	24,7 ± 3,1 a
Olathe Conv.	3,4 ± 0,1 ab	2,7 ± 0,1 a	0,7 ± 0,2 ab	19,8 ± 4,5 a
Jalo Precoce	3,3 ± 0,1 b	2,7 ± 0,2 a	0,5 ± 0,2 b	16,4 ± 4,9 a
Pérola	2,6 ± 0,2 c	2,0 ± 0,3 b	0,6 ± 0,1 b	21,8 ± 5,7 a

^a Médias seguidas da mesma letra na coluna por geração não diferem entre si pelo teste de “Tukey” a 5%.

Análise quantitativa e qualitativa da macro e mesofauna do solo sob influência do feijoeiro Embrapa 5.1

As abundâncias das comunidades da macro e mesofauna do solo foram avaliadas somente nos ensaios realizados por dois anos em condições de campo, em Londrina, Sete Lagoas e Santo Antônio de Goiás. No primeiro ano, em 2008, a abundância da macrofauna foi muito variável entre as localidades, com o menor valor encontrado em Sete Lagoas (306 indivíduos.m⁻²). Em Londrina, foram encontrados cerca de 820 ind/m², e pouco mais de 3000 ind/m² em Santo Antônio de Goiás (Tabela VII.21). Nos experimentos de 2009, a abundância da macrofauna foi menos contrastante entre localidades. Considerando-se que a condução dos experimentos foi relativamente semelhante, esta diferença é certamente resultante de aspectos regionais, tais como clima e características do solo, além de possíveis efeitos de vizinhança de outros sistemas agrícolas, que permitem uma maior ou menor colonização pela macrofauna do solo. Sileshi & Mafongoya (2006) estudando as variações temporais da atividade da fauna do solo em relação às diferentes categorias de uso da terra observaram que os diferentes manejos podem afetar significativamente a incidência e abundância da macrofauna do solo, especialmente minhocas, centopéias e lacraias. Ressaltam ainda que fatores como microclima, baixo teor de água no solo, temperatura do solo elevada e

radiação incidente são provavelmente desfavoráveis para esses invertebrados do solo em áreas sob monocultivo.

Para a mesofauna, constituída principalmente por colêmbolos e ácaros do solo, foi observada diferença significativa de densidade entre as três localidades de estudo no segundo ano. No entanto, os dados foram menos discrepantes entre localidades do que o observado para macrofauna. Uma possível explicação para esse fato é a maior habilidade de colonização dos grupos da mesofauna quando comparados aos da macrofauna, uma vez que suas atividades tróficas incluem tanto o consumo de microrganismos e da microfauna, como a fragmentação de material vegetal em decomposição (Correia & Andrade, 2008).

Em relação à comparação das densidades sob cultivo do feijoeiro convencional e transgênico Embrapa 5.1 somente foi observada diferença significativa para a mesofauna do solo, no experimento realizado em Sete Lagoas (MG), onde o solo sob cultivo com feijoeiro convencional teve densidades superiores às encontradas no solo cultivado com feijoeiro transgênico (Tabela VII.21).

O número médio de unidades taxonômicas por amostra ou riqueza média de grupos apresentou variação significativa em função da localidade, tanto para a macrofauna quanto para a mesofauna do solo. No caso da macrofauna, observa-se que a riqueza seguiu a mesma tendência da densidade total, onde St^o. Antônio de Goiás apresentou não só a comunidade mais abundante, mas também com maior número de diferentes grupos, seguida por Londrina e por fim, Sete Lagoas (Tabela VII.22). Para a mesofauna, no entanto, no experimento de Londrina foi verificada uma comunidade mais rica, do que as duas outras localidades, que não se diferenciaram (Tabela VII.22). Para esta variável não foi observada diferença significativa entre os solos cultivados com feijoeiro convencional e transgênico Embrapa 5.1 tanto para macrofauna quanto para mesofauna do solo em nenhuma das três localidades.

Tabela VII.21. Comparação entre as médias de densidade total da macrofauna e mesofauna (indivíduos.m⁻²) do solo cultivado com feijoeiro Olathe (FC) e Embrapa 5.1 (FGM).

Local	Macrofauna do solo			Mesofauna do Solo		
	FC	FGM	MGL	FC	FGM	MGL
2008						
Stº. Antônio de Goiás	2542 aA	3570 aA	3056 A	1503 aB	1576 aA	1539 A
Sete Lagoas	434 aB	306 aB	370 C	2859 aA	1227 bA	2043 A
Londrina	782 aA	858 aA	820 B	1462 aB	1105 aA	1283 A
MGF	1253 a	1578 a		1942 a	1302 a	
2009						
Stº. Antônio de Goiás	348 aA	230 aB	288 A	577 aA	382 aB	479 B
Sete Lagoas	462 aA	356 aB	408 A	1267 aA	1714 aA	1490 A
Londrina	504 aA	838 aA	671 A	723 aA	942 aB	832 B
MGF	438 a	474 a		855 a	1012 a	

Médias seguidas de letras iguais, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. MGL: média geral por local proveniente de 16 dados; MGF: média geral por tipo de feijoeiro proveniente de 24 dados.

Tabela VII.22. Comparação entre as médias de riqueza (número de grupos taxonômicos) da macrofauna e mesofauna do solo cultivado com feijoeiro Olathe (FC) e evento Embrapa 5.1 (FGM).

Local	Macrofauna do solo			Mesofauna do Solo		
	FC	FGM	MGL	FC	FGM	MGL
2008						
Sto. Antônio de Goiás	8,75 aA	7,63 aA	8,19 A	3,75 aB	3,00 aB	3,38 B
Sete Lagoas	3,50 aB	3,13 aB	3,31 C	2,88 aB	2,13 aB	2,50 B
Londrina	7,13 aA	6,50 aA	6,81 B	4,75 aA	4,38 aA	4,56 A
MGF	6,46 a	5,75 a		3,79 a	3,17 a	
2009						
Sto. Antônio de Goiás	2,50 aB	2,75 aA	2,63 B	5,00 aA	4,63 aB	4,83 A
Sete Lagoas	3,00 aB	3,13 aA	3,06 B	5,00 aA	4,63 aB	4,83 A
Londrina	4,50 aA	4,13 aA	4,31 A	5,50 aA	6,38 aA	5,94 A
MGF	3,34 a	3,34 A		5,17 a	5,20 a	

Médias seguidas de letras iguais, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. MGL: média geral por local proveniente de 16 dados; MGF: média geral por tipo de feijoeiro proveniente de 24 dados.

Os grupos da macrofauna mais abundantes foram: Formicidae, larvas e adultos de Coleoptera, larvas de Diptera, Isoptera e Oligochaeta. Não foram observadas diferenças significativas de densidades dos diferentes grupos entre os solos cultivados com feijoeiro convencional e transgênico em nenhuma das três localidades (Tabela VII.23).

A comunidade da mesofauna do solo teve o grupo Acari como o mais representativo, representando entre 51% a 68% em Londrina e mais de 90% em Sete Lagoas. Outros grupos importantes foram: Formicidae, Collembola, larvas de Coleoptera e larvas de Diptera. Houve diferença significativa para a densidade média de ácaros presentes no solo cultivado com os dois tipos de feijoeiro. Neste caso, o solo sob feijoeiro convencional teve uma maior densidade de indivíduos deste grupo do que o solo sob feijão transgênico (Tabela VII.24).

Na análise conjunta, considerando-se os dados das repetições dos três experimentos, não foi observada diferença significativa de densidade para nenhum grupo da macrofauna do solo. No caso da mesofauna, foi observada diferença significativa de densidade apenas para o grupo Acari, com menores densidades no solo sob cultivo do feijoeiro transgênico (Tabela VII.25).

Tabela VII.23. Comparação entre as médias de densidade da macrofauna do solo, expressas em número de indivíduos por m², provenientes de 8 repetições de amostras de solo cultivado com feijoeiro Olathe (FC) e o evento GM Embrapa 5.1 (FGM), em cada localidade de avaliação.

Grupos da fauna	Santo Antônio de Goiás				Sete Lagoas				Londrina			
	FC		FGM		FC		FGM		FC		FGM	
Araneae	2	a	8	a	0	a	2	a	6	a	2	A
Archaeognata	0	a	0	a	0	a	0	a	0	a	6	A
Auchenorrhyncha	2	a	4	a	0	a	2	a	0	a	0	A
Blattodea	0	a	4	a	0	a	0	a	4	a	0	A
Casulo Minhoca	2	a	0	a	16	a	4	a	0	a	0	A
Chilopoda	4	a	2	a	4	a	6	a	16	a	6	A
Coleoptera	28	a	16	a	2	a	8	a	42	a	66	A
Dermaptera	4	a	0	a	2	a	0	a	0	a	0	A
Diplopoda	2	a	0	a	0	a	0	a	16	a	32	A
Diplura	0	a	0	a	0	a	0	a	6	a	0	A
Diptera	4	a	14	a	0	a	0	a	4	a	0	A
Enchytraeidae	0	a	0	a	0	a	0	a	0	a	2	A
Formicidae	1.072	a	500	a	54	a	48	a	362	a	334	A
Gastropoda	0	a	0	a	0	a	0	a	2	a	10	A
Heteroptera	6	a	2	a	0	a	0	a	6	a	8	A
Hymenoptera	4	a	0	a	2	a	0	a	0	a	2	A
Isoptera	62	a	404	a	2	a	0	a	22	a	0	A
Larva Coleoptera	74	a	84	a	52	a	40	a	94	a	92	A
Larva Diptera	120	a	16	a	4	a	0	a	0	a	0	A
Larva Lepidoptera	0	a	0	a	0	a	2	a	4	a	2	A
Oligochaeta	138	a	188	a	294	a	194	a	160	a	162	A
Opilionida	0	a	0	a	0	a	0	a	12	a	40	A
Orthoptera	2	a	2	a	0	a	0	a	0	a	0	A
Psocoptera	4	a	0	a	0	a	0	a	0	a	0	A
Sternorrhyncha	88	a	94	a	2	a	0	a	0	a	0	A
Symphyla	10	a	12	a	0	a	0	a	8	a	28	A

Médias seguidas de letras iguais na linha, em cada localidade, não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

Embora muitos estudos tenham avaliado os efeitos de culturas GM sobre a biodiversidade acima do solo, poucos investigaram possíveis impacto de plantas GM sobre a biota do solo. Em revisão sobre o tema, O'Callaghan et al. (2005), não encontrou na literatura nenhum estudo que detectasse efeitos deletérios sobre minhocas, isópodes, colêmbolos e ácaros expostos a restos culturais de diferentes culturas geneticamente modificadas para expressar toxinas Bt.

Em trabalho mais recente, Griffiths et al. (2008), em um experimento de casa de vegetação comparando os efeitos de milho GM tolerante a herbicida, verificou um

efeito deletério da aplicação de herbicida sobre a mesofauna, mas não do milho GM isoladamente. Por sua vez, Krogh et al. (2007) também investigando um milho resistente a herbicida verificou uma redução na população de minhocas, a que os autores atribuíram à aplicação de herbicida.

Tabela VII.24. Comparação entre as médias de densidade da mesofauna do solo, expressas em número de indivíduos por m², provenientes de 8 repetições de amostras de solo cultivado com feijoeiro Olathe (FC) e o evento GM Embrapa 5.1 (FGM), em cada localidade de avaliação.

Grupos da fauna	Santo Antônio de Goiás		Sete Lagoas		Londrina	
	FC	FGM	FC	FGM	FC	FGM
Acari	1137 a	625 a	2648 a	1145 b	991 a	569 a
Araneae	8 a	0 a	0 a	0 a	8 a	0 a
Coleoptera	16 a	32 a	16 a	8 a	8 a	24 a
Diplura	0 a	0 a	0 a	0 a	65 a	106 a
Diptera	0 a	8 a	0 a	0 a	0 a	24 a
Entomobryomorpha	0 a	0 a	16 a	0 a	195 a	227 a
Formicidae	195 a	585 a	81 a	0 a	57 a	81 a
Heteroptera	0 a	0 a	0 a	16 a	0 a	8 a
Larva Coleoptera	16 a	8 a	32 a	32 a	81 a	24 a
Larva Diptera	49 a	8 a	32 a	8 a	8 a	8 a
Poduromorpha	0 a	0 a	0 a	0 a	8 a	24 a
Sternorrhyncha	16 a	268 a	0 a	0 a	0 a	0 a
Symphyla	41 a	24 a	0 a	0 a	0 a	0 a
Symphyleona	0 a	0 a	0 a	0 a	32 a	8 a
Thysanoptera	0 a	0 a	8 a	0 a	8 a	0 a

Médias seguidas de letras iguais na linha, em cada localidade, não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

Outros resultados experimentais com colêmbolos submetidos a dietas com trigo GM resistente a fungos (Romeis et al., 2003) e ácaros oribatídeos alimentados com folhas de algodão Bt (Oliveira et al., 2007) também não demonstraram nenhum efeito das plantas GM sobre variáveis de ciclo de vida das espécies testadas.

Não há na literatura nenhum estudo sobre o efeito de uma planta GM semelhante, com resistência a um vírus. Desta forma, torna-se difícil comparar os resultados encontrados neste trabalho. De maneira geral, não foram encontradas diferenças significativas entre o solo cultivado com o feijoeiro GM e o convencional. Apenas, os Acari, em Sete Lagoas apresentaram diferença significativa.

Tabela VII.25. Comparação entre as médias gerais de densidade da macrofauna e mesofauna do solo, expressas em número de indivíduos por m², no solo cultivado com feijoeiro Olathe (FC) e o evento GM Embrapa 5.1 (FGM), provenientes de 24 dados (8 repetições x 3 locais de avaliação do experimento).

Grupos da fauna	Macrofauna do Solo				Mesofauna do Solo			
	FC		FGM		FC		FGM	
Acari					1592,01	a	779,76	B
Araneae	2,72	a	4,00	a	5,20	a	0,00	A
Archaeognata	0,00	a	2,08	a			0,00	
Auchenorrhyncha	0,64	a	2,08	a				
Blattodea	1,28	a	1,28	a				
Casulo Minhoca	6,08	a	1,28	a				
Chilopoda	8,00	a	4,64	a				
Coleoptera	24,00	a	30,08	a	13,65	a	21,44	A
Dermaptera	2,08	a	0,00	a				
Diplopoda	6,08	a	10,72	a				
Diplura	2,08	a	0,00	a	21,44	a	35,09	A
Diptera	2,72	a	4,64	a	0,00	a	11,05	A
Enchytraeidae	0,00	a	0,64	a				
Entomobryomorpha					70,18	a	76,03	A
Formicidae	496,00	a	294,08	a	111,12	a	222,23	A
Gastropoda	0,64	a	3,36	a				
Heteroptera	4,00	a	3,36	a	0,00	a	8,45	A
Hymenoptera	2,08	a	0,64	a				
Isoptera	28,64	a	134,72	a				
Larva Coleoptera	73,28	a	72,00	a	43,54	a	21,44	A
Larva Diptera	41,28	a	735,36	a	29,89	a	8,45	A
Larva Lepidoptera	1,28	a	1,28	a				
Oligochaeta	197,28	a	181,28	a				
Opilionida	4,00	a	13,28	a				
Orthoptera	0,64	a	0,64	a				
Poduromorpha					2,60	a	8,45	A
Psocoptera	1,28	a	0,00	a				
Sternorrhyncha	30,08	a	31,36	a	5,20	a	89,67	A
Symphyla	6,08	a	13,28	a				
Symphyleona					11,05	a	2,60	A
Thysanoptera					5,20	a	0,00	A

Médias seguidas de letras iguais na linha, em cada método de captura, não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

Não foram encontradas diferenças significativas para a macrofauna e mesofauna do solo, à exceção do grupo Acari, na localidade de Sete Lagoas, entre os solos cultivados com o feijoeiro Embrapa 5.1 modificado geneticamente para resistência ao vírus do mosaico dourado e o feijoeiro convencional. No entanto, as diferenças foram pontuais e não podem ser atribuídas a efeitos da modificação genética do feijoeiro sobre a fauna do solo.



Crescimento do feijoeiro sob efeito de inoculação com rizóbio

As avaliações foram feitas em experimentos conduzidos em casa-de-vegetação, onde as plantas foram crescidas por cerca de 40 dias em vasos com solo coletados nos campos cultivados com o feijoeiro evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe, sem a adição de fertilizante nitrogenado.

Produção de matéria seca e acumulação de nitrogênio

A produção de matéria seca pelas plantas de feijoeiro variou entre os experimentos com solos das diferentes localidades (Tabela VII.26). No primeiro experimento realizado com solo coletado em Londrina, houve diferenças entre as duas variedades testadas, tendo o feijoeiro Embrapa 5.1, geneticamente modificado, apresentado a maior acumulação de matéria seca. Nos demais experimentos, não houve diferença entre os tratamentos, e visualmente, as plantas mostravam bom desenvolvimento, exceto no experimento 2 de Sete Lagoas, em que a acumulação de matéria seca foi muito baixa, situando-se próximo de 0,5 g/planta.

A acumulação de N pelas plantas seguiu a variação entre experimentos e localidades observada para a produção de matéria seca, variando de 14,5 a 159,8 mg N/planta, respectivamente. Houve diferença estatística apenas no segundo experimento feito com solo coletado no campo de Londrina, com a maior acumulação de N observada para o feijoeiro Embrapa 5.1.

Tabela VII.26. Acumulação de matéria seca e nitrogênio em plantas do evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe, obtidas em cada um dos dois experimentos realizados com solos provenientes de campos de Londrina, Santo Antonio de Goiás e Sete Lagoas.

Genótipo	Londrina				Santo Antonio de Goiás				Sete Lagoas			
	Matéria seca		N acumulado		Matéria seca		N acumulado		Matéria seca		N acumulado	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
	g/planta	g/planta	mg N/planta	mg N/planta	g/planta	g/planta	mg N/planta	mg N/planta	g/planta	g/planta	mg N/planta	mg N/planta
Olathe	1,75a	1,99a	38,2a	63,6a	2,35a	4,19a	69,9a	117,9a	4,09a	0,56a	142,8a	15,0a
Embrapa 5.1	2,30b	2,18a	45,8a	78,3b	2,39a	4,37a	70,4a	114,9a	4,42a	0,42a	159,8a	14,5 ^a
CV (%)	22,2	13,6	22,6	15,9	30,1	9,2	28,6	10,9	16,8	27,3	14,9	20,8
Prob. (trat.)	0,043	0,225	0,154	0,035	0,918	0,386	0,960	0,658	0,384	0,069	0,176	0,730

Dados médios de 8 repetições. Médias seguidas de letras diferentes na coluna apresentam diferença significativa a 5% de probabilidade.

Müller et al. (1993) avaliaram a produção de matéria seca e acumulação de N pelas variedades Puebla 152 e Negro Argel de feijoeiro comum, em diferentes estádios de desenvolvimento das plantas. Para ambas as variedades, consideradas de alto potencial para se beneficiar da fixação biológica de N₂ (FBN), a avaliação feita em R₁ revelou quantidades de matéria seca de 2,93 a 3,83 g/planta, e de N na parte aérea de 95,0 a 99,4 mg N/planta. Em outro estudo, a cultivar Carioca do feijoeiro comum apresentou pouco mais de 4 g/planta de matéria seca, e de 130 mg N/planta (Brito et al., 2009). Peña-Cabriales et al. (1993), em um estudo em vasos com variedades de feijoeiro comum mexicanas, também encontram quantidades de N acumulado na parte aérea da planta próximas de 100 mg N/planta, aos 42 dias após emergência. Em Ponta Grossa, no Paraná, em um estudo em condições de campo, a variedade Pérola acumulou entre 67 e 138 mg N/planta aos 35 dias após emergência, dependendo da estirpe de *Rhizobium tropici* que foi inoculada (Hungria et al., 2003).

Assim, pode-se dizer que o desenvolvimento das plantas dos experimentos em casa-de-vegetação foi satisfatório. A única exceção foi o experimento 2 com solo de Sete Lagoas, cujas plantas aparentemente sofreram com altas temperaturas e estresses hídricos durante o período experimental, em função de problemas com o sistema de refrigeração da casa-de-vegetação. Não obstante, os dois genótipos (evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe) mostram comportamento similar frente às condições de estresse, embora respostas diferenciadas entre variedades já tenham sido observadas quando

plantas de feijoeiro são submetidas a estresse hídrico (Ramos et al., 2003) e térmico (Didonet & Vitória, 2006).

Nodulação e dependência pela fixação biológica de N₂ pelas plantas de feijoeiro

A nodulação do feijoeiro foi avaliada pelo peso seco de nódulos retirados das raízes logo após o corte da parte aérea. Em dois dos experimentos, o primeiro realizado com solo coletado de campos de Londrina, e o segundo com solo coletado de campos de Sete Lagoas, o peso seco dos nódulos das plantas de feijoeiro geneticamente modificado superou em 30 a 90 % o dos nódulos do feijoeiro convencional, embora essas diferenças não tenham sido estatisticamente diferentes (Tabela VII.27). No entanto, no experimento 1, com solo coletado de campos de Santo Antonio de Goiás, a diferença entre pesos secos de nódulos foi significativa, mas superior nas plantas de feijoeiro convencional. Nos demais experimentos, os pesos de nódulos foram mais próximos, sem diferenças significativas entre as variedades de feijoeiro.

Os pesos secos de nódulos encontrados nos experimentos situaram-se entre 20,1 e 156,9 mg/planta. Embora a nodulação seja a principal indicação de ocorrência de fixação biológica de N₂, o número e a massa seca de nódulos podem não apresentar uma relação direta com o grau de dependência das plantas pela FBN (Duque et al., 1985). Essa falta de correlação também foi observada por Hungria & Neves (1986). De fato, a dependência pela FBN apresentada pelas plantas de feijoeiro (Tabela VII.28), tendo como base a técnica de abundância natural de ¹⁵N (Unkovich et al., 2008), não mostrou uma relação direta com o peso seco de nódulos ($R^2 = 0,001$).

Tabela VII.27. Peso seco de nódulos em plantas do evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe, obtidas em cada um dos dois experimentos realizados com solos provenientes de campos cultivados em Londrina, Santo Antonio de Goiás e Sete Lagoas.

Genótipos	Londrina		Santo Antonio de Goiás		Sete Lagoas	
	1	2	1	2	1	2
	mg/vaso					
Olathe	58,3a	77,6a	156,9a	32,5a	70,7a	23,9a
Embrapa 5.1	114,9a	79,2a	95,2b	36,9a	95,7a	20,1a
CV (%)	67,2	49,3	30,1	96,9	34,0	177,6
Prob. (trat.)	0,093	0,934	0,014	0,802	0,121	0,85

Dados médios de 8 repetições. Médias seguidas de letras diferentes na coluna apresentam diferença significativa a 5% de probabilidade.

Os dados de abundância natural de ^{15}N das plantas de sorgo, usada como testemunha para a quantificação da FBN pela técnica isotópica, foram 4 a 5 deltas superiores aos da soja não nodulante, outra testemunha utilizada no estudo. As plantas de sorgo, por terem crescido pouco nos vasos, devem ter apresentado forte influência da marcação natural de ^{15}N das sementes. Devido ao pequeno crescimento, as plantas de sorgo não foram utilizadas para os cálculos de FBN para os genótipos de feijoeiro.

A dependência das plantas de feijoeiro pela FBN oscilou entre 11,3 e 67,3 % do N acumulado na planta ao longo dos períodos experimentais, considerando-se a técnica isotópica, sem diferenças entre tratamentos (Tabela VII.28). As estimativas da FBN pela técnica de diferença de N foram próximas das da técnica isotópica, e em apenas um estudo, com solo de Londrina, as estimativas de FBN foram diferentes entre a variedade convencional e a geneticamente modificada, embora não tenha ocorrido diferença na nodulação (Tabela VII.27).

Em geral, os níveis de FBN encontrados nos diferentes experimentos são médios e baixos, o que parece ser normal para plantas de feijoeiro comum. Em uma rede de experimentos realizados em vários países, o potencial de FBN de diferentes linhagens e cultivares de feijoeiro comum testados no Brasil, pelo método de diluição do isótopo ^{15}N , situaram-se em uma faixa entre 12 e 53 %, sendo grande parte próxima de 20 a

30% (Hardarson et al., 1993). Numa avaliação mais global, Herridge et al. (2008) apresentaram uma média de dependência pela FBN pelo feijoeiro comum de 40 %, considerando-se dados de experimentos com estimativas entre 0 a 73%, e que em condições de produtores, essa média seria de 36 %.

Tabela VII.28. Dependência pela FBN (%) por plantas do evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe, estimada em cada um dos dois experimentos realizados com solos provenientes de Londrina, Santo Antonio de Goiás e Sete Lagoas, utilizando-se as técnicas de abundância natural de ^{15}N (Delta ^{15}N) e diferença de N (Dif. N).

Genótipos	Londrina				Santo Antonio de Goiás				Sete Lagoas			
	Delta 15N		Dif. N		Delta 15N		Dif. N		Delta 15N		Dif. N	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Olathe	25,9a	51,3a	17,0a	40,3b	51,0a	63,4a	9,22a	49,0a	55,5a	15,6 ^a		
Embrapa 5.1	24,3a	67,3a	32,9a	51,2a	65,2a	74,1a	5,71a	45,6a	60,6a	11,0a		
CV (%)	27,0	24,6	82,0	17,4	48,0	32,0	123,2	19,2	10,4	122,2		
Prob. (trat.)	0,656	0,065	0,165	0,029	0,342	0,950	0,469	0,487	0,136	0,589		

Dados médios de 8 repetições. Médias seguidas de letras diferentes na coluna apresentam diferença significativa a 5% de probabilidade.

Assim, as variações observadas na acumulação de matéria seca e de nitrogênio pelas plantas de feijoeiro estão relacionadas com a maior ou menor capacidade do solo em suprir nitrogênio para o crescimento das plantas até cerca de 40 dias de idade. Tal como reportado na literatura, a contribuição da FBN é um processo complementar no suprimento de N para o feijoeiro, embora pouco eficiente, sem relação direta com a nodulação. Diferenças entre as variedades de feijoeiro estudadas foram pontuais, ou inconsistentes, em relação a essas variáveis.

Comunidade de fungos micorrízicos arbusculares e sua associação com as raízes das plantas de feijoeiro

Densidade de esporos de FMAs na rizosfera das plantas

A densidade de esporos de FMAs na rizosfera dos experimentos de campo é apresentada na Figura VII.30. Verifica-se que em nenhum dos experimentos houve

diferença significativa entre o evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe. Verifica-se que no primeiro ano de condução (2008) a esporulação dos FMAs foi baixa em todos os experimentos, particularmente em Sete Lagoas e Londrina. Em Londrina em 2008 não foram encontrados esporos de FMAs na rizosfera do genótipo Embrapa 5.1, embora a densidade de esporos tenha sido tão baixa no experimento que este valor não diferiu estatisticamente da quantidade que foi encontrada em ‘Olathe’. Há a possibilidade de efeitos sazonais nesta baixa esporulação dos FMAs no ano 2008, já que ocorreu nas três localidades. Em 2009, a esporulação foi cerca de 10 vezes maior que em 2008. Entretanto, o solo de Santo Antonio de Goiás que apresentou a maior esporulação em 2008, apresentou a menor em 2009, evidenciando os grandes efeitos edafoclimáticos e de manejo sobre esta variável biológica.

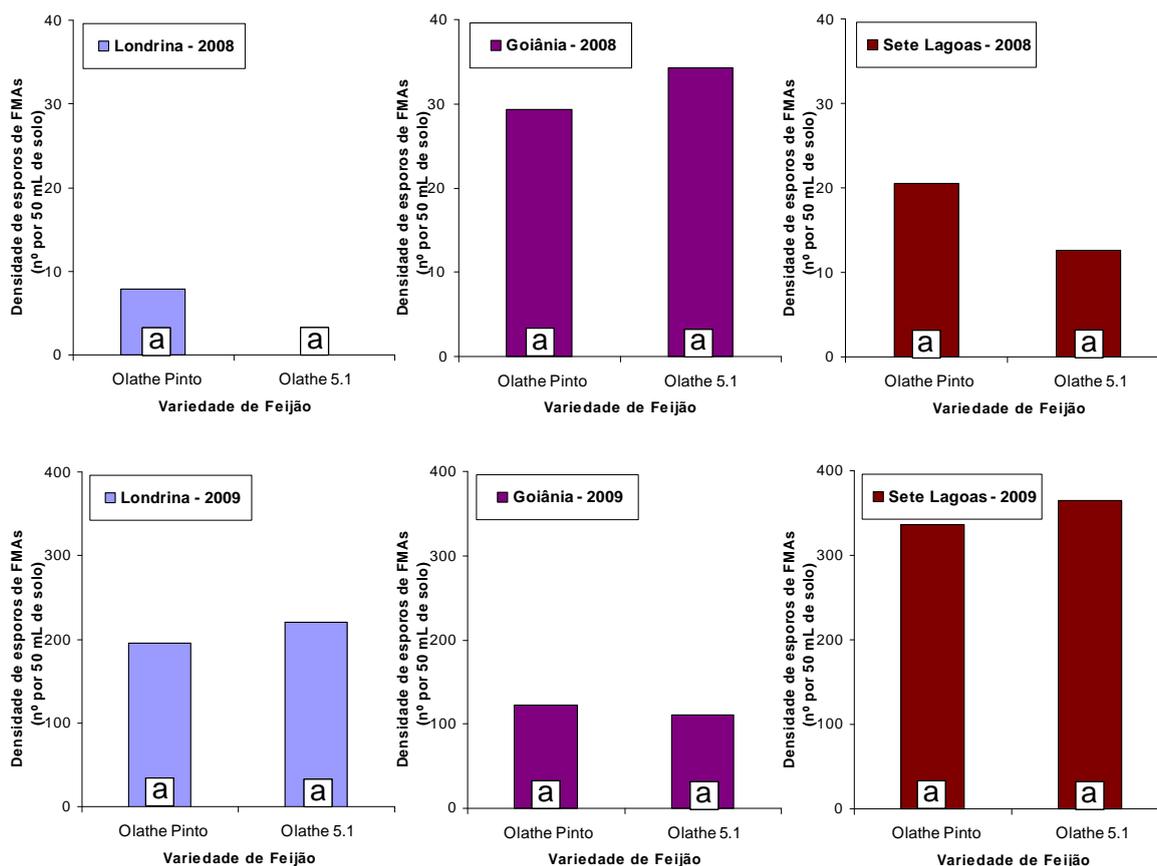


Figura VII.30. Densidade de esporos de fungos micorrízicos arbusculares na rizosfera de plantas de feijão dos genótipos GM (Embrapa 5.1) e não-GM (Olathe=Olathe Pinto) em três localidades nos anos de 2008 e 2009. Letras iguais nas barras indicam ausência de diferença pelo teste de Tukey 5%.

A densidade de esporos de FMAs na rizosfera dos experimentos de casa de vegetação é apresentada na Tabela VII.29. Na maioria dos experimentos não houve diferença significativa entre o feijoeiro Embrapa 5.1 e seu parental não-GM Olathe. Apenas no quinto experimento, realizado com solo de Sete Lagoas, foi onde se observou uma maior esporulação na rizosfera do feijoeiro Embrapa 5.1, embora com uma diferença apenas superior a diferença mínima significativa (DMS) em três esporos, o que é insignificante em termos de esporulação de FMAs. Apenas no primeiro experimento, com solo de Santo Antonio de Goiás, houve uma esporulação muito elevada na rizosfera, nos demais experimentos os valores permaneceram com valores usualmente observados em vasos com FMAs.

Tabela VII.29. Densidade de esporos de fungos micorrízicos arbusculares na rizosfera de plantas de feijão dos genótipos GM (Embrapa 5.1) e não-GM (Olathe) em cinco experimentos de casa de vegetação conduzidos na Embrapa Agrobiologia entre 2008 e 2010.

Genótipos	St.At° Goiás	St.At° Goiás	Londrina	Londrina	Sete Lagoas
	Experimento	Experimento	Experimento	Experimento	Experimento
	1	2	3	4	5
(Número de esporos em 50 mL de solo)					
Olathe	1727,50 a	205,50 a	156,00 a	105,50 a	131,50 B
Embrapa 5.1	1430,50 a	284,00 a	60,50 a	138,25 a	169,38 A
DMS	328,83	99,89	193,75	50,31	34,75

DMS: diferença mínima significativa pelo teste de Tukey 5%. Letras iguais nas barras indicam ausência de diferença pelo teste de Tukey 5%.

A presença abundante de esporos de FMAs na rizosfera das plantas indica que houve a formação de uma simbiose micorrízica funcional e esta resultou na multiplicação e manutenção da comunidade de FMAs indígenas. A presença de esporulação na rizosfera do evento Embrapa 5.1 tanto no campo como em casa de vegetação sugere que esta variedade está, de forma normal, multiplicando os FMAs indígenas cujos propágulos estão no solo, e que a transgenia não afetou a capacidade geral dos FMAs se multiplicarem a partir de seu metabolismo radicular. Os FMAs são biotróficos obrigatórios e sua esporulação somente ocorre associada a uma raiz com

metabolismo ativo e funcional. Alguns fatores do solo podem reduzir e até mesmo eliminar a esporulação e a multiplicação dos FMAs na rizosfera, sendo que nos solos agrícolas, o fator que mais causa esta depauperação biológica é o excesso de fertilizantes, seguido de fungicidas e outros agroquímicos adicionados na planta e no solo.

Colonização das raízes por FMAs indígenas

A colonização micorrízica das raízes coletadas nos experimentos de campo é apresentada na Figura VII.31. Verifica-se ausência de diferença entre as colonizações radiculares do evento Embrapa 5.1 e seu parental não-GM Olathe dentro de cada localidade em que foi conduzido o experimento, sugerindo ausência de alteração da capacidade de micorrização pela transgenia. Houve grande variação da colonização micorrízica pelas diferenças de solo, fertilidade e clima de cada local. A colonização micorrízica verificada em Londrina é muito baixa para a família leguminosa, que geralmente apresenta colonização elevada, particularmente quando fixadora de nitrogênio atmosférico, como o feijoeiro. Uma comprovação disto é observada em Santo Antonio de Goiás, onde a taxa de colonização se aproximou de 80%. As plantas em Londrina certamente são mais dependentes de fertilizantes fosfatados prontamente disponíveis próximos de suas raízes, pois se utilizam menos da estratégia micorrízica para sua nutrição.

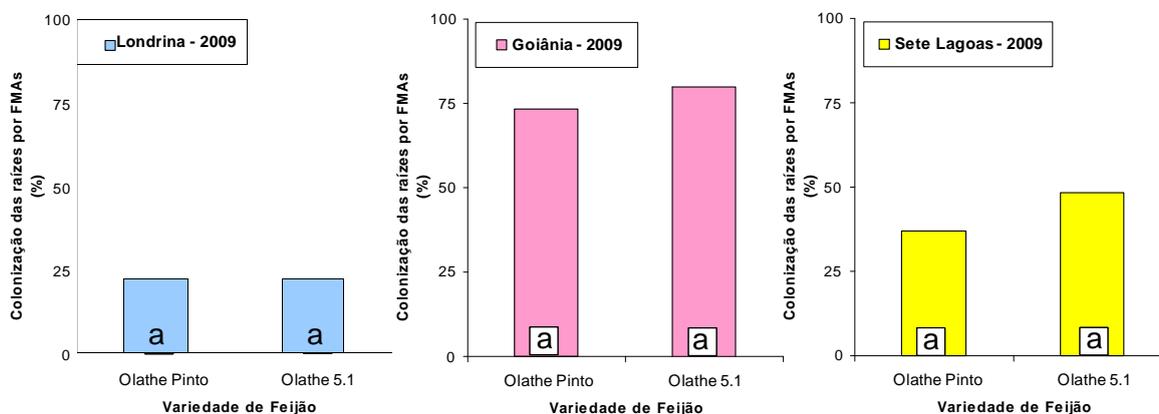


Figura VII.31. Colonização micorrízica das raízes de plantas de feijão GM (evento Embrapa 5.1) e não-GM (Olathe=Olathe Pinto) em três localidades nos anos de 2009. Letras iguais nas barras indicam ausência de diferença pelo teste de Tukey 5%.

A colonização micorrízica dos experimentos de casa de vegetação é apresentada na Tabela VII.30. Também se verifica em todos os experimentos, ausência de alteração da colonização micorrízica no evento Embrapa 5.1 em comparação com seu parental Olathe. A colonização em todos os experimentos de casa de vegetação foi de média a alta, sendo acima de 50%. Foi maior nos dois primeiros experimentos, realizados com solos de Santo Antonio de Goiás, onde também se observou maior esporulação dos FMAs.

Tabela VII.30. Colonização por fungos micorrízicos arbusculares nas raízes de plantas de feijão GM (evento Embrapa 5.1) e não-GM (Olathe) em cinco experimentos de casa de vegetação conduzidos na Embrapa Agrobiologia durante 40 dias.

Genótipos	St. At ^o . Goiás Experimento 1		Goiânia Experimento 2		Londrina Experimento 3		Londrina Experimento 4		Sete Lagoas Experimento 5	
	Colonização micorrízica (%)									
Olathe	82,63	a	83,50	a	50,75	a	56,13	a	53,75	A
Embrapa 5.1	86,50	a	80,63	a	48,88	a	54,25	a	50,38	A
DMS	4,42		7,58		10,41		6,82		9,75	

DMS: diferença mínima significativa pelo teste de Tukey 5%. Letras iguais nas barras indicam ausência de diferença pelo teste de Tukey 5%.

As raízes da maioria das plantas estabelecem simbiose com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) que colonizam seu córtex em diferentes graus. O grau de colonização varia grandemente com dependência micorrízica que a planta apresenta e com infectividade que a espécie de FMA possui. Plantas como o cafeeiro apresentam grande usufruto da simbiose com 30 a 50% do comprimento das raízes colonizados pelos FMAs, enquanto que algumas leguminosas arbóreas apresentam mais de 80% do comprimento de suas raízes colonizados por FMAs.

Dentro de um mesmo conjunto de planta e fungo, extensiva variação na colonização radicular é observada por mudanças nos fatores químicos e físicos do solo. Entre eles, principalmente a disponibilidade de fósforo, que quando elevada, diminui radicalmente a colonização micorrízica das raízes, pois o fósforo atua como nutriente

chave que controla o funcionamento da simbiose micorrízica. Os mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos não estão ainda evidenciados claramente, mas a adição de fertilizantes em excesso, particularmente os fosfatados, aliado ao uso de fungicidas sistêmicos pode reduzir acentuadamente a colonização radicular de FMAs nos cultivos agrícolas. A redução da colonização radicular implica em menor uso da simbiose como estratégia nutricional.

Os dados de colonização micorrízica apresentados indicam que o feijoeiro transgênico evento Embrapa 5.1 não sofreu alteração na sua capacidade de formar a simbiose micorrízica, tanto em campo quanto em casa de vegetação, e que pode, quando bem colonizado por FMAs, utilizar esta simbiose como grande aliada na sua nutrição fosfatada.

Número de espécies de FMAs identificadas na rizosfera

O número de espécies em uma comunidade é um índice ecológico de diversidade biológica que primariamente indica a alteração de um ambiente ou ecossistema. A redução do número de espécies geralmente encontrada é um fator de impacto ecológico de considerável importância.

A riqueza de espécies de FMAs observadas nos experimentos de campo foi baixa, mas condizentes com ambientes de agricultura intensiva. O número de espécies identificadas dos experimentos de campo é apresentado na Figura VII.32. Não se verifica diferença entre a variedade convencional (Olathe) e a transgênica (Embrapa 5.1) quanto ao número de espécies de FMAs identificadas na rizosfera. Em geral o número foi baixo, apresentando algumas médias inferiores a três espécies identificadas.

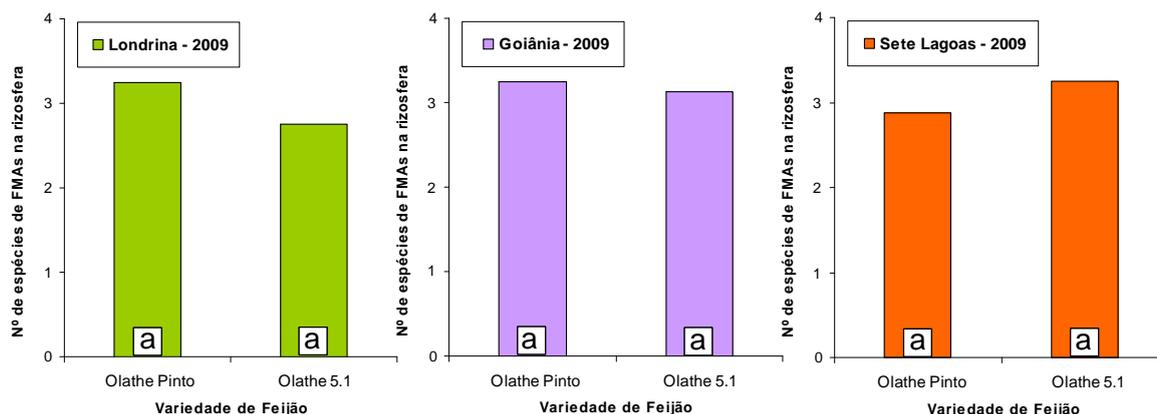


Figura VII.32. Número de espécies de fungos micorrízicos arbusculares identificadas na rizosfera de plantas de feijão GM (Embrapa 5.1=Olathe 5.1) e não-GM (Olathe=Olathe Pinto) em três localidades no ano de 2009. Letras iguais nas barras indicam ausência de diferença pelo teste de Tukey 5%.

A riqueza de espécies nos experimentos de casa de vegetação é apresentada na Tabela VII.31. Em todos os experimentos não houve diferenças entre o número de espécies de FMAs para o evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe. O número médio de espécies foi bastante uniforme em todos os experimentos, sugerindo igualdade de condições, como mesmo solo e ambiente.

Tabela VII.31. Número de espécies de fungos micorrízicos arbusculares identificadas na rizosfera de plantas de feijão GM (Embrapa 5.1) e não-GM (Olathe) em cinco experimentos de casa de vegetação conduzidos na Embrapa Agrobiologia.

Genótipos	St.At° Goiás		Londrina		Londrina		Sete Lagoas			
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4	Experimento 5	Experimento 6	Experimento 7			
Número de espécies de fungos micorrízicos										
Olathe Embrapa	3,63	a	3,38	a	2,50	a	3,25	a	3,38	A
5.1	4,25	a	3,63	a	2,25	a	3,25	a	4,25	A
DMS	1,26		1,06		0,78		0,95		1,05	

DMS: diferença mínima significativa pelo teste de Tukey 5%. Letras iguais nas barras indicam ausência de diferença pelo teste de Tukey 5%.

Composição de espécies na comunidade de FMAs indígenas

A análise de componentes principais para evidenciar diferenças na composição de comunidades de FMAs por presença e ausência de espécies nos experimentos de campo é apresentada na Figura VII.33. Verifica-se similaridade entre as comunidades de FMAs na rizosfera em feijão GM (Embrapa 5.1) e não-GM (Olathe) nas três localidades, observadas pela proximidade dos pontos e direcionamentos semelhantes em relação às espécies de FMAs. Amostras testemunhas tomadas próximas às áreas experimentais indicam que a comunidade no entorno também difere pouco da observada na lavoura de feijão, sendo as mais distintas aquelas comunidades presentes na Mata, em Santo Antônio de Goiás, e no eucalipto em Sete Lagoas.

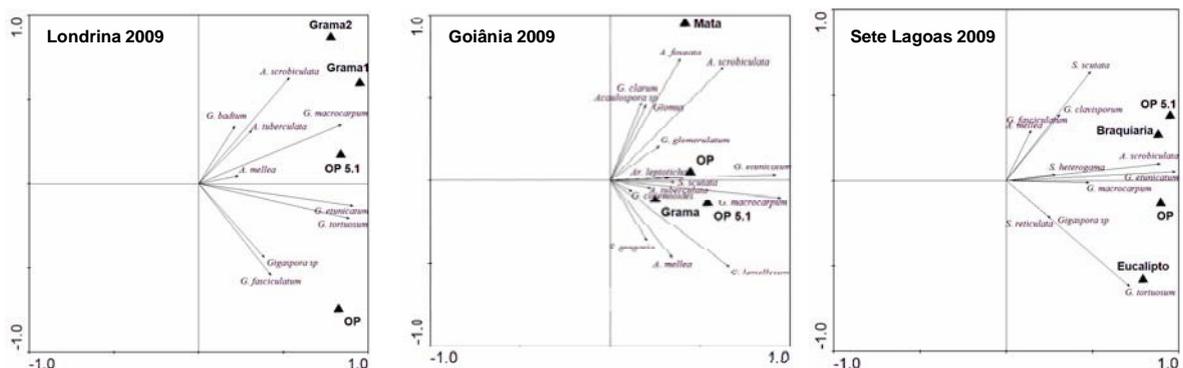


Figura VII.33. Análise de componentes principais para a presença e ausência de espécies de fungos micorrízicos arbusculares identificadas na rizosfera de plantas de feijão do evento GM (Embrapa 5.1 = OP 5.1) e seu parental Olathe (OP 5.1) em três localidades no ano de 2009. Pontos de referências em gramados, pastagens, mata e reflorestamentos foram tomados próximos às áreas experimentais como testemunhas.

Maior segurança na afirmação de similaridade entre as comunidades de FMAs na rizosfera nos campos cultivados com o evento Embrapa 5.1 e Olathe (não-GM) vem dos dados dos experimentos de casa de vegetação em condições controladas, apresentados na Figura VII.34. Ambas as variedades, em condições controladas de casa de vegetação apresentaram comunidades de FMAs com composição bastante similar. Os maiores distanciamentos foram observados nos experimentos 3, com solo de Londrina, e 5, com solo de Sete Lagoas, mas mesmo assim, dentro de um comportamento muito próximo.

Vários estudos demonstram a importância de conhecer a comunidade de FMAs para determinar impactos sobre os ecossistemas. Em comparação com áreas preservadas, a comunidade de fungos micorrízicos pode ser reduzida em solos sem vegetação, inundados e nos alterados pela agricultura, envolvendo manejo inadequado ou culturas com baixa ou nenhuma dependência micorrízica, como as Brassicaceae. O uso do solo ou a mudança de seu uso, a variedade cultivada e o sistema de manejo empregado são fatores que influenciam a ocorrência e a abundância relativa das espécies de FMAs nos ecossistemas. A complexidade de sistemas ecológicos apresenta um desafio considerável para avaliar os riscos e benefícios de plantas geneticamente modificadas (Wolfenbarger & Phifer, 2000).

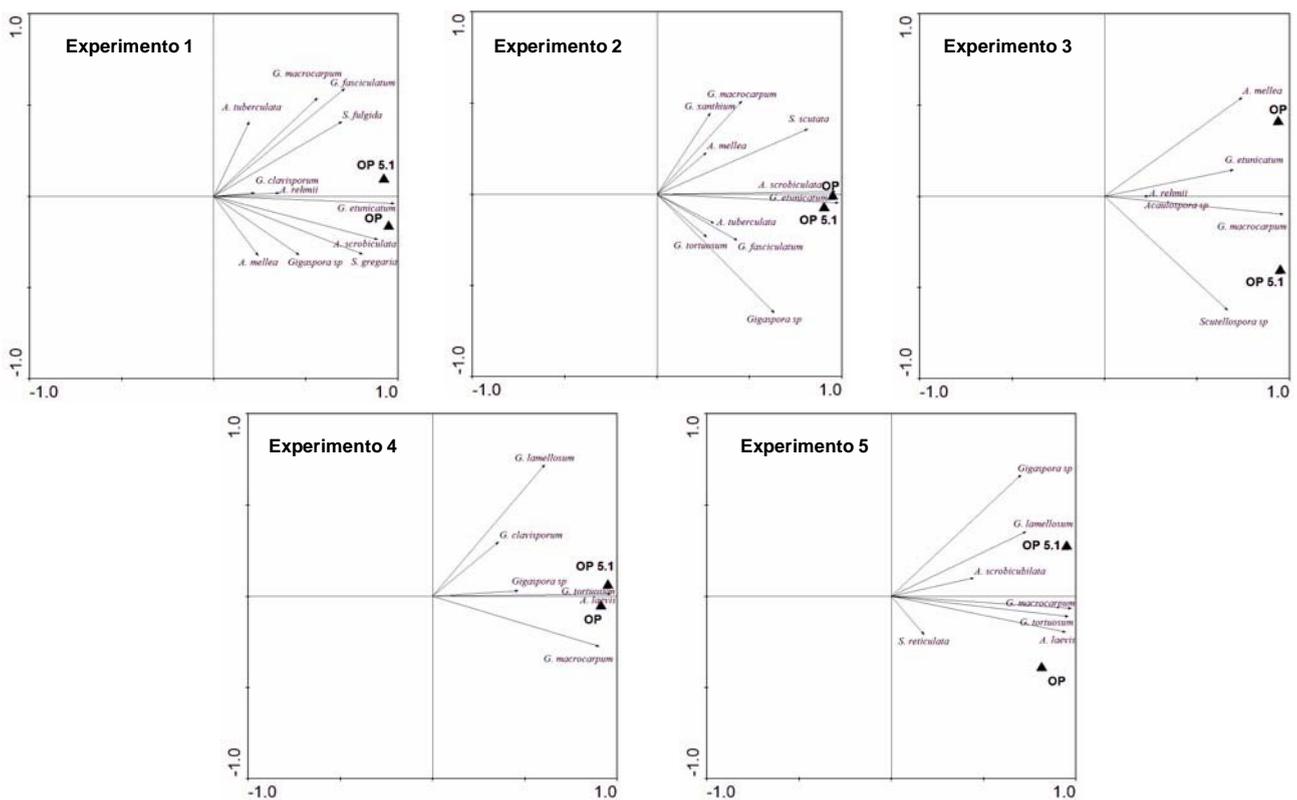


Figura VII.34. Análise de componentes principais para a presença e ausência de espécies de fungos micorrízicos arbusculares identificadas na rizosfera de plantas de feijão do evento Embrapa 5.1 (OP 5.1) e seu parental Olathe (OP) em cinco experimentos em casa de vegetação.

Em função dos resultados obtidos, pode-se afirmar que o feijoeiro transgênico Embrapa 5.1 não teve modificada sua capacidade de formar a simbiose micorrízica, e assim se tornar colonizado por estes fungos. Durante a formação de uma micorriza arbuscular, o fungo forma uma estrutura chamada apressório e penetra inter e intracelularmente no córtex das raízes. Esta formação da micorriza envolve a ativação, indução e desativação de várias proteínas relacionadas com a defesa da planta hospedeira. Uma modificação nos genes que controlam esta formação da simbiose, ou uma superexpressão de um destes genes nas raízes da planta, como por exemplo da chitinase (Vierheilig et al., 1993, 1995), pode impedir a formação da micorriza, ou ainda selecionar determinadas espécies de fungos, modificar a comunidades de fungos micorrízicos no solo e sua eficiência. Essa possibilidade parece estar descartada em relação a variedade geneticamente modificada do feijoeiro estudada. Os resultados também permitem afirmar que a modificação genética do feijoeiro não está afetando significativamente a comunidade destes fungos no solo, tanto em termos de riqueza de espécie quanto em composição de espécies.

Análise quantitativa e qualitativa dos microrganismos em solos sob influência do feijoeiro Embrapa 5.1

Análise do perfil de alfa-proteobactérias na rizosfera do feijoeiro

A Figura VII.35 detalha os dendrogramas obtidos a partir da análise dos perfis de DGGE gerados pelas amostras de solo rizosférico obtidos do cultivo em casa de vegetação do feijoeiro Olathe (não-GM) e seu parental Embrapa 5.1 (GM). O solo rizosférico foi obtido durante a coleta, aos 40 dias após a semeadura em solo oriundo de Santo Antônio de Goiás (GO). Com base nos perfis detalhados, não é possível observar grupamentos condicionados pelo cultivo do feijoeiro geneticamente modificado. Grande parte dos grupamentos foram formados com similaridade acima de 45%.

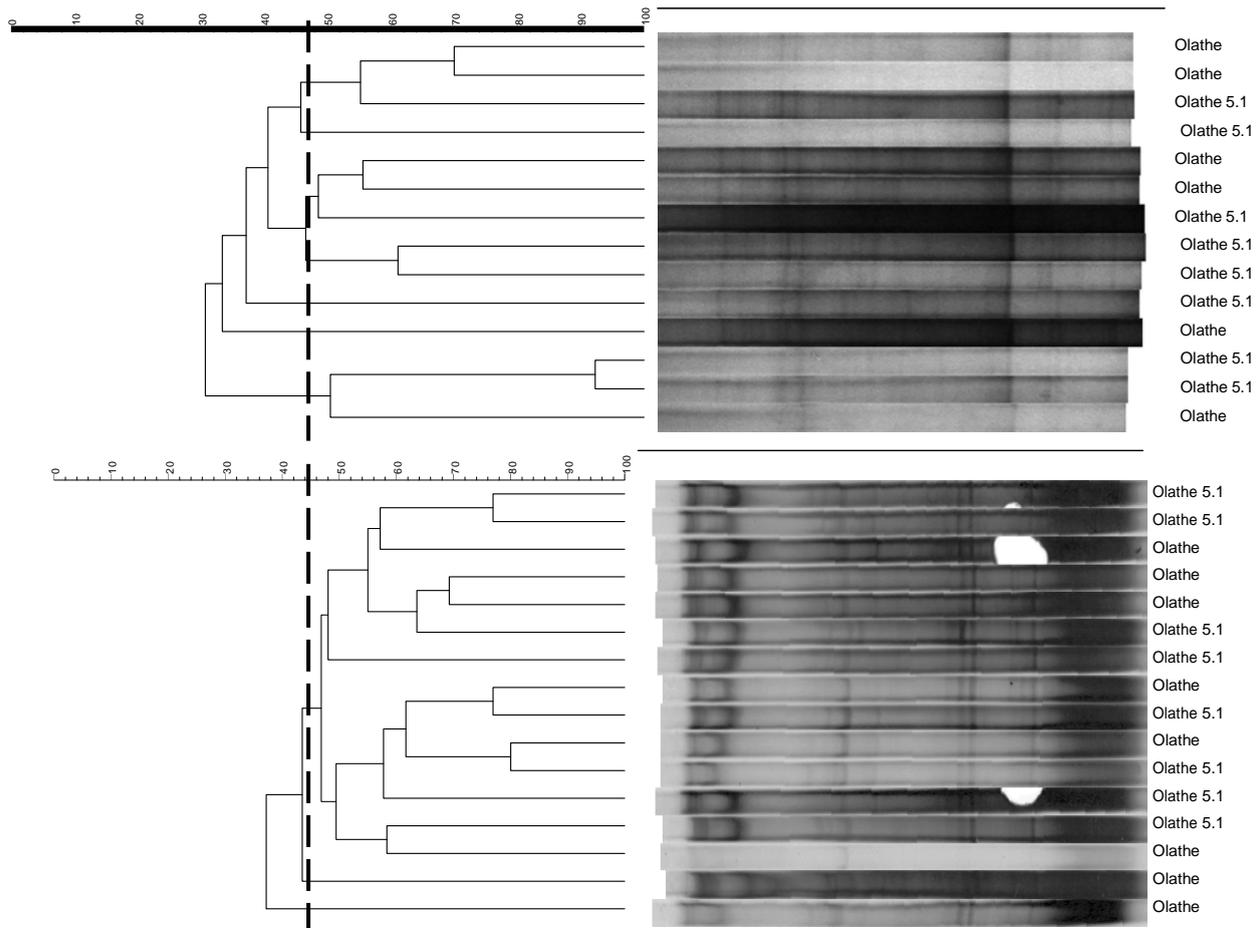


Figura VII.35. Perfil de DGGE obtido de amostras de solo rizosférico obtidas de plantas cultivadas em sistema protegido sobre solo de Santo Antônio de Goiás. O feijoeiro evento Embrapa 5.1 geneticamente modificado foi identificado no dendrograma como Olathe 5.1, e o convencional, somente como Olathe.

No ensaio de campo realizado em Santo Antonio de Goiás, o dendrograma obtido a partir das amostras de DNA rizosférico de plantas (Figura VII.36) mostra que grupamentos que refletem o resultado obtido com o experimento com solo em casa-de-vegetação. Os grupamentos formados não foram condicionados pelo cultivo do feijão geneticamente modificado, sendo formados com similaridade maior do que 55%.

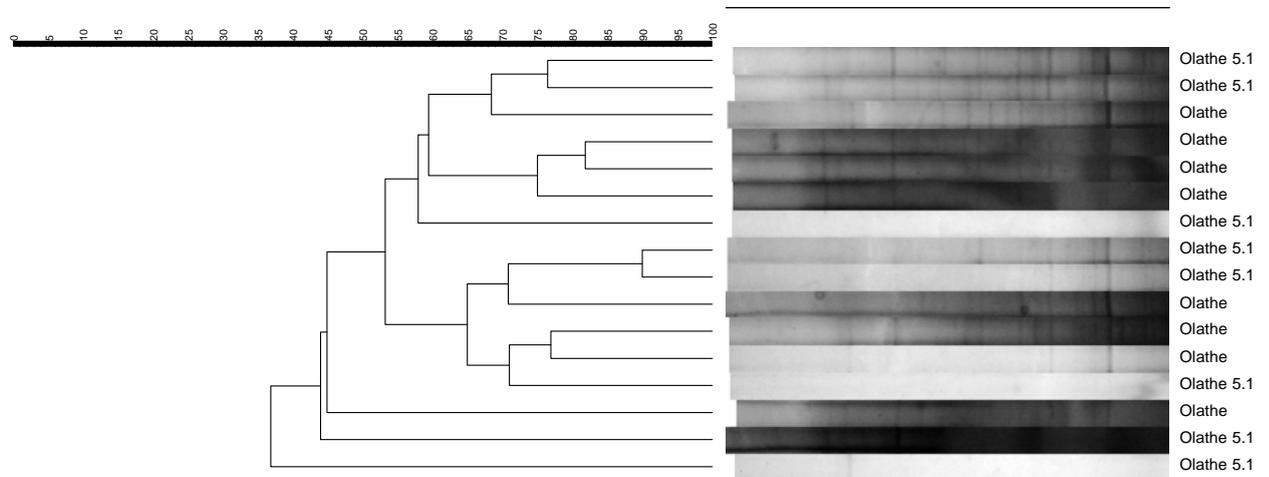


Figura VII.36. Perfil de DGGE a partir de amostras obtidas na rizosfera de plantas cultivadas em Santo Antônio de Goiás. O feijoeiro geneticamente evento Embrapa 5.1 modificado foi identificado no dendrograma como Olathe 5.1, e o convencional, somente como Olathe.

A Figura VII.37 ilustra o perfil eletroforético da comunidade de alfaproteobacterias associadas a rizosfera do feijoeiro crescido em vasos com solo de Londrina. É possível notar no dendrograma que não foram formados grandes grupamentos, e os que foram formados não foram induzidos pelo cultivo do feijão geneticamente modificado evento Embrapa 5.1, ficando dispostas amostras oriundas da planta geneticamente modificada agrupadas com o parental não-GM com mais de 80% de similaridade, como demonstrado pela linha divisória (tracejada) inserida.

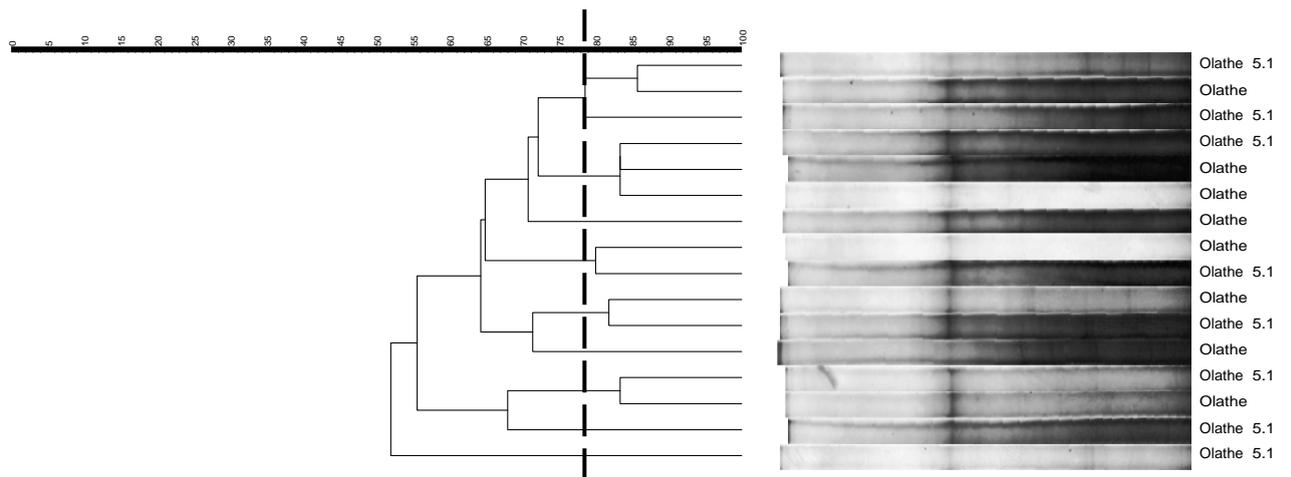


Figura VII.37. Perfil de DGGE obtido de amostras de solo rizosférico obtidas de plantas cultivadas em sistema protegido sobre solo de Londrina (PR). O feijoeiro geneticamente modificado evento Embrapa 5.1 foi identificado no dendrograma como Olathe 5.1, e o convencional, somente como Olathe.

Da mesma forma como foi mostrado no experimento em vasos, a análise de solo de rizosfera do estudo realizado em campo, em Londrina, mostrou agrupamentos que não foram condicionados pelo cultivo do feijoeiro geneticamente modificado Embrapa 5.1, ficando agrupadas amostras de ambas as variedades de feijoeiro (Figura VII.38). O padrão de agrupamento foi mantido, exceção feita à similaridade entre os grupos, que foi menor, mas ainda assim superior a 60%, fato que é perfeitamente assimilável devido a concorrência com a estrutura da comunidade microbiana no solo e às influências ambientais sofridas pela planta cultivada em nível de campo.

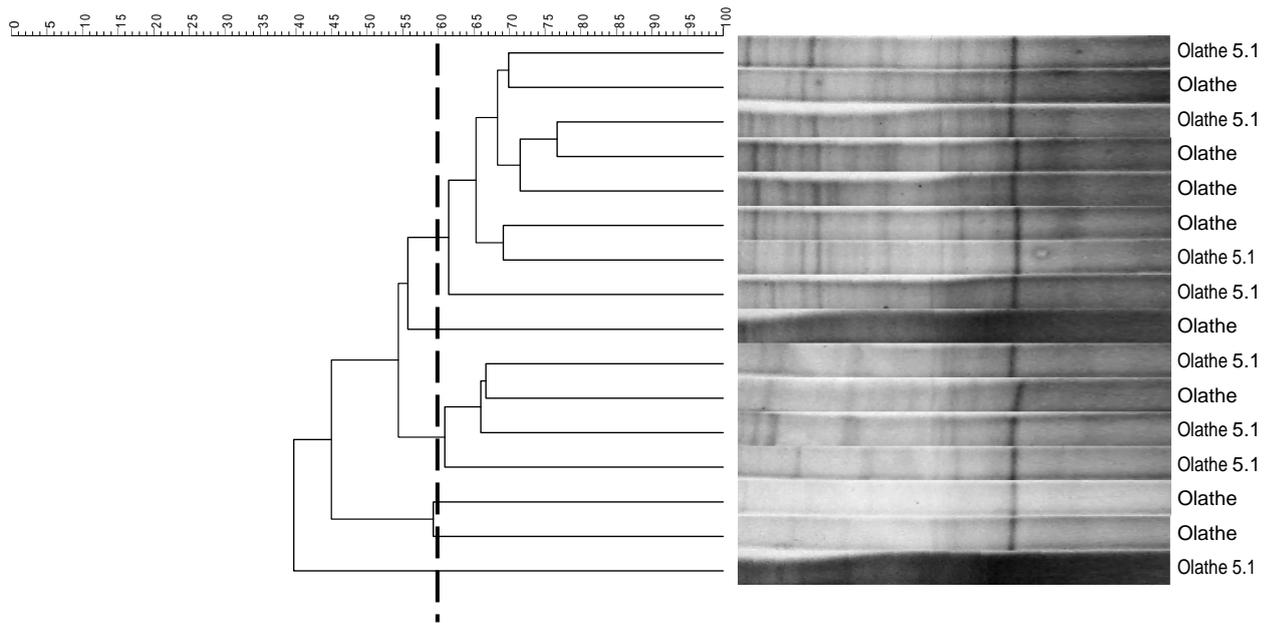


Figura VII.38. Perfil de DGGE rizosférico obtidos de plantas cultivadas em Londrina - PR. O feijoeiro geneticamente modificado evento Embrapa 5.1 foi identificado no dendrograma como Olathe 5.1, e o convencional, somente como Olathe.

As análises de solo de Sete Lagoas, obtida do experimento em vasos (Figura VII.39), mostrou um padrão de agrupamento semelhante aos demais, não sendo condicionado pelas variedades de feijoeiro Embrapa 5.1. A divergência desta avaliação em relação aos solos de outras localidades (Londrina-PR e Santo Antônio de Goiás-GO) foi a formação de grupos em menor escala de similaridade, mesmo estando em cultivo protegido, ficando com pouco mais de 35 % de similaridade, mesmo assim não sendo possível observar grupamentos condicionados em função do cultivo do feijão geneticamente modificado.

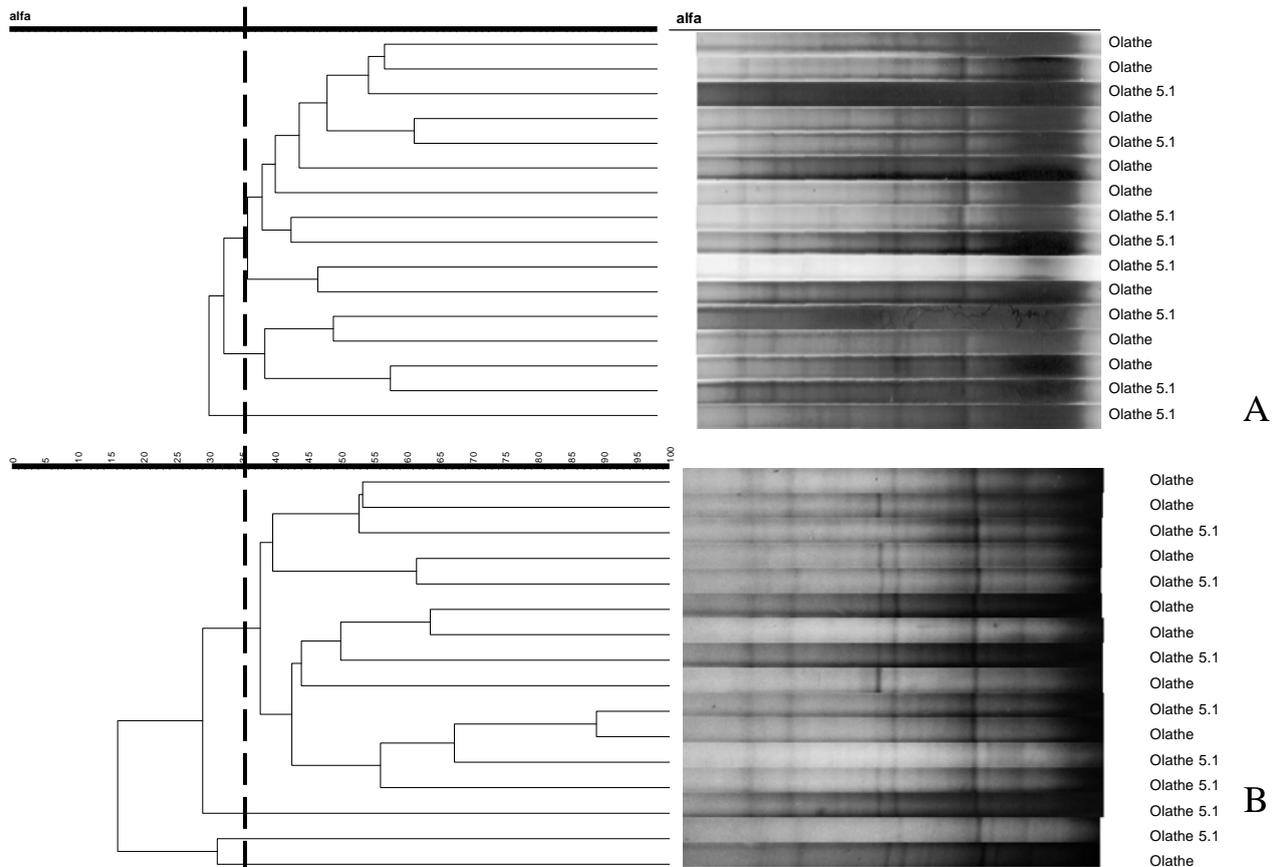


Figura VII.39. Perfil de DGGE obtido de amostras de solo rizosférico obtidas de plantas cultivadas em sistema protegido sobre solo de Sete Lagoas – MG. O feijoeiro geneticamente modificado evento Embrapa 5.1 foi identificado no dendrograma como Olathe 5.1, e o convencional, somente como Olathe.

No dendrograma obtido da análise de amostras de solo de rizosfera obtidas do ensaio de campo em Sete Lagoas (Figura VII.40), foi possível observar pequenos grupamentos que não foram condicionados pelo cultivo do feijoeiro modificado Embrapa 5.1. Em contraste com os outros locais de amostragem, apesar do cultivo ter sido feito em campo, grande parte dos grupamentos foram formados em escala de similaridade mais alta, em torno de 70% de similaridade.

A rizosfera é um ambiente dinâmico, em que os parâmetros de exsudação da planta podem influenciar a atividade e população das comunidades microbianas associadas a este ambiente. Estas podem ser compostas por microrganismos de vida livre, bem como simbioses. Esses exsudados podem influenciar a comunidade de

alfaproteobacterias na rizosfera de plantas de feijoeiro geneticamente modificado em relação a isolínea não transformada.

Técnicas de “*fingerprint*” são ferramentas amplamente utilizadas na avaliação de comunidades microbianas, por sua versatilidade e resultados rápidos. Entre elas destacam-se as em Gel de Polimorfismo de Conformação da Fita Simples (Schwieger & Tebbe, 1998) e Eletroforese em Gradiente Desnaturante (Muyzer et al., 1993), sendo DGGE amplamente utilizado por diversos grupos de pesquisa. Estes métodos possuem capacidade de análise de grande número de amostras. Em estudo anteriores, Knupp et al. (2009) demonstraram que os perfis moleculares da comunidade microbiana, acessados por análise do gene 16S rDNA via PCR-DGGE não foram alterados em função do cultivo do feijoeiro geneticamente modificado. Estes autores reportaram pequeno efeito sobre a comunidade de proteobactérias alfa, efeito este não continuado.

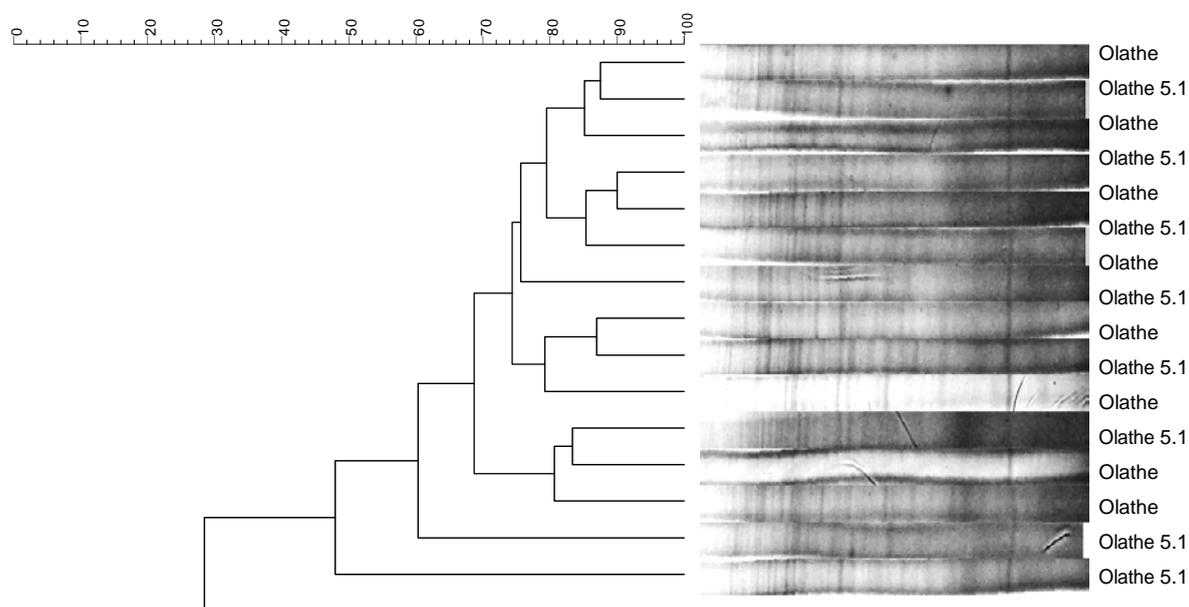


Figura VII.40. Perfil de DGGE a partir de amostras obtidas na rizosfera de plantas cultivadas na unidade experimental em Sete Lagoas – MG. O feijoeiro geneticamente modificado evento Embrapa 5.1 foi identificado no dendrograma como Olathe 5.1, e o convencional, somente como Olathe.



Dados semelhantes aos mostrados neste trabalho são encontrados na literatura em que foram demonstrados efeitos transitórios e temporários da atividade enzimática no solo e da estrutura bacteriana associada à rizosfera, não sendo, portanto, observados padrões de exsudação radicular (Rasche et al., 2006), ou efeitos variáveis entre os estágios de desenvolvimento da planta, como demonstrado para estrutura de perfis da comunidade bacteriana por Schmalenberger & Tebbe (2002) e Milling et al. (2004).

Atividade enzimática do solo

O resultado das avaliações da atividade enzimática medida em amostras de solo de Santo Antonio de Goiás, nos dois ensaios realizados em casa-de-vegetação, é mostrado na Figura VII.41. Não foi observada diferença estatística entre as amostras do feijoeiro transgênico Embrapa 5.1 e o convencional (Olathe) quanto as atividades das enzimas arilsulfatase (conjunto de enzimas do ciclo do enxofre), fosfatase ácida e β -glucosidase.

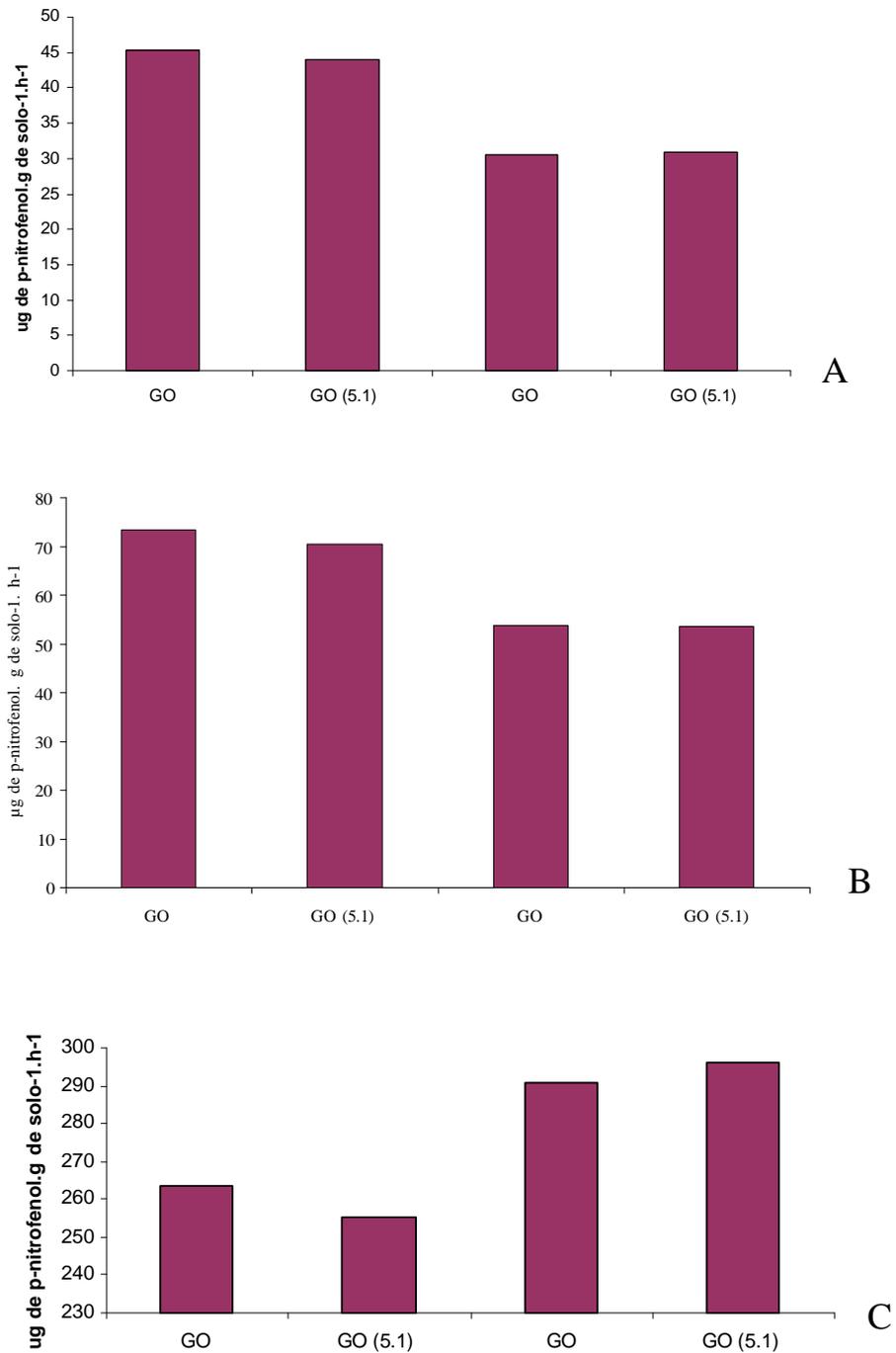


Figura VII.41. Resultados do teste de atividade enzimática (A) arilsulfatase, (B) beta-glucosidase e (C) fosfatase ácida em solo dos dois experimentos em vasos, em casa-de-vegetação, proveniente de Santo Antônio de Goiás.

O resultado da determinação das atividades enzimáticas do solo oriundo de Londrina -PR (Figura VII.42), após experimento em vasos, também não apresentou diferenças estatísticas na comparação do feijoeiro Embrapa 5.1 e seu parental não-GM.

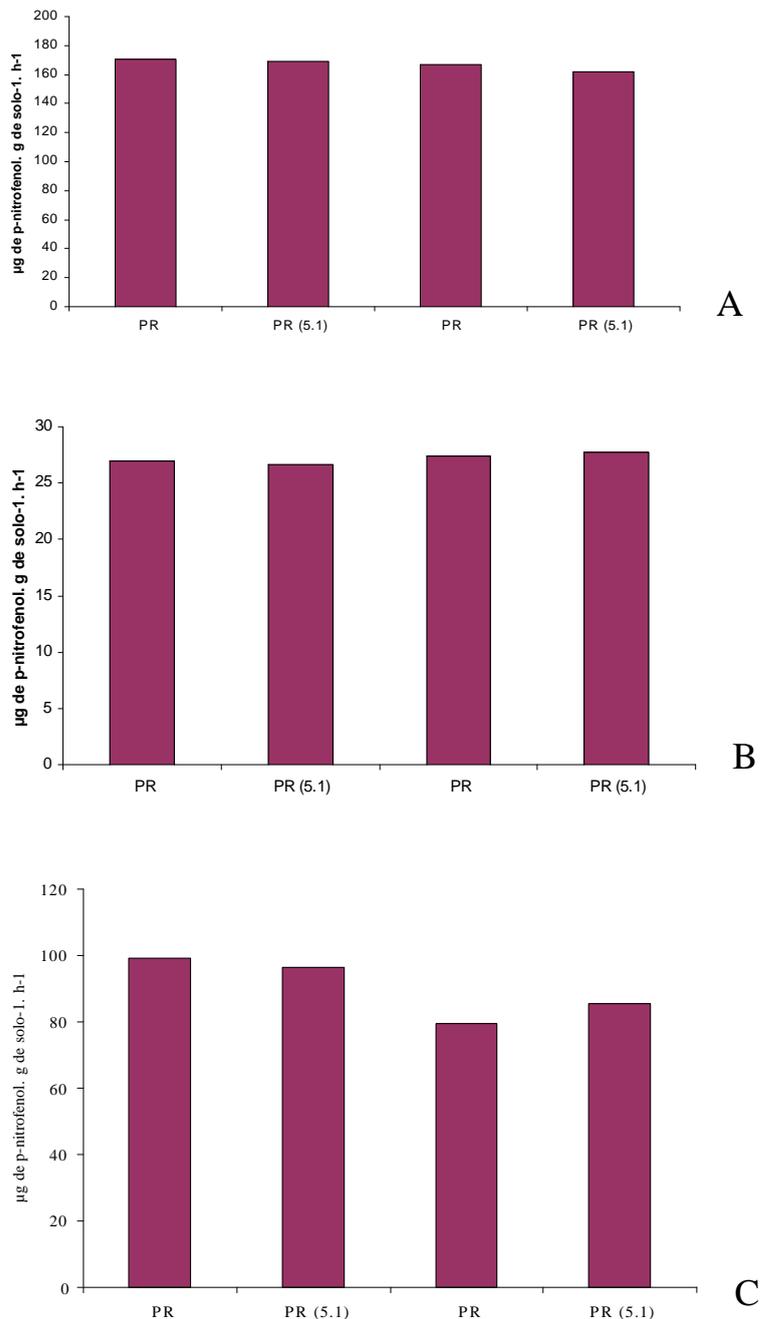


Figura VII.42. Resultados do teste de atividade enzimática (A) arilsulfatase, (B) beta-glucosidase e (C) fosfatase ácida em solo dos dois experimentos em vasos, em casa-de-vegetação, proveniente de Londrina. (PR= não GM; PR5.1= evento Embrapa 5.1)

O resultado da determinação das atividades enzimáticas do solo oriundo de Sete Lagoas - MG é mostrado na Figura VII.43, onde só foi possível notar diferença estatística na atividade da enzima beta-glucosidase, contudo este efeito não foi observado no segundo experimento com solo da mesma localidade. As atividades de fosfatase ácida e arilsulfatase não tiveram sua atividade afetada estatisticamente em função do cultivo do feijão geneticamente modificado.

A rizosfera é a porção do solo que sofre influência direta da planta por ocasião dos exudatos que a planta produz. Alterações nos padrões de atividade enzimática do solo representadas pelo grupo de enzimas denominadas, fosfatase ácida, beta-glucosidase e arilsulfatase, podem ocorrer em função da influência da planta sobre a atividade biológica de rizosfera.

Atividades de enzimas chaves do solo têm sido utilizadas para investigar a possível integração entre os processos bioquímicos e a qualidade do solo, refletida pelo status biológico do solo (Trasar-Cepeda et al., 1998; Vepsäläinen et al., 2001). As enzimas do grupo das beta-glicosidasas são produzidas por uma variedade de organismos, entre eles, animais, plantas, fungos e bactérias (Esen, 1993). A beta-glicosidase é uma enzima que atua na etapa final do processo de decomposição da celulose, pela hidrólise dos resíduos de celobiose (Tabatabai, 1994) e alterações em sua atividade podem ter, portanto, influência sobre a qualidade do solo. Entre os indicadores avaliados no trabalho de Chaer & Tótola (2007), a atividade da enzima beta-glicosidase ficou entre os mais sensíveis ao efeito do uso ou manejo do solo, em áreas com eucalipto. As fosfatases, representadas pela fosfatase ácida são enzimas envolvidas no ciclo do fósforo e as arilsulfatases enzimas relacionadas ao ciclo do enxofre. Pelos resultados encontrados nos estudos com as variedades de feijoeiro, pode-se concluir que a modificação genética para resistência ao vírus do mosaico dourado não implicou de forma sensível e consistente em alterações na planta capazes de influenciar atividades enzimáticas chaves na dinâmica de C, S e P, na região da rizosfera do feijoeiro.

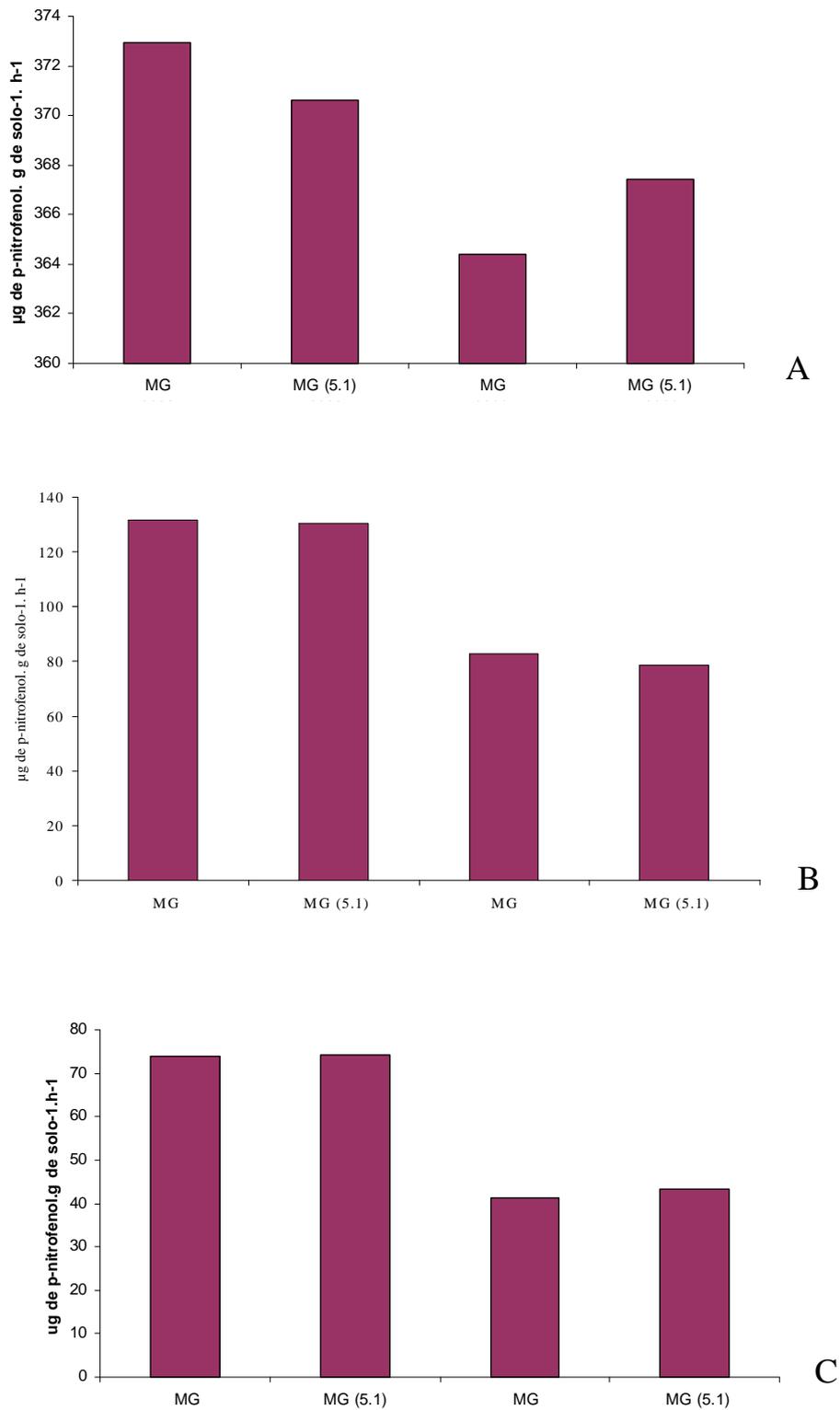


Figura VII.43. Resultados do teste de atividade enzimática (A) arilsulfatase, (B) beta-glucosidase e (C) fosfatase ácida em solo dos dois experimentos em vasos, em casa-de-vegetação, proveniente de Sete Lagoas. . (MG= não GM; MG5.1= evento Embrapa 5.1)

Biomassa microbiana e respiração basal do solo de rizosfera do feijoeiro

A biomassa microbiana, expressa pelo conteúdo de carbono microbiano determinado nas amostras de solo dos experimentos realizados em vasos (Tabela VII.32) e em campo (Tabela VII.33) em área de feijoeiro de Londrina, Santo Antonio de Goiás e Sete lagoas, foi relativamente pequena, em comparação ao observado em vários estudos feitos no País (Kaschuk et al., 2010). Apesar dos exsudados do feijoeiro estimularem a biomassa microbiana do solo, especialmente aquela relacionada a processos do ciclo de nitrogênio no solo (Hungria et al., 1997), o manejo convencional associado aos tratos culturais, especialmente o uso de herbicidas, como o Robust® usado na cultura, podem resultar em níveis de biomassa semelhantes aos aqui encontrados (Santos et al., 2006).

Tabela VII.32. Biomassa microbiana e respiração basal, como referência da atividade microbiana, determinadas em solo rizosférico oriundo de áreas de cultivo com plantas do evento GM (evento Embrapa 5.1) e seu parental Olathe (não-GM), crescidas por cerca de 40 dias, em solos provenientes de Londrina, Santo Antonio de Goiás e Sete Lagoas, em condição de casa-de-vegetação.

Genótipos	Biomassa microbiana						Respiração Basal					
	mg C/kg solo						< g C-CO ₂ /kg solo/h					
	Londrina		Sto Ant Goiás		Sete Lagoas		Londrina		Sto Ant Goiás		Sete Lagoas	
1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
Olathe	34,7b	76,5a	29,4a	32,7a	84,7a	53,3a	132,8a	136,9a	53,9a	86,0a	39,8a	77,0a
Embrapa												
5.1	52,7a	74,3a	32,0a	31,0a	62,2b	67,8a	113,8a	121,1a	62,1a	94,5a	41,3a	70,5a
CV (%)	34,6	23,3	60,6	47,9	23,6	47,0	33,6	35,4	33,3	27,5	12,2	73,4
Prob. (trat.)	0,049	0,851	0,783	0,829	0,036	0,341	0,390	0,513	0,425	0,545	0,563	0,580

Foram montados dois experimentos com cada um dos solos das diferentes localidades, identificados como 1 e 2, em função da data de plantio. Dados médios de 8 repetições. Médias seguidas de letras diferentes na coluna apresentam diferença significativa a 5% de probabilidade.

Tabela VII.33. Biomassa microbiana e respiração basal, como referência da atividade microbiana, determinadas em solo rizosférico oriundo de áreas de cultivo com plantas do evento GM (evento Embrapa 5.1) e seu parental Olathe (não-GM), crescidas por cerca de 40 dias, em experimentos de campo plantados no ano de 2009, em Londrina, Santo Antonio de Goiás e Sete Lagoas.

Genótipos	Biomassa microbiana			Respiração Basal		
	mg C/kg solo			µg C-CO ₂ /kg solo/h		
	Londrina	Sto Ant Goiás	Sete Lagoas	Londrina	Sto Ant Goiás	Sete Lagoas
Olathe Pinto	31,9a	43,0a	37,0a	134,1a	58,4a	124,1 ^a
Olathe 5.1	33,3a	41,7a	42,2a	146,9a	80,9a	126,8 ^a
CV (%)	39,3	26,0	39,6	19,0	27,8	20,9
Prob. (trat.)	0,828	0,816	0,183	0,373	0,053	0,838

Dados médios de 8 repetições. Médias seguidas de letras diferentes na coluna apresentam diferença significativa a 5% de probabilidade.

Nos estudos realizados em vasos, a comparação do conteúdo de carbono da biomassa microbiana do solo trouxe diferenças significativas entre os tratamentos, sendo superior para o solo plantado com o feijoeiro geneticamente modificado Embrapa 5.1 (Tabela VII.32). No entanto, essas diferenças foram observadas somente em um dos estudos realizados em solo de Londrina, e em outro, com solo de Sete Lagoas, não sendo mais observadas na segunda rodada de estudos com os mesmos solos. Nas amostras de solo retiradas dos ensaios em campo, em cada localidade, não se observaram diferenças entre tratamentos no conteúdo de carbono da biomassa microbiana (Tabela VII.33).

A atividade dos microrganismos do solo, representada pela respiração basal do solo, não foi diferente entre os tratamentos estudados, nem nos ensaios em vasos, nem nas amostras de solo de experimentos de campo realizados nas áreas de plantio do feijoeiro (Tabelas VII.32 e VII.33). Os níveis de respiração foram variáveis entre os ensaios em vasos e em campo, sendo mais elevados nos estudos feitos com solo de Londrina (Tabela VII.32), e também de Sete Lagoas, no caso dos ensaios em campo (Tabela VII.33). Os níveis de respiração basal encontrados foram semelhantes aos encontrados por Silva et al. (2007c) na fase de floração da cultura do feijoeiro, mas inferiores aos observados por D'Andrea et al. (2002), na fase final do ciclo da cultura ou posterior a colheita. A atividade respiratória do solo é resultado da maior atividade biológica, que por sua vez está relacionada diretamente com a quantidade de carbono

lável existente no solo (Follet & Schimel, 1989). O tempo de transporte e estocagem de amostras de solo das áreas experimentais em Londrina, Sete Lagoas e Santo Antonio de Goiás até a montagem dos ensaios em Seropédica, no Rio de Janeiro, associados ao preparo do solo, podem ter reduzido os níveis de carbono lábil do solo.

Apesar de diferenças observadas no conteúdo de biomassa microbiana entre as variedades do feijoeiro em dois dos seis experimentos em vasos, essas diferenças não se repetiram em ensaios com solos de mesma localidade e não foram observadas nos estudos em campo. A atividade biológica não foi alterada pelos tratamentos, seja nos ensaios em vasos ou em campo. Assim, pode-se afirmar com certa segurança que os resíduos do feijoeiro geneticamente modificado, sejam de raízes e nódulos senescidos, exsudados radiculares, ou mesmo resíduos de safras anteriores ainda existentes no solo, não trazem efeito na quantidade e na atividade de microrganismos no solo diferentes do que é observado com o feijoeiro comum.

VII.4. a capacidade de dispersão das estruturas de propagação e reprodução do OGM além das áreas de cultivo e os mecanismos de sua dispersão no ar, na água e no solo, fornecendo informações sobre a viabilidade do pólen da planta e indicando os agentes polinizadores potenciais e sua distribuição geográfica no Brasil

Polinização, reprodução e dispersão de estruturas reprodutivas em feijoeiro

São cultivados no Brasil o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e a fava (*P. lunatus* L.), espécies que foram introduzidas. Não há registros de espécies silvestres destes gêneros no Brasil, uma vez que não se trata de um centro de origem e diversidade genética (Debouck, 1988). A maioria das espécies do gênero *Phaseolus* são predominantemente autógamas, podendo ser observadas baixas taxas de cruzamento natural, que são geralmente consideradas irrelevantes. Isso se deve preponderantemente devido à morfologia floral. O feijoeiro apresenta flor perfeita, com pedicelo, cálice, corola, androceu e gineceu. A corola é pentâmera, com três pétalas livres e duas menores, soldadas na base, formando a denominada “quilha”, a qual protege os órgãos de reprodução. Englobada na quilha e seguindo as suas circunvoluções encontram-se os filamentos de nove estames fusionados e um livre, envolvendo o ovário. O pistilo tem um ovário com cinco a oito óvulos, podendo chegar a dez. O estilete é encurvado e o

estigma é achatado, ligeiramente deprimido. Os filamentos acompanham o estilete de tal modo que os sacos polínicos são comprimidos sobre o estigma. Assim, o pólen é liberado diretamente sobre a superfície estigmática, resultando na autopolinização (Bliss, 1980). Ainda de acordo com esse mesmo autor, a deiscência das anteras e autopolinização ocorrem em estágio tardio do desenvolvimento das flores, usualmente à noite, e o tubo polínico se desenvolve imediatamente. A deiscência dos sacos polínicos depende da maturação do pólen, sendo favorecida pela queda de umidade relativa do ar. As flores se abrem na parte da manhã, provavelmente em resposta à temperatura e à luz. Este tipo de flor favorece a autopolinização.

Mesmo apresentando essa estrutura, cruzamentos naturais entre indivíduos da mesma espécie podem ocorrer em baixas proporções, que variam em função da cultivar, do local, do clima, da população dos insetos polinizadores, morfologia floral e coincidência do período de floração (Barrons, 1939; Ramalho & Santos, 1982). Em estudos sobre o desenvolvimento das estruturas reprodutivas de *P. vulgaris*, Webster et al. (1977) observaram que algumas características morfológicas podem contribuir para a autopolinização do feijoeiro, tais como: proximidade das anteras e do estigma na fase de maturação; maturação quase simultânea do pólen e receptividade da superfície do estigma; e possivelmente pela posição e orientação dos pêlos estilares. Segundo estes autores, a presença de uma variação morfológica no pistilo de algumas flores da cultivar *Light Red Kidney* torna o estigma receptivo, em baixa frequência, mesmo após a abertura completa da flor. Tais flores estariam aptas a receber polinização cruzada através de abelhas e outros insetos.

Com relação à hibridização entre espécies de *Phaseolus*, o feijão comum dificilmente cruza com outras espécies. *P. lunatus*, ou feijão de lima, tem capacidade mais ampla de adaptação que o feijoeiro comum. É filogeneticamente a espécie mais distante de *P. vulgaris*. Apenas dois casos de sucesso foram relatados de cruzamentos (Zimmermann & Teixeira, 1996). Com o *P. acutifolius*, ou feijão tepari, também com dificuldade, pode-se obter cruzamentos interespecíficos. Por outro lado, *P. coccineus*, ou feijão “ayocote”, apresenta estigma exposto, proporcionando maior taxa de polinização cruzada dentro de sua espécie. Do cruzamento de *P. vulgaris* com outras espécies de *Phaseolus* (principalmente com *P. coccineus*), podem-se obter híbridos viáveis, utilizando-se *P. vulgaris* como fonte de citoplasma. Em todos estes casos, porém, a hibridização só foi possível com a assistência humana e ajuda laboratorial do

cultivo *in vitro* dos embriões, devido a problemas relacionados à incompatibilidade entre os embriões e o endosperma (Zimmermann & Teixeira, 1996).

Não há um consenso sobre quais espécies de insetos são mais significativas na polinização do feijoeiro. Muitos autores citam as abelhas como as principais espécies de insetos polinizadores da cultura (Stoetzer, 1984; Ibarra-Perez et al., 1997). Darwin afirmou que o movimento do pistilo, realizado pelo toque das abelhas, poderia contribuir na fertilização da flor pelo seu próprio pólen, mas não descreveu a espécie ou cultivar de feijão utilizada em seu estudo (Desmond & Moore, 1991). Ele generalizou que as flores perturbadas pelas abelhas produziram mais do que aquelas que não foram movimentadas pelos insetos. Taylor (1919) contestou estes resultados, afirmando que a polinização cruzada do feijoeiro pelas abelhas pode ocorrer, no entanto, a ausência destes insetos não prejudicaria a produção, já que pode ser obtida alta produção de feijão em casas de vegetação onde as abelhas não estão presentes. Free (1966) também considerou improvável que as abelhas tenham efeito significativo na produção de feijão, mesmo tendo comprovado que plantas de *P. vulgaris* conduzidas em gaiolas com abelhas produziram 21% a mais em peso de sementes e 6% a mais em peso de vagens, em comparação com as plantas conduzidas sem o contato das abelhas. Mommers (1971), citado por McGregor (1976), estudou a polinização de feijões cultivados *in vitro* e observou que as abelhas não influenciaram o desenvolvimento e a produção de *P. vulgaris*, concluindo que os resultados obtidos por Free (1966) foram influenciados por diferenças varietais. Em estudo desenvolvido por Santana et al. (2002) na região de Lavras, MG, muitas espécies de abelhas (especialmente *Paratrigona lineata*, *Trigona spinipes* e *Apis mellifera*) foram observadas visitando flores de feijoeiro, mas sua eficiência como polinizadores não foi avaliada neste trabalho. Mackie & Smith (1935) argumentaram que as abelhas visitantes em nenhum momento foram observadas forçando a abertura das flores de feijoeiro. Como as anteras do feijoeiro derramam o pólen antes da abertura da flor, estes autores concluíram que as abelhas não teriam condições de contribuir para a polinização cruzada do feijoeiro.

Outros autores afirmam que os insetos da ordem Thysanoptera, conhecidos como tripses, são os verdadeiros responsáveis pela polinização cruzada do feijoeiro no campo (Mackie & Smith, 1935; Antunes et al., 1973; Pereira Filho & Cavariani, 1984). Grande ocorrência de tripses da espécie *Frankliniella occidentalis* foi observada por Mackie & Smith (1935) em flores de feijoeiro. A discussão realizada por estes autores

está baseada no fato de que, como estes insetos se alimentam de partes das flores, incluindo o pólen e o néctar, e são capazes de perfurar os tecidos para atacar os órgãos sexuais, provavelmente teriam grande importância na ocorrência natural da polinização cruzada em feijoeiro. Observaram também ocorrência de grande número de tripes em uma única flor e concluíram que a competição por alimento poderia levar estes insetos a procurar outras flores, carregando, assim, grãos de pólen em seu corpo durante o vôo. Em contraste com as abelhas, os tripes geralmente entram no botão floral antes da abertura da flor, podendo, pois, afetar a autopolinização (Mackie & Smith, 1935). Park et al. (1996) observaram que todos os tripes encontrados dentro de botões florais estavam no estágio jovem, o que se traduz na possibilidade de que os ovos tenham sido colocados dentro da flor ou muito próximos dela. Apesar disso, estudos recentes com feijoeiro GM tolerante ao herbicida glifosinato de amônio mostraram baixas taxas de fecundação cruzada em experimentos realizados em Santo Antonio de Goiás (GO) e Londrina (PR), nos anos de 2004 e 2006, com taxas variando entre zero a 0.00741% (Faria et al., 2010).

Dados adicionais sobre polinização estão na seção VII.6. O feijoeiro cultivado é indeiscente e suas sementes são desprovidas de estruturas especiais para dispersão. Além disso, não possuem dormência e não permanecem viáveis no campo por um longo tempo.

VII.5. A possibilidade de formação de estruturas de reprodução de longo prazo no organismo parental

Embora não se espere qualquer alteração nas estruturas reprodutivas devido à expressão dos transgenes presentes no evento Embrapa 5.1, foram realizados ensaios de germinação após tratamento para mimetizar o envelhecimento das sementes (teste de envelhecimento acelerado). O teste de envelhecimento acelerado baseia-se no aumento da taxa de deterioração das sementes, pela sua exposição a fatores ambientais de maior influência na intensidade e velocidade de germinação, como níveis elevados de temperatura e umidade relativa do ar. Os resultados nos permitiram concluir que não houve variação significativa dos valores de germinação entre Olathe e Embrapa 5.1 após envelhecimento acelerado a 42°C por 72h e em sílica gel a 42°C por 72 h (Figura

VII.44). Embora tenha-observado uma perda no vigor germinativo após os tratamentos, não foram observadas diferenças fenotípicas nas plântulas de Embrapa 5.1 quando comparadas com o parental Olathe.

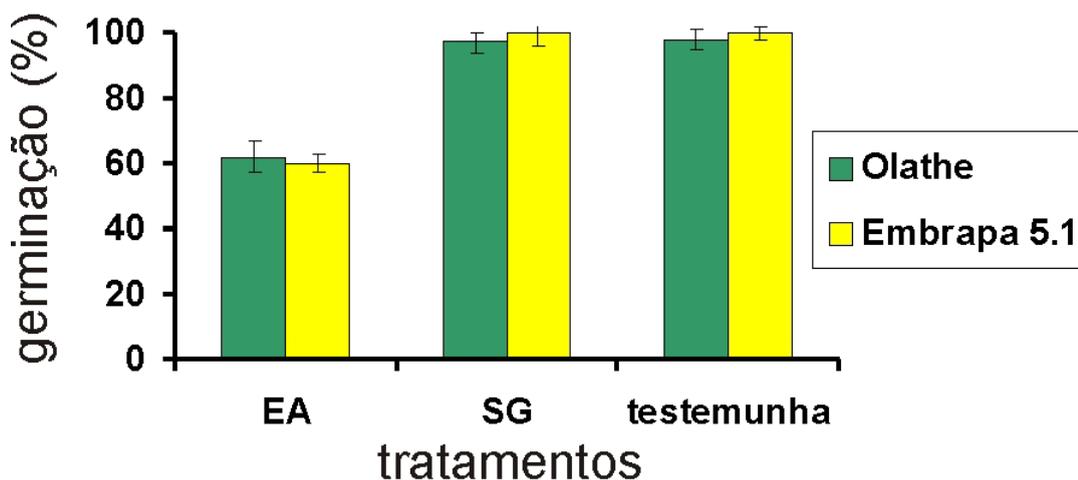


Figura VII.44. Porcentagens de germinação de sementes de feijão do evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe antes (testemunha) e após diferentes tratamentos. EA- envelhecimento acelerado; SG- envelhecimento em sílica gel. Não se observou diferença estatisticamente significativa entre Embrapa 5.1 e seu parental Olathe ($p \leq 0.05$).

VII.6. Frequência com que ocorre o cruzamento do organismo parental do OGM, dentro da mesma espécie e com espécies sexualmente compatíveis, arrolando as espécies avaliadas, as técnicas utilizadas e os efeitos resultantes

Fluxo gênico em feijoeiro

Apesar de o feijoeiro ser uma planta predominantemente autógama, taxas de polinização cruzada foram registradas em diversos trabalhos desenvolvidos em diferentes regiões, com uso de marcadores morfológicos, principalmente a cor das flores, do hipocótilo e dos grãos. Ibarra-Perez et al. (1997) observaram que altas taxas de cruzamento em *P. vulgaris* podem ocorrer ocasionalmente, variando em função da cultivar avaliada, da população de insetos polinizadores e dos fatores ambientais, como o local, ano e época de cultivo (Ortega, 1974; Park et al., 1996). Estudos desenvolvidos

por Barrons (1939) no Alabama (EUA) registraram de 2,63 a 8,26% de polinização cruzada em *P. vulgaris*, enquanto Pereira Filho & Cavariani (1984) observaram uma média de 1,0 % de hibridação natural em feijoeiro comum em Patos de Minas, MG. A maioria dos trabalhos, no entanto, reportam taxas de cruzamento natural em feijoeiro bem menores do que estas. Entre os que registraram as menores taxas, Tucker & Harding (1975) observaram uma variação de 0 a 0,007% de polinização cruzada em experimentos realizados na Califórnia. No Brasil, Vieira (1960) obteve de 0,18 a 0,70% na proximidades de Viçosa, MG, e Pacova & Rocha (1975) observaram valores entre 0,18 e 0,35% de hibridação natural em *P. vulgaris* nas proximidades de Linhares, ES. Ferreira et al. (2007) estudaram o fluxo gênico da cultivar Diamante Negro para a cultivar BRS Talismã, em Coimbra, MG. Em média, os autores observaram maiores valores de polinização cruzada (0,135%) quando utilizaram menores espaçamentos, ou seja, mais próximo da cultivar fonte (até 1 m de distância). A partir da distância de 3,25 m da fonte, a taxa de cruzamento natural reduziu-se e estabilizou em 0,0045%. Esta foi a distância necessária de isolamento para evitar o fluxo gênico. A relação entre a taxa de cruzamento natural em *P. vulgaris* e o espaçamento entre linhas de plantio também foi avaliada por Antunes et al. (1973), que relacionaram as taxas mais baixas aos espaçamentos maiores. Estes resultados discordaram dos obtidos anteriormente por Alan & Moh (1966), em Alajuela (Costa Rica), que observaram taxas de 0,2 e 0,19% de cruzamento, respectivamente, para os espaçamentos de 50 e 100 cm entre linhas e 0,05% de cruzamento para o menor espaçamento, de 25 cm. Estes autores justificaram que o espaçamento de 25 cm reduziu a área de exposição dos parentais maternos à visitação dos insetos polinizadores, resultando em uma menor taxa de polinização cruzada. Alguns autores avaliaram o efeito de diferentes épocas de cultivo sobre a ocorrência de cruzamento natural em *P. vulgaris*. Ortega (1974) obteve médias maiores no cultivo da época das chuvas (0,49%), em comparação com a época seca (0,22%), em cinco anos de plantio em Aragua (Venezuela). No Brasil, resultados semelhantes foram obtidos por Royer et al. (2002) em Maringá (PR), que estimaram valores médios entre 0,71 e 1,66% de polinização cruzada em *P. vulgaris* e registraram taxas maiores na época das chuvas (1,34% para a cultivar Pérola). Em Campinas (SP), Pompeu (1963) observou taxas de cruzamento semelhantes nas épocas da seca de 1959 (1,26%) e das chuvas de 1961 (1,33%), mesmo considerando que as condições climáticas fossem bem distintas nas duas épocas de semeio e pudessem interferir nas populações de insetos

polinizadores. Brunner & Beaver (1989), em Isabela (Porto Rico), observaram taxas de cruzamento mais altas no plantio da época das chuvas (13,3%), em comparação com o plantio de dezembro (5,0%). Outro tipo de marcadores utilizado para estimar a polinização cruzada em feijoeiro comum foram as proteínas das sementes, que permitiram a Ferreira et al. (2000) a seleção de um número relativamente alto de marcadores co-dominantes, possibilitando a identificação de todos os possíveis híbridos entre as cultivares. Este estudo, desenvolvido em Asturias (Espanha), estimou em 0,74% a média de polinização cruzada para as quatro cultivares de *P. vulgaris* avaliadas. Em nenhum dos estudos relatados foi analisada a progênie em F₂, a fim de certificar-se de que realmente se tratava de polinização cruzada, excluindo qualquer possibilidade de mistura varietal. Mesmo assim, é possível concluir que a ocorrência de fluxo gênico no feijoeiro comum é um fenômeno pouco freqüente. No Brasil, a recomendação oficial de isolamento de um campo de produção de sementes de feijoeiro é de 3 m, compatível com os dados experimentais (Vieira & Rava, 2000).

Estudos foram conduzidos para avaliar o fluxo gênico com feijoeiro geneticamente modificado transformado com o gene bar, que confere tolerância ao herbicida glifosinato de amônio (GA). Esse marcador seletivo possibilita quantificar o fluxo gênico entre plantas GM e não-GM de uma mesma cultivar. Os resultados de três anos de avaliações em dois lugares do Brasil mostram que o fluxo gênico ocorreu em uma freqüência muitíssimo baixa, não chegando a ser observada em alguns casos a uma distância de 1 a 10 metros da fonte de pólen (Tabela VII.34) (Faria et al., 2010). Quando o fluxo gênico foi observado, ocorreu apenas até uma distância de 6,5m da fonte de polens. Além disso não foi observada uma prevalência na direção para os eventos de fecundação cruzada (Faria et al., 2010).

Tabela VII.34. Avaliação de plantas da geração F₁ para verificação de fluxo gênico entre feijoeiros GM e seu parental não-GM. Fonte: adaptado de Faria et al. (2010).

Cultivar/ano	No. de plantas avaliadas	Plantas tolerantes ao GA	Fluxo gênico
Olathe/2004 ^a	36.025	0	0%
Olathe/2005 ^a	37.156	0	0%
Olathe/2006 ^a	10.489	0	0%
Pérola/2006 ^a	99.738	7	0.0070%
Pérola/2006 ^b	21.709	2	0.0092%

^a Experimento realizado em Santo Antônio de Goiás, GO; ^b Experimento realizado em Londrina, PR.

VII.7. Efeitos resultantes da transferência horizontal para a microbiota do solo, caso ocorra

A transferência de genes entre reinos é limitada por combinações físicas, biológicas, genéticas e ambientais. Isso faz com que, em decorrência deste fato, tal evento ocorra de forma extremamente rara durante a história evolucionária (Richards et al., 2009). Antes que o gene de uma planta transgênica possa ser expresso em bactérias, são necessários vários eventos, como liberação de genes durante a degradação da célula da planta; a persistência do DNA no solo por vários meses (Bertolla et al., 1999) presença de bactérias transformáveis (Bertolla et al., 2000a); incorporação do transgene no DNA bacteriano e expressão do gene na bactéria. Condições ambientais do solo, como nutrientes disponíveis, umidade, pH e temperatura são importantes para que a bactéria possa desenvolver um estado de competência fisiologicamente ativa. Outros fatores incluem a homologia de recombinação (De Vries et al., 2001), o número de cópias do transgene, o tamanho do genoma da planta, e a relação entre o transgene e o genoma inteiro da planta (Bertolla et al., 2000b). A transferência pode ser eficiente somente quando houver homologia em pelo menos várias centenas de nucleotídeos (Palmen et al., 1993; De Vries et al., 2001; Meier & Wackernagel, 2003). Fatores como competição, predação e interação com outros organismos também devem ser considerados (Kay et al., 2002, 2003).

O DNA liberado no solo é um potencial alvo de nucleases podendo afetar a sua persistência (Blum et al., 1997; Gebhard & Smalla, 1999). É também protegido pela rápida ligação em material sólido, como argila, quartzo, feldspato, metais pesados, ácidos húmicos (Lorenz & Wackernagel, 1994). As frequências de transferências na maioria dos solos, se ocorrerem, são certamente muito baixas, devido à incapacidade das bactérias desenvolverem estado de competência e à sucessão de muitas barreiras seletivas (Bertolla et al., 2000b).

Foi mostrado, sob condições otimizadas em laboratório, que um gene de resistência à canamicina (*nptII*) integrado no DNA de plantas transgênicas poderia transformar *Acinetobacter* sp. e tornar esta bactéria resistente ao antibiótico (Gebhard & Smalla, 1998). Outro estudo envolvendo o gene de resistência à canamicina (*nptII*) foi estudado por Friedrich & Passaglia (2004). Eles investigaram a possibilidade de

transferência de DNA de plantas de tabaco transgênicas, contendo este gene, para a bactéria *Azospirillum brasilense* (bactéria fixadora de nitrogênio). Observaram também a ocorrência de possíveis alterações em genes envolvidos em processos fisiológicos importantes, como a fixação biológica de nitrogênio. A avaliação ocorreu num período de 12 meses de contato da bactéria com a planta de tabaco, cobrindo todo o ciclo de vida da planta. Foram realizadas análises de PCR e Southern blot e nenhuma banda referente ao gene *nptII* foi encontrada. Além disso, as bactérias foram espalhadas em placas contendo canamicina e não foram observadas colônias. Este evento de transferência de genes não era esperado, uma vez que o gene marcador utilizado está sob o controle de um promotor eucariótico, o qual não é reconhecido pela maquinaria de transcrição procariótica. Não ocorreram também alterações fenotípicas nas bactérias submetidas ao contato com plantas transgênicas.

Nielsen et al. (2000) relataram a existência de transferência de genes temporária, *in vitro*, entre o DNA de plantas de beterraba geneticamente modificadas com o gene *nptII* e bactérias do gênero *Acinetobacter*. Porém, o trabalho concluiu que as condições testadas não refletiam as condições reais e que seria extremamente improvável que uma transferência dessa ordem ocorresse em condições naturais. Uma das causas dessa impossibilidade seria a necessidade de homologia entre os DNAs que irão recombinar, ou seja, o da planta com o da bactéria. Além disso, uma vez liberado no solo, o DNA das plantas é rapidamente degradado pelos compostos presentes no solo, dificultando muito a fixação de seus genes nos genomas bacterianos (Azevedo & Araújo, 2003; Nielsen & Townsend, 2004; Van Den Eede et al., 2004).

A transferência horizontal de genes (THG) também foi estudada entre bactérias patogênicas (*Erwinia chrysanthemi*) e batatas transgênicas (*Solanum tuberosum*) contendo um gene de resistência a ampicilina (*neo*). O sistema adotado oferece ótimas condições de detecção de possível transferência de genes, mesmo quando ocorrem em muito baixa frequência. Não foi detectada a THG em condições de infecção natural. A frequência de transferência natural calculada estudada pelos autores foi realizada até o limite de 2.0×10^{-17} . Os dados desse trabalho afirmam que transferência horizontal do gene, se é que ocorre, é tão rara que seria irrelevante a avaliação do risco envolvido na liberação das plantas transgênicas (Schluter et al., 1995).

Donegan et al. (1999) realizaram um experimento de campo com plantas de alfafa geneticamente transformadas com o gene da α -amilase ou com o gene da lignina

peroxidase em associação com linhagens de *Sinorhizobium meliloti* do tipo selvagem ou contendo genes de resistência aos antibióticos espectinomina e estreptomicina ou elevada atividade de fixação de nitrogênio. Não foram observadas alterações nos microorganismos em relação ao convívio ou não com as plantas geneticamente modificadas.

Outro estudo, envolvendo plantas de *Lotus japonicum* transformadas com o gene da glutamina sintetase (GS) de alfafa mostrou o dobro de atividade de GS em nódulos contendo a bactéria fixadora de nitrogênio *Mesorhizobium loti*. Observou também atividade de GS nas raízes similar à atividade de GS observada nas plantas não transformadas, indicando que a presença desse gene aumentou a interação com as bactérias presentes nos nódulos das raízes das plantas (Suarez et al., 2003), porém, não houve indícios de transferência de genes da planta transgênica para a bactéria.

Alguns estudos analisaram a transferência horizontal de genes, entre plantas transgênicas e microorganismos, sob condições de laboratório e experimentos de campo. Na maioria dos experimentos a transferência não foi detectada. Estudando a interação entre plantas de tabaco transgênicas e o patógeno de plantas *Agrobacterium tumefaciens*, Broer et al. (1996) não detectaram a transferência de genes entre as plantas e o patógeno. Outro experimento com tabaco transgênico e bactérias do solo também não mostrou a transferência, mesmo após um ano de interação (Paget & Simonet, 1994). Beterraba transgênica foi utilizada em experimentos de campo e não se observou a transferência de genes para as bactérias do solo (Gebhard & Smalla, 1999).

A *Ralstonia solanacearum* é uma bactéria patogênica que apresenta estado de competência natural para transformação durante a interação com o hospedeiro (Bertolla et al., 1999). Inicialmente o DNA da planta foi liberado próximo das bactérias e foram construídas e testadas várias combinações de plantas transgênicas e das bactérias para mostrar que a eficácia de tais transferências esteve relacionada diretamente à relação da complexidade do genoma da planta e número de cópias do transgene (Bertolla et al., 2000a). Para ocorrer a transferência horizontal de uma planta para *Ralstonia solanacearum* são necessárias condições ótimas, e não foram observadas em condições naturais ou experimentais. Porém, se essa transferência ocorrer, deverá ser em frequências muito baixas (Bertolla et al., 1999).

Em comunidades microbianas do solo existem oportunidades de interação com produtos gênicos de plantas. Após a colheita, a decomposição da planta pode liberar

proteínas e fragmentos de ácidos nucleicos no ambiente do solo (Donegan et al., 1999). De acordo com os tratos culturais utilizados, esse material pode ficar concentrado na superfície ou serem incorporados no solo, diluindo a concentração dos produtos gênicos, mas aumentando o número de organismos expostos a eles (Angle 1994; Dunfield & Germida, 2004).

A possibilidade de transferência gênica horizontal de plantas para microrganismos foi extensivamente investigada por vários grupos (Nap et al., 1992; Gebhard & Smalla, 1998; Nielsen et al., 2000; De Vries et al., 2001; De Vries & Wackernagel, 2002; Kaldorf et al., 2002). O impacto de eventos de THG dependerá do número de fatores ambientais e, o mais importante, da vantagem seletiva para a população microbiana (Van Den Eede et al., 2004). Geralmente, os promotores funcionais em plantas têm pouca ou nenhuma atividade nas células procarióticas (Lewin et al., 1998).

Os trabalhos com metodologias apropriadas e reconhecidas pela comunidade científica não têm demonstrado transferência horizontal de planta transgênicas para microrganismos em condições naturais, embora isso possa ser observado em condições ótimas estabelecidas artificialmente. Se ocorrer transferência de genes de plantas transgênicas para bactérias, essa frequência deverá ser muito baixa (Paget & Simonet, 1994; Schluter et al., 1995; Broer et al., 1996; Nielsen et al., 1998; Gebhard & Smalla, 1999; Dröge et al., 2000; Kaldorf et al., 2000; Smalla et al., 2000; Friedrich & Passaglia, 2004; Ishii & Meng-Zhu, 2008) e é improvável que os genes de resistência a antibióticos usados como marcadores em plantas transgênicas contribuirão significativamente para a propagação da resistência em populações bacterianas. Não há dúvidas que os problemas atuais na medicina humana e veterinária, resultando da pressão seletiva sobre as comunidades microbianas, foram criados pelo uso irrestrito dos antibióticos em tratamentos na medicina humana e animal, e não pelas plantas transgênicas que possuem marcadores de resistência a antibióticos (Smalla et al., 2000).

No evento Embrapa 5.1 não há genes de resistência a antibióticos funcionais, o que dificultaria a premissa de uma possível seleção em caso remoto de transferência horizontal. Além disso não há outro transgene presente nesse evento que possa conferir uma vantagem seletiva a outros tipos celulares, inclusive em microorganismos. Os dados obtidos, em condições de campo, sobre o impacto do evento Embrapa 5.1 sobre



microrganismos e microfauna do solo não detectaram qualquer alteração nesses organismos (seção VII.3).

VII.8. Impactos negativos e positivos aos organismos alvo e não-alvo que poderão ocorrer com a liberação do OGM, arrolando as espécies avaliadas, as razões da escolha e as técnicas utilizadas para demonstrar os impactos

O evento Embrapa 5.1 é uma tecnologia que visa o controle do mosaico dourado em condições de campo. Não possui tolerância empregável biologicamente a moléculas biocidas. Portanto não será possível a utilização do feijoeiro Embrapa 5.1 como parte de uma estratégia para controle de plantas daninhas. Esse evento também não possui qualquer gene com potencial biocida. Não há genes potencialmente causadores de efeitos sobre fungos, bactérias, insetos e outros animais do filo Arthropoda. Portanto, com o cultivo do evento Embrapa 5.1 não haverá alteração no manejo de plantas daninhas e organismos que se constituem em pragas para o cultivo do feijoeiro, tais como artrópodes, moluscos, nematóides, fungos, bactérias, micoplasmas e outros.

A estratégia utilizada para obtenção de plantas resistentes ao BGMV não se constitui de ferramentas que inviabilizem partículas virais, mas sim a de evitar a replicação do genoma viral e conseqüentemente evitar a multiplicação das partículas virais. Como conseqüência as plantas do evento Embrapa 5.1 em homozigose permanecem sadias mesmo em presença de moscas brancas virulíferas.

Ainda assim, foram realizados vários ensaios para verificar impactos negativos e positivos a vários organismos não-alvo que poderão interagir com o feijoeiro em condições de campo. Esses ensaios foram apresentados na seção VII.3 desse documento. Foram escolhidos aqueles organismos que interagem com o feijoeiro de forma mais freqüente ou que são importantes para o seu cultivo, por terem impactos negativos ou positivos.

VII.9. As modificações da capacidade da planta em adicionar ou remover substâncias do solo, em decorrência da introdução de novas características, descrevendo possíveis alterações físicas e químicas no solo e contaminação dos corpos d'água adjacentes resultantes das interações com o OGM, comparativamente aos sistemas convencionais.

Embora a modificação genética realizada no evento Embrapa 5.1 não esteja correlacionada com alterações da adição ou remoção de substâncias do solo, foram realizados experimentos para verificar diferenças na absorção de nutrientes. Os experimentos buscaram avaliar o desempenho das plantas em condições de alta e baixa fertilidade do solo. As condições de baixa fertilização foram geradas com 1 g de fertilizantes (5-30-15) por kg de solo e as condições de alta fertilização foram geradas com 2 g de fertilizantes (5-30-15) por kg de solo. Foram medidos o rendimento de grãos, número de vargens por planta e número de sementes por vargens. Os resultados mostram que houve uma diferença significativa em plantas mantidas em alto ou baixo níveis de fertilização do solo (Tabela VII.35). A análise de variância mostrou que massa seca foi significativamente influenciada pelo tratamento do genótipo (Tabela VII.35). No entanto, o rendimento de grãos e vagens por planta foram significativamente influenciados pelos tratamentos de fertilização. Não se observou qualquer diferença significativa entre os eventos GM e os seus parentais.

Tabela VII.35. Influência da fertilidade do solo sobre o peso seco de brotos, rendimento de grãos e vagens por planta em genótipos de feijoeiro Embrapa 5.1, seu parental Olathe e seus derivados.

Fertilidade/genótipo	Massa seca de brotos (g planta ⁻¹)	Rendimento de grãos (g planta ⁻¹)	Vagens (planta ⁻¹)
Baixa fertilidade	6,39a	10,06b	8,47b
Alta fertilidade	6,87a	15,58 ^a	14,93 ^a
Olathe	4,57c	12,07 ^a	11,25 ^a
Olathe Embrapa 5.1 ¹	5,23bc	11,22 ^a	10,12 ^a
Pérola	7,05abc	12,32 ^a	13,08 ^a
Pérola Embrapa 5.1 ¹	8,49a	14,47 ^a	12,66 ^a
Pontal	6,56abc	11,34 ^a	10,04 ^a
Pontal Embrapa 5.1 ¹	7,88ab	15,51 ^a	13,04 ^a
Média	6,63	12,82	11,69
Teste-F			
Fertilidade	NS	**	**
Genótipo	**	NS	NS
CV (%)	30,15	43,64	38,78

¹Genótipos geneticamente modificados (GM). **, NS Significante a 1% de probabilidade e não-significante, respectivamente. Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey com nível de 5% de probabilidade.

De forma similar, observou que o número de sementes por vagem foi influenciado tanto pela fertilidade do solo quanto pelo genótipo (Tabela VII.36). Com alta fertilidade o peso das sementes foi maior em plantas cultivadas em solo de alta fertilidade. No entanto não se observou diferença entre os eventos GM e não-GM, tanto para Olathe quanto para as linhagens derivadas.

Tabela VII.36. influencia da fertilidade de solos e genótipos sobre o numero de sementes por vagem e pelo de 100 sementes no evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe e suas linhagens derivadas.

Fertilidade/genótipo	Sementes por vagem	Peso de 100 sementes (g)	
		Baixa fertilidade	Alta fertilidade
Baixa fertilidade	4,00a	-	-
Alta fertilidade	3,60b	-	-
Olathe	3,30b	31,36ab	33,13 ^a
Olathe Embrapa 5.1 ¹	3,12b	34,32a	35,20 ^a
Pérola	3,30b	23,75c	32,66 ^a
Pérola Embrapa 5.1 ¹	3,71b	32,85a	30,68 ^a
Pontal	4,46a	26,15bc	24,39b
Pontal Embrapa 5.1 ¹	4,90a	26,11bc	23,06b
Mean	3,79	29,09	29,85
F-Teste			
Nível de fertilidade	**	NS	
Genótipo (G)	**	**	
CV (%)	10,72	9,05	

¹Genótipos geneticamente modificados (GM). **, NS Significante a 1% de probabilidade e não-significante, respectivamente. Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey com nível de 5% de probabilidade.

Foram estudados o comportamento do evento Olathe Embrapa 5.1 (e seus derivados), comparado ao parental Olathe quanto ao índice de grãos colhidos, comprimento da raiz (Tabela VII.37); peso seco de raízes e comprimento específico de raízes (Tabela VII.38). Embora tenha-se observado que a fertilidade e o genótipo tenham significativamente influenciado essas medidas, não se observou diferenças entre os eventos GM e não-GM, quer para Olathe quanto para os seu derivados (Tabela VII.37 e Tabela VII.38; Figura VII.45).

Tabela VII.37 Influencia da fertilidade do solo e dos genótipos de feijoeiros Olathe Embrapa 5.1 e seus derivados sobre o índice de grãos colhidos e o comprimento máximo das raízes

Genótipo	Índice de grãos colhidos		Maximo comprimento das raízes (cm)	
	Baixa fertilidade	Alta fertilidade	Baixa fertilidade	Alta fertilidade
Olathe	0,65a	0,75a	23,00b	31,25 ^a
Olathe Embrapa 5.1 ¹	0,63a	0,68a	25,50ab	27,25 ^a
Pérola	0,45a	0,73a	43,50 ^a	27,25 ^a
Pérola Embrapa 5.1 ¹	0,51a	0,68a	31,00ab	28,75 ^a
Pontal	0,67a	0,58a	35,75ab	27,25 ^a
Pontal Embrapa 5.1 ¹	0,63a	0,66a	34,00ab	28,00a
Média	0,59b	0,68a	32,12 ^a	28,29 ^a
F-Teste				
Fertilidade	**		NS	
Genótipo	NS		NS	
CV (%)	17,77		23,65	

¹Genótipos geneticamente modificados (GM). **, NS Significante a 1% de probabilidade e não-significante, respectivamente. Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não são significativamente diferentes pelo teste de Tukeys com nível de 5% de probabilidade.

Tabela VII.38. Influência da fertilidade do solo e dos genótipos de feijoeiros Olathe Embrapa 5.1 e seus derivados sobre o peso seco de raízes e comprimento específico de raízes

Fertilidade/genótipo	Comprimento específico de raiz (cm g ⁻¹)	Peso seco de raízes (g planta ⁻¹)	
		Baixa fertilidade	Alta fertilidade
Baixa fertilidade	77,22a		
Alta fertilidade	62,25b		
Olathe	83,13ab	0,25c	0,42ab
Olathe Embrapa 5.1 ¹	80,60abc	0,30c	0,39b
Pérola	49,48bc	0,86a	0,57ab
Pérola Embrapa 5.1 ¹	45,63c	0,68b	0,68 ^a
Pontal	73,71abc	0,40c	0,52ab
Pontal Embrapa 5.1 ¹	85,86a	0,39c	0,38b
Média	69,73	0,48a	0,49 ^a
Teste-F			
Fertilidade	*	NS	
Genótipo	**	**	
CV (%)	34,04	20,81	

¹Genótipos geneticamente modificados (GM). **, NS Significante a 1% de probabilidade e não-significante, respectivamente. Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não são significativamente diferentes pelo teste de Tukeys com nível de 5% de probabilidade.

Não se observou diferença na morfologia e no crescimento das raízes de plantas do evento Olathe Embrapa 5.1 e seu parental Olathe, quando cultivadas em solos com baixa ou alta fertilidade (Figura VII.45).



Figura VII.45. Crescimento de raízes de plantas do evento Olathe Embrapa 5.1 (Olathe 5.1) e de seu parental Olathe (Olathe Pinto) quando cultivadas em solos de baixa (esquerda) ou alta fertilidade (direita).

Coletivamente os dados mostram que não houve diferença significativa no fenótipo de plantas do evento Embrapa 5.1 quando comparadas ao parental Olathe. Observou-se uma diferença no peso de 100 sementes e peso seco de raízes entre linhagens derivadas do evento Embrapa 5.1 após cruzamento com a cv. Pérola. Isso é esperado e pode ser explicado pelo fato de as linhagens não serem isogênicas nessa etapa da análise.

VII.10. Possíveis modificações da biodegradabilidade da planta GM, comparativamente ao genótipo parental;

Em um contexto da produção vegetal, a definição restrita de resíduos agrícolas se emprega como determinação de resíduos da colheita. Ou ainda, as sobras da colheita, a fração de um cultivo em que não se organiza a colheita propriamente dita e ou aquela

parte da colheita que não satisfaz com os requisitos da qualidade mínima para ser comercializada como tal. No cultivo do feijoeiro no Brasil são adotadas diversas as práticas agrônômicas pós-colheita. Na maioria delas os tecidos remanescentes voltam a ser incorporados no solo. Com o tempo esse material é degradado pela microflora do solo e se transforma em componentes inorgânicos elementares que são então incorporados ao solo ou à atmosfera. Os fenômenos biológicos abrangem duas atividades fundamentais interdependentes, que são a síntese dos compostos orgânicos e a biodegradação destes compostos. A biodegradação é a decomposição de um material em componentes mais simples por organismos vivos, em que este processo biológico envolve dois fatores essenciais, que é a nutrição e a respiração.

Os microrganismos fazem uso da matéria orgânica constituída de um resíduo, seja ele sólido ou líquido, servindo-se de uma boa parte desta para a sua autoconstrução e reprodução. O restante é oxidado por meio da respiração, aproveitando sua energia e compensando ao meio, elementos na forma de subprodutos do seu metabolismo. Desta maneira, carbono, nitrogênio e fósforo, etc, que faziam parte das moléculas orgânicas dos resíduos, são devolvidas ao meio (ar, água, solo) na forma de compostos mais simples, como gás carbônico, fosfatos, nitratos, etc.

Os tecidos vegetais são compostos principalmente de polímeros, como carboidratos de armazenamento (como amido etc.), carboidratos estruturais (lignina, celulose etc.), proteínas, lipídeos, sais minerais e água. Assim, as substâncias da composição centesimal (proteínas, carboidratos, lipídeos, umidade, cinzas) e as fibras dos tecidos vegetais são os componentes que mais se incorporam ao solo ao final do período de cultivo. Não foram inseridos no genoma do feijoeiro Embrapa 5.1 qualquer gene com expectativa de que cause alteração na composição das moléculas que compõem sua constituição ao que alterem a biologia microbiana dos organismos envolvidos com a biodegradabilidade da matéria vegetal produzida durante o cultivo. Foram realizadas análises de composição em tecidos vegetais do evento de feijoeiro Embrapa 5.1 (composição centesimal) (seção VI.3). Os dados obtidos mostraram que os principais componentes dos tecidos vegetais presentes no evento de feijoeiro Embrapa 5.1 são equivalentes aos do parental Olathe e de outros feijoeiros cultivados no Brasil. Também não foram observadas alterações na atividade de enzimas envolvidas de resposta ao estresse oxidativo nos tecidos foliares do evento Embrapa 5.1 (seção VII.13).

Estudos da atividade enzimática do solo no qual foram cultivados o evento Embrapa 5.1 em distintas regiões do Brasil não permitiram observar diferença estatística entre as amostras do feijoeiro transgênico Embrapa 5.1 e o convencional (Olathe) quanto as atividades das enzimas arilsulfatase (conjunto de enzimas do ciclo do enxofre), fosfatase ácida e β -glucosidase (seção VII.3). A rizosfera é a porção do solo que sofre influência direta da planta por ocasião dos exudatos que a planta produz. Alterações nos padrões de atividade enzimática do solo representadas pelo grupo de enzimas denominadas, fosfatase ácida, beta-glicosidase e arilsulfatase, podiam ocorrer em função da influência da planta sobre a atividade biológica de rizosfera. Atividades de enzimas chaves do solo têm sido utilizadas para investigar a possível integração entre os processos bioquímicos e a qualidade do solo, refletida pelo status biológico do solo (Trasar-Cepeda et al., 1998; Vepsäläinen et al., 2001). As enzimas do grupo das beta-glicosidasas são produzidas por uma variedade de organismos, entre eles, animais, plantas, fungos e bactérias (Esen, 1993). A beta-glicosidase é uma enzima que atua na etapa final do processo de decomposição da celulose, pela hidrólise dos resíduos de celobiose (Tabatabai, 1994), e alterações em sua atividade podem ter, portanto, influência sobre a qualidade do solo. Entre os indicadores avaliados no trabalho de Chaer & Tótola (2007), a atividade da enzima beta-glicosidase ficou entre os mais sensíveis ao efeito do uso ou manejo do solo, em áreas com eucalipto. As fosfatases, representadas pela fosfatase ácida são enzimas envolvidas no ciclo do fósforo e as arilsulfatases enzimas relacionadas ao ciclo do enxofre. Pelos resultados encontrados nos estudos com as variedades de feijoeiro, pode-se concluir que a modificação genética para resistência ao vírus do mosaico dourado não implicou de forma sensível e consistente em alterações na planta capazes de influenciar atividades enzimáticas chaves na dinâmica de C, S e P, na região da rizosfera do feijoeiro.

Foi realizada uma análise de feitos sobre organismos decompositores e isso demonstrou que estes não foram alterados com o cultivo do evento Embrapa 5.1. Também não foram observadas alterações na biomassa, atividade enzimática e respiração basal do solo (seção VII.3). Portanto não se espera diferença na biodegradabilidade dos tecidos do evento de feijoeiro Embrapa 5.1 no solo em relação aos tecidos do seu parental e de outros feijoeiro já cultivados no Brasil.



VII.11. a possível resistência a agentes químicos conferida pela característica introduzida

Ensaio de tolerância aos herbicidas da classe das imidazolinonas

Em ensaio realizado para determinar a tolerância a Imazapyr 80 nM in vitro, pode-se verificar que existe uma certa tolerância de eixos embrionários a essa concentração do herbicida (Figura VII.46). Esse nível de tolerância provavelmente foi importante para a seleção do evento de transformação Embrapa 5.1. Entretanto, quando plantas adultas foram tratadas com dosagens entre 50 e 200 g i.a./ha com herbicidas do grupo químico das imidazolinonas (imazapic, imazapir e imazamox) não se observou qualquer nível de tolerância. Todas as plantas tratadas com imidazolinonas morreram independentemente da dosagem utilizada (50 a 200 g i.a./ha) (Figura VII.47). Esses resultados demonstram que a presente tecnologia para resistência ao BGMV não tem qualquer relevância no que diz respeito ao controle de ervas daninhas. Mais detalhes desses experimentos estão na seção V.10 desse documento.

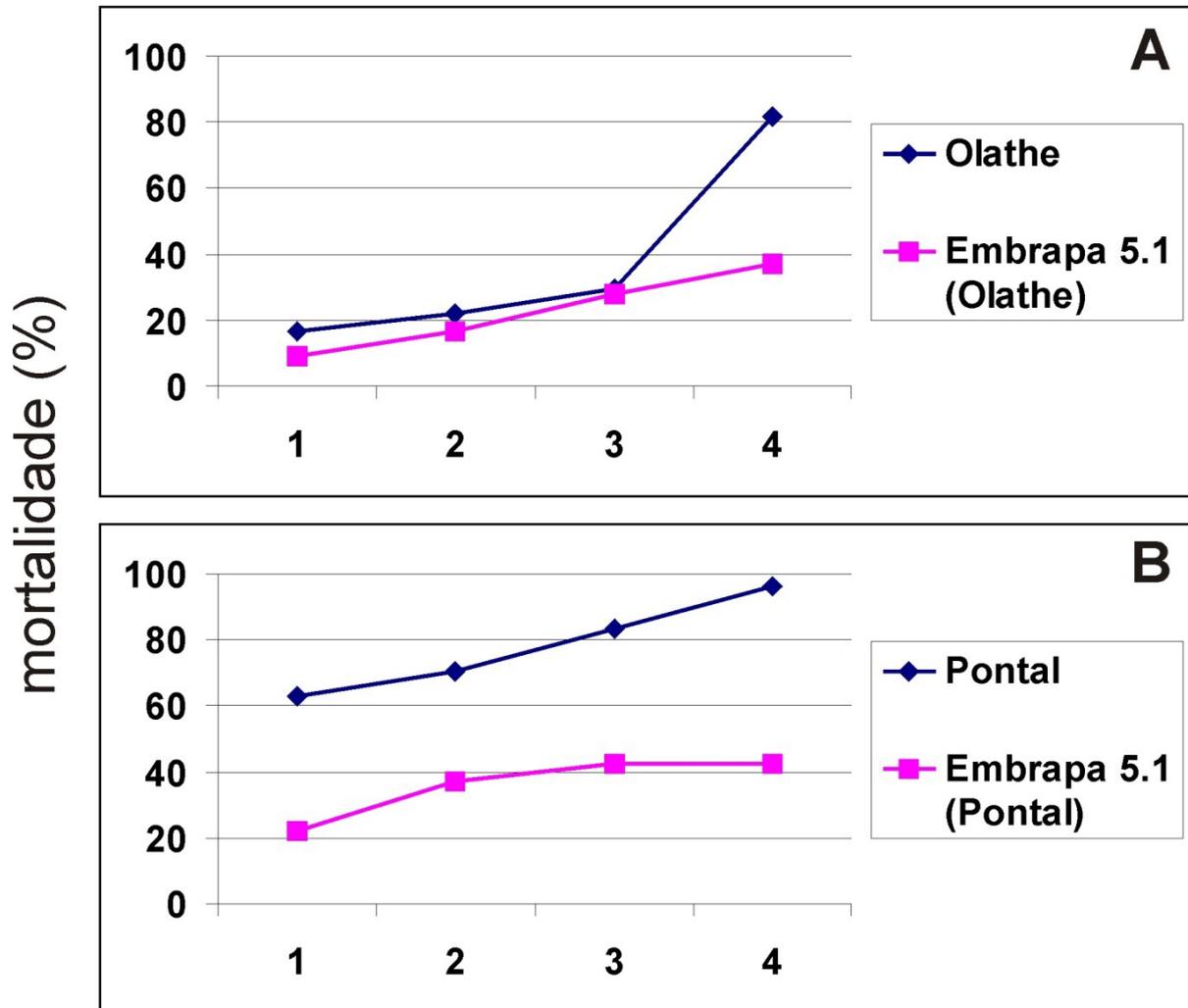


Figura VII.46. Avaliação da tolerância ao herbicida imazapyr 80 nM in vitro. Os embriões foram cultivados em meio contendo imazapyr e a frequência de sobrevivência foi analisada ao longo de 4 semanas para o evento Embrapa 5.1 comprado à mesma variedade não GM (A) e a linhagem derivada resultante de cruzamentos com a var. Pontal (B).



Figura VII.47. Plantas do evento Embrapa 5.1 (Olathe 5.1) e seu parental Olathe (Olathe Pinto) mostrando os sintomas de toxidez após pulverização com herbicida do grupo químico das imidazolinonas. Para comparação, na esquerda está um grupo de plantas não pulverizadas com herbicidas (test). Não se observou diferença no fenótipo de plantas do evento Embrapa 5.1 quando comparadas às plantas do parental Olathe, após a aplicação de diversas dosagens de imazapic, imazapir e imazamox.

VII.12. Histórico de uso do OGM e os países onde já foram autorizadas ou recusadas a sua comercialização e plantio apresentando, neste caso, dados de monitoramento ou de estudos pós-liberação comercial, se houver;

O feijoeiro Embrapa 5.1 resistente ao *Bean golden mosaic virus* está sendo desenvolvido pela Embrapa para ser cultivado primariamente no Brasil. Uma vez que o mosaico dourado ocorre em outros países há a possibilidade da utilização dessa

tecnologias em outras regiões das Américas. No entanto o Brasil é o primeiro país em que se requer liberação para cultivo comercial e consumo para esse evento. Apesar disso, outros eventos geneticamente modificados desenvolvidos para o silenciamento de genes endógenos ou de genes de patógenos intracelulares já foram aprovados em outros países, como é o caso da soja (evento DP-305423-1 aprovado na Austrália, Canadá, Estados Unidos e México e DD-Ø26ØØ5-3 aprovado na Austrália, Canadá, Estados Unidos e Japão), mamoeiro (eventos CUH-CP551-8, CUH-CP631-7 e UFL-X17CP-6, aprovados nos Estados Unidos), abóbora (eventos ZW20 e CZW-3, aprovado nos Estados Unidos), ameixa (evento ARS-PLMC5-6 (C5) aprovado nos Estados Unidos), Tomate (eventos 1345-4 e B, Da, F aprovados nos Estados Unidos, Canadá e México, CGN-89564-2 (FLAVR SAVR) aprovado nos Estados Unidos, Canadá, México e Japão) (<http://rasm.icgeb.org/>; <http://www.cera-gmc.org/>).

VII. 13. Alterações na capacidade de sobrevivência do OGM em ambientes distintos daqueles ocupados pelo parental, provocadas pelas novas características introduzidas.

Não se espera que os genes introduzidos possam gerar qualquer alteração na capacidade de sobrevivência do evento Embrapa 5.1 em relação ao seu parental Olathe. No caso de ocorrência de uma epidemia de mosaico dourado, obviamente a capacidade de produção de estruturas reprodutivas será muito maior no evento Embrapa 5.1 em relação ao seu parental Olathe, que é suscetível ao BGMV. Não foram observadas diferenças fenotípicas no que diz respeito à capacidade de sobrevivência em nenhum dos campos cultivados nas três regiões no Brasil e em duas safras. Apesar disso avaliamos a resposta desse evento GM ao estresse oxidativo como um indicativo de possíveis alteração na capacidade de sobrevivência.

A capacidade das plantas em lidar com o estresse oxidativo reflete em vários processos fisiológicos tais como: o crescimento, a reprodução e a resistência aos estresses biótico e abiótico. Os agentes estressores típicos de plantas incluem: a seca, a umidade, o calor, a deficiência mineral, queda de temperatura, UVA e UVB, ozônio, pragas (ex.: vírus, insetos, bactérias, fungos), metais pesados e agrotóxicos. Esta longa lista indica que as plantas precisam ativar constantemente seus mecanismos de defesa específicos, sendo um deles a resposta à geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). Para manter as concentrações dessas substâncias em níveis fisiológicos ideais, existe um equilíbrio entre a produção e o mecanismo

de proteção. As defesas antioxidantes compreendem agentes que removem os radicais livres. Neste caso, tais substâncias auxiliam na manutenção deste equilíbrio. As enzimas chaves que atuam para o controle das EROs em plantas são: catalases, ascorbato peroxidases, superóxido-dismutases e a glutatona-peroxidases. Contudo, em condições específicas de estresse, os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) excedem a capacidade antioxidante da célula, estabelecendo uma condição de desequilíbrio referida como estresse oxidativo. Neste caso, as EROs reagem com os componentes celulares de modo inespecífico, danificando proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos. Deste modo, a capacidade das plantas em lidar com o estresse oxidativo reflete em vários processos fisiológicos tais como: o crescimento, a reprodução e a resistência aos estresses biótico e abiótico. Resultando, em muitos casos, na redução da produtividade e rentabilidade do material cultivado. Neste caso, foi estudado o mecanismo de defesa antioxidante das enzimas: catalase, ascorbato peroxidase e superóxido dismutase (SOD) bem como as medidas de dano celular (peroxidação lipídica) e dano a proteínas utilizando-se os extratos das folhas de feijão GM (Embrapa 5.1) e o seu parental não-GM (Olathe).

A figura VII.48 mostra os resultados das determinações da atividade específica da enzima catalase de cada linhagem (evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe). As atividades específicas entre as amostras GM e não-GM não apresentaram diferenças estatísticas significativas.

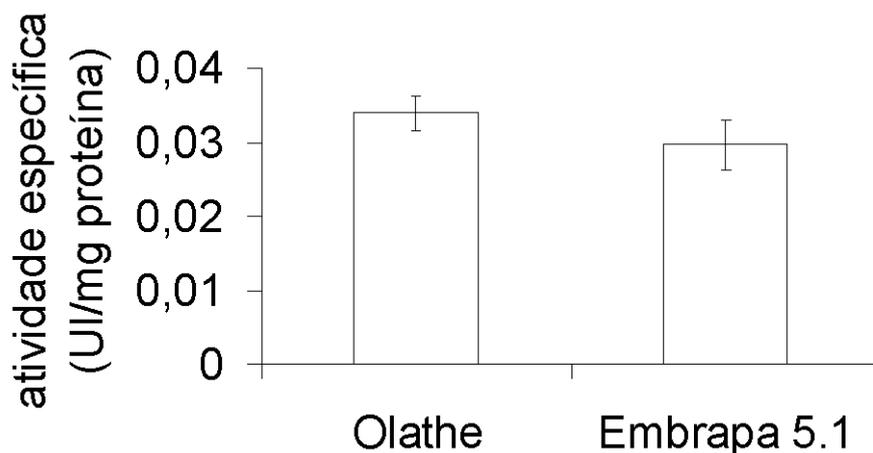


Figura VII.48. Medida da atividade específica da enzima antioxidante catalase (resultado dos grupos - duas medidas em dias diferentes).

A figura VII.49 mostra os resultados das determinações da atividade específica da enzima ascorbato peroxidase de cada linhagem testada (evento Embrapa 5.1 e seu

parental Olathe). As atividades específicas entre as amostras não transgênicas e transgênica não apresentaram diferenças estatísticas significativas.

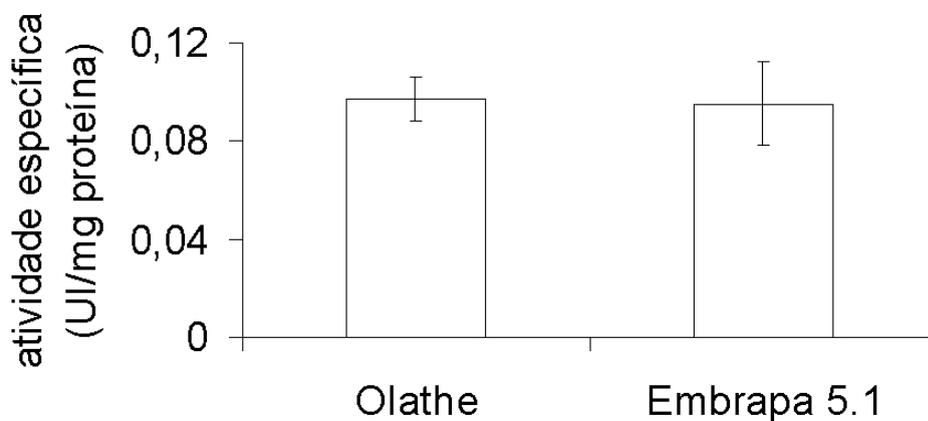


Figura VII.49. Medida da atividade específica da enzima antioxidante ascorbato peroxidase (resultado dos grupos - duas medidas em dias diferentes).

A figura VII.50 representa a comparação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em gel nativo de poliacrilamida entre as amostras GM e não-GM. Neste caso, não foi verificada nenhuma diferença significativa entre todas as amostras analisadas.

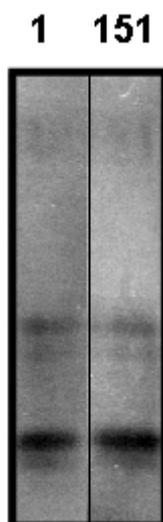


Figura VII.50. Medida da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em gel nativo de poliacrilamida – resultado representativo de duas amostras (1= parental Olathe não-GM; 151= evento Embrapa 5.1 GM)

A Figura VII.51 mostra os resultados das medidas de peroxidação lipídica (método xilenol orange para verificar o grau de lesão celular) de cada planta (evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe). As medidas de peroxidação lipídica entre as amostras não transgênica e transgênica não apresentaram diferenças estatísticas significativas.

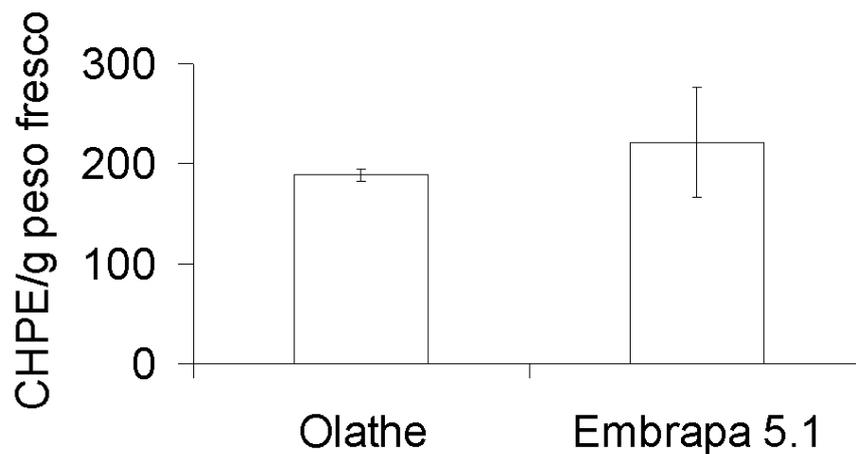


Figura VII.51. Medida da peroxidação lipídica pelo método do alaranjado de xilenol – resultado de normal x transgênico (resultado de 06 indivíduos em cada grupo)

A figura VII.52 mostra a investigação do perfil protéico em gel de poliacrilamida não desnaturante corado com comassie blue de todas as amostras analisadas (evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe). Neste caso, não foi observada nenhuma alteração no perfil protéico.

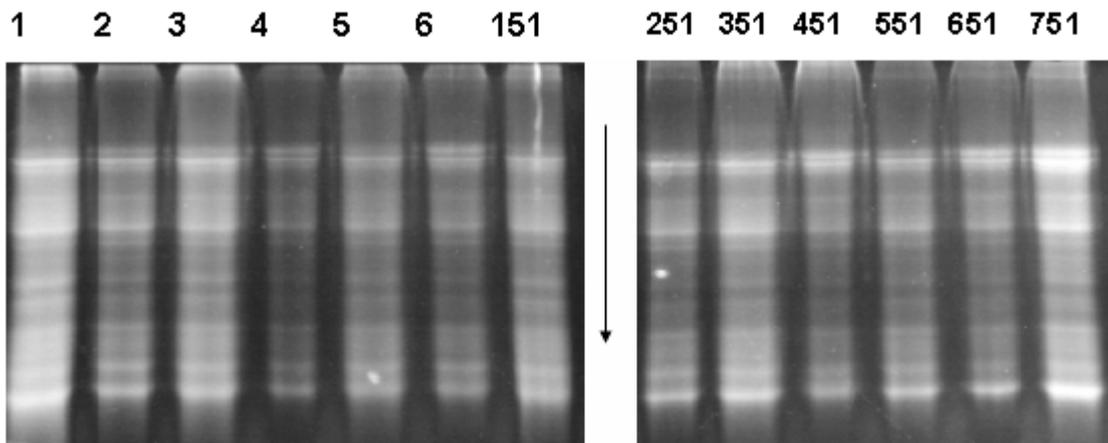


Figura VII.52. Investigação do perfil protéico em gel de poliacrilamida não desnaturante corado com Commassie Blue. As amostras 1, 2, 3, 4, 5 e 6 são não-GM (Olathe) e as amostras 151, 251, 351, 451, 551, 651 e 751 são plantas GM (evento Embrapa 5.1)

A figura VII.53 mostra os resultados das medidas do dano oxidativo a proteína pelo método oxyblot que investiga as proteínas carboniladas por meio de western blot. Neste caso, também não foi observado nenhuma alteração entre as amostras GM e não-GM.

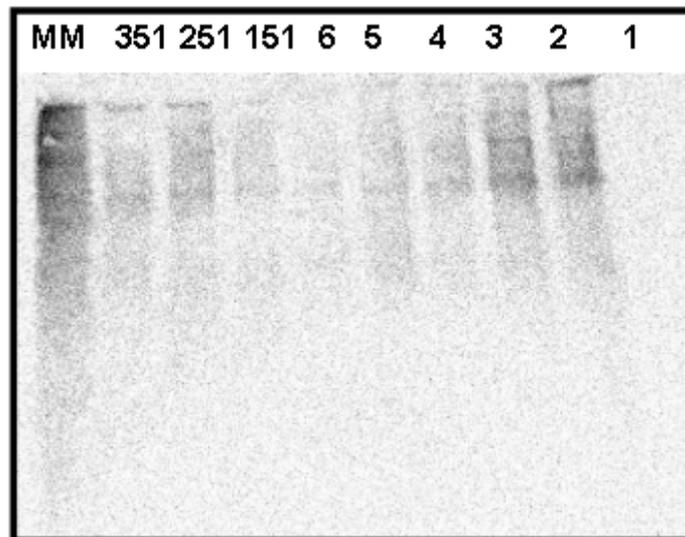


Figura VII.53. Medida do dano oxidativo a proteína pelo método oxyblot que investiga as proteínas carboniladas por meio de western blot. As amostras 351, 251 e 151 correspondem ao evento Embrapa 5.1 e as amostras 6, 5, 4, 3, 2 e 1 correspondem ao parental não-GM (Olathe).



Em conclusao podemos afinnar que todos os resultados obtidos nao apresentaram nenhuma diferen<a significativa entre as amostras GM (evento Embrapa 5.1) e seu parental nao-GM (Olathe) tanto no mecanismo de defesa antioxidante enzimatico quanto nas medidas de danos as proteinas ou lesao celular (via peroxida<ao lipidica).



SEÇÃO VIII

Proposta de Monitoramento Pós-Liberação Comercial de Feijoeiro Geneticamente Modificado Resistente ao Mosaico Dourado – Evento Embrapa 5.1 (EMB-PVØ51-1)

Introdução

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária desenvolveu o feijoeiro Embrapa 5.1 (EMB-PVØ51-1) que é resistente ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro (BGMV, *Bean golden mosaic virus*). O BGMV não é transmitido diretamente à progênie via semente ou pólen. Também não é transmitido por inoculação mecânica (exceto pelo uso do processo de biobalística) ou contato entre plantas. O BGMV se move de um campo a outro apenas devido ao seu vetor natural – mosca branca (*Bemisia tabaci*,) uma vez que praticamente não há movimentação de plantas.

O monitoramento levará em conta que esse é um evento resistente a um geminivirus e que possui tolerância negligenciável aos herbicidas do grupo químico das imidazolinonas. Portanto, não será possível a utilização do feijoeiro Embrapa 5.1 como parte de uma estratégia para controle de plantas daninhas. Esse evento também não possui qualquer gene com potencial biocida. Não há genes potencialmente causadores de efeitos sobre fungos, bactérias, insetos e outros animais do filo Arthropoda. Portanto, com o cultivo do evento Embrapa 5.1 não haverá alteração no manejo de plantas daninhas e indivíduos que se constituem em pragas para o cultivo do feijoeiro, tais como artrópodes, moluscos, nematóides, fungos, bactérias, micoplasmas e outros. Igualmente, não foi inserido qualquer gene com potencial para fazer com que o cultivo desse evento possa gerar alteração da composição química do solo. Portanto, o cultivo do evento de feijoeiro Embrapa 5.1 não levará necessariamente a uma alteração significativa no manejo da cultura. De fato, uma única alteração que se pode vislumbrar



é a redução de aplicação de inseticidas utilizados no controle preventivo de moscas brancas. Dessa forma, entendemos que o monitoramento de alterações do estado nutricional das plantas GM, alteração de características físico-químicas e biológicas do solo, alterações na comunidade de plantas invasoras não são científica e racionalmente sustentáveis. No entanto, o monitoramento deverá ser relevante para estudar alterações na população do BGMV e outros geminivirus que por ventura possam surgir decorrente de processos evolucionários alterados pelo cultivo do evento Embrapa 5.1.

Em decorrência do cultivo do evento Embrapa 5.1 pode-se levantar a hipótese de que: poderá haver uma alteração na variabilidade do BGMV, com conseqüente surgimento de outras espécies de geminivirus, que podem também ser selecionadas em populações crípticas presentes em plantas GM resistentes ao BGMV. Recentemente (entre os anos de 2007 e 2010) os cientistas da Embrapa, em parceria com outras instituições, realizaram um levantamento da variabilidade do BGMV nas regiões Nordeste, Centro Oeste, Sudeste e Sul do Brasil. Este levantamento mostrou que a variabilidade da região do gene *rep.* (AC1) é baixa, mostrando identidade de seqüência entre 90,5 e 98,8%. Esses dados são semelhantes a um levantamento realizado no nos 1990 (Gilbertson et al., 1993; Faria & Maxwell, 1999) e serão a base para os levantamentos de possíveis alterações na variabilidade viral e na ocorrência de outros geminivirus como uma conseqüência da liberação comercial do evento Embrapa 5.1.

Objetivos

O Monitoramento Ambiental do Feijoeiro Embrapa 5.1, que será conduzido após o início da sua comercialização, visa comparar os efeitos, no ambiente, de plantios comerciais do feijão geneticamente modificado com o evento GM cultivados em sistema convencional em diferentes regiões do Brasil, em atendimento ao Anexo I da Resolução Normativa nº 5 da CTNBio de 12 de março de 2008.

Este monitoramento, que será implantado em diferentes regiões do Brasil por um período de cinco anos, considera contingências e acomodações logísticas; entretanto,



alterações poderão ser necessárias para manter a exequibilidade, a confiabilidade e a qualidade dos dados que serão obtidos. Caso necessárias e tecnicamente justificáveis, essas alterações serão submetidas à consideração da CTNBio.

A seguir relacionamos os indicadores ambientais e as atividades que serão avaliadas e executadas no referido monitoramento ambiental do feijoeiro Embrapa 5.1.

- Monitoramento da variabilidade do BGMV
- Emergência de novas doenças causadas por geminivirus
- Ocorrência de mosaico dourado

Métodos

Para cada uma das variáveis avaliadas no monitoramento serão elaborados documentos denominados “Procedimentos Operacionais Padrões (POP)”, cujo principal objetivo é a padronização do trabalho, propiciando qualidade e confiabilidade para os resultados obtidos.

Os POPs apresentarão de modo geral informações sobre:

1. Objetivos da avaliação do indicador ambiental ou da atividade;
2. Épocas de amostragem e/ou avaliações;
3. Parcelas amostradas, forma de amostragem e número de amostras;
4. Equipamentos utilizados;
5. Acondicionamento e registro das amostras unitárias e para transporte;
6. Resumo da metodologia analítica;
7. Indicação da instituição/laboratório de análises e do pesquisador responsável;
8. Prazo para realização das análises e redação dos relatórios;
9. Indicação do tratamento estatístico básico que será aplicado (se for o caso).

Regiões de monitoramento

A coleta de dados correrá em áreas comerciais ou experimentais nas três áreas onde está concentrada a produção de feijão no Brasil (marcadas no mapa abaixo, figura 1). A escolha dos locais levará em consideração: as dimensões das parcelas necessárias ao monitoramento; a representatividade do local quanto às características climáticas regionais; o histórico agrícola do local; o nível tecnológico da propriedade; a disponibilidade do proprietário em comprometer-se com o monitoramento e os aspectos logísticos relacionados ao monitoramento.

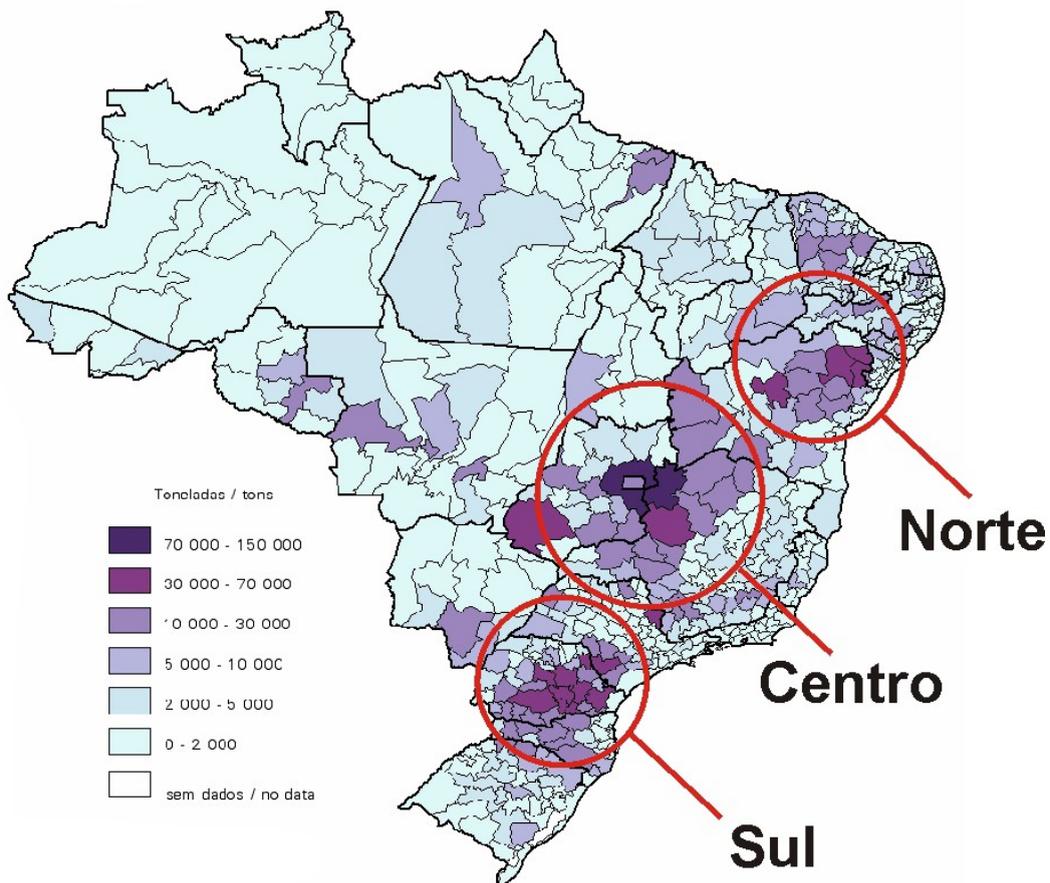


Figura VIII.1. Mapa mostrando as áreas com maior produção de feijão no Brasil. Os círculos correspondem às áreas a serem monitoradas com a liberação comercial do feijoeiro Embrapa 5.1

Épocas de coleta de dados

Na região Centro-Oeste e parte da região Sudeste, as principais épocas de plantio de feijão são: “safrinha” e “inverno com irrigação”. O feijão da “safrinha” tende a ser mais afetado pelo mosaico dourado em função de uma maior população de moscas brancas proveniente da cultura da soja, em fase de maturação e colheita. Na região Nordeste o plantio ocorre nos meses de maio/junho. Portanto, as coletas deverão se concentrar no período de janeiro a maio nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul (mostradas na Figura 1); e no período de maio/junho a agosto na região Nordeste (área Norte no mapa da Figura 1).

Análises de variabilidade do BGMV e emergência de novas doenças virais

As amostras serão coletadas, registradas e armazenadas de acordo com o POP e serão encaminhadas aos laboratórios da Embrapa onde o DNA e RNA totais serão isolados. Para análise da presença de geminivirus serão realizados “rolling circle amplification” - RCA (de acordo com Inoue-Nagata et al., 2004) para amplificação dos genomas virais completos e PCR para amplificação de seqüências específicas usando-se primers universais para geminivirus. Os fragmentos isolados serão clonados em vetores apropriados, como o pGEM-TEasy (Promega) e seqüenciados. As seqüências serão comparadas com aquelas obtidas anteriormente, nas análises prévias que já foram realizadas para estudo da variabilidade de geminivirus que ocorrem no feijoeiro no Brasil. De acordo com “International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV; <http://www.ictvonline.org/>)” uma nova espécie de geminivirus ficará caracterizada no caso de se encontrar um componente A mostrando identidade de seqüência inferior a 89% quando esta for comparada com o genoma do BGMV.

Caso haja suspeita da ocorrência de outras viroses as amostras serão submetidas a tratamentos semelhantes aos descritos acima, acrescentando-se análises de RT-PCR para amplificação de fragmentos de seqüências virais no caso de vírus cujo genoma é composto de RNA. Serão coletadas amostras em campos cultivados com o evento Embrapa 5.1 nas áreas marcadas no mapa (figura 1) mostrado anteriormente, sendo que deverá haver pelo menos 100 amostras coletadas anualmente e distribuídas em pelo



menos cinco municípios distintos de cada área mostrada na figura 1 (Norte, Central e Sul). Então, anualmente serão coletadas 300 amostras nas principais áreas produtoras de feijão do Brasil para a realização de análises para a presença dos transgenes (incluindo análises de hemizigose/homozigose), de BGMV e outros geminivirus. A escolha dos locais para realização do monitoramento, bem como o número de amostras dependerão da adoção do evento Embrapa 5.1.

A ocorrência de plantas mostrando sintomas de mosaico dourado será realizada por amostragem em campos comerciais convencionais e cultivados com o evento Embrapa 5.1. No caso de se encontrar plantas apresentando sintomas de mosaico, estas deverão ser analisadas para demonstrar se são indivíduos hemizigotos ou homozigotos para os transgenes presentes no evento Embrapa 5.1.

Programa de divulgação

A Embrapa tem em sua missão a marca da responsabilidade social, isto é, o compromisso de interagir permanentemente com a sociedade, na antecipação e avaliação das conseqüências sociais, econômicas, culturais e ambientais da ciência e da tecnologia, e contribuir com conhecimentos e tecnologias para a redução da pobreza e das desigualdades regionais. Esse compromisso é materializado pela marcante atuação na divulgação científica de seus resultados, nas formas mais variadas, desde programas de TV (como é o caso do Dia de Campo na TV da Embrapa) e rádio próprios, as inserções em programas populares, dias de campo com produtores rurais, cursos para estudantes de diversos níveis (primário, secundário, graduação e pós-graduação), palestras em eventos científicos e populares, artigos científicos, folders, feiras (como a Ciência Para a Vida realizada a cada dois anos). Serão desenvolvidos mecanismos específicos para a informação da sociedade sobre evento de feijoeiro Embrapa 5.1 e os aspectos relacionados à sua liberação comercial.



Monitoramento dos Agravos à Saúde Humana

O monitoramento dos agravos à saúde humana será feito por meio de notificação dos postos de atendimento de saúde humana ao Sistema de Notificação de Doenças (SND; <http://www.datasus.gov.br/dirbd/area/banco/snd.htm>) ou o Sistema Nacional de Notificação de Eventos Adversos Relacionados a Produtos de Saúde (SINEPS) regulamentado pela ANVISA. Anualmente a Embrapa Arroz e Feijão consultará o SND e SINEPS para obter informações compiladas de ocorrência de doenças que eventualmente possam ter alguma relação com o consumo do evento de feijoeiro Embrapa 5.1. A Embrapa também consultará o setor de Sanidade Animal do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento sobre possíveis ocorrências de eventos negativos com animais nos campos cultivados com o evento Embrapa 5.1.

Equipe técnica de monitoramento

A equipe do monitoramento será definida posteriormente pela Embrapa, entretanto deverá ser composta por um coordenador e pelos responsáveis por atividades de campo e laboratórios. Ajustes na estrutura operacional de campo serão efetuadas caso necessário. Para as diferentes variáveis a serem analisadas serão identificados pesquisadores da Embrapa e de instituições públicas e privadas, os quais colaborarão também na redação dos procedimentos padrões e da metodologia analítica.

Relatórios

Após cada ano agrícola serão elaborados os relatórios a seguir relacionados: (1) Os Relatórios de Atividades serão elaborados pelos membros das equipes técnicas. (2) Os Relatórios de Análises serão elaborados pelos pesquisadores responsáveis após a análise das amostras encaminhadas ao laboratório ou dados coletados no campo. Será elaborado um relatório por área, para cada procedimento, mesmo que o procedimento inclua a análise de amostras coletadas em duas ou mais amostragens. (3) Os Relatórios Consolidados serão elaborados pelo coordenador, que será formatado e encaminhado à



CTNBio pela CIBio da Embrapa Arroz e Feijao. Tambem poderao haver os (4) Relat6rios Especificos, que deverao ser elaborados e enviados à CTNBio, a qualquer tempo, caso tenha-se observado urn fato relevante do ponto de vista de biosseguranc;a nas areas de monitoramento.



ANEXO I

Materiais e Métodos

Transformação genética do feijoeiro

O evento Embrapa 5.1 foi gerado com a metodologia descrita em Aragão et al. (1996) e Bonfim et al. (2007). As sementes de feijoeiro da variedade Olathe foram desinfetadas em etanol 70%, durante 1 min, e hipoclorito de sódio 1,0%, durante 20-30 min. Lavadas 5 vezes em água destilada estéril. A seguir as sementes foram incubadas durante 16-18 h em água destilada estéril, a temperatura ambiente. As sementes foram abertas e os eixos embrionários removidos. As folhas primárias foram cortadas para expor a região do meristema apical (contém a região do meristema e os primórdios foliares). Em seguida os eixos embrionários foram posicionados (10-15 eixos/placa), nas placas de cultura contendo meio de MS, suplementado com 44,3 μM benzilaminopurina (BAP), 3% de sacarose e 0,8% phytigel (Sigma), dispostos em círculo, equidistantes entre 6 a 12 mm do centro da placa e com a região do meristema apical direcionada para cima. Os explantes foram bombardeados com micropartículas de tungstênio contendo o vetor pBGMVRNAiAHAS previamente digerido com a enzima de restrição *FspI*.

Após o bombardeamento, as placas contendo os eixos embrionários foram cultivadas em meio de cultura MSB (contendo 10 mg/L BAP, 80 nM imazapyr), durante 7 dias a 28°C com 16h de fotoperíodo (40 $\mu\text{mol s}^{-1}$), para induzir a multibrotação. Após este período, os eixos embrionários que germinaram foram transferidos para “Magenta box” contendo o meio MSBK e cultivados durante 7 dias sob as mesmas condições. A presença do herbicida imazapyr no meio de cultura reduz o número total de brotações. Reduzindo a necessidade de manipulação de um grande número de



brotações advindas do meio de cultura sem o agente seletivo. As plântulas que enraizaram foram aclimatadas em casa de vegetação.

Preparação de anticorpos específicos contra AtAHAS e PvAHAS

Os peptídeos específicos para AtAHAS e PvAHAS foram sintetizados no Laboratório de Espectrometria de Massa da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Quadro AI.1). Esses peptídeos foram ligados à hemocianina (KLH) de *Megathura crenulata* com o uso do Imject® Maleimide Activated mcKLH Kit da Pierce (Rockford, IL, EUA) seguindo as instruções do fabricante (www.piercenet.com).

A proteína conjugada aos peptídeos foi usada para imunizar coelhos. As amostras foram misturadas com Imject® Freund's Complete Adjuvant (Pierce). Antes de as amostras serem injetadas nos coelhos o soro não imune foi colhido para ser usado como branco nas análises por ELISA. Em seguida foi feita uma a injeção inicial de 100 µg do preparado imunogênico em 6-10 aplicações subcutâneas no dorso do animal. No dia 14 as mesmas amostras foram injetadas, mas previamente misturadas com adjuvante incompleto de Freund em substituição ao adjuvante completo, para evitar causar estresse adicional aos animais. No dia 21 foram coletadas amostras de sangue (200-400 µl) da veia da orelha e testadas por ELISA para a presença de anticorpos. Se necessário uma nova injeção foi feita no dia 22. As amostras de sangue foram colhidas até a resposta imune estar satisfatória.



Quadro AI. 1. Sequência de AtAHAS e PvAHAS mostrando os peptídeos utilizados para síntese dos anticorpos específicos

A. thaliana AHAS (AtAHAS) GeneBank Acesso No. NP190425

MAAATTTTTSSSISFSTKPSPLPISRFSLPFSLNPNKSSSSRRRGIKSSSP
SSISAVLNTTTNVTTPSPTKPTKETFISRFPDQPRKGADILVEALERQGVETVFAY
PGGASMEIHQALTRSSSIRNVLP RHEQGGVFAAEGYARSSGKPGICIATSGPGATNLVS
GLADALLDSVPLVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVMDVEDIPRIIE
EAFFLATSGRPGPVLVDVPKDIQQQLAIPNWEQAMRLPGYMSRMPKPPEDSHLEQIVRL
ISESKKPVLYVGGGCLNSSDELGRFVELTGIPVASTLMGLGSYPCDELHMLGMHGT
VYANYAVEHSDLLAFGVRFDRTGKLEAFASRAKIVHIDIDSAEIGKNKTPHVSVC
GVKLLALQGMNKVLENRAEELKLDGVRNENLVQKQKPLSFKTFGEAIPPQYAIKVL
D ELTDGKAIISTGVGQHQMWAQFYNYKKPRQWLSGGLGAMGFGLPAAIGASVANPDAI
VVDIDGDSFIMNVQELATIRVENLPVKVLLNQHLMVMQWEDRFYKANRAHTFLGD
PAQEDEFNMLLFAAACGIPAARVTKKADLREAIQTMLDTPGPYLLDVICPHQEHVLP
MIPSGGTFNDVITEGDGRIKY

P. vulgaris AHAS (PvAHAS) GenBank Acesso No. GQ466185

MEAVTAPKPAFTAFPSSHTPKPFLRFALPFSSLPNAPLLSQRRSLQISPAISDAAA
AKS TAAEPFLSRFGLEPRKGADILVEALERQGVTDVFAYPGGASMEIHQALTRSATIRNV
L PRHEHGGVFAAEGYARSSGLPGVCIATSGPGATNLVSGGLADALLDSVPLVAITGQV
PRR MIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVLDVDDIPRIVNEAFFLATSGRPGPVLIDIP
KDI QQQLAIPNWDQPIRLSGYMSRLPKSPNEKHLELIVRLLFEAKKPVLYVGGGCLNS
SEEL RRFVQLTGVPVASTLMGLGAYPIADENSLQMLGMHGTVYANYAVDRSDLLAFG
VRFD RVTGKLEAFASRAKIVHIDIDSAEIGKNKQPHVSVCADIKLALKGINLVLES
RGAKGKLD FRSWREELNEQKRKFPLSYKTFEEEEISPQYAIQVLDEL TNGEAI
VSTGVGQHQMWAQ FYKYKRPRQWLTSGGLGAMGFGLPAAMGA AVANPGAI
VVDIDGDSFIMNVQELATIKV EKLPVKILLNQHLMVQWEDRFYKSNRGHTYLG
DPSNESAI FPNFLKFADACGIPA ARVAKKEDLKA IQKMLDTPGPYLLDVIVPHQ
EHVLP MIPSNGT FQDVITEGDGRKSN

Peptídeos

AtAHAS (PEP. 08/22)

VLNTTTNVTTPSPTKPTKETFISRFPDQ

AtPvAHAS (PEP 08/24)

IATSGPGATNLVSGGLADALLDSVPLVAITGQ

PvAHAS (PEP 08/25)

VCADIKLALKGINLVLESRGAKGKLD FRSWREQ

Peptídeo de trânsito para os cloroplastos mascarados em azul



ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*)

Os ensaios de ELISA foram realizados de acordo com Baldoni et al. (2010). A extração de proteína total foi realizada misturando-se o tecido previamente macerado em nitrogênio líquido (0.2 g) com 600 μ L do tampão de amostra (50 mM NaH₂PO₄, 20 mM NaCl, 2 mM PMSF, 10 mM DTT, pH 7.0) por 30 min a 4°C. A mistura foi centrifugada (18,500 g) por 40 min a 4°C e o subrenadante coletado. A proteína total foi quantificada usando o Quick Start Bradford Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, UUA). Placas de 96 poços foram cobertas com 3 μ g da proteína total (diluída em PBS) e incubadas por 4 h a 37°C. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS, bloqueadas com 200 μ L/poço com a solução de bloqueio (PBS, Tween (0.05%), e 2% leite tem pó desnatado) por 16 h a 4°C. As placas foram lavadas 3 vezes com a solução de bloqueio e incubadas com o anticorpo específico por 2 h a 37°C. As placas foram então lavadas 7 vezes com a solução de bloqueio e incubadas com 50 μ L/poço de anticorpo secundário diluído 1:3000 (rabbit anti-goat IgG conjugado com fosfatase alcalina, Santa Cruz Biotechnology Inc.) por 2 h a 37°C. As placas foram então lavadas 5 vezes com PBS e a reação enzimática foi realizada com o Alkaline Phosphatase Substrate Kit (Bio-Rad) de acordo com o fabricante. A absorbância foi medida em leitor de ELISA (Bio-Rad) com comprimento de onda de 405 nm. Os experimentos foram realizados com 3 repetições biológicas e 3 repetições técnicas.

Análise da transcrição

A técnica de RT-PCR foi utilizada para detecção de transcritos dos genes *AtAhas* e *Atsec61 γ* em sementes imaturas, folhas e raízes do evento Embrapa 5.1. RNA total de tecidos (200 mg) do evento Embrapa 5.1, do feijoeiro parental Olathe e *A. thaliana* (usado como controles positivo) foram isolados usando o RNAeasy kit (Qiagen, Valencia, CA, EUA). O DNA genômico que ainda poderia estar na amostra foi eliminado com digestão com DNase. Cabe lembrar que se houvesse amplificação a partir do DNA genômico os fragmentos gerados seriam maiores devido à presença de introns. Oito microgramas do RNA total foram usados para síntese de cDNA usando o Superscript III kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) seguindo o protocolo sugerido pelo

fabricante. PCR foram realizados em termociclador Bio-Rad em 50 μ L de solução contendo 40 ng de cDNA, 60 mM Tris-SO₄ (pH 8.9), 18 mM (NH₄)₂SO₄, 2mM MgSO₄, 250 nM de cada dNTP, 200 nM de cada primer e 5 U of Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen). A reação foi realizada com um tratamento de um ciclo de 95 °C (5 min), 25 ciclos de amplificação (95 °C por 1 min, 55 °C por 1 min, 68 °C por 1 min) com um ciclo final de alongação de 5 min a 68 °C. O número de ciclos foi previamente determinado para tornar essa análise semi-quantitativa. Os fragmentos gerados foram analisados em gel de agarose e corados com brometo de etídio.

Os primers usados na RT-PCR estão descritos na Tabela AI.1. Os primers foram desenhados no sentido de evitar ampliações dos genes endógenos, exceto o gene *PvI8SrRNA*. Amostras de *A. thaliana* foram usadas como controle positivo. Como controle interno foi utilizado o gene endógeno *PvI8S rRNA* (TIGR *P. vulgaris* Gene Index, TC238). Para confirmação das seqüências amplificadas os fragmentos foram clonados no vetor pGEMT-Easy e seqüenciados. Essas análises mostraram que as seqüências eram realmente aquelas esperadas.

Tabela AI.1. Primers utilizados nas análises de RT-PCR para detecção de transcritos dos genes *AtAhas* e *Atsec61 γ* .

Gene alvo	Pares de primers	Seqüência (5'-3')	Tamanho do amplicon (pb)
<i>AtAhas</i>	AtAHAS-RTF	ATGTCACAACCACTCCCTCTCCAA	432
	AtAHAS-RTR	GCGTTACCTCAACAATCGGAGTC	
<i>Atsec61γ</i>	SEC1	ACGAACCTGCTGAAACCCTAAT	393
	SEC2-	TAAGAATGGAGAATTTGGCTACA	
<i>PvI8S rRNA</i>	rRNA1	AACGGCTACCACATCCAAGG	458
	rRNA2C	TCATTACTCCGATCCCGAAG	

Para análise de transcrição da ORF 35SPv1 em folhas do evento Embrapa 5.1 o procedimento foi essencialmente igual ao descrito acima. Os primers Pv1 (5'-GAACGCGGAATAGCCCGCGA-3') e Pv1R (5'-CCGGCCTCCGGTACTGACCA-3') foram utilizados para amplificar um fragmento de 294 pb (The DFCI *Phaseolus vulgaris* Gene Index (PhvGI), report TC238). Para esse caso, foi utilizado como controle interno o gene PVEF1a (gene constitutivo do fator de alongamento alpha) e

para amplificação dos transcritos desse gene foram usados os primers EF1F (5'-TGTTGCTGTTAAGGATTTGAAGCG-3') e EF1R (5'-AACAGTTTGACGCATGTCCCTAAC-3') para amplificar um fragmento de 358 pb (The DFCI *Phaseolus vulgaris* Gene Index (PhvGI), report TC21212)

Extração de RNA pelo método de cloreto de lítio

Os tecidos são coletados, congelados em N₂ líquido, pesados e macerados (2g) até ficar um pó bem fininho em cadinho livre de RNase com N₂ líquido. São adicionados 6 mL de fenol ácido: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) RNase free e 9 mL de tampão NTES (0,1 M NaCl; 0,01M Tris-HCl; 1 mM EDTA; 1% SDS;) no tubo de centrífuga. Foram adicionados ao tubo de centrífuga o tecido macerado utilizando o lado inverso da ponteira azul RNase Free. Os tubos são fechados e agitados vigorosamente por 15 minutos a temperatura ambiente e centrifugados a 12000 rpm por 10 minutos. A partir desse ponto, os tubos são mantidos no gelo. A fase aquosa foi transferida para tubo novo. São adicionados 1/10 volume de NaAc 3M pH 4,5 e 2 volumes de ETOH absoluto (-20°C). São agitados e deixados a -20°C por pelo menos 1 hora. Centrifugados a 10.000g por 15 minutos. O sobrenadante é descartado e o pellet foi dissolvido em 2,5mL de água DEPC gelada. Adicionou-se 2,5mL de LiCl 4M e o material foi deixado na geladeira por uma noite. Centrifugou-se a 10.000g por 15 minutos e descartou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o pellet em 1,8mL de H₂O DEPC. O pellet deve ser translúcido e gelatinoso e deve ser facilmente ressuspendido. Foram adicionados 200µL de NaAc 3M e 4mL de ETOH absoluto (-20°C). Precipitou-se a -20°C por pelo menos 1h e o material foi em seguida centrifugado a 10.000g por 20 minutos e descartou-se o sobrenadante. Adicionou-se 5mL de EtOH 70% RNase Free e centrifugou-se a 10.000g por 3 minutos. O EtOH foi descartado cuidadosamente e o material foi ressuspendido com 200µL de H₂O DEPC gelada. Foi feito uma corrida em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio 1% (1/50000µL – v/v). O RNA foi quantificado em Nanodrop. Esse RNA foi usado para as análises de pequenos RNA (siRNA) e para a ingestão em animais experimentais.



Análise dos pequenos RNA (siRNA)

RNA total foi extraído de 400mg de folha usando o reagente Trizol (guanidinium isothiocyanate/acidic phenol) segundo descrição do fabricante (Invitrogen) ou como descrito acima. Cinquenta microgramas de RNA total foram aplicados em gel 20% PAGE 1x Tris-borate-EDTA (TBE) contendo 7M de uréia, três óligos foram usados como marcador molecular (18, 24 e 36 nucleotídeos). O gel foi corado em 1X TBE contendo brometo de etídeo (0.5 µg/ml), e fotografado para verificar a visualização dos tRNAs e 5S rRNA. O RNA foi transferido por eletroblot para membrana Hybond-N+ (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) durante 4 horas, e fixado em UV cross-linking. A membrana foi pré-hibridizada a 45°C em tampão de hibridização (0,5 M Na₂HPO₄, 1mM EDTA, 1% BSA e 7% SDS) em um volume final de 25mL. A hibridização foi feita usando random primed DNA labeling kit (Ready-to-Go™ Kit Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) α^{32P}-dCTP e como sonda foi usado o fragmento (411pb) recuperado após a digestão do vetor de usado na transformação com as enzimas de restrição *XbaI/ClaI*. Foram feitas duas lavagens de 10 minutos cada a 5°C em tampão SSC 2X, SDS 0,1%. A membrana foi exposta em filme KODAC BioMax XAR Film (cat 150 6955) a -85°C por uma noite ou em FLA (FujiFilm).

Método de detecção do evento Embrapa 5.1 por PCR evento-específico

DNA genômico foi extraído de folhas usando o Extract-N-Ampä Plant PCR Kit (Sigma-Aldrich, EUA; boletim técnico AF,CR,PHC 06/09-1 disponível em <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Bulletin/xnap2bul.Par.0001.File.tmp/xnap2bul.pdf>) ou sementes usando o Extract-N-Ampä Seed PCR Kit (Sigma-Aldrich, EUA; boletim técnico AF,CR,PHC 08/09-1 disponível em <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Bulletin/xnas2bul.Par.0001.File.tmp/xnas2bul.pdf>). As PCR foram realizadas conforme descritos pelos boletins técnicos descritos acima usando a enzima *Taq* polimerase distribuída pela Phoneutria Biotecnologia e Serviços Ltda (Belo Horizonte, MG). As condições das reações foram:

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95°C	5 min	1
Desnaturação	95°C	1 min	35
Anelamento	55°C	1min	
Extensão	72°C	1min	
Extensão final	72°C	7min	1
Manutenção	4 °C	∞	

Os pares de primers utilizados estão especificados na tabela abaixo bem como os tamanhos dos fragmentos esperados. A identidade das seqüências foi confirmada por seqüenciamento.

PCR	Pares de Primers	Seqüências (5'-3')	Fragmento amplificado (pb)
1	R124F1 SOJAE3P3R	TACAGGCCAAGCAGCTAGGAAG GGACTCCAACGTCAAAGGGCGA	717
2	COLR22R1 PUCLINK19R	GCCATTATCATGACGCCACCAAC GGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGT	434
3	SOJAE3P1R PVCOLF	TACCAATGCTTAATCAGTGAGGC CGGTATTCTCCAGCACATTTCG	533
4	FEIJÃO12 FEIJÃO3	GAGTTGGTAGCTCTTGATCC GCAGGAATTCGATATCAAGC	394
5	PVCLOROR3 AHAS534C	TACATAATAGGGAGGCTGTTC GGAGTGGTTGTGACATTGGTGG	530
6	PVCLOROF FEIJÃO3	GTGTGCCGACTTGAGATTTTG GCAGGAATTCGATATCAAGC	417
7	R14R FEIJÃO7	CAAATCACGAATAAGTTGTATAG TCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACC	486
8	PVCOLF2 35SKAN2F	ATCATGAAGGCGCGCTGAATGT CCTACAAATGCCATCATTGCG	355
9	PVCLOR3 FEIJÃO8	TAGCGGAGATTGATGACGTACC TTAATCGCCTTGCAGCACATCC	439



Análise do sítio de integração e seqüência completa do inserto

Para análise do sítio de integração e obtenção da seqüência completa do DNA exógeno presente no evento Embrapa 5.1, o DNA genômico foi isolado de acordo com Dellaporta et al. (1983). As reações de amplificação e resgate de fragmentos dos transgenes presentes no genoma do evento Embrapa 5.1 foram realizadas por SON-PCR de acordo com Antal et al. (2004), TAIL-PCR de acordo com Liu & Whittier (1995) e Liu et al. (1995) ou usando o Genome Walker™ Universal kit (Manual Cat. No. 638904; Protocolo PT3042-1, Versão No. PR742239, Publicado em 25 de abril de 2007 e disponível em www.clontech.com ; Clontech Laboratories, Inc. EUA/Canadá). Para garantir a fidelidade das seqüências, todas as reações foram realizadas com Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen). Os fragmentos amplificados foram seqüenciados diretamente ou clonados no vetor pGEMT-Easy (Invitrogen) e em seguida seqüenciados. As seqüências foram analisadas usando as ferramentas BLAST disponíveis em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (National Center for Biotechnology Information, USA) e MEGA (Kumar et al., 2008). Foram consideradas seqüências com $QV \geq 20$ (o escore QV pode ser interpretado da mesma forma que o escore Phred. Valores acima de 20 geralmente significam que a seqüência é confiável. $QV = -10 \log_{10}(PE)$ onde PE é a probabilidade de erro. Então $QV = 20$ corresponde a 99% de acurácia. Devido à dificuldades de seqüenciamento de regiões grampo, técnicas especiais foram utilizadas para permitir seqüenciamento de DNA com estrutura secundárias estáveis na forma de dsRNA (<http://www.fidelitysystems.com/difficult.htm>) ou seqüenciamento de última geração foram utilizados (GS FLX Titanium).

Abaixo estão especificados os *primers* utilizados para essas análises:

<i>Primer</i>	<i>Sequencia</i>
35SKAN199F	CTATTACAGAGGCAAGAGCAGC
35SKAN2F	CTACAAATGCCATCATTGCG
35SKAN576R	GACCTGCTGCGTAGGCCTCTCTAAC
35SKANNIBAL1051F	CCAGCTATCTGTCACTTCATCG
AD1	CTCGAGTATTGGTGTT

AD2	AGTCGAATGAAAGGAA
AD3	TGTGTAGTAGCAGAGA
AD6	AGCCAGTCAGTAGAAG
AD7	AAGCATGCCGGACATA
AHAS1/Mg	GAGGATGATTTGTTGGG
AHAS35	CTTCGATCTCCTTCTCCACC
AHAS500C	GTGGCTATACAGATACCTGG
AHAS534C	GGAGTGGTTGTGACATTGGTGG
AHASCD1F	ATCAGTCAACTCATCAAGGACC
AHASCD1R	GAATATCTCGTCCTCCTGAGCC
AHASCD1R	GGCTCAGGAGGACGAGATATTC
AHASCD2F	TATTCTTCCCAATCTCAGCC
AHASCD2R	GGAACAGGCTATGAGATTAC
AHASP1	GCGCTTCAAGCCTTCAACATCA
AHASP124	ACTAGAGATTCCAGCGTCAC
AHASP2	GGATCGATTGCGGAATCAATGG
AHASP3	CGAGCTTCACGAAGAATCCAAC
AHASP4	ATGGAAGCATACCAAGACTCCTTG
AMP1849	TTATCCGCCTCCATCCAGTCTA
AMP7	CTTAATCAGTGAGGCACC
AP2	ACTATAGGGCACGCGTGGT
AtAHAS/RTR	GCGTTACCTCAACAATCGGAGTC
COLIR22-1F	TCTGCGCTACCTGGACTTATCG
COLIR22-2F	CTGGATGAGATGCAGCAGATGG
COLIR22-3F	CTGGCATCGCAATTATGAGTGG
COLIR22R1	GCCATTATCATGACGCCACCAAC
COLIR22R2	GGCGCTGAATATCTGGTTGTTGG
COLIR22R3	CGTCAACAACGTTATTCCGCCAC
EDUORI1	AGGGATTTTGGTCATGAG
EDUORI2	TAGTTAGGCCACCACTTC
FEIJÃO1	GGTTATGATGGCAGGATGTG
FEIJAO10	CAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG
FEIJAO10	CAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG
FEIJAO11	TTCGCCACCTCTGACTTGAG
FEIJÃO2	GCAATTTACACTTCCAAAAG
FEIJÃO3	GCAGGAATTTCGATATCAAGC
FEIJAO4	TCTCAGTTCGGTGTAGGTTCGTTTCG
FEIJAO5	GGCGGTAATACGGTTATCCACAG

FEIJA06	CAGCAGCCACTGGTAACAGGAT
FEIJA07	TCTGAGAATAGTGTATGCGGGCACC
FEIJA08	TTAATCGCCTTGCAGCACATCC
FEIJA08	ACTTAATCGCCTTGCAGCACATCC
FEIJA09	CCCTATAGTGAGTCGTATTAC
M13F(-20)	GTAAAACGACGGCCAGT
M13R(-20)	GCGGATAACAATTTACACACAGG
OCSKAN515R	GTAGAGCGGACGGCCAATACTCAAC
OCSKAN83F	GCATGTGTAGCTCAGATCCTTACC
OCSKannibalR	TCGGTGTGTCGTAGATACTAGC
OPE 14	TGCGGCTGAG OPE 7
	AGATGCAGCC
PB52100C	CACAATTCCACACAA
PBS	CCGGCTCGTATGTTGTGTGG
PBS2827C	ATTCAACATTTCCGTGTCGC
PCR1F1	CCATCTGATTCAATCGACGCCT
PCR1F2	CCATCTGATTCAATCGACGCCT
PCR1F3	CGAACTTCCAGCCAACCTCGACC
PCR1R1	CTGCACTAATAGGTCAAGCCAC
PCR1R2	GGACTGCTTGCTTGTGCCTTA
PE2F1178	CCAGAAGCACTAATCAGAC
PUCLI19R	GGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGT
PV1	ACTTTATGAAATGGGGTG
PVCLOROF	GTGTGCCGACTTGAGATTTTG
PVCLOROF2	ATATTTAGACCTCGCAACTGGAC
PVCLOROR	CGTCCAACCGTTACTGAAGCT
PVCLOROR2	CCAGCAATTCTTACTCAGGGA
PvCol1R	CTTCGGCTATCAGCTACTGTGG
PVCOLI2F	ATCATGAAGGCGCGCTGAATGT
PvCOLI2R	ACTATCGCGTTGAGAGTAGCAG
PVCOLI3R	TAGCGGAGATTGATGACGTACC
PVCOLI4R	GTCCGGTGTGTCATAGTCTGC
PvCOLIF mntH	CTCATAACCAGAATCCGTGTCG
PvCOLIF	CGGTATTCTCCAGCACATTCG
PvCOLIFmntH	CTCATAACCAGAATCCGTGTCG
PvFJ817289	CCATTCTGCCACTTCACAAC
PvGU215957/FJ817289	ATTTTTTGTCTCTAAAATTG
PvGU215957	TCATTCTCCTTAGAAGCTTGC
PVQ	GGTTACAGATTTGGTCAAGAGG

R124F1	TACAGGCCAAGCAGCTAGGAAG
R124F2	TCGCATATACGGTTCTCTGAGG
R124R1	CCGTAGTTGATAGTCAAGGTCG
R124R2	ACGTATTTACTGGTTATATCATCG
R124R3	CTCAGAGAACCGTATATGCGAATT
R14R	CAAATCACGAATAAGTTGTATAG
R313F1/Mg	ATTCCTTGAAGTTGAGTATT
R313F2/Mg	GAATTTAAAATTTAAAAGGTT
R313F3/Mg	CCTGTAAGGCTTGCTGTAAA
R313R1/Mg	ATTATTACAATGAAAATTTC
R313R2/Mg	GAGAACGAAGACAAGACTCC
R332R	TCTGGAGAGGGCGGTAAGAC
R88F/Mg	AAACCCGTCGCCTTAC
R88R1/Mg	GTCGTTTTACAACGTC
R88R2/Mg	ACCCAACCTTAATCGC
R88R3/Mg	TTTCGTTGAACTGAC
R88R4/Mg	GTTGATCTCTTCATC
SOJAE1F	CATTGCTTCTGCTATCGACACG
SOJAE1R	CCTCGGGATTTGATTTTTGGTCCT
SOJAE2F	ATTGAAATGTGCTCATATGGGCCG
SOJAE2R	GCCATCATAACCTCATGCTGGAAA
SOJAE3P1R	TACCAATGCTTAATCAGTGAGGC
SOJAE3P3F	CCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTT
SOJAE3P3R	GGACTCCAACGTCAAAGGGCGA
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG
T7	AATACGACTCACTATAG

Análise de Southern Blot

DNA genômico foi extraído de folhas de feijão seguindo método descrito por Dellaporta et al. (1983). A concentração foi determinada usando o Nanodrop. Vinte microgramas de cada amostra de DNA genômico foram digeridos com as enzimas *Xba*I, *Eco*RI, *Nco*I, *Kpn*I, e *Sph*I (FastDigest® Restriction Enzymes, Fermentas) por um período de 16 h, fracionado em gel de agarose 1% , transferido por capilaridade para membrana de nylon Hybond N⁺ (Amersham Pharmacia Biotech, Suécia) e fixado em UV cross-linking. A membrana foi pré-hibridizada a 65°C em SSPE 5X , solução Denhardt's 5X, SDS 0,5%

(w/v) e 100 μ L de DNA de espermatozoides de salmão, em um volume final de 25mL. A produção das sondas foi feita usando um random primed (Ready-to-Go™ Kit Pharmacia Biotech, UK) α^{32P} -dCTP. Como sonda foram marcados fragmentos gerados por PCR com os pares de primers SOJAE1R/SOJAE1F (SONDA 1, 661 pb correspondendo a um fragmento da sequência 3' do gene *AtAhas*, posições 4.083-4.743 no vetor pBGMVRNAiAHAS) 35SKAN199F/35SKAN576R (SONDA 2; 375pb correspondendo a um fragmento do promotor 35SCaMV; posições 6.655-7.028 no vetor pBGMVRNAiAHAS), OCSKAN83F/OCSKAN515R (SONDA 3; 433pb correspondendo a um fragmento do terminador *ocs*; posições 9.519-9.951 no vetor pBGMVRNAiAHAS) e AMP7/EDUORI2 (SONDA 4; 214 pb correspondendo a um fragmento do gene *bla*; posições 12.009-12.295 no vetor pBGMVRNAiAHAS). A Figura AI.1 mostra a posição das sondas no mapa do vetor pBGMVRNAiAHAS. Foram feitas duas lavagens em tampão SSPE 2X, SDS 0,1% a temperatura ambiente; uma lavagem em tampão SSPE 1X, SDS 0,1% a 65°C e uma lavagem em tampão SSPE 0,1X, SDS 0,1%. A membrana foi observada Usando o FujiFilm Fluorescent Image Analyzer FLA-3000. A membrana foi limpa para remoção das sondas com SDS 0,1X fervendo e onde permaneceu até esfriar completamente e lavada rapidamente em SSPE por duas vezes. Em seguida a membrana foi analisada novamente para garantir que não havia sinais observáveis. Esta foi então pré-hibridizada e hibridizada novamente como descrito acima com sucessivas sondas.

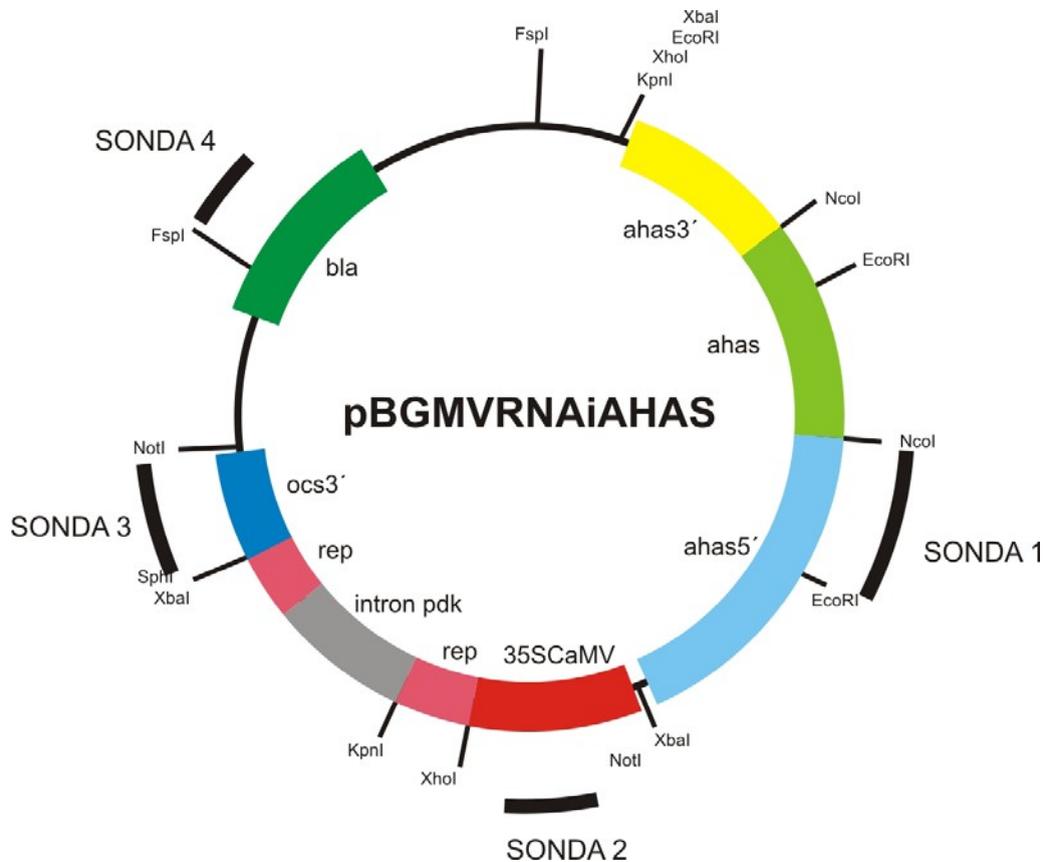


Figura AI.1. Esquema do vetor pBGMVRNAiAHAS mostrando a posição das sondas usadas nas análises de Southern.

Estabilidade do inserto ao longo de gerações

Para a análise da estabilidade da estrutura dos transgenes, DNA genômico de plantas de várias gerações a partir da planta mãe (R_0) foi isolado, digerido com a enzima *XbaI* e submetido a análises de Southern (como descrito acima) usando a SONDA2. Essa enzima e sonda foram escolhidas porque geram mais de 3 bandas, o que torna a análise mais robusta e confiável. As análises foram realizadas nas gerações F_0 (planta mãe ou evento primário), F_1 , F_2 , F_3 , F_4 e F_8 após autopolinização e após cruzamento e retro-cruzamentos com a var BRS Pontal não geneticamente modificada [geração F_1 do retro-cruzamento 1 (RC1 F_1), geração F_2 do retro-cruzamento 2 (RC2 F_2), geração F_2 do retro-cruzamento 3 (RC3 F_2) e geração F_1 do retro-cruzamento 4 (RC4 F_1)]. Foram feitas duas lavagens em tampão SSPE 2X, SDS 0,1% a temperatura ambiente; uma lavagem em tampão SSPE 1X, SDS 0,1% a 65°C e uma lavagem em tampão SSPE 0,1X, SDS



0,1%. A membrana foi observada Usando o FujiFilm Fluorescent Image Analyzer FLA-3000.

FISH de alta resolução

Foram coletadas flores contendo anteras com microsporócitos em fase de paquíteno. As anteras foram removidas das flores e então digeridas com solução enzimática composta de pectinase, citohelicase e celulase. Após digestão as anteras foram maceradas e utilizadas para preparo de lâminas com espalhados de cromossomos paquítenicos os quais foram utilizados para hibridização da sonda marcada com o fluoróforo FITC. A sonda usada foi a construção gênica utilizada na transformação das plantas de *Phaseolus vulgaris* por meio da tecnologia de RNAi. O mapeamento da sonda nos cromossomos foi conduzido com a metodologia de Hibridização In Situ Fluorescente de elevada resolução adaptada de Capdeville et al. (2009) e Szinay et al. (2008).

Inoculação das plantas transgênicas com BGMV para avaliação dos sintomas

As plantas transgênicas (geração T₀) foram inoculadas pela exposição com 20-30 moscas-brancas virulíferas por três dias e foram analisadas pela resistência ao BGMV. As gerações seguintes foram inoculadas usando de 200-300 moscas-brancas virulíferas por planta (8 dias após a germinação) por um período de 13 dias. A colônia de moscas-brancas virulíferas é mantida em plantas de feijão (*P. lunatus* L) e soja (*Glycine max* Merrill) em casa de vegetação. Após o período de inoculação os insetos foram removidos e as plantas foram transferidas para casa de vegetação para o desenvolvimento e avaliação dos sintomas que é primeiramente analisado pelo aparecimento de pequenos clareamentos foliares e posterior desenvolvimento da doença.



Estudo da tolerância in vitro dos eixos embrionários de feijão ao herbicida Imazapyr

Avaliação da tolerância a Imazapyr 80 nM in vitro. A metodologia é semelhante à do bombardeamento. As linhagens de feijão utilizadas foram todas de sementes produzidas em casa de vegetação e tinham a mesma idade aproximada. Foram superficialmente desinfestadas. Embeberam por 16-18 hrs. Os embriões foram retirados, preparados e plaqueados em caixa tipo Magenta com cerca de 50 ml de meio MS suplementado com 80 nm de Imazapyr e BAP após 5 dias no escuro, os explantes foram transferidos para o meio MS semelhante, porém sem o BAP onde foram mantidos sob luz. A temperatura flutuou de 24 a 26 °C durante o período do experimento. As leituras foram por contagem dos embriões com a extremidade meristemática morta nos intervalos anotados. Leituras realizadas ao longo de 4 semanas.

Estudo da tolerância de plantas de feijão aos herbicidas do grupo químico das imidazolinonas

Plantas de feijoeiro cultivadas em casa de vegetação (com 14 dias de idade) foram pulverizadas com herbicidas do grupo químico das imidazolinonas: imazapic (Acido 2-[4,5-dihidro-4-metil-4-(1-metiletil) -5-oxo-1Himidazol-2-il]-5-metil-3-piridine carboxilico, imazapyr: ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il) e Imazamox: Ácido 2-[(RS)-4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolina-2-yl]-5-metoxymetil nicotínico

Produto	Nome químico/composição
KiFix®	imazapic: Acido 2-[4,5-dihidro-4-metil-4-(1-metiletil) -5-oxo-1Himidazol-2-il]-5-metil-3-piridine carboxilico imazapyr: ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)
Imazapyr	imazapyr: ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il) nicotínico
Imazamox	Ácido 2-[(RS)-4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolina-2-yl]-5-metoxymetil nicotínico
Sweeper®	Imazamox: Ácido 2-[(RS)-4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolina-2-yl]-5-metoxymetil nicotínico



Foram usados os seguintes tratamentos: KiFix (50, 100 e 200 g i.a./ha), Imazapyr (50, 100 e 200 g i.a./ha), Imazamox (50, 100 e 200 g i.a./ha), Basagran (1L)+Sweeper (40g), e Basagran (0,8)+Flex (0,6). A aplicação foi realizada com barra pulverizadora mantendo-se a pressão constante. Também foi adicionado o adjuvante Fixade ® (espalhante adesivo não iônico do grupo químico alquil fenol etoxilado) (0,9ml/L) em todos os tratamentos.

Avaliação agronômica e fenotípica

Foram cultivados campos de feijoeiro com parcelas compostas pelo evento Embrapa 5.1 em homozigose e parcelas compostas pelo parental Olathe. Os campos foram cultivados em Santo Antônio de Goiás - GO (Embrapa Arroz e Feijão), Sete Lagoas - MG (Embrapa Milho e Sorgo) e Londrina - PR (Embrapa Soja) nos anos de 2008 e 2009. Todas as operações, tais como tratamentos culturais, foram sempre realizados em todas as parcelas experimentais e bordaduras, sem discriminação. O solo foi preparado com grade aradora e de nivelamento (quando necessário).

Análise de solo: Foi feita a coleta de solo em cinco pontos da área, até a profundidade de 10-15 cm. Desta amostra composta foi retirada a quantidade necessária para as análises laboratoriais.

Adubação e sulcamento mecanizado: 400 kg/ha da fórmula 04-30-10 + 0,5% de zinco.

Tratamento de sementes: imediatamente antes do semeio, com o fungicida Vitavax + Thiram na dosagem recomendada pelo fabricante. Em alguns casos o tratamento de sementes não foi realizado.

Irrigação: Foi realizada de acordo com a necessidade.

Cobertura nitrogenada: Realizada dia 22/04/2008 e 30/04/2008 com sulfato de amônia, à razão de 58 kg/ha.

Herbicida: Flex-Fusilade (uma aplicação) ou foi realizada capina manual do experimento.



Controle de pragas e doenças. Controle percevejo das vagens: Folisuper 600 BR 200 ml/hectare. Controle de doenças foliares e das vagens: preventivamente foi usado Score EC 250 – 75 ml/hectare. Em alguns casos o controle de doenças não foi necessário.

Dessecamento das plantas existentes na área: Glifosato (4 l/ha) e/ou e/ou gladium (2 l/ha); gramoxone (2 l/ha) para controlar plantas remanescentes;

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SAS, no modo GLM (general linear model) de acordo com a necessidade do conjunto de dados. O número de observações foi entre 42 e 46 (para o ano de 2008) e de 36 para o ano de 2009. Usou-se no mínimo $n=8$ tanto para o evento Embrapa 5.1 quanto para o seu parental Olathe.

As seguintes variáveis foram analisadas: PROD- produção (g/parcela de 25 m²); GERM- germinação (%); ALTIN- altura inicial das plântulas (cm); LARG- largura máxima das folhas primárias (cm); COMP- comprimento máximo das folhas primárias (cm); SEVA- Nº de sementes por vagem; P100S- massa de 100 sementes; COMPV- comprimento das vagens (cm); LARGV- largura das vagens (mm); COMPS- comprimento das sementes (mm); LARGS- largura das sementes (mm); ESPS- espessura das sementes (mm)

Análises de composição

As amostras de grãos foram coletadas de ensaios de campos cultivados em Sete Lagoas (MG), Santo Antônio de Goiás (GO) e Londrina (PR) e enviadas para a Embrapa Agroindústria de Alimentos para as análises de composição em grãos crus e processados (cozidos). Antes do processamento e preparo das amostras, o material foi analisado por PCR para confirmação de que se tratava do evento geneticamente modificado e que os grãos usados como controle eram realmente oriundos dos blocos de plantas convencionais. As amostras foram recebidas no Laboratório de Diagnóstico Molecular para a confirmação da modificação genética. As análises iniciaram-se pela moagem dos grãos de feijão (com e sem cozimento) em micro moinho para posterior extração/isolamento do DNA.



Extração de DNA

Foi realizado procedimento de extração do DNA genômico utilizando-se dois protocolos de extração: CTAB e o kit DNeasy[®] (Qiagen).

Quantificação de DNA

A quantificação do DNA extraído das amostras foi procedida através do método de fluorometria, utilizando equipamento fluorômetro (*Qubit[®] Fluorometer/ Invitrogen*). Foram utilizados dois kits de acordo com a quantidade do DNA que se deseja quantificar. O kit *Quant-iT[™] dsDNA BR Assay Kit* é indicado para quantidades entre 2 e 1000 ng de DNA; e o kit *Quant-iT[™] dsDNA HS Assay Kit* é mais sensível à quantidades de DNA entre 0,2 e 100 ng.

Detecção/PCR

A PCR foi conduzida utilizando o seguinte par de oligonucleotídeos: HPXHO (5'-CCTCGAGATAGTGCGGTGCGA-3') e HPKPN (5'-AGGTACCATGCGGCATCCGAAGC-3'), gerando um fragmento de 424pb.

As condições da reação e ciclagem estão descritas a seguir.

Mix	Reação	Volume para 1 amostra
Tampão (10X)	1X	2,0 µL
Primer 1 (HPKPN 10 µM)	0,25 µM	1,25 µL
Primer 2 (HPXHO 10 µM)	0,25 µM	1,25 µL
dNTPs (10 mM)	0,40 mM	0,80 µL
MgCl ₂ (50 mM)	3,5 mM	1,4 µL
Taq Recombinante (5 U/µL)	0,15 U/µL	1,2 µL
H ₂ O	-	8,1 µL
DNA	-	4,0 µL

Volume total da reação = 16,0 µL de Mix + 4,0 µL de DNA = 20,0 µL

Ciclagem: 95°C/5min; 40 ciclos: 95°C/1min, 68°C/1min, 72°C/2min30seg; 72°C/4min; 4°C/∞.

Os produtos das reações foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% (150mV/150mA/80min). A figura a seguir retrata as corridas eletroforéticas (Figura X). Ficou evidenciado que o par de oligonucleotídeos usado foi específico para a detecção do evento Embrapa 5.1, pois nas reações onde foram usadas amostras de DNA de feijão convencional (não geneticamente modificado) a banda característica de 424pb não apareceu.

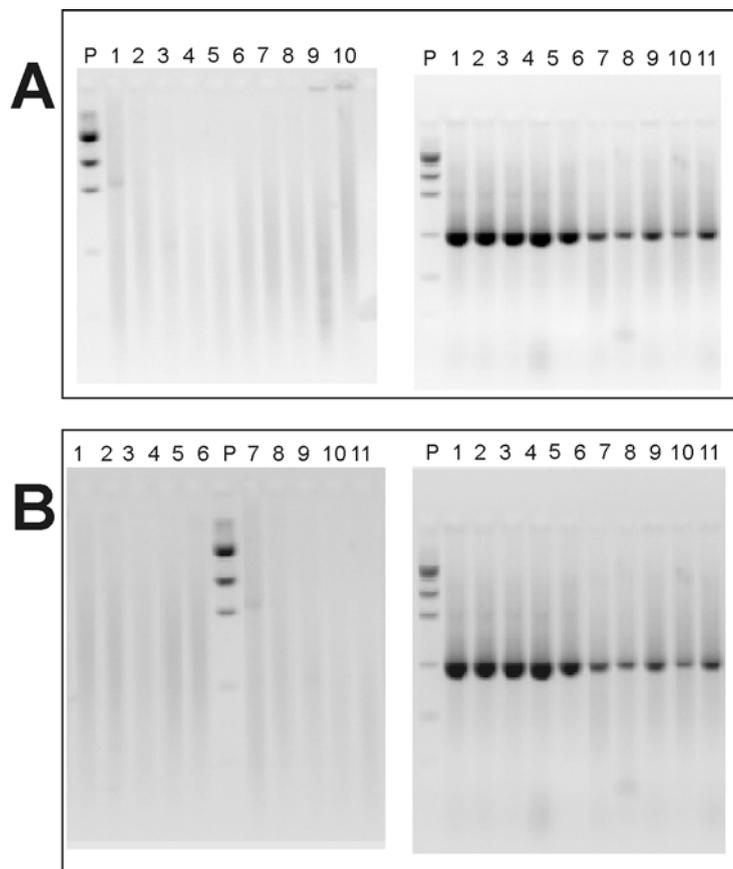


Figura AI.2. Análise de detecção de transgenes em sementes por PCR usando DNA de feijão convencional (gel na esquerda em A e B) e evento Embrapa 5.1 (gel na direita em A e B). A) Sementes secas antes de cozimento e B) sementes após o cozimento. 1 a 5: DNA isolado usando o método CTAB; 6 a 10: DNA isolado. B) P: marcadores de massa molecular (*low mass*).

Para geração de dados a serem utilizados como padrão de referência, foram cultivados campos de feijoeiro (variedades BRS Valente, Diamante Negro, Pérola, Timbó, Olathe) nos anos de 2003, 2004, 2005, 2006 e 2007 nos municípios de Santo



Antônio de Goiás (GO), Simão Dias (SE), Lavras (MG), Ponta Grossa (PR), Anápolis (GO), Passo Fundo (RS) em distintas épocas do ano.

As amostras teste foram compostas de grãos oriundos de plantas do Evento Embrapa 5.1 e as amostras controle foram grãos coletados de plantas de feijão convencional var. Olathe. Os campos foram cultivados por dois anos em Sete Lagoas (MG), Santo Antônio de Goiás (GO) e Londrina (PR). As amostras foram enviadas para Embrapa Agroindústria de Alimentos. As amostras foram recebidas na Central de Recebimento de Amostras e encaminhadas para os Laboratórios de Análise Sensorial, de Físico-Química, de Minerais e de Cromatografia Líquida para as análises descritas a seguir.

Fibra Alimentar

Método 985.29, (AOAC, 2005).

Pesou-se em triplicata 1 g das porções testes, acompanhadas de mais 2 brancos, adicionou-se tampão fosfato e colocou-se em banho com agitação por 20 minutos a temperatura de 95-100°C. Seguiu-se o tratamento das amostras no mesmo banho com adição de enzima Termamyl e agitação a 95-100°C por 35 minutos. As amostras foram esfriadas e ajustou-se o pH de cada amostra para $7,5 \pm 0,1$. Adicionou-se 0,1 mL de solução de protease e incubou-se sob agitação na temperatura de 60°C por 30 minutos. Esfriou-se e ajustou-se as amostras para pH de $4,5 \pm 0,2$. Adicionou-se solução de amiloglucosidase sob agitação e incubou-se por 30 minutos com agitação mecânica no banho-maria à 60°C. As amostras foram retiradas do banho e adicionou-se cerca de 300 mL de etanol 95% pré-aquecido. Um precipitado foi deixado se formar à temperatura ambiente por 1 hora. Filtrou-se as amostras através do sistema de filtração com o cadinho com filtro sinterizado + celite usando vácuo. Transferiu-se quantitativamente todo o resíduo do Becher usando etanol 78%. Os cadinhos foram levados à estufa (105°C) por 1 hora e esfriados em dessecador. Após esse procedimento as amostras foram pesadas (P1). Dois dos cadinhos e um dos brancos foram colocados na mufla à 550°C por 5 horas. Resfriou-se a seguir em dessecador e o peso foi medido (P3). Este resultado corresponde ao teor de cinzas do resíduo. Nos outros dois cadinhos e no branco remanescente, procedeu-se a análise de proteína. Com o auxílio de uma espátula



apropriada, o material do cadinho (com resíduo) foi transferido para papel manteiga e depois para um tubo de digestão Kjeldhal, para se determinar o teor de proteína do resíduo. Digeriu-se e dosou-se a proteína de acordo com o POP da análise de proteína. O cálculo do teor de fibra foi corrigido em relação ao teor de cinzas, proteína e branco.

Cinzas

Método 923.03 (AOAC, 2005).

Pesou-se em duplicata cerca de 2g de amostra em cadinho de porcelana previamente tarado em mufla a 550°C. Levou-se a amostra para queima em bico de Bunsen até que não mais ocorresse desprendimento de fumaça. Colocaram-se os cadinhos em mufla a 550°C por cerca de 5 horas ou até que o resíduo se manteve-se branco ou cinza. Esfriou-se em dessecador e o material foi pesado.

Umidade

Método 925.09 modificado (AOAC, 2005).

Pesou-se em duplicata cerca de 2g de amostra em pesa filtro previamente tarado em estufa a 100°C. Colocaram-se os pesa filtros em estufa a 100°C, por cerca de 3 horas. O material foi retirado e pesado em dessecador, logo que atinja a temperatura ambiente. Retornaram-se os pesa filtros para estufa a 100°C por mais 1 hora. Foram então esfriados e pesados. Esta operação foi repetida até que se alcance peso constante entre as pesagens.

Extrato etéreo

Método 922.06 (AOAC, 2005).

Pesou-se em duplicata cerca de 2g de amostra em balão de fundo chato de 250 mL. Foram adicionados 2 mL de álcool, e agitou-se. Foram adicionados 10 mL de HCl (25:11), misturou-se bem. Colocaram-se os balões em banho-maria Dubnoff em temperatura 70-80°C, e agitaram-se durante 30-40 minutos. A mistura foi transferida



para funil de decantação de 250 mL. Adicionou-se 25 mL de éter etílico e agitou-se por 1 minuto. Foram adicionados 25 mL de éter de petróleo e agitou-se por 1 minuto. As porções foram deixadas em repouso até que se apresentem em duas fases. A fase aquosa foi descartada. A fase etérea foi filtrada para balão de fundo redondo de 250 mL previamente tarado em estufa a 100°C. A fase etérea foi filtrada usando funil contendo sulfato de sódio. Secou-se a fase etérea até a secura em roto evaporador. O balão seco foi levado para estufa a 60°C, e deixado por 1 hora para esfriar e em seguida foi pesado.

Proteína/Nitrogênio Total

Método 2001.11 modificado (AOAC, 2005).

Pesou-se em duplicata 0,5 g de amostra em papel manteiga e um branco. Transferir para o tubo de digestão. Adicionou-se uma espátula cheia de catalisador (ou uma pastilha do catalisador pronto) no tubo de digestão e em seguida 8 mL de H₂SO₄ P.A. Colocaram-se todos os tubos no bloco digestor e ajustou-se a temperatura, para elevação gradual da temperatura até 350°C. Deixou-se digerir até que o conteúdo do tubo se tornasse claro (verde ou azul claro e límpido). Deixou-se em digestão por mais 1 hora e esfriar até temperatura ambiente. Levou-se o tubo de digestão para destilador. Foram adicionados 30 mL de solução de ácido bórico a 5% em erlenmeyer de 250 ou 300 mL, adicionou-se em seguida no mínimo 4 gotas de indicador e colocou-se na saída do destilador. Foram adicionados cerca de 25 mL da solução de NaOH 40% no copo dosador do destilador, aguardou-se o início da produção de vapor e adicionou-se de uma vez a solução de NaOH ao conteúdo do tubo de digestão. Destilou-se até a virada da solução indicadora de rosa para verde. Após a virada, foram aguardados mais 10 minutos e interrompeu-se a destilação. Titulou-se o destilado com a solução de H₂SO₄ 0,05M padronizada até viragem de verde para rosa. O valor de nitrogênio total da amostra foi calculado. Para se converter nitrogênio em proteína, multiplica-se o valor de nitrogênio total por um fator empírico correspondente a matriz analisada.



Ácido Fítico

Método 986.11, (AOAC, 1986).

Pesou-se em duplicata cerca de 2 gramas de amostra em Erlenmeyer de 125 mL. Foram adicionados 40 mL de solução de ácido clorídrico HCl 2,4%. Os frascos foram fechados com parafilme e deixados no Agitador por 3h. Após a agitação centrifugou-se durante 10 min., e em seguida a amostra foi filtrada a vácuo com papel de filtro Whatman nº 1. Pipetou-se 1 mL do filtrado obtido em um balão volumétrico de 25 mL. Foi adicionado 1 mL de Na₂EDTA-NaOH. Avolumou-se a 25 mL com água. Misturou-se bem e transferiu-se quantitativamente para uma coluna contendo resina de troca iônica para reter o fitato. O eluato foi descartado. Passou-se (eluição) 15 mL de água e descartou-se o eluato. Foram passados 15 mL de solução de NaCl 0,1M: descartou-se o eluato. Foram passados 15 mL de solução de NaCl 0,7M: coletou-se esta fração (fitato liberado) em balão de digestão micro-Kjeldahl de 100 mL. Foi adicionado 0,5 mL de H₂SO₄ e 3,0 mL de HNO₃ Foram adicionados 3 pérolas de vidro e um funil de colo curto na boca do balão para fazer o refluxo. Os balões foram levados até a chapa de aquecimento e realizar a digestão em temperatura média até que a ebulição cessasse e ocorresse a formação de vapores amarelos no pescoço do balão. Deixou-se esfriar e foram adicionados 10 mL de água e continuou-se o processo de digestão na chapa de aquecimento até que ocorra intensa liberação de vapores de coloração castanha com redução de volume próximo a secura. Esfriou-se e foram adicionados 10 mL de água e aqueceu-se a baixa temperatura para dissolver o sal se necessário. Continuou-se aquecendo por 10 min e em seguida a amostra foi esfriada. Transferiu-se quantitativamente a solução em um balão volumétrico de 50 mL. Foram adicionados 2 mL da solução de molibdato de amônio. Misturou-se bem. Adicionou-se 1 mL da solução do reagente ácido sulfônico. Misturou-se bem. O volume foi levado a 50 mL e misturou-se bem. Após 15 min as amostras foram lidas no Espectrofotômetro na região do visível a 640 nm.



Atividade Inibidora de Tripsina

Método: Ba 12-75, (AOCS, 2009).

Pesou-se, com precisão de décimo de miligrama 1 grama de amostra em becker de forma alta de 100mL. Foram adicionados 50 mL (pipeta volumétrica) de solução de hidróxido de sódio 0,01M e agitou-se, com barra magnética, a suspensão vagarosamente por 3 horas. Verificou-se o pH da suspensão que deve estar entre 8,4 e 10,0. Verteu-se esta solução para um tubo Falcon e centrifugou-se por cerca de 10 minutos. Uma alíquota da suspensão foi retirada e diluída em água destilada. Tomou-se uma alíquota de 1 mL da solução da diluição e realizou-se a reação completa com tripsina (descrita abaixo). A absorvância deste teste deve estar entre 0,4 e 0,6 vezes a absorvância do ensaio 0-mL (branco). Quando não é possível alcançar a absorvância esperada nesta primeira diluição, outra diluição deve ser realizada. Adicionou-se 0; 0,6; 1,0; 1,4 e 1,8mL da suspensão diluída em duas baterias de tubos de ensaio e completou-se o volume para 2mL em cada tubo de ensaio com água destilada. Foram adicionados 2mL de solução de tripsina em cada tubo, misturou-se rapidamente no agitador Vortex e colocou-se imediatamente no banho a 37°C. Preparou-se um timer para um intervalo de 10 minutos e fez-se a mesma seqüência do começo até o fim da reação, para cada tubo. Foram adicionados 5 ml da solução de BAPA, misturou-se no agitador Vortex, e colocou-se no banho a 37°C e imediatamente começou-se a marcar o intervalo de 10 minutos. Após o intervalo de 10 minutos a reação em cada tubo foi parada usando a seqüência original, pela adição de 1 mL de solução de ácido acético e misturada no agitador Vortex. Um branco foi preparado. Pipetou-se 2 mL da suspensão diluída em um tubo de ensaio. Adicionou-se 5 mL de solução de BAPA e misturou-se no agitador Vortex. Colocou-se no banho a 37°C por 10 minutos. Adicionou-se 1mL de ácido acético e misturou-se no agitador Vortex. Foram adicionados 2 mL da solução de tripsina e misturada. Este branco foi usada para zerar o espectrofotômetro. O conteúdo de cada tubo foi filtrado usando filtro de papel Whatman n°. 2 ou n°. 3, ou equivalente. Determinou-se a absorvância de cada ensaio contra o branco em 410nm. A atividade é expressa em TIU/g = Trypsin Inhibitor Activity por grama. Um TIU é arbitrariamente definido como um aumento de 0,01 unidade de absorvância a 410 nm por 10mL de mistura de reação (nas condições usadas no método).



Minerais

Métodos: 999.11 (digestão) e 990.08 (quantificação), (AOAC, 2005).

Pesou-se em duplicata cerca de 0,4 g de amostra em cadinho de porcelana descontaminado e seco. A amostra foi levada para queima em bico de Bunsen até que não mais ocorresse desprendimento de fumaça. Colocaram-se os cadinhos em mufla a 450°C por pelo menos 12 horas ou até que o resíduo se mantivesse branco ou cinza. Após esfriamento, foram adicionadas algumas gotas de água ultra-pura e 6 mL de HNO₃ concentrado. Aguardou-se 30 minutos e adicionou-se 1 mL de H₂O₂ concentrado. Após mais 30 minutos a amostra foi transferida quantitativamente para balão volumétrico de 50mL. Analisou-se as concentrações de minerais por leitura ICP-OES relacionadas a uma curva de calibração.

Vitamina B1

Realizada de acordo com European Committee for Standardization. EN 14122: foodstuffs: determination of vitamin B1 por HPLC (European Committee for Standardization, 2003a). O método visa quantificar a vitamina B1 presente em alimentos em geral, através de método por HPLC, padronização externa e derivatização pós-coluna com ferricianeto de potássio alcalino. Preparo de amostra: pesa-se 1,5g da amostra em erlenmeyer âmbar de 125mL, adiciona-se 15mL de HCl 0,1M, leva-se o erlenmeyer à autoclave por 30 minutos à 121°C, após isto adiciona-se solução de acetato de sódio 2,5M até pH 4 e 150mg da Enzima Takadiastase, em seguida leva-se o erlenmeyer ao banho Maria aquecido à 38°C com agitação por aproximadamente 16 horas, transfere-se quantitativamente todo o conteúdo do erlenmeyer para balão volumétrico âmbar de 100mL com HCl 0,1M, filtrando-se em seguida a solução obtida para vial do injetor automático.

Condições cromatográficas:

Coluna: Coluna C18: 3,2x100mm e 3,5 µm.

Detetor Fluorescência: λ_{exc} = 368nm e λ_{em} =440nm

Volume de injeção amostra: 20µL



Tempo de corrida cromatográfica: 10min

Temperatura do injetor: 5°C

Eluição Isocrática

Fase móvel A: 60% Hexanossulfonato de sódio ou Heptanossulfonato de sódio 25mM.

Fase móvel B: 40% Metanol.

Vazão de fase móvel: 1,0 mL/min

Derivatização pós-coluna com ferricianeto de potássio alcalino

Vazão do reagente: 0,3mL/min

Temperatura da reação: ambiente

Vitamina B2

Análises realizadas de acordo com European Committee for Standardization. EN 14152: foodstuffs: determination of vitamin B2 by HPLC (European Committee for Standardization, 2003b)

O método visa quantificar a vitamina B2 presente em alimentos em geral, através de método por HPLC e padronização externa.

Preparo de amostra: idem ao preparo da vitamina B1.

Condições cromatográficas:

Coluna: Coluna C18: 3,2x100mm e 3,5 μ m.

Detetor Fluorescência: λ_{exc} = 468nm e λ_{em} =520nm

Volume de injeção amostra: 20 μ L

Tempo de corrida cromatográfica: 6 min

Temperatura do injetor: 5°C

Eluição Isocrática

Fase móvel A: 50% Água Milli-Q®

Fase móvel B: 50% Metanol

Vazão de fase móvel: 1,0 mL/min



Açúcares

As análises foram realizadas de acordo com Macrae (1998).

O método baseia-se na separação cromatográfica da amostra em coluna de Fase Reversa e conseqüente determinação da concentração dos açúcares por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, utilizando método de padronização externa.

Preparo de amostra: pesa-se 1g de amostra em balão volumétrico de 20mL, adiciona-se de 10mL de água ultrapurificada, posteriormente segue-se para extração em banho ultrassom por 20 minutos, em seguida adiciona-se de 5mL de acetonitrila, avoluma-se com água ultrapurificada e filtra-se a solução diretamente para o vial do injetor automático.

Condições cromatográficas:

Coluna: Amino 30 cm x 4,6 mm (High Performance Carbohydrate)

Temperatura da coluna: Ambiente

Fase Móvel: Acetonitrila 75%

Fluxo: 1,4mL/min

Detetor: índice de Refração

Temperatura interna do detetor: 45°C

Volume de injeção: 20µL

Tempo de corrida: 20min

Temperatura do injetor: +10 °C (opcional, sendo recomendado sempre que o injetor possuir refrigeração)

Determinação de Aminoácidos

Hidrólise ácida, hidrólise básica para triptofano e oxidação perfórmica para sulfurados: Aminoacids in feed, (AOAC, 2005) - Método 998.15. Análises realizadas de acordo com Cohen & Michaud (1993).

Preparo da amostra:

- Moagem em moinho manual – IKA A11
- Desengraxe em Homogenizador com Éter de Petróleo

- Secagem em dessecador sob vácuo 24h

Procedimento a seguir:

- Pesagem em duplicata em ampolas de vidro
- Adição de HCl 6M
- Selagem da ampola sob vácuo
- Hidrólise a 110°C por 20h
- Abertura de ampola e secagem de alíquota em dessecador por 16h
- Reação com derivatizante AQC (Amino Quinolil Carbamato) e análise cromatográfica em CLAE

Hidrólise aminoácidos sulfurados

- Pesagem em duplicata em ampolas de vidro
- Oxidação com Ácido Perfórmico em gelo por 16h
- Neutralização com Ácido Bromídrico
- Evaporação em vácuo por 2h(mínimo)
- Adição de HCl 6M
- Selagem da ampola sob vácuo
- Hidrólise a 110°C por 20h
- Abertura de ampola e secagem de alíquota em dessecador por 16h
- Reação com derivatizante AQC e análise cromatográfica em CLAE

Hidrólise básica (Triptofano)

- Pesagem em duplicata em ampolas de vidro
- Adição de amido
- Adição de NaOH 4,2M
- Selagem da ampola sob vácuo
- Hidrólise a 110°C por 20h
- Abertura de ampola e neutralização com Ác. Acético
- Análise cromatográfica em CLAE



Análises Sensoriais

Capacidade de absorção de água e pico de absorção

A Determinação de absorção água foi realizada segundo Uebersax & Bedford (1980) e Dolvo (1977). A percentual de água absorvida leva em consideração a diferença de peso antes e após a maceração. Foram pesados e colocados em béquer de 500 mL, contendo 100 mL de água destilada, alíquotas de oito gramas (8g) de grãos de cada amostra (variedade), a temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2$) por 16 horas, sendo drenados por 3 minutos, a cada 1 hora e, posteriormente, pesados. A relação de hidratação foi obtida pela fórmula:

$$\% \text{água} = [(P_f - P_i) / P_i] \times 100, \text{ onde:}$$

%água = percentual de água absorvida;

P_i = peso inicial da amostra;

P_f = peso final da amostra.

Percentual de grãos duros (*hard-shell*) (banco de dados)

As análises de HardShel foram realizadas de acordo com Garruti (1981). O percentual de grãos duros ou *hard-shell* consiste na proporção daqueles que, após o período de maceração, não absorveram água em relação ao total.

Os grãos normais e os grãos duros (com baixa capacidade de hidratação) em relação ao número total de grãos avaliados foram quantificados por meio de contagem manual.

Os grãos foram peneirados (peneira n°12) sendo escolhidos 100 daqueles que ficaram retidos, levando-se em consideração sua integridade. Posteriormente, foram imersos por 8 horas em água destilada e, após este tempo, aqueles grãos que não absorveram água foram contados. A identificação dos grãos duros foi realizada através



da observação do enrugamento da casca. O resultado foi expresso em % de grãos duros (sem capacidade de hidratação).

Tempo de cozimento experimental (banco de dados)

A determinação do tempo de cozimento foi realizada segundo Burr et al. (1968) e Proctor & Watts (1987). O tempo de cozimento dos grãos foi realizado no cozedor experimental JAB-77, tipo minor, com 25 estiletes, pesando cada um deles 90g, fabricado pela UNESP – Jaboticabal – SP, o qual se baseia nos mesmo princípio do cozedor de Mattson.

O equipamento contém receptáculos de metal que mantêm o grão de feijão em posição estática e possui duas pequenas aberturas: uma superior e outra inferior, onde os estiletes verticais repousam sobre as porções terminais de cada grão e, penetram após o seu cozimento. Cada receptáculo é atravessado, verticalmente, por um estilete quando o feijão se torna suficientemente macio. Vinte e cinco grãos foram colocados e posicionados nos receptáculos sendo o cozedor, a seguir, colocado em panela de aço inox, com capacidade para 10 litros, contendo 5L de água destilada, mantendo-se a porção inferior do cozedor imersa em água a temperatura de 104°C. Inicialmente, foi registrado, o momento em que cada estilete penetrava o seu respectivo grão. O tempo de cozimento foi considerado aquele necessário para que 50% dos estiletes penetrassem nos grãos, convencionando-se adotar o tempo da queda do 13º estilete. Os experimentos foram realizados com os grãos imersos em água, por 16 horas e naqueles não, previamente, imersos.

Eletroforese bi-dimensional (2D)

Grãos maduros colhidos nos campos cultivados em Santo Antonio de Goiás, Londrina e Sete Lagoas foram congelados e macerados até se transformarem em um pó fino separado em uma malha de 100 mesh. A extração de proteína total foi feita de acordo com Vasconcelos et al. (2005) e quantificada pelo método descrito por Bradford (1976). Para a eletroforese bi-dimensional as tiras de gel Immobiline Dry Strips pH 4-7 ou pH 3-10 (Amersham) foram re-hidratadas por uma noite em tampão de re-hidratação



(7M uréia, 2M tiouréia, 1% triton X-100, 0.5% Pharmalyte 3-10, 2% tampão IPG, 65mM DTT). A corrida foi feita no sistema Multiphor III EF (Amersham Pharmacia Biotech) seguindo as condições recomendadas pelo fabricante. Após a corrida da primeira dimensão, as tiras de gel foram colocadas seladas em plástico e congeladas a -80°C ou incubadas à temperatura ambiente para entrarem em equilíbrio em 3 mL de tampão (50mM Tris, 6M uréia, 2% SDS e traços de azul de bromofenol) contendo 57,8 mg de DTT. A segunda dimensão foi realizada em aparato vertical com gel separador uniforme de 15% (14x14 cm), a 25°C. Os géis foram corados com azul de Coomassie. A identificação das proteínas nos géis foi feita com base na massa molecular e ponto isoelétrico, através do uso da ferramenta PepIdent (ExpASy Proteomics Server, Swiss Institute of Bioinformatics) e de acordo com Vasconcelos et al. (2005).

Estudos de consumo em animais (*Rattus norvegicus*)

Foram utilizados ao todo 34 ratos Wistar (22 machos e 12 fêmeas), provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Os animais foram separados e distribuídos, aleatoriamente, em quatro grupos conforme quatro diferentes tratamentos (Tabela AI.2). As dietas foram preparadas segundo a formulação preconizada pelo American Institute of Nutrition (Reeves et al., 1993) para a dieta AIN – 93G, com modificação no conteúdo de proteína bruta (N x 6), que era de 10% (Pellet & Young, 1980), utilizando como fonte protéica o feijão transgênico (Embrapa 5.1) e seu correlativo não transgênico, (Olathe). As amostras foram manipuladas de acordo com as especificações estabelecidas pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). As dietas experimentais ficaram assim constituídas: dieta de caseína-controle (DCas), dieta aprotéica (DA); dieta feijão transgênico (DFT) e dieta feijão comum (DFC). As dietas contendo proteína eram isocalóricas ($382,8 \pm 2,9$ kcal/100g) e isoprotéicas ($10,3 \pm 0,4\%$) (Tabela AI.3).

Tabela AI.2. Grupos de animais e tratamentos.

Grupos	No. de animais / grupo (Peso Médio Inicial ± DP)	Tratamento
GFT: grupo feijão transgênico (n=10)	6 machos (63g ± 20) 4 fêmeas (81g ± 5)	DFT DFC
GFC: grupo feijão comum (n=10)	6 machos (60g ± 17) 4 fêmeas (85g ± 5)	DCas
GC: Controle (n=10)	6 machos (62g ± 20) 4 fêmeas (86g ± 4)	
GA: Aprotéico (n=4)	4 machos (49g ± 3)	DA

Tabela AI.3. Composição da dieta DCas, DA, DFT e DFC.

Ingredientes (g/kg de dieta)	DCas	DA	DFT	DFC
Fonte protéica	200	0	518	552,6
Amido de milho	529	729	50	50
Amido dextrinizado			215	184
Açúcar (sacarose)	100	100	100	100
Óleo de soja	70	70	40	40
Fibra (celulose)	50	50	30	26
Mix mineral (AIN-93G-MX)	35	35	35	35
Mix vitamínico (AIN-93-VX)	10	10	10	10
L-Cistina	3	0	0	0
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,0	2,0
T-butil-hidroquinona	0,014	0,014	0,008	0,008

As amostras foram manipuladas de acordo com as especificações estabelecidas pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). Para preparar as farinhas integrais de feijão para formulação das dietas DFT e DFC, foram utilizados ao todo 5kg de cada amostra, previamente selecionados, pesados, lavados e macerados separadamente em água quente filtrada por 1h na proporção 1:3 (p/v), após fervura rápida por 2 minutos. Em seguida, foram cozidos no próprio caldo de maceração, com acréscimo do volume de água que foi absorvido pelos grãos, por 30 minutos. Para todos os tratamentos foi utilizada panela de pressão com fluxo contínuo de pressão de 1 atm e temperatura de 116°C. Após o cozimento, as amostras foram homogeneizadas junto com o caldo de cocção em liquidificador (Black & Daker), acondicionadas em bandejas de aço inoxidável (capacidade 1,5l), congeladas em freezer (-10°C) e liofilizadas em equipamento Sokers Freezer Dryer, com 2 pol Hg de pressão a 15,6°C (Figura AI.3). As

amostras processadas foram mantidas em geladeira (8°C) até o momento de formulação das dietas.



Figura AI.3. Processo de liofilização das amostras de feijão OGM e comum, previamente cozidas e homogeneizadas.

Todas as dietas foram elaboradas e peletizadas pela indústria Rhoster (<http://www.rhoster.com.br/empresa.htm>) de acordo com as especificações mencionadas anteriormente e mantidas sob refrigeração (4°C) até o momento de sua utilização (Figura AI.4). Para diferenciar as rações DFC e DFT, foi solicitado que a cor marrom da dieta DFT fosse acentuada pelo uso de corante alimentar natural.



Figura AI.4. Dietas experimentais peletizadas: DFC, DFT, DCas e DA

Tanto o processo de maceração como o de cozimento, visaram melhorar a digestibilidade do feijão, já que é o primeiro fator que afeta a eficiência da utilização protéica da dieta, pois a baixa digestibilidade no feijão cru é atribuída à atividade dos inibidores de proteases, que diminuem a atividade das enzimas digestivas. O tratamento térmico do feijão, no processo de cozimento, inativa os inibidores de proteases, promovendo um efeito benéfico na digestibilidade (Antunes et al., 1995). Jood et al. (1989) constataram que a digestibilidade *in vitro* da proteína de leguminosas cozidas era maior quando os grãos sofriam maceração o que também foi constatado por Barampama

& Simard (1994), em estudo realizado com feijão-carioca (*Phaseolus vulgaris*). O cozimento também elimina em larga escala inibidores de proteases de grãos inteiros e cotilédones como foi observado por Cruz et al. (2004), onde amostras de feijão cozido, apresentaram 0,012 a 0,362mg de tripsina inibida/g, sugerindo assim, que o aquecimento pelo qual os feijões foram submetidos durante o seu preparo, foi eficaz na inativação de grande parte dos inibidores de tripsina. De maneira geral, os inibidores de proteases se definem como aqueles compostos que estão presentes de forma natural em alguns alimentos e atuam provocando uma perda de nutrientes essenciais, ou interferindo em sua utilização e função metabólica. São substâncias de natureza protéica que interferem na atividade de sistemas enzimáticos do trato digestivo, inibindo especialmente proteases, que são enzimas que hidrolisam as ligações peptídicas como primeiro passo para a assimilação das proteínas. Esta inibição se traduz, *in vivo*, numa redução da digestão protéica e conseqüentemente da assimilação de proteínas (Partearroyo et al., 1995).

Ensaio biológico: Protocolo Experimental

O estudo foi conduzido no Laboratório de Ensaio Biológicos do departamento de Micro e Imunologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Campus Botucatu, São Paulo, nas condições experimentais de rotina (ciclo de claro/ escuro de 12h, $22\pm 5^{\circ}\text{C}$), sem restrição de água e dieta, com prévio período de 72h para adaptação às novas condições ambientais. O manuseio e o procedimento experimental foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Estadual Paulista - UNESP, com prévia aprovação do protocolo experimental (Protocolo no. 67/08-CEEA), em concordância com os princípios em pesquisa animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Na determinação do Quociente de Conversão Alimentar (QCA), Quociente de Eficiência Líquida da Proteína (NPR), Digestibilidade Verdadeira (Dv) e Quociente de eficiência Protéica (PER) (Pellet & Young, 1980), os animais foram colocados em gaiolas metabólicas de crescimento individuais (Figura AI.5) e monitorados a cada 48-72h para reposição hídrica e alimentar. O ganho de peso foi registrado semanalmente. O

período total do ensaio foi de 35 dias, sendo os primeiros 3 dias de adaptação e os 32 dias seguintes utilizados para obtenção destes indicativos nutricionais.



Figura AI.5. Gaiolas metabólicas

Os índices de nutricionais foram calculados de acordo com as seguintes fórmulas (Pellet & Young, 1980):

- Quociente de Conversão Alimentar: $QCA = \text{ganho de peso} / \text{consumo de dieta}$;
- Quociente de Eficiência Líquida da Proteína: $NPR = \text{ganho de peso do grupo experimental} + \text{perda de peso do grupo aprotéico} / \text{proteína consumida}$;
- Digestibilidade Verdadeira: $\%Dv = (N \text{ ingerido} - (N \text{ excretado fezes grupo teste} - \text{Nitrogênio fecal do grupo com dieta aprotéica})) / N \text{ ingerido} \times 100$;
- Quociente de Eficiência Protéica: $PER = \text{ganho de peso} / \text{proteína consumida}$

A digestibilidade verdadeira foi calculada, medindo-se a quantidade de nitrogênio ingerida na dieta, a quantia excretada nas fezes e a perda metabólica no

material fecal. Esta última foi estimada pelo montante de nitrogênio excretado pelos ratos alimentados com a dieta livre desta substância (Amaya et al., 1991).

As fezes de cada animal foram coletadas semanalmente e mantidas sob refrigeração até o momento das análises. Para quantificar o nitrogênio excretado, elas foram previamente peneiradas para remoção de impurezas, moídas e homogeneizadas.

No 35º dia foram sacrificados 3 machos de cada grupo, após 24h de jejum, por asfixia em câmara de gás carbônico para coletar o sangue por punção cardíaca e remover os órgãos internos (fígado, intestino delgado e grosso e rins). Os demais animais foram mantidos nas mesmas condições experimentais até completarem a idade fértil de 80-90 dias sendo então, transferidos para gaiolas comuns (Figura AI.6) com ração e água à vontade e agrupados macho e fêmeas de acordo com seu grupo para promover o acasalamento e a obtenção da 2ª geração de animais.



Figura AI.6. Gaiolas comuns com tampa.

Para promover o máximo de conforto para os animais, foram mantidas as mesmas condições ambientais, com limpeza frequente das gaiolas a cada 72h. A reposição de ração e água era feita a cada 48h.

Análises morfológicas e histológicas

Foram realizadas de acordo com as técnicas laboratoriais de rotina, com mensuração do peso e tamanho dos órgãos após autopsia. As lâminas histológicas foram analisadas por meio de programa de análise de imagens Leica QwinV3, em microscópio Leica DMLB acoplado de câmara digital Leica DFC 300FX.



Análises bioquímicas

O sangue de cada animal foi obtido por punção cardíaca, deixado em repouso sem tratamento com EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético) e posteriormente centrifugado a 118xg por 15 min em centrífuga Sigma 2k15, rotor No. 12141. O plasma obtido foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80° C, em biofreezer. Para as análises bioquímicas foram utilizados kits específicos para as determinações de: albumina, creatinina, uréia e enzimas hepáticas (ALT e AST).

Análises químicas

Foram determinados os teores de proteína (AOAC , 1995), lipídeos (Bligh & Dyer, 1959) e de umidade (Instituto Adolfo Lutz, 1976) nas amostras de feijão Olathe 5.1 e Olathe Pinto liofilizadas.

Teor de nitrogênio e proteína bruta das leguminosas liofilizadas, dietas e material biológico: O teor de nitrogênio foi quantificado pelo método semi-micro de Kjeldahl (AOAC, 1995), utilizando dióxido de titânio como catalisador (Williams, 1973). Para determinar o respectivo equivalente protéico, foi utilizado o fator de conversão 6,25 (Sgarbieri, 1996). Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

Perfil de aminoácidos das leguminosas liofilizadas: As determinações e quantificações de aminoácidos foram realizadas de acordo com o método proposto por White et al. (1986), Elkim & Wasynesuk (1987) e Hagen et al. (1989). Em tubo de hidrólise (Pierce, 18.800), foi pesado 0,16g de cada amostra, previamente triturada e homogeneizada, e se adicionou 9mL de HCl 6N com fenol. A amostra foi homogeneizada em ultra-som por 6 minutos, seguida de fechamento a vácuo e hidrólise a 110°C por 24h. Posteriormente, foi introduzido no tubo de hidrólise o Padrão B1 (0,3mg de ácido alfa-aminobutírico, AAAB, 99-100% Pierce em 1000mL de HCl 0,1M) e homogeneizado em mixer vortex (Janke & Kunkel, VF2) por 30 segundos. O conteúdo foi transferido para balão volumétrico de 50mL e completado o volume final com H₂O ultrapura. Em seguida, foi recolhido 3-4mL desta solução em uma seringa

plástica acoplada a um filtro Millipore (Millex) de 0,45mm, sendo que as primeiras cinco gotas filtradas foram desprezadas e o restante do filtrado foi transferido para um copo plástico de 5mL. Deste volume foram tomadas alíquotas de 50 μ L e transferidas para tubo de vidro (6x50mm), a fim de proceder à derivatização. Os tubos serão então colocados no vial de secagem na estação de vácuo (bomba a vácuo DV-142N-250 CE/JB Motor Division St. Louis, Missouri), até 70 militorr. A seguir, foi adicionado 20 μ L de solução de re-secagem (acetato de sódio triidratado 0,2N, metanol 99-100%, trietilamina 99-100%). Procedeu-se novamente à homogeneização em mixer vortex por 30 segundos e secagem em bomba de vácuo, com posterior adição de 20 μ L da solução derivatizante, sem feniltiosianato e com feniltiosianato (PITC 99-100%, Pierce). Deixou-se a amostra em repouso por 20 minutos, seguidos de secagem a vácuo. No final desta fase, o tubo apresentou cristais brancos, não oleosos. As amostras derivadas e secas foram mantidas sob congelamento (temperatura inferior a 2°C) até o momento da análise. Para análise no HPLC, precedeu-se a calibração do aparelho com uma corrida inicial em branco com os eluentes programados a partir do eluente B (mediu-se 400mL de água ultrapura e transferiu-se para um balão volumétrico de 1000mL para completar o volume final com acetonitrila a 99-100% grau HPLC, seguida da adição de 200 μ L de EDTA dissódico à 2g/L) e com os Padrões C1, C2 e C3 feitos a partir dos padrões A (Padrão Pierce H, com todos os componentes na concentração de 2,5 micromoles por mL, exceto a cistina que possui 1,25 micromoles por mL, em HCl 0,1M) e do Padrão B2 (0,3mg de ácido alfa-aminobutírico AAAB 99-100% Pierce em 1000mL de HCl 0,1M, foi utilizado 25mL desta solução diluída novamente em HCl 0,1M). Após conclusão do aminograma se introduziu a tabela de calibração (Tabela AI.4) com posterior obtenção dos fatores de calibração a partir da injeção dos padrões C1, C2 e C3. Em seguida, foi realizada a transferência de 500 μ L de solução diluente (0,3mg de hidrogeno fosfato de sódio a 99-100% em 1000mL H₂O ultrapura, dissolvido, homogeneizado, titulado com ácido fosfórico a 10% até o pH 7.40, acrescentado de 5mL de acetonitrila a 99,7-100% grau HPLC) nos tubos contendo a amostra seca e derivatizada. A continuação, foram vedados os tubos com três camadas de teflon e deixou-se no banho de ultra-som (Branson, 5210) por 10 minutos com posterior homogeneização em mixer vortex por 30 segundos, sendo depois transferida para o vial de injeção (30 μ L) com microseringa. A leitura foi realizada em analisador de

aminoácidos Pickering com coluna Picotag Column HPLC Waters Technologies do Brasil. Os resultados estão expressos em porcentagens dos componentes com relação à amostra tal qual. Para isto foi preciso corrigir as diluições efetuadas.

Tabela AI.4. Condições operacionais para calibração do analisador de aminoácidos.

Componente	Nº. do	PM	Padrão	Padrão	Concentração (g/100mL) X 1000		
			31 (g)	32 (g)	Padrão C ₃	Padrão C ₂	Padrão C ₁
ASP	01	133,1	1,0000	5,0000	6,6550	3,3275	1,6638
GLU	02	147,1	1,0000	5,0000	7,3550	3,6775	1,8388
SER	03	105,1	1,0000	5,0000	5,2550	2,6275	1,3138
GLY	04	75,1	1,0000	5,0000	3,7550	1,8775	0,9388
HIS	05	155,2	1,0000	5,0000	7,7600	3,8800	1,9400
ARG	06	174,2	1,0000	5,0000	8,7100	4,3550	2,1775
THR	07	119,1	1,0000	5,0000	5,9550	2,9775	1,4888
ALA	08	89,1	1,0000	5,0000	4,4550	2,2275	1,1138
PRO	09	115,1	1,0000	5,0000	5,7550	2,8775	1,4388
AAAB	10	103,1	0,6500		6,4350	6,43,50	6,4350
TYR	11	181,2	1,0000	5,0000	9,0600	4,5300	2,2650
VAL	12	117,2	1,0000	5,0000	5,8600	2,9300	1,4650
MET	13	149,2	1,0000	5,0000	7,4600	3,7300	1,8650
CIS 1	14	240,2	1,0000	5,0000	12,0100	6,0050	3,0025
CIS 2	15	240,2	1,0000	5,0000	12,0100	6,0050	3,0025
CIS 3	16	240,2	1,0000	5,0000	12,0100	6,0050	3,0025
ILE	17	131,2	1,0000	5,0000	6,5600	3,2800	1,6400
LEU	18	131,2	1,0000	5,0000	6,5600	3,2800	1,6400
PHE	19	165,2	1,0000	5,0000	8,2600	4,1300	2,0650
LYS	20	146,2	1,0000	5,0000	7,3100	3,6550	1,8275
			Total	AAAB	142,7550	71,3775	35,6888

Quantificação de Ca, Mg, Fe, Cu, e Zn por absorção atômica das leguminosas liofilizadas: Soluções-padrão (1000 mg/L) de cada mineral foram obtidas a partir de ampolas Tritisol Merck, após diluição para um litro de água deionizada. Posteriormente, foram acondicionadas em frascos de polietileno e guardadas à temperatura ambiente. Toda a vidraria utilizada foi deixada previamente em repouso em solução de HNO₃

(suprapuro) a 10% por 24 horas e depois lavada com água destilada (Milli-Q) em abundância. Os elementos metálicos foram determinados em triplicata, utilizando-se um delineamento completamente casualizados. As análises foram efetuadas por espectrofotometria de absorção atômica com chama. As amostras foram previamente mineralizadas em ácido nítrico (65%), Forno de Microondas (DGT 100 Provecto) - Programa 71/15min (Manual de Métodos DGT 100/No.18). Em seguida, foram transferidas com enxágüe prévio do copo de reação (3mL de água deionizada) para frascos de polietileno, completando um volume final de 8mL. A leitura da absorbância dos elementos presentes nas soluções foi efetuada utilizando-se espectrofotômetro de absorção atômica (GBC AA 932) com corretor de deutério e lâmpada de cátodo oco dos elementos que foram analisados, nas condições instrumentais especificadas pelo fabricante, precedida com solução de óxido de lantânio a 10% para evitar interferência espectral química. Todas as etapas do método foram acompanhadas por brancos analíticos. A quantificação mineral foi realizada com auxílio de curvas de calibração (procedimento de rotina), construídas a partir de soluções-padrão para Ca (1,0-2,0-4,0-8,0mg/mL), Mg (0,4-0,8-1,6-3,2mg/mL), Fe (2,5-5,0-10mg/mL), Cu (0,25-0,5-1,0mg/dL) e Zn (0,5-1,0-2,0mg/dL) em concentrações dentro da faixa ótima de operação do aparelho (Tabela AI.5).

Tabela AI.5. Condições operacionais para determinação de Ca, Mg, Fe, Cu e Zn por espectrofotometria de absorção atômica.

Elemento	Comprimento de onda (nm)	Corrente (mA)	Fenda (nm)	Tipo de chama	Faixa ótima de operação (µg/mL)	Working Range (µg/mL)	Sensibilidade (µg/mL)
Ca	422,7	5	0,5	a/a	1,0-8,0	1,0-4,0	0,02
Mg	285,2	4	0,5	a/a	0,1-4,0	0,1-0,4	0,003
Fe	248,3	7	0,2	a/a	2,0-10,0	2,0-9,0	0,05
Cu	324,7	4	0,5	a/a	0,25-5,0	1,0-5,0	0,025
Zn	213,9	5	0,5	a/a	0,4-2,0	0,4-1,5	0,008

a/a = ar/acetileno

Análises estatísticas utilizadas nos experimentos com animais: Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e, quando adequado, foi aplicado o teste de Duncan (Bender et al., 1982), multivariado, para comparação entre as médias. Diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. Para todas estas análises foi utilizado o programa STATISTICA para Windows, versão 6.0.

Estudo do efeito do feijoeiro geneticamente modificado na flutuação populacional de artrópodes na parte aérea

Os experimentos de campo para determinar a flutuação populacional de artrópodes da parte aérea e danos associados ao feijoeiro transgênico e convencional foram conduzidos durante dois anos em Santo Antônio de Goiás, GO, Londrina, PR e Sete Lagoas, MG. Em Santo Antônio de Goiás, as amostragens dos artrópodes foram realizadas semanalmente. Em Londrina e em Sete Lagoas, os levantamentos dos artrópodes foram realizados em três épocas de desenvolvimento das plantas de feijão (início-V3, florescimento-R6 e enchimento/maturação de vagens-R8/R9).

Foram utilizados diferentes métodos de amostragem de artrópodes e dos danos para que fossem coletadas a maioria de espécies de artrópodes associadas ao feijoeiro.

A amostragem de artrópodes da emergência até o estágio de três a quatro folhas trifolioladas foi realizada medindo-se dois metros na linha de plantio com o auxílio de uma vara de dois metros de comprimento. A amostragem foi realizada em dois pontos por parcela registrando na planilha de amostragem: o número de plantas avaliadas, o número de plantas mortas por pragas de solo e o número de insetos nas plantas. Para não dispersar os insetos, a face superior e inferior das folhas foi virada lentamente.

Após o estágio de três a quatro folhas trifolioladas até a maturação do feijoeiro, as amostragens foram realizadas com o pano de batida branco (1 m de comprimento por 0,5 m de largura), com um suporte de cada lado. O pano foi inserido cuidadosamente entre duas filas de feijão, para não perturbar os artrópodes presentes nas plantas. As plantas foram batidas vigorosamente sobre o pano para deslocar os artrópodes.

Os adultos da mosca-branca foram amostrados em 10 folhas primárias ou trifolioladas por parcela. Para a amostragem, a face inferior das folhas localizadas no terço superior das plantas foi virada lentamente para não dispersar os adultos.

Para a amostragem de tripses, as plantas foram batidas sobre uma placa branca de poliondas (0,5 m de comprimento, 0,5 m de largura). Foram realizadas duas batidas por parcela.

No florescimento das plantas, a amostragem do percevejo *Neomegalotomus simplex*, polinizadores (principalmente abelhas) e outros artrópodes foi realizada com uma rede entomológica. A rede entomológica foi passada sobre as plantas do feijoeiro

por cinco vezes, em movimentos horizontais duplos de aproximadamente um metro de largura. Neste estágio de crescimento, as flores foram retiradas das plantas e amostrados os tripes pretos, amarelos e outros artrópodes presentes em 10 flores, escolhidas aleatoriamente na parcela.

Para a avaliação de artrópodes (mosca branca, tripes, ácaros, larva minadora) e dano por vaquinhas (*Cerotoma arcuata* e *Diabrotica speciosa*), em cada data de amostragem foram coletadas aleatoriamente 10 folhas por parcela. Na primeira e segunda semana de avaliação foram coletadas as folhas primárias, na terceira semana a 1ª trifoliolada, na 4ª semana a 2ª trifoliolada e assim por diante, nesta ordem até a última amostragem. As folhas foram armazenadas em caixas tipo Gerbox (11 cm comprimento, 11 cm de largura, 3,5 cm de altura) que foram etiquetadas e fechadas com atílio de borracha. As caixas foram acondicionadas em caixa de isopor com gelo, onde permaneceram até a chegada no laboratório. A amostragem de ovos e ninfas de mosca branca, ácaros, tripes, minadora e dos demais artrópodes presentes nas folhas foram realizadas com auxílio de um contador manual e um microscópio estereoscópico no aumento de 40×. Logo após, o número de orifícios de alimentação das vaquinhas nas folhas foi contado e medido os comprimentos (menor e maior) de cada orifício com auxílio de uma régua.

Para a avaliação do número de sinais de alimentação por percevejos, 50 sementes, coletadas aleatoriamente de cada repetição, foram adicionadas em vidros transparentes (70 mL) e, em seguida, imersos com 50 mL de água destilada a 70°C. Duas horas após, os grãos foram descascados, a água foi descartada e em seguida foi adicionado 50 mL de álcool etílico hidratado a 70%. A contagem do número de sinais de alimentação nas sementes foi realizada em microscópio estereoscópico no aumento de 40×.

Estudo do efeito do feijoeiro geneticamente modificado na flutuação populacional de artrópodes na superfície do solo.

A amostragem de artrópodes na superfície do solo foi realizada com armadilhas de queda (Figura AI.7) nas mesmas datas de avaliação de artrópodes da parte aérea citadas acima para Santo Antônio de Goiás, Sete Lagoas e Londrina.

Em cada parcela, foi feito um orifício no solo na parte central da parcela para colocação de um recipiente de plástico de boca larga (aproximadamente 9 cm diâmetro x 15 cm altura). O recipiente foi enterrado no solo de forma que a parte superior do recipiente ficasse ao nível do solo. Em volta do recipiente foi adicionado solo para que a parede do mesmo ficasse deformada para evitar a retirada do recipiente devido as chuvas. Um recipiente de vidro (3 cm de diâmetro, 8 cm de altura) contendo aproximadamente 30 mL de formaldeído a 2%, foi adicionado dentro do recipiente de plástico. Sobre o recipiente de vidro foi encaixado um funil de plástico de 9,5 cm de diâmetro. O encaixe foi realizado de forma que não houvesse espaço entre a boca do vidro e a extremidade do funil. Quando necessário, foi adicionado solo no recipiente de plástico para fixar melhor o vidro. Após dois dias, os recipientes de vidro foram retirados e uma etiqueta de identificação foi colocada dentro do vidro. Logo em seguida, os recipientes de plástico com o funil foram tampados para evitar a entrada de artrópodes e pequenos animais. Os recipientes foram colocados em bandeja plástica com tampa (36 cm de comprimento, 25,5 cm de largura, 10 cm de altura) contendo no fundo isopor perfurado para encaixe dos vidros. As bandejas foram armazenadas no laboratório até processamento.

As espécies conhecidas como pragas e inimigos naturais mais comuns nos sistemas de produção do feijoeiro foram identificadas visualmente. As demais espécies foram identificadas ao nível de ordem e família pelo estudo das chaves de identificação das famílias e numeradas para posterior identificação das espécies. Os artrópodes coletados foram etiquetados e armazenados na coleção do Laboratório de Entomologia da Embrapa Arroz e Feijão.



Figura AI.7. Armadilhas de queda (tipo *pitfalls*) utilizadas para amostragem de artrópodes na superfície do solo



Estudo do efeito do feijoeiro geneticamente modificado no desenvolvimento biológico de *Zabrotes subfasciatus*.

O experimento para avaliar o efeito do feijoeiro geneticamente modificado no desenvolvimento biológico de *Zabrotes subfasciatus* foi conduzido no laboratório de Entomologia da Embrapa Arroz e Feijão, em Santo Antônio de Goiás, GO. Os adultos do *Z. subfasciatus* utilizados no experimento foram obtidos da 1ª. geração da criação massal do laboratório de Entomologia.

Os tratamentos avaliados foram: 1) Evento Embrapa 5.1; 2) Cultivar Olathe convencional; 3) Cultivar Jalo Precoce (padrão de comparação como cultivar suscetível, grão utilizado na criação massal deste inseto); 4) Cultivar Pérola (padrão de comparação como cultivar suscetível); 5) Linhagem contendo o alelo arcelina 1 (ARC1), proteína encontrada em feijões silvestres (*Phaseolus vulgaris*) que confere resistência ao caruncho. Dez grãos íntegros de feijão foram pesados em balança analítica de precisão e transferidos para um recipiente de plástico (5 cm de altura, 4 cm de diâmetro. Em seguida, 10 casais de carunchos com no máximo 15 horas de idade foram adicionados ao recipiente. Os recipientes foram fechados com tecido de filó e atílio de borracha e armazenados em estufa incubadora B.O.D a $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, em ausência de luz.

Após dois dias, os insetos foram retirados dos recipientes com auxílio de um sugador manual e transferidos para outro recipiente de plástico, contendo 10 grãos do mesmo feijão avaliado, para determinar a longevidade. Diariamente, os insetos mortos eram separados em machos e as fêmeas e transferidos para recipientes de vidro para pesagem. Após a morte de todos os carunchos, os recipientes de vidro foram mantidos em estufa de secagem a $50^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Em seguida, os recipientes foram transferidos para um dessecador por 15 minutos para posterior pesagem em balança analítica de precisão.

Dez dias após remoção dos adultos, os recipientes foram retirados da incubadora B.O.D para contagem do número de ovos por grão com auxílio de um microscópio estereoscópico no aumento de 40×. Na emergência dos adultos (aproximadamente 30 dias após a data de infestação dos grãos) foi registrado diariamente a data da emergência e o número de machos e fêmeas emergidos. Após emergência de todos os adultos foi



realizada a pesagem final dos grãos em balança analítica. Os 10 primeiros casais de adultos emergidos de cada repetição foram utilizados na infestação de novos grãos para avaliar o desenvolvimento da geração subsequente do *Z. subfasciatus*. Este procedimento foi repetido até a 10^a. geração.

Avaliação comparativa da Biota do Solo em Feijoeiro Olathe e Embrapa 5.1, modificado geneticamente para resistência ao mosaico dourado

Investigou-se a ocorrência de possíveis efeitos da modificação genética do feijoeiro nas chamadas associações íntimas da planta com componentes da biota do solo, neste caso, com fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e com rizóbio, fixador de N₂. Quanto aos demais componentes do solo avaliou-se a biomassa e atividade microbiana e de enzimas do solo, e alterações na diversidade de macro e mesofauna, FMAs e bactérias do solo, elementos envolvidos na degradação de resíduos e reciclagem de nutrientes. Alterações nos processos associativos, ou mesmo na ciclagem de nutrientes poderiam afetar o crescimento das plantas, que foi avaliado pela acumulação de matéria seca e nitrogênio na parte aérea.

As avaliações foram feitas em seis experimentos de campo, e em seis experimentos em vasos em condições controladas de casa-de-vegetação. Os experimentos de campo foram realizados em Santo Antônio de Goiás (GO) Londrina, (PR) e Sete Lagoas (MG) dois em cada localidade, tal como descrito anteriormente. Em resumo, foram implantados em delineamento em blocos casualizados, com 8 repetições. Os tratamentos avaliados corresponderam aos dois tipos de feijoeiro, Olathe Pinto e o evento 5.1 modificado geneticamente para resistência ao vírus do mosaico dourado. Solos dessas localidades foram transportados para a Embrapa Agrobiologia para a realização dos experimentos em vasos, em casa-de-vegetação de biossegurança.

Os ensaios em casa-de-vegetação foram delineados em blocos casualizados com dois tratamentos e oito repetições. Os tratamentos foram o feijoeiro convencional Olathe Pinto e o geneticamente modificado 5.1. Em cada bloco foram introduzidos dois vasos extras, um deles plantado com a variedade não-nodulante do feijoeiro NOAH 54, e o outro com sorgo (*Sorghum bicolor* L.) híbrido BRS 332, os quais foram utilizados para servirem de testemunhas para avaliação da fixação biológica de nitrogênio, conforme

descrição do método, mais adiante. O solo utilizado foi secado ao ar e peneirado (<4 mm), corrigido com aplicação de calcário e fertilizados com 15 ppm de P_2O_5 e 15 ppm de K_2O . As sementes do feijoeiro foram inoculadas com rizóbio utilizando-se uma mistura das estirpes BR 322 e BR 520. Foram colocadas 6 sementes por vaso, sendo feito desbaste para duas plantas por vaso 7 dias após emergência. As plantas foram irrigadas periodicamente, e colhidas entre 35 e 40 dias após a germinação.

Os ensaios de campo foram conduzidos tal como preconiza o manejo dado à cultura do feijoeiro nas localidades estudadas, e por isso, como as plantas foram manejadas com fertilizante nitrogenado, as avaliações de nodulação e fixação de N_2 não foram realizadas nessa condição. Da mesma forma, não faria sentido avaliar a macro e mesofauna do solo nas condições experimentais de casa-de-vegetação, onde o solo foi peneirado e colocado em vasos.

Determinação da matéria seca da parte aérea das plantas de feijoeiro Olathe convencional e geneticamente modificado (Embrapa 5.1), feijoeiro não-nodulante e sorgo.

Esta avaliação foi feita nos ensaios em vasos. Na colheita, a parte aérea das plantas foi removida e colocada em sacos de papel, devidamente identificados. A secagem das plantas foi feita a $65^{\circ}C$ em estufa de circulação forçada, existente na sala de apoio anexa à casa-de-vegetação de biossegurança. Após a secagem, as plantas foram pesadas com balança de precisão (0,01 g).

Determinação da nodulação pelo feijoeiro

A nodulação foi avaliada pelo peso seco dos nódulos, nos ensaios em casa-de-vegetação. O procedimento foi semelhante ao adotado por Müller et al. (1995) em estudos feitos em Santo Antonio de Goiás, GO. Na data de amostragem, o sistema radicular do feijoeiro foi separado do solo manualmente, e em seguida, lavado. Os nódulos foram separados e colocados para secar em estufa a $65^{\circ}C$ em estufa de circulação forçada. Após a secagem, os nódulos foram pesados com balança de precisão (0,001 g).



Análise da quantidade de N nas plantas de feijoeiro Olathe convencional e geneticamente modificado (Embrapa 5.1), feijoeiro não-nodulante e sorgo.

O material de parte aérea colhido dos ensaios em vasos, já secado em estufa com determinação do peso seco, foi moído (<2 mm) em moinho de facas tipo Wiley, e posteriormente pulverizado (<200 mesh) em moinho de rolagem, similar ao descrito por (Smith & Myung, 1990). O material processado foi analisado para o conteúdo de N pelo método Kjeldhal, tal como descrito em (Alves et al., 1999). Transferiram-se 200 mg de cada material para tubo de ensaio, adicionando-se em seguida 1,1 g de uma mistura catalisadora de sulfato de potássio, sulfato de cobre e selênio, na proporção de 100:10:1, respectivamente. Adicionaram-se a cada tubo de ensaio 4 mL de ácido sulfúrico concentrado. A digestão da amostra vegetal foi feita em bloco digestor com capacidade para 40 tubos de ensaio, dos quais dois são provas em branco e dois são padrões internos com conteúdo de N conhecido. O bloco digestor é mantido a uma temperatura de 150 °C por 1 hora, passando para 350 °C por mais 3 horas. Ao final da digestão, as amostras são deixadas para esfriar a temperatura ambiente. A determinação do N na amostra é realizada com processo de destilação a vapor e titulometria com ácido sulfúrico padronizado, em sistema automatizado. A fração de N na amostra seca é calculada multiplicando-se a normalidade do ácido sulfúrico padrão pelo volume gasto na titulação da amostra subtraído do volume da prova em branco, e finalmente por 14, que é a massa de N, dividindo-se o resultado por 2, que é o peso da alíquota da amostra analisada. Multiplicando-se a matéria seca da planta pela fração de N no material seco da planta, quantifica-se o total de N acumulado pela planta.

Quantificação do N derivado da fixação biológica de nitrogênio nas plantas de feijoeiro pelas técnicas de diferença de N total e abundância natural de ¹⁵N

Diferença de N- A quantificação da fixação biológica de nitrogênio (FBN) pela técnica diferença de N é simples, e é realizada pela diferença entre as quantidades de N das plantas fixadoras de N₂ e das plantas testemunhas (Unkovich et al., 2008). O N acumulado pelas plantas testemunhas representa o N disponível do solo, uma vez que não possuem a capacidade de fixar N₂ do ar. No caso do presente estudo, o total de N

acumulado nas plantas dos feijoeiros Olathe Pinto e 5.1 foram subtraídas das quantidades de N acumuladas pelo feijoeiro não-nodulante e pelo sorgo, sendo o resultado da diferença, a quantidade de N proveniente da FBN. Dividindo-se essa quantidade pelo total de N acumulado pela planta fixadora de N₂, em avaliação, calcula-se a dependência da planta pela FBN (%FBN).

Abundância natural de ¹⁵N - A técnica de abundância natural de ¹⁵N para quantificação da FBN é baseada na diferença das abundâncias de ¹⁵N entre plantas fixadoras de N₂ e plantas testemunhas (Unkovich et al., 2008). Alíquotas da ordem de 1 a 2 mg das amostras finamente moídas das plantas foram pesadas em balança de precisão (0,00001 g). As mesmas foram analisadas para a determinação da abundância natural de ¹⁵N utilizando um espectrômetro de massas de relação isotópica (Finnigan Delta Plus acoplado a um auto-analisador de C e N total Carlo Erba EA 1108 – Finnigan MAT, Bremen, Alemanha).

Para o cálculo da contribuição percentual da FBN foi aplicada a fórmula % FBN = $[(\delta^{15}\text{N}_{\text{test}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{fbn}}) \times 100] / (\delta^{15}\text{N}_{\text{test}} - B)$, onde, $\delta^{15}\text{N}_{\text{test}}$ é abundância natural de ¹⁵N das plantas não fixadoras de N₂, utilizadas como indicadores da marcação isotópica do N disponível do solo, ou plantas testemunhas; $\delta^{15}\text{N}_{\text{fbn}}$ é a abundância natural de ¹⁵N da planta fixadora de N₂; e B é o valor da discriminação isotópica de ¹⁵N durante o processo de FBN. Para o presente estudo, utilizou-se o valor de B recomendado por Unkovich et al. (2008).

Colonização micorrízica e diversidade de fungos no solo

Nos ensaios de campo, foi obtida uma amostra de cada parcela, coletada na profundidade de 0-10 cm, contendo solo e raízes de feijoeiro. Após a coleta, as amostras de solo foram separadas as raízes finas, sendo armazenadas em álcool (50%) para avaliação da colonização micorrízica. Amostras de raízes e solo rizosférico também foram retiradas de cada vaso dos experimentos em casa-de-vegetação, sofrendo o mesmo tratamento.

Colonização micorrízica - As raízes finas coletadas foram clarificadas e coloridas conforme a metodologia de Koske & Gemma (1989) e Grace & Stribley (1991), utilizando KOH 2,5% e azul de metila. Posteriormente, estas raízes foram

dispostas em lâminas com glicerina e observadas em microscópio óptico, quantificando a colonização micorrízica após a observação da presença ou ausência de estruturas fúngicas de FMAs em pelo menos 100 segmentos de raiz com 1 mm de comprimento.

Diversidade de fungos micorrízicos - O solo coletado foi utilizado para a extração dos esporos de FMAs e posterior determinação do número de esporos e identificação das espécies de FMAs para quantificação da diversidade e riqueza destes fungos. A extração dos esporos de FMAs foi realizada segundo Gerdemann & Nicolson (1963) seguido de centrifugações em água e sacarose (45%). Os esporos foram contados e posteriormente separados de impurezas presentes por meio de estiletos de pontas finas. Foram então divididos em dois grupos, os quais com uma pipeta de Pasteur foram transferidos para pontos sobre uma lâmina de vidro para microscopia. Um dos grupos foi fixado com PVLG (álcool polivinílico-lactoglicerol) e outro com PVLG + Reagente de Melzer (1:1) (Morton et al., 1993). Os esporos fixados com PVLG + Reagente de Melzer foram submetidos a uma pequena pressão sobre a lamínula para que suas paredes fossem rompidas, permitindo a coloração das paredes internas, servindo de parâmetro de identificação. Após a montagem, as lâminas foram mantidas em temperatura ambiente para secagem inicial e posteriormente levadas a estufa ($\pm 40^\circ \text{C}$) para secagem completa do PVLG.

A identificação dos FMAs foi realizada com auxílio de um microscópio óptico equipado com ocular micrométrica. Para subsidiar o trabalho de identificação foram utilizados o Manual de Schenck & Perez (1990), artigos originais da descrição das espécies e descrições das espécies fornecidas no site do INVAM (The International Culture Collection of Arbuscular and Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi) - <http://invam.caf.wva.edu>.

Quantificação da biomassa microbiana do solo

Procedimento proposto por Vance et al. (1987), com modificações, tal como descrito por Silva et al. (2007a). As amostras de solos de rizosfera, tanto dos ensaios de campo quanto dos ensaios em casa de vegetação, foram analisadas em triplicata. Para isso, cada amostra foi dividida em sete sub-amostras de 20 g (três fumigadas, três não-fumigadas e uma obtenção da umidade do solo), colocadas em frascos de 100 mL. O

frasco destinado a umidade do solo foi levado à estufa de circulação forçada de ar ajustada para uma temperatura de 105 °C, por 3 dias, e depois pesada. Três dos frascos com amostras de solo foram submetidos a um processo de extração com 50 mL de K₂SO₄ 0,5 M. Após a adição da solução extratora, os frascos foram mantidos por agitação por 30 min a 220 rpm. Após agitação, os frascos foram deixados imóveis por 30 min para que houvesse decantação. Em seguida, fez-se a filtração do extrato evitando-se re-suspensão. Os outros três dos frascos com amostras de solo foram fumigados com adição de 1 mL de clorofórmio livre de etanol, e depois mantidos fechados em local escuro por 24 h, onde a temperatura ambiente se encontrava entre 25 a 28 °C. Após o tempo de incubação, os frascos foram levados para uma capela de exaustão, destampados e deixados no local até que todo o clorofórmio tivesse evaporado. Em seguida, fez-se o processo de extração tal como descrito para os frascos que não foram fumigados. Uma sub-amostra da solução extraída foi transferida para Erlenmeyer de 250 mL, e em seguida, misturada com 2 mL de uma solução 0,066 M de K₂Cr₂O₇, 10 mL de H₂SO₄ concentrado, e 5 mL de ácido orto-fosfórico. Após esfriamento em temperatura ambiente, adicionou-se 70 mL de água deionizada. Adicionaram-se 4 gotas de difenilamina, e depois fez-se a titulação com uma solução 0,033 M de sulfato ferroso amoniacal. O teor de C nas amostras de solo foi quantificado pela equação $C \text{ (mg kg}^{-1}\text{)} = [(V_b - V_a) \times M \times 0,003 \times V_1 \times 10^6] / (P_s \times V_2)$, onde, C é o carbono extraído do solo; V_b é o volume de sulfato ferroso amoniacal gasto na titulação da prova em branco (solução extratora), em mL; V_a é o volume de sulfato ferroso amoniacal gasto na titulação do extrato das amostras, em mL; M é molaridade exata da solução de sulfato ferroso amoniacal; V₁ é o volume da solução extratora usada na extração, em mL; V₂ é a alíquota de extrato utilizada na determinação do conteúdo de C, em mL; 0,003 é o miliequivalente do C; e P_s é a massa do solo seco, em gramas. A biomassa microbiana, em mg C kg⁻¹ solo, foi calculada pela equação $BM-C = (C_f - C_{nf}) / k_c$, utilizando-se o K_c de 0,33, descrito por Sparling & West (1988), onde C_f e C_{nf} são, respectivamente, o C da biomassa microbiana, em mg C kg⁻¹ solo, do solo fumigado e do solo não fumigado.

Quantificação da respiração basal do solo

A respiração basal do solo é o resultado dos processos metabólicos, realizados principalmente por bactérias e fungos do solo, que consomem matéria orgânica e a transformam em CO₂. O procedimento utilizado para determinação dessa variável foi descrito por Silva et al. (2007b). A análise foi feita com o mesmo solo de rizosfera, e paralelamente a, análise de biomassa microbiana. Pesaram-se 50 g de solo em frascos de 100 mL. A umidade do solo foi determinada no procedimento de análise da biomassa microbiana. Cada frasco contendo amostra de solo foi colocado em jarras de vidro de 2 L. Em cada jarra contendo um frasco com solo, colocou-se um segundo frasco contendo 10 mL de NaOH 1 M, sendo imediatamente fechada, hermeticamente. Uma prova em branco foi feita colocando-se o frasco com NaOH em uma jarra, sem o frasco com solo. As jarras foram mantidas em ambiente escuro, por 5 dias, à temperatura de 25 a 28 °C. Após o período de incubação retira-se o frasco contendo NaOH e adicionam-se ao mesmo 2 mL de BaCl₂ 10% (m/v) para precipitação do carbonato formado no meio alcalino, tampando-se imediatamente. Para quantificação do CO₂ respirado do solo, abre-se o frasco e adicionam-se 2 gotas de fenolftaleína 1% (m/v), e inicia-se a titulação do NaOH excedente com uma solução de HCl 0,5 M padronizada. A respiração basal é calculada pela equação $RBS \text{ (mg C-CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ solo h}^{-1}) = [(Vb-Va) \times M \times 6 \times 1000]/(Ps \times t)$, onde, RBS é a respiração basal do solo; Vb é o volume de ácido clorídrico gasto na titulação da prova em branco, em mL; Va é o volume de ácido clorídrico gasto na titulação da amostra, em mL; M é molaridade exata do ácido clorídrico; Ps é a massa do solo seco, em gramas; e t é o tempo de incubação, em horas.

Determinação da atividade enzimática do solo

Após a remoção da parte aérea do feijoeiro, cerca de 500g de solo rizosférico foram acondicionados em sacos de plástico e mantidos em geladeira até início das análises. Uma alíquota de solo foi acondicionada em cadinho tarado, incubada por uma noite a 105°C e novamente pesada para a determinação do teor de umidade.

Atividade da enzima fosfatase ácida - Cerca de 1g de solo foi acondicionado em erlenmeyer de 50 mL, estéril e tampado, em triplicata. Aos mesmos, foram adicionados

4 ml de MUB pH 6,5 [MUB – 12,1g de THAM (Tris-Hydroxymethyl-Amino-Metano), 11,6 g de ácido maleico, 14,0 g de ácido cítrico, 6,3 g de ácido bórico, 488 ml de NaOH 1M, água destilada q.s.p. 1000 mL], HCL 0,1N e água destilada q.s.p. 100 mL nas três repetições, e 1 mL de PNF (para-nitrofenyl fosfato) 0,05M em duas das três repetições. Todas foram homogeneizadas, tampadas e incubadas por 37°C por 60 minutos, quando se interrompeu a reação com a adição de 1 ml de CaCl₂ 0.5M. Em seguida adicionou-se 4 mL de NaOH 0,5M e PNF nos controles para concentração final de 0, 10, 20, 30, 40 e 50 µg/L para confecção da curva de leitura padrão e equação da reta.

Antes da leitura, as amostras foram filtradas em papel de filtro Whatman no. 2. A leitura foi feita em espectrofotômetro Shimadzu em comprimento de onda de 410 nm. Os valores de absorbância obtidos foram utilizados na equação da reta para determinação da concentração das amostras. Os valores finais de concentração foram expressos em µg de p-nitrofenol g de solo⁻¹ h⁻¹.

Atividade da enzima Arilsulfatase (conjunto de enzimas do ciclo do enxofre) - Cerca de 1g de solo foi acondicionado em erlenmeyer de 50 mL, estéril e tampado, em triplicata. Foram adicionados 4 mL de tampão acetato pH 5.8 (dissolver 68g de acetato de sódio tri hidratado em 700 ml de água destilada e corrigir o pH a 5,8 com ácido acético glacial (99%) completar o volume a 1000mL com água destilada), 1 mL de PNS (para-nitrofenol sulfato) 0,05M em duas das três repetições, que foram homogeneizadas, tampadas e incubadas por 37°C por 60 minutos. Após esse tempo, a reação foi interrompida por adição de 1 ml de CaCl₂ 0,5M. Seguiu-se com a adição de 4 mL de NaOH 0,5M e PNS nos controles para concentração final de 0, 10, 20, 30, 40 e 50 µg/L para confecção da curva de leitura padrão e equação da reta.

Antes da leitura, as amostras foram filtradas em papel de filtro Whatman no. 2. A leitura foi feita em espectrofotômetro Shimadzu em comprimento de onda de 410 nm. Os valores de absorbância obtidos foram utilizados na equação da reta para determinação da concentração das amostras. Os valores finais de concentração foram expressos em µg de p-nitrofenol g de solo⁻¹ h⁻¹.

Atividade da enzima β-glucosidase - Cerca de 1g de solo foi acondicionado em erlenmeyer de 50 mL, estéril e tampado, em triplicata. Foram adicionados 4 ml de MUB pH 6,0 (MUB – 12,1g de THAM (Tris-Hydroxymethyl-Amino-Metano), 11,6g de Acido maleico, 14,0g de ácido cítrico, 6,3g de ácido bórico, 488 ml de NaOH 1N

(NaOH 1M= 20g P/ 500ml), água destilada q.s.p. 1000mL – a correção do pH é foi feita utilizando-se 200 mL de solução de MUB, HCL 0,1N e água destilada q.s.p. 100mL) nas três repetições, e 1 mL de PNG (p-nitrophenyl- β -D-Glucopyranoside) 0,05M em duas das três repetições, eu foram homogeneizadas, tampadas e incubadas por 37°C por 60 minutos. Após esse tempo, a reação foi interrompida por adição de 1 ml de CaCl₂ 0,5M, adicionados 4 mL de THAM pH 12 (12,2 g de THAM, 700 ml de água destilada com ajuste do pH para 12 com NaOH 0,5M, água destilada q.s.p. 1000mL) e PNG nos controles para concentração final de 0, 10, 20, 30, 40 e 50 μ g/L para confecção da curva de leitura padrão e equação da reta.

Antes da leitura, as amostras foram filtradas em papel de filtro Whatman no. 2. A leitura foi feita em espectrofotômetro Shimadzu em comprimento de onda de 410 nm. Os valores de absorbância obtidos foram utilizados na equação da reta para determinação da concentração das amostras. Os valores finais de concentração foram expressos em μ g de p-nitrofenol g de solo⁻¹ h⁻¹.

Diversidade de macro e mesofauna do solo

A avaliação da macrofauna do solo foi realizada feita através de um levantamento em amostras de solo (0,25 x 0,25 x 0,30 m de profundidade) retiradas de cada parcela dos experimentos de campo, separadas em estratos e analisadas separadamente (método usado no Programa TSBF – Anderson & Ingram, 1993). O solo retirado no extrator foi colocado em bandeja e os componentes da fauna foram coletados com pinças, transferidos para solução de álcool 70 %. No laboratório, quantificou-se o número de indivíduos e procedeu-se a identificação taxonômica com auxílio de lupa. Para a comunidade da mesofauna do solo, a avaliação foi feita mediante o uso de extratores do tipo Berlese-Tüllgren por 7 dias para a remoção dos invertebrados (Aquino et al., 2006). Os dados de densidade individuais dos grupos de fauna, densidade total e riqueza média foram determinados.

Procedimento para análise de perfil da comunidade microbiana por Gel de Eletroforese em Gradiente de Desnaturante (DGGE).

O solo de rizosfera coletado na amostragem das plantas foi homogeneizado, e 0,5 g do mesmo foram colocados em microtubo estéril de 1,5 mL, seguido de acondicionamento em gelo. Para a extração de DNA total do solo, a extração foi feita utilizando o kit Ultra Clean Soil dos Laboratórios Mobio, seguindo a orientação do fabricante. A confirmação da extração procedeu-se por eletroforese horizontal em gel de agarose 0,8%, e migração por 80 a 90 minutos. Após eletroforese, o DNA foi corado com brometo de etídio $10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ e visualizado em transiluminador em comprimento de onda na faixa do UV.

PCR - 16S rDNA - A reação de amplificação procedeu-se via PCR. Cerca de 20 ng de DNA da extração foram adicionados a mistura de PCR contendo tampão de reação 10%, 1,5 mM de MgCl_2 , 5% de DMSO, 0,2 mM de dNTP, 0,2 mM dos iniciadores 27F e 1492R (Heuer et al., 1997) e 2,5U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) por 25 ciclos de desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguidos de 25 ciclos de 93°C por 45 segundos, 57°C por 45 segundos e 72°C por 2 minutos, seguidos de desnaturação final de 72°C por 10 minutos. Após a reação, o produto de PCR foi diluído 50 vezes e utilizado com molde para o Nested-PCR, em que foram utilizados os iniciadores F968-CG e R1401 (Passos et al., 2008). As condições de reação foram as mesmas descritas acima, com exceção da temperatura de anelamento dos iniciadores que foi de 56°C e o tempo de extensão reduzido para 1 minuto. Após a reação, a amplificação foi confirmada em gel de agarose 1% em eletroforese horizontal por 90 minutos a 90 Volts. Após eletroforese o DNA foi corado com brometo de etídio 10 mg ml^{-1} e visualizado em transiluminador em comprimento de onda na faixa do UV.

PCR - 16S rDNA do grupo de alfa proteobactérias - As proteobactérias alfa incluem a maioria dos gêneros fototróficos, mas também vários gêneros que metabolizam componentes C1, simbioses de plantas (por exemplo, os rizóbios). Para amplificação do grupo das alfa proteobactérias, foram utilizados os iniciadores F203 α e R1492 utilizados por Milling et al. (2004). A reação de PCR foi dimensionada para 25 mL em tampão de reação 10%, 3,75 mM de MgCl_2 , DMSO 5%, 0,25 mM de dNTP, 0,2 mM de cada iniciador e 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen). A reação consistiu

em desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguidos de 25 ciclos de (93°C por 45 segundos, 56°C por 45 segundos e 72°C por 2 minutos, seguidos de extensão final de 72°C por 10 minutos. Após a reação de amplificação, o produto de PCR foi diluído em 25 vezes e o procedimento para o Nested-PCR foi o mesmo descrito anteriormente.

Análise por Gel de Eletroforese em Gradiente Desnaturante (DGGE) - Para análise do perfil da comunidade microbiana, cerca de 20 mL de produto do Nested-PCR foi aplicado em Gel de DGGE para análise. O DGGE foi carregado em gel de poliacrilamida a 6%, em gradiente de desnaturante químico variando de 52 a 70%. A eletroforese ocorreu em tampão TAE 0,5% por 60°C, por 15 horas e voltagem constante de 100V. Após eletroforese, o gel foi corado com prata seguindo protocolo descrito por Creste et al. (2001). Após coloração, o gel foi acondicionado em papel celofane transparente, desidratado, digitalizado e levado para análise no programa Gel Compar II, v.4.3 (Applied Maths, Bélgica). O dendrograma de similaridade foi construído utilizando o coeficiente de Jaccard e método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*).

Teste de germinação após envelhecimento acelerado e sílica gel.

As sementes foram acondicionadas sobre telas metálicas em caixas plásticas contendo 60 ml de água e expostas por 72h à temperatura de 42°C. Para os tratamentos com sílica gel as sementes foram acondicionadas sobre telas metálicas em caixas plásticas contendo 5g sílica/g semente e expostas por 72h e 48h à temperatura de 42°C. Após os tratamentos pré-germinativos, foram conduzidos testes de germinação com quatro repetições de 25 sementes, cada, em substrato rolo de papel, à temperatura de 25°C, fotoperíodo 12h luz/12h escuro. As contagens foram realizadas aos 9 dias após o semeio.

Estudo do comportamento de plantas cultivadas em solos de baixa e alta fertilidades

Propriedades químicas do solo, da fertilidade e níveis de nitrogênio em cobertura.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Embrapa Arroz e Feijão (Santo

Antônio de Goiás, GO). O solo utilizado no experimento foi um Cambissolo com as seguintes propriedades físicas e químicas antes de aplicar os tratamentos de fertilidade: pH em H₂O 5,9, Ca 12,50 cmol_c kg⁻¹, Mg 4,46 cmol_c kg⁻¹, Al 0,0 cmol_c kg⁻¹, P 6,1 mg kg⁻¹, K 132 mg kg⁻¹, Cu 3,0 mg kg⁻¹, Zn 8,8 mg kg⁻¹, Fe 72 mg kg⁻¹, Mn 110 mg kg⁻¹ e matéria orgânica 35 g kg⁻¹, argila 449 g kg⁻¹, silte 260 g kg⁻¹ e areia 291 g kg⁻¹. A metodologia de análise de solo usado é descrito no manual de análise de solo (Embrapa, 1997). Os níveis de fertilidade dos solos foram de 1 g de fertilizante (5-30-15) por kg de solo (nível de baixa fertilidade) e 2 g de adubo (5-30-15) por kg de solo (alta fertilidade). O experimento foi conduzido em vasos com 6 kg de solo em cada vaso. O delineamento experimental foi em blocos casualizados com quatro repetições. Após a germinação, três plantas foram mantidas em cada vaso. As plantas foram cultivadas em capacidade de campo e cada dia a quantidade desejada de água foi adicionada para manter o nível de umidade. Vasos com alta fertilidade também receberam 1g de sulfato de amônio após a semeadura.

Observações e análise de dados. As plantas foram colhidas na maturação fisiológica. Vagens foram coletadas de cada vaso e, após a debulha as sementes foram secas e o peso foi determinado. As brotações foram colhidas de cada pote e foram secas em estufa a 70 °C até o peso se tornar constante para determinar o acúmulo de matéria seca. O Índice de eficiência de produção de grãos (GYEI) foi calculado para classificar os genótipos para a sua eficiência na utilização de nutrientes, utilizando a seguinte equação (Fageria, 2009):

$$\text{GYEI} = (\text{peso de grãos em nível de fertilidade baixa} / \text{peso médio de grãos de seis genótipos ao nível de baixa fertilidade}) \times (\text{peso de grãos em nível de fertilidade alta} / \text{peso médio de grãos de seis genótipos de alta fertilidade})$$

Os genótipos que tiveram valores de GYEI > 1 foram classificados como altamente eficiente (E), genótipos que tiveram GYEI entre 0,5-1 foram classificados como moderadamente eficientes (ME) e aqueles com valores de GYEI < 0,5 foram classificadas como ineficientes (IE) no uso dos nutrientes. O Índice de produção de grãos (GHI) e comprimento radicular específico (SRL) foram calculados usando as seguintes fórmulas:

$$GHI = \frac{\text{Peso de grãos}}{\text{grãos} + \text{peso de brotações}}$$

$$SRL = \frac{\text{Máximo comprimento de raízes}}{\text{Peso seco de raízes}} = \text{cm g}^{-1}$$

Análise de variância foi utilizada para testar a significância estatística dos efeitos dos tratamentos e interações. As médias foram comparadas pelo teste de Turkeys, ao nível 5% de probabilidade. A análise de regressão foi realizada para determinar a relação entre produção de grãos e componentes do rendimento.

Análise das defesas antioxidantes enzimáticas presentes em folhas de feijão

As amostras de folhas de feijão foram congeladas em nitrogênio líquido e conservadas em uma temperatura de – 80C até o momento das análises.

Medidas de atividade enzimáticas:

a) Medidas de atividade enzimáticas específicas:

- Medida da catalase (CAT): a atividade enzimática da catalase foi medida espectrofotometricamente, acompanhando o desaparecimento de peróxido de hidrogênio a 240 nm, como descrito por Aebi (1984).

- Medida da ascorbato peroxidase (APX): a atividade da ascorbato peroxidase foi medida de acordo com o método de Nakano & Asada, 1981 descrito em Hossain et al. (2006).

- Concentração de proteínas: os resultados foram normalizados pela concentração de proteínas que foi medida usando o método de Bradford (1976).

b) Medidas de atividade enzimáticas:

- Análise da superóxido dismutase (SOD): a medida da atividade da SOD foi realizada em gel nativo de poliacrilamida.

Medida da peroxidação lipídica:

A peroxidação lipídica foi medida pelo método de Xilenol-orange (Hermes-Lima et al., 1995).



Medida de dano a proteínas:

A medida do dano oxidativo a proteína está sendo realizada pelo método Oxyblot que investiga as proteínas carboniladas por meio de western blot.

Análise estatística:

Os dados estão sendo apresentados como média \pm erro padrão de pelo menos dois diferentes experimentos. ANOVA (one-way) sendo usada para comparar diferentes amostras. A significância estatística foi considerada quando $P < 0,05$.

Referências Bibliográficas

- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105:121–126.
- Agrawal N, Dasaradhi PVN, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee S (2003) RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67:657-685.
- Alan JJ, Moh CC (1966) Determinación del porcentaje de cruzamiento natural en el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en Alajuela, Costa Rica. *Turrialba* 16:156-158.
- Altung-Mees MA, Short JM (1989) pBluescript II: gene mapping vectors. *Nucleic Acids Research* 17:9494.
- Alvarez MN, Ascher PD, Davis DW (1981) Interspecific hybridization in *Euphaseolus* through embryo rescue. *HortScience* 16:541-543.
- Alves BJR, Baêta AM, Alves JV (1999) Protocolo da Embrapa Agrobiologia para análise de nitrogênio em adubos orgânicos, solo e tecidos. Embrapa Agrobiologia, Seropédica.
- Amaya H, Acevedo E, Bresani, R (1991) Efecto del recalientamiento sobre la disponibilidad de hierro y valor nutritivo de la proteína del frijol negro (*Phaseolus vulgaris*) cocido. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 16:222-237.
- Anderson JM, Ingram JSI (1993) Tropical soil biological and fertility: a handbook of methods. 2nd ed. CAB International, Wallingford.
- Andrade-Aguilar JA, Jackson MT (1988) Attempts at interspecific hybridization between *Phaseolus vulgaris* L. and *P. acutifolius* A. Gray using embryo rescue. *Plant Breeding* 101:173-180.
- Angle JS (1994) Release of transgenic plants: biodiversity and population level considerations. *Molecular Ecology* 3:45–50.
- Antal Z, Rasclé C, Fevre M, Bruel C (2004) Single oligonucleotide nested PCR: a rapid method for the isolation of genes and their flanking regions from expressed sequence tags. *Current Genetics* 46:240–246.

- Antunes IF, Costa JGC, Oliveira EA (1973) Determinação da porcentagem de cruzamentos naturais em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) no município de Pelotas, RS, Brasil. IPEAS, Pelotas.
- Antunes PL, Sgarbieri VC (1980) Effect of heat treatment on the toxicity and nutritive value of dry bean (*Phaseolus vulgaris* var. Rosinha G2) proteins. Journal of Agricultural and Food Chemistry 28:935-938.
- Antunes PL, Bilhalva AB, Elias MC, Soares GJD (1995) Valor nutricional de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.), cultivares rico 23, carioca, pirata-1 e rosinha-G2. Revista Brasileira de Agrociência 1:12-18.
- AOAC Association of Official Analytical Chemist (1986) Official methods of analysis. 7th ed. AOAC International, Washington.
- AOAC Association of Official Analytical Chemist (1995) Official methods of analysis. 16th ed. AOAC International, Washington.
- AOAC Association of Official Analytical Chemist (2005) Official methods of analysis. 18th ed. AOAC International, Washington.
- AOCS American Oil Chemists Society (2009) Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society. 6th ed. AOCS, Champaign.
- Aquino AM, Correia MEF, Badejo MA (2006) Amostragem da mesofauna edáfica utilizando funis de Berlese-Tüllgren modificados. Embrapa Agrobiologia, Seropédica.
- Aragão FJL, Figueiredo SA (2009) RNA interference as a tool for plant biochemical and physiological studies. In: Rivera-Domínguez M, Rojas R, Tiznado-Hernández ME (ed) A transgenic approach in plant biochemistry and physiology. Research Signpost, Kerala, pp 17-50.
- Aragão FJL, Rech EL (1997) Morphological factors influencing recovery of transgenic bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) of a carioca cultivar. International Journal of Plant Sciences 158:157-163.

- Aragão FJL, Rech EL (1998) O processo biobalístico. In: Brasileiro ACM, Carneiro VTC (ed) Manual de transformação genética de plantas. Embrapa-Cenargen, Brasília, pp 51-69.
- Aragão FJL, Barros LMG, Brasileiro ACM, Ribeiro SG, Smith FD, Sanford JC, Faria JC, Rech EL (1996) Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. Theoretical and Applied Genetics 93:142-150.
- Aragão FJL, Brondani RPV, Burle ML (2011) *Phaseolus*. In: Kole C (ed). Wild crop relatives: genomic and breeding resources - legume crops and forages. Springer, Berlin, No prelo.
- Aragão FJL, Grossi de Sá M, Davey MR, Brasileiro ACM, Faria JC, Rech EL (1993) Factors influencing transient gene expression in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using an electrical particle acceleration device. Plant Cell Reports 12:483-490.
- Araújo JPP, Watt EE (1988) O caupi no Brasil. IITA/EMBRAPA, Brasília.
- Azevedo JL, Araújo WL (2003) Genetically modified crops: environmental and human health concerns. Mutation Research 544:223-233.
- Baldoni AB, Araújo ACG, Carvalho MH, Gomes ACMM, Aragão FJL (2010) Immunolocalization of ricin accumulation during castor bean (*Ricinus communis* L.) seed development. International Journal of Plant Biology 1:61-65.
- Barampama Z, Simard RE (1994) Oligosaccharides, antinutritional factors and protein digestibility of dry beans as affected by processing. Journal of Food Science 59:833-838.
- Barbosa FR, Siqueira KMM, Souza EA, Moreira WA, Haji FNP, Alencar JA (2002) Efeito do controle químico da mosca-branca na incidência do vírus do mosaico dourado e na produtividade do feijoeiro. Pesquisa Agropecuária Brasileira 37:879-883.
- Barbosa FR, Yokoyama M, Pereira PAA, Zimmermann FJP (2000a) Danos de *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Coleoptera: Bruchidae) em linhagens de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) contendo arcelina. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil 29:113-121.

- Barbosa FR, Yokoyama M, Pereira PAA, Zimmermann FJP (2000b) Estabilidade da resistência de *Zabrotes subfasciatus* conferida pela proteína arcelina, em feijoeiro. Pesquisa Agropecuária Brasileira 35:895-900.
- Barrons KC (1939) Natural crossing in beans at different degrees of isolation. Proceedings of the American Society for Horticultural Science 36:637-640.
- Baudet JC (1977) Origine et classification des espèces cultivées du genre *Maseolus*. Bulletin de la Société de Botanique de Belgique 110:65-76.
- Baudoin JP, Camarena F, Maréchal R (1986) Interspecific crosses between *Phaseolus coccineus* subsp. *polyanthus* M.M. & S., as seed parent, and *Phaseolus vulgaris* L. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative 29:64.
- Baudoin JP, Otoul E, Camarena F (1985) Interspecific hybridizations within the *Phaseolus vulgaris* L. - *Phaseolus coccineus* L. complex. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative 28:64-65.
- Bedford D, Briddon RW, Brown JK, Rosell RC, Markham PG (1994) Geminivirus transmission and biological characterisation of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographic regions. Annals of Applied Biology 125:311-325.
- Belivanis T, Doré C (1986) Interspecific hybridization of *Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus angustissimus* A. Gray using in vitro embryo culture. Plant Cell Reports 5:329-331.
- Bellows TS Jr, Perring TM, Gill RJ, Headrick DH (1994) Description of a species of *Bemisia* (Homoptera: Aleyrodidae). Annals of the Entomological Society of America 87:195-206.
- Bender FE, Douglas LW, Kramer A (1982) Statistical methods for food agriculture. AVI, Westport.
- Bernardi JVE, Lacerda LD, Dórea JG, Landim PMB, Gomes JPO, Almeida R, Manzatto AG, Bastos WR (2009) Aplicação da análise das componentes principais na ordenação dos parâmetros físico-químicos no alto rio madeira e afluentes, Amazônia ocidental. Geochimica Brasiliensis 23:79-90.

- Bertolla F, Brito B, Frostegard A, Nesme X, Simonet P (1999) During infection of its host, the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* naturally develops a state of competence and exchanges genetic material. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12:390-393.
- Bertolla F, Kay E, Simonet P (2000b) Potential dissemination of antibiotic resistance genes from transgenic plants to microorganisms. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 21:390-393.
- Bertolla F, Pepin R, Passelegue-Robe E, Paget E, Simkin A, Nesme X, Simonet P (2000a) Plant genome complexity may be a factor limiting in situ the transfer of transgenic plant genes to the phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. *Applied and Environmental Microbiology* 66:4161–4167.
- Bianchini A (1999) Resistance to bean golden mosaic virus in bean genotypes. *Plant Disease* 83:615-620.
- Birmingham A, Anderson EM, Reynolds A, Ilsley-Tyree D, Leake D, Fedorov Y, Baskerville S, Maksimova E, Robinson K, Karpilow J, Marshall WS, Khvorova A (2006) 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. *Nature Methods* 3:199–204.
- Blair MW, Bassett MJ, Abouzid AM, Hiebert E, Polston JE, McMillan Jr, RT, Graves W, Lamberts M (1995) Occurrence of bean golden mosaic virus in Florida. *Plant Disease* 79:529-533.
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37:911-917.
- Bliss FA (1980) Common bean. In: Fehr WR, Hadley HH (ed) *Hybridization of crop plants*. American Society of Agronomy, Madison, pp 273-284.
- Blum S, Lorenz MG, Wackernagel W (1997) Mechanisms of retarded DNA degradation and prokaryotic origin of DNases in nonsterile soils. *Systematic and Applied Microbiology* 20:513-521.
- Bonfim K, Faria JC, Nogueira EOPL, Mendes EA, Aragão FJL (2007) RNAi-mediated resistance to *Bean golden mosaic virus* in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20:717-726.

- Borror DJ, DeLong DM (1969) Introdução ao estudo dos insetos. E. Blücher, Rio de Janeiro.
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248–254.
- Brito MMP, Muraoka T, Silva EC (2009) Marcha de absorção do nitrogênio do solo, do fertilizante e da fixação simbiótica em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) e feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) determinada com uso de ¹⁵N. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 33:895-905.
- Brodersen P, Voinnet O (2006) The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends in Genetics* 22:268-280.
- Broer I, Droëge-Laser W, Gerke M (1996) Examination of the putative horizontal gene transfer from transgenic plants to agrobacteria. In: Schmidt ER, Hankeln T (ed) *Transgenic organisms and biosafety*. Springer Verlag, Berlin, pp 67-70.
- Broughton WJ, Hernandez G, Blair M, Beebe S, Gepts P, Vanderleyden J (2003) Beans (*Phaseolus* spp.) - model food legumes. *Plant and Soil* 252:55-128.
- Brown JK (2007a) The *Bemisia tabaci* complex: genetic and phenotypic variability drives begomovirus spread and virus diversification. *APSnet Features*. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/BemisiatabaciComplex.aspx>>. Acesso em: 20 ago. 2010.
- Brown JK (2007b) The *Bemisia tabaci* complex: genetic and phenotypic variation and relevance to TYLCV-vector interactions. In: Czosnek H (ed) *Tomato yellow leaf curl virus disease management, molecular biology, breeding for resistance*. Springer, Netherlands, pp 25-56.
- Brunner BR, Beaver JS (1989) Estimation of outcrossing of the common bean in Puerto Rico. *Hortscience* 24:669-671.
- Bulisani EA (2003) O feijão da alimentação do brasileiro. In: Castro JL, Ito MF (ed) *Dia de Campo de Feijão*. Instituto Agrônômico, Campinas, pp 1-3.

- Buren WF (1972) Revisionary studies on the taxonomy of the red imported fire ants. *Journal of the Georgia Entomological Society* 7:1-26.
- Burr HK, Kon S, Morris HJ (1968) Cooking rates of dry beans as influenced by moisture content and temperature and time of storage. *Food Technology* 22:336-338.
- Buzzi ZJ (2002) Ordem Collembola. In: Buzzi ZJ, Miyazaki RD (ed) *Entomologia didática*. Editora UFPR, Curitiba, pp 125-127.
- Capalbo DMF, Simon MF, Nodari RO, Valle S, Santos RF, Coradin L, Duarte JO, Miranda JE, Dias EPF, Le Quang Quyen, Underwood E, Nelson KC (2006) Consideration of problem formulation and option assessment for Bt cotton in Brazil. In: Hilbeck A, Andow DA, Fontes EMG (ed) *Environmental risk assessment of genetically modified organisms: methodologies for assessing Bt cotton in Brazil*. CABI Publications, Wallingford, pp 67-92.
- Capdeville G, Souza Júnior, MT, Szinay D, Diniz LEC, Wijnker E, Swennen R, Kema G, De Jong H (2009). The potential of high resolution FISH in Musa. *Euphytica* 166:431–443.
- Cardona C (1994) Insectos y otras plagas invertebradas en frijol en America Latina. In: Schwarts HF, Pastor Corrales MA (ed) *Problemas de producción del frijol en los trópicos*. 2nd ed. Ciat, Cali, pp 577-651.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical (1980) *Diversidad genética de las especies cultivadas del género Phaseolus*. Ciat, Cali.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical (2010) *Common bean: the nearly perfect food*. Disponível em: <http://www.ciat.cgiar.org/ourprograms/agrobiodiversity/beans/documents/beanfocus.pdf>. Acesso em: 10 out. 2010.
- CGEE - Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (2008) *Projeto piloto de avaliação ambiental e social de riscos de organismos geneticamente modificados (PAR)*. Disponível em: www.cgee.org.br/atividades/redirect.php?idProduto=4827. Acesso em: 10 ago. 2010.

- Chaer GM, Tótolá MR (2007) Impacto do manejo de resíduos orgânicos durante a reforma de plantios de eucalipto sobre indicadores de qualidade do solo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 31:1381-1396.
- Carrillo-Tripp J, Lozoya-Gloria E, Rivera-Bustamante RF (2007) Symptom remission and specific resistance of pepper plants after infection by pepper golden mosaic virus. *Phytopathology* 97:51-59.
- Chellappan P, Vanitharani R, Fauquet CM (2004) Short interfering RNA accumulation correlates with host recovery in DNA virus-infected hosts, and gene silencing targets specific viral sequences. *Journal of Virology* 78:7465-7477.
- Cheung AY, Bogorad L, Van Montagu M, Schell J (1988) Relocating a gene for herbicide tolerance: A chloroplast gene is converted into a nuclear gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85:391-395.
- Coehn SA, Michaud DP (1993) Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acids via high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* 211:279-287.
- Conab (2010) Brasil: balanço de oferta e demanda. Disponível em: <http://conab.gov.br/conabweb/download/indicadores/0301_Oferta_e_demanda_brasil_eira.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2010.
- Correia MEF, Andrade AG (2008) Formação de serapilheira e ciclagem de nutrientes. In: Santos GA, Camargo FA (ed) *Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais*. 2. ed. Metrópole, Porto Alegre, pp 137-158.
- Corseuil E (2000) Caracterização das ordens. In: *Apostila de entomologia*. Editora Alphagraphics, Porto Alegre, pp 77-103.
- Costa AS (1965) Three whitefly-transmitted virus diseases of bean in São Paulo, Brazil. *FAO Plant Protection Bulletin* 13:121-130.
- Costa AS (1975) Increase in the populational density of *Bemisia tabaci*, a threat of widespread virus infection of legume crops in Brazil. In: Bird J, Maramorosch K (ed) *Tropical diseases of legumes*. Academic Press, New York, pp 27-49.

- Costa AS (1987) Fitoviroses do feijoeiro no Brasil. In: Bulisani EA (coord) Feijão: fatores de produção e qualidade. Fundação Cargill, Campinas, pp 175-256.
- Costa AS, Cupertino FP (1976) Avaliação das perdas na produção do feijoeiro causadas pelo vírus do mosaico dourado. *Fitopatologia Brasileira* 1:18-25.
- Credland PF, Dendy J (1992) Intraspecific variation in bionomics characters of the Mexican bean weevil, *Zabrotes zebrafasciatus*. *Entomologia Experimentalis Applicata* 65:39-47.
- Creste S, Tullman-Neto A, Figueira A (2001) Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrilamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter* 19:299-306.
- Cruz I (2008) Manual de identificação de pragas de milho e de seus inimigos naturais. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília.
- Cruz GADR, Oliveira MGA, Pilon AM, Cruz RS, Brumano MHN (2004) Avaliação da digestibilidade protéica, inibidor de protease e fibras alimentares de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). *Brazilian Journal of Food Technology* 7:103-109.
- Cui J, Han LY, Lin HH, Zhang HL, Tan ZQ, Zheng CJ, Cao ZW, Chen YZ (2007) Prediction of MHC-binding peptides of flexible lengths from sequence-derived structural and physicochemical properties. *Molecular Immunology* 44:866-877.
- D'Andrea AF, Silva MLN, Curi N, Siqueira JO, Carneiro MAC (2002) Atributos biológicos indicadores da qualidade do solo em sistemas de manejo na região do cerrado no sul do estado de Goiás. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 26:913-923.
- Daly HV, Doyen JT, Purcell AH (1998) The Parainsecta: protura and collembolan. In: Daly HV, Doyen JT, Purcell III AH (ed) *Introduction to insect biology and diversity*. 2nd ed. Oxford University Press, New York, pp 333-337.
- Davies HV (2005) GM organisms and the EU regulatory environment: allergenicity as a risk component. *Proceedings of the Nutrition Society* 64:481-486.

- Davis ME, Zuckerman JE, Choi CHJ, Seligson D, Tolcher A, Alabi CA, Yen Y, Heidel JD, Ribas A (2010) Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature* 464:1067-1070.
- De Candolle A (1983) *Origine des plantes cultivées*. Librairie Germer Baillière, Paris.
- De Vries J, Wackernagel W (2002) Integration of foreign DNA during natural transformation of *Acinetobacter* sp. by homology-facilitated illegitimate recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:2094–2099.
- De Vries J, Meier P, Wackernagel W (2001) The natural transformation of the soil bacteria *Pseudomonas stutzeri* and *Acinetobacter* sp. by transgenic plant DNA strictly depends on homologous sequences in the recipient cells. *FEMS Microbiology Letters* 195:211-215.
- Debouck DG (1988) *Phaseolus* germplasm exploration. In: Gepts P (ed) *Genetic resources of Phaseolus beans*. Kluwer, Dordrecht, pp 3-29.
- Debouck DG (1999) Diversity in *Phaseolus* species in relation to the common bean. In: Singh SP (ed) *Common bean improvement in the twenty-first century*. Kluwer, Dordrecht, pp 25–52.
- Delfourne E, Bastide J, Bandon R, Rachon A, Genix P (1994) Specificity of plant acetohydroxyacid synthase: formation of products and inhibition by herbicides. *Plant Physiology and Biochemistry* 32:473-477.
- Delgado-Salinas A, Bibler R, Lavin M (2006) Phylogeny of the genus *Phaseolus* (Leguminosae): a recent diversification in an Ancient landscape. *Systematic Botany* 31:779-791.
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Report* 1:19-20.
- Dendy J, Credland PF (1991) Development, fecundity and egg dispersion of *Zabrotes subfasciatus*. *Entomologia Experimentalis Applicata* 59:9-17.
- Desmond A, Moore J (1991) *Darwin*. Michael Joseph, London.

- Didonet AD, Vitória TB (2006) Resposta do feijoeiro comum ao estresse térmico aplicado em diferentes estágios fenológicos. *Pesquisa Agropecuária Tropical* 36:199-204.
- Ding SW (2000) RNA silencing. *Current Opinion in Biotechnology* 11:152-156.
- Dolvo FE (1977) Criteria for cooking quality and acceptability of cowpeas. In: NUTRITIONAL standards and methods of evaluation for food legume breeders. IDRC, Ottawa, pp 85-87.
- Donegan KK, Seidler RJ, Doyle JD, Porteous LA, Digiovanni G, Widmer F, Watrud LS (1999) A field study with genetically engineered alfalfa inoculated with recombinant *Sinorhizobium meliloti*: effects on the soil ecosystem. *Journal of Applied Ecology* 36:920-936.
- Dröge M, Pühler A, Selbitschka W (2000) Phenotypic and molecular characterization of conjugative antibiotic resistance plasmids isolated from bacterial communities of activated sludge. *Molecular and General Genetics* 263:471-482.
- Dunfield KE, Germida JJ (2004) Impact of genetically modified crops on oil- and plant-associated microbial communities. *Journal of Environmental Quality* 33:806-815.
- Duque FF, Neves MC, Franco AA, Victória R, Boddey RM (1985) The response of field grown *Phaseolus vulgaris* to Rhizobium inoculation and the quantification of N₂ fixation using ¹⁵N. *Plant and Soil* 88:333-343.
- Elkim RG, Wasynesuk AM (1987) Amino acid analysis of feedstuff hydrolysates by precolumn derivatization with phenylisothiocyanate and reversed – phase high performance liquid chromatography. *Cereal Chemistry* 64:226-229.
- Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Solos (1997) Manual de métodos de análise de solo. 2. ed. Embrapa-CNPS, Rio de Janeiro.
- Esen FA (1993) IgGlucosidases, over review. In: Esen FA (ed) 3-Glucosidase, biochemistry and molecular biology. American Chemical Society, Washington, pp 1-14.
- European Committee for Standardization (2003a) EN 14122: foodstuffs: determination of vitamin B1 by HPLC. CEN, Brussels.

- European Committee for Standardization (2003b) EN 14152: foodstuffs: determination of vitamin B2 by HPLC. CEN, Brussels.
- Evans AM (1973) Commentary upon plant architecture and physiological efficiency in the field bean. In: Potentials of field beans and other food legumes in Latin America. Cali: CIAT, pp 279-286.
- Evans AM (1976) Beans (*Phaseolus* spp. Leguminosae-Papilionatae). In: Simmonds NW (ed) Evolution of crop plants. Longman, London, pp 168-172.
- Evans RJ, Bauer DH (1978) Studies of the poor utilization by the rat of methionine and cystine in heated dry bean seed (*Phaseolus vulgaris*). Journal of Agricultural and Food Chemistry 26:779-784.
- Fageria NK (2009) The use of nutrients in crop plants. CRC Press, New York.
- FAO (2009) Faostat. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Acesso em: 17 abr. 2009.
- FAO (2001) Evaluation of allergenicity of genetically modified foods: report of a joint FAO/WHO Expert Consultation on allergenicity of foods derived from biotechnology. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/agn/food/pdf/allergygm.pdf>>. Acesso em: 29 out. 2010.
- FAO (2010) Faostat. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 22 jul. 2010.
- Faria JC (2000) Historia y situación del cultivo del frijol en los países latinoamericanos afectados por geminivirus transmitidos por mosca blanca: Brasil. In: Morales Garzón FJ (ed) Bean golden mosaic and other diseases of common bean caused by whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. Ciat, Cali, pp 79-87.
- Faria JC, Maxwell DP (1999) Variability in geminivirus isolates associated with *Phaseolus* spp. in Brazil. Phytopathology 89:262-268.
- Faria JC, Zimmermann MJO (1988) Controle do mosaico dourado do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) pela resistência varietal e inseticidas. Fitopatologia Brasileira 13:32-35.

- Faria JC, Bezerra IC, Zerbini FM, Ribeiro SG, Lima MF (2000) Situação atual das geminiviroses no Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 25:125-137.
- Faria JC, Carneiro GES, Aragão FJL (2010) Gene flow from transgenic common beans expressing the *bar* gene. *GM Crops* 2:1-5.
- Faria JC, Gilbertson RL, Hanson SF, Morales FJ, Ahlquist P, Loniello AO, Maxwell DP (1994) Bean golden mosaic geminivirus type II isolates from the Dominican Republic and Guatemala: nucleotide sequences, infectious pseudorecombinants, and phylogenetic relationships. *Phytopathology* 84:321-329.
- Ferreira CM (2001) Comercialização de feijão no Brasil 1990-99. Dissertação de mestrado, ESALQ, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Ferreira CM, Del Peloso MJ (2005) Matriz produtiva e sustentabilidade do feijão no Brasil de 1990 a 2003. In: VIII Congresso Nacional de Pesquisa de Feijão. Anais. Embrapa Arroz e Feijão, Goiânia, pp 888-891.
- Ferreira CM, Yokoyama LP (1999) Comportamento dos consumidores de feijão. In: VI Reunião Nacional de Pesquisa de Feijão. Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, pp 717-719.
- Ferreira CM, Del Peloso MJ, Faria LC (2002) Feijão na economia nacional. Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás.
- Ferreira JJ, Alvarez E, Fueyo MA, Roca A, Giraldez R (2000) Determination of the outcrossing rate of *Phaseolus vulgaris* L. using seed protein markers. *Euphytica* 113:259-263.
- Ferreira JL, Carneiro JES, Teixeira AL, Lanes FF, Cecon PR, Borem A (2007) Gene flow in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Euphytica* 153:165-70.
- Fiers MW, Kleter GA, Nijland H, Peijnenburg AA, Nap JP, Ham RC Van (2004) Allermatch, a webtool for the prediction of potential allergenicity according to current FAO/WHO Codex alimentarius guidelines. *BMC Bioinformatics* 5:33.

- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811.
- Follet RF, Schimel DS (1989) Effect of tillage practices on microbial biomass dynamics. *Soil Science Society of America Journal* 53:1091-1096.
- Free JB (1966) Pollination of the beans *Phaseolus multiflorus* and *Phaseolus vulgaris* by honeybees. *Journal of Apicultural Research* 5:87-91.
- Friedrich DC, Passaglia LMP (2004) Avaliação da possibilidade de ocorrência de transformação natural de *Azospirillum brasilense* com DNA de plantas contendo o gene de resistência à canamicina. *Brazilian Journal of Biosciences* 2:151-158.
- Frizzi A, Huang S (2010) Tapping RNA silencing pathways for plant biotechnology. *Plant Biotechnology Journal* 8:655–677.
- Fukuda G, Elias LG, Bressani R (1982) Significado de algunos factores antifisiológicos y nutricionales em la evaluación biológica de diferentes cultivares de frijol comum (*Phaseolus vulgaris*). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 32:945-960.
- Futterer J, Gordon K, Sanfacon H, Bonneville JM, Hohn T (1990) Positive and negative control of translation by the leader sequence of cauliflower mosaic virus pregenomic 35S RNA. *EMBO Journal* 9:1697–1707.
- Gaitan-Solis E, Choi I, Quigley CV, Cregan PB, Tohme J (2008) Single nucleotide polymorphisms in common bean: their discovery and genotyping using a multiplex detection system. *The Plant Genome* 1:125-134.
- Gallo D, Nakano O, Silveira Neto S, Carvalho RPL, Baptista GC, Berti Filho E, Parra JRPP, Zucchi RA, Alves SB, Vendramim JD, Marchini LC, Lopes JRS, Omoto C. (2002) *Entomologia agrícola*. FEALQ, Piracicaba.
- Galvez GE, Morales FJ (1989) Whitefly-transmitted viruses. In: Schwartz HF, Pastor-Corrales MA (ed) *Bean production problems in the tropics*, 2nd ed. Ciat, Cali, pp 379-406.

- Garrido-Ramirez ER, Sudarshana MR, Gilbertson RL (2000) *Bean golden yellow mosaic virus* from Chiapas, Mexico: characterization, pseudorecombination with other bean-infecting geminiviruses, and germ plasm screening. *Phytopathology* 90:1224-1232.
- Garruti RS (1981) Metodologia estatístico-sensorial para avaliação do sabor e textura de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.), armazenados. Tese de livre docência, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Gaspar JO, Costa AS (1993) Efeito do vírus do mosaico angular sobre o metabolismo de carboidratos em feijoeiro Jalo. *Fitopatologia Brasileira* 18:541-544.
- Gebhard F, Smalla K (1998) Transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413 by transgenic sugar beet DNA. *Applied and Environmental Microbiology* 64:1550–1554.
- Gebhard F, Smalla K (1999) Monitoring field releases of genetically modified sugar beets for persistence of transgenic plant DNA and horizontal gene transfer. *FEMS Microbiology Ecology* 28:261-272.
- Geil PB, Anderson JW (1994) Nutrition and health implications of dry beans: a review. *Journal of the American College of Nutrition* 13:549-558.
- Gepts P (1988) Provisional linkage map of common bean. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative* 31:20-25.
- Gepts P (1998) Origin and evolution of common bean: past events and recent trends. *Hort Science* 33:1124-1130.
- Gepts P, Bliss FA (1985) F1 hybrid weakness in the common bean: differential geographic origin suggests two gene pools in cultivated bean germplasm. *Journal of Heredity* 76:447-450.
- Gepts P, Bliss FA (1986) Phaseolin variability among wild and cultivated common beans (*Phaseolus vulgaris*) from Colombia. *Economic Botany* 40:469-478.
- Gepts P, Debouck D (1991) Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: Schoonhoven A Van, Voysest O (ed) *Common beans: research for crop improvement*. CAB International/Ciat, Cali. pp 7-53.

- Gepts P, Aragão FJL, Barros E, Blair MW, Brondani R, Broughton W, Galasso I, Hernández G, Kami J, Lariguet P, McClean P, Melotto M, Miklas P, Pauls P, Pedrosa-Harand A, Porch T, Sánchez F, Sparvoli F, Yu K (2008) Genomics of *Phaseolus* beans, a major source of dietary protein and micronutrients in the tropics. In: Moore PH, Ming R (ed) Genomics of tropical crop plant. Springer, Berlin, pp 113-143.
- Gepts PL, Kmiecik K, Pereira PAA, Bliss FA (1988) Dissemination pathways of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae) deduced from phaseolin electrophoretic variability. I. The Americas. *Economic Botany* 42:73-85.
- Geraldo A (2006) Aminoácidos sulfurados, lisina e treonina digestíveis para poedeiras comerciais leves em pico de produção. Tese de doutorado, Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- Gerdemann JW, Nicolson TH (1963) Spores of mycorrhizal endogone extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society* 46:235-244.
- Gilbertson RL, Faria JC, Ahlquist P, Maxwell DP (1993) Genetic diversity in geminivirus causing bean golden mosaic disease: the nucleotide sequence of the infectious cloned DNA components of a Brazilian isolate of bean golden mosaic geminivirus. *Phytopathology* 83:709-715.
- Golob P, Kilminster A (1982) The biology and control of *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) (Coleoptera: Bruchidae) infesting red kidney beans. *Journal of Stored Products Research* 18:95-101.
- Gong W, Ren Y, Xu Q, Wang Y, Lin D, Zhou H, Li T (2006) Integrated siRNA design based on surveying of features associated with high RNAi effectiveness. *BMC Bioinformatics* 7:516.
- Gong W, Ren Y, Zhou H, Wang Y, Kang S, Li T (2008) siDRM: an effective and generally applicable online siRNA design tool. *Bioinformatics* 24:2405-2406.
- Grace C, Stribley DP (1991) A safer procedure for routine staining of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycological Research* 95:1160-1162.

- Grafton KF, Wyatt JE, Weiser GC (1983) Genetics of a vicescent foliage mutant in beans. *Journal of Heredity* 74:385.
- Griffiths BS, Caul S, Thompson J, Hackett A, Cortet J, Pernin C, Krogh PH (2008) Soil microbial and faunal responses to herbicide tolerant maize and herbicide in two soils. *Plant and Soil* 308:93–103.
- Guilley H, Dudley RK, Jonard G, Balazs E, Richards KE (1982) Transcription of *Cauliflower mosaic virus* DNA: detection of promoter sequences, and characterization of transcripts. *Cell* 30:763-773.
- Guivant JS, Capalbo DMF, Dusi NA, Fontes EG, Pires CSS (2010) Acima dos confrontos sobre os transgênicos: uma experiência-piloto de consulta pública. *Cadernos de Ciência & Tecnologia* No prelo.
- Guo X, Ruan S, Hu W, Cai D, Fan L (2008) Chloroplast DNA insertions into the nuclear genome of rice: the genes, sites and ages of insertion involved. *Functional and Integrative Genomics* 8:101–108.
- Hagen SR, Frost B, Augustin J (1989) Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of aminoacids in foods. *Journal Association Analytical Chemistry* 2:6.
- Hamilton AJ, Baulcombe DC (1999) A species of small antisense RNA in post transcriptional gene silencing in plants. *Science* 286:950-952.
- Hangen L, Bennink MR (2002) Consumption of black beans and navy beans (*Phaseolus vulgaris*) reduced azoxymethane-induced colon cancer in rats. *Nutrition and Cancer* 44:60-65.
- Hanley-Bowdoin L, Settlage SB, Orozco BM, Nagar S, Robertson D (1999) Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell regulation. *CRC Critical Reviews in Plant Science* 18:71-106.
- Hardarson G, Bliss FA, Cigales-Rivero MR, Henson RA, Kipe-Nolt JA, Longeri L, Manrique A, Peña-Cabriales JJ, Pereira PAA, Sanabria CA, Tsai SM (1993) Genotypic variation in biological nitrogen fixation by common bean. *Plant and Soil* 152:59-70.

- Harlan JR (1975) Crops and man. American Society of Agronomy, Madison.
- Hartmann E, Sommer T, Prehn S, Görlich D, Jentsch S, Rapoport TA (1994) Evolutionary conservation of components of the protein translocation complex. *Nature* 367:654-657.
- Hensche A, Buchholz F, Habermann B (2004) DEQOR: a web-based tool for the design and quality control of siRNAs. *Nucleic Acids Research* 32 :W113-W120.
- Hermes-Lima M, Willmore W, Storey KB (1995) Quantification of lipid peroxidation in tissues based on the Fe(III)xylenol orange complex formation. *Free Radical Biology & Medicine* 19: 271-280.
- Herridge DF, Peoples MB, Boddey RM (2008) Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant and Soil* 311:1–18.
- Heuer H, Krsek M, Baker P, Smalla K, Wellington EMH (1997) Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology* 63:3233–3241.
- Hileman RE, Silvanovich A, Goodman RE, Rice EA, Holleschak G, Astwood JD, Hefle SL (2002) Bioinformatic methods for allergenicity assessment using a comprehensive allergen database. *International Archives of Allergy and Immunology* 128:280–291.
- Hoffmann R (2000) Elasticidade-renda das despesas com alimentos em regiões metropolitanas do Brasil em 1995-96. *Informações Econômicas* 30:17-24.
- Hoffmann-Campo CB, Moscardi F, Corrêa-Ferreira BS, Oliveira LJ, Sosa-Gómez DR, Panizzi AR, Corso IC, Gazzoni DL, Oliveira EB (2000) Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado. *Embrapa Soja*, Londrina.
- Hohn T (2007) Plant virus transmission from the insect point of view. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:17905–17906.
- Honma S, Heeckt O (1959) Interspecific hybrid between *Phaseolus vulgaris* and *P. lunatus*. *Journal of Heredity* 50:233-237.

- Hossain Z, Mandal AKA, Datta SK, Biswas AK (2006) Decline in ascorbate peroxidase activity – a prerequisite factor for tepal senescence in gladiolus. *Journal of Plant Physiology* 163:186-194.
- Hungria M, Neves MCP (1986) Interações entre cultivares de *Phaseolus vulgaris* e estirpes de *Rhizobium* na fixação e transporte de nitrogênio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 21:127-140.
- Hungria M, Andrade DS, Colozzi-Filho A, Balota EL (1997) Interação entre microrganismos do solo, feijoeiro e milho em monocultura ou consórcio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 32:807–818.
- Hungria M, Campo RJ, Mendes IC (2003) Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. *Biology and Fertility of Soils* 39:88–93.
- Ibarra-Perez FJ, Ehdaie B, Waines JG (1997) Estimation of outcrossing rate in common bean. *Crop Science* 37:60-65.
- IBGE (1998) Pesquisa de orçamentos familiares 1995-1997. Fundação IBGE, Rio de Janeiro.
- IBGE (2010a) Estimativas da população. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 22 jul. 2010.
- IBGE (2010b) Levantamento sistemático da produção agrícola: 1990-2008. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 22 jul. 2010.
- IBGE (2010c) Pesquisa de orçamentos familiares 2002-2003. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 22 jul. 2010.
- IBGE (2010d) Produção agrícola municipal: culturas temporárias e permanentes, 1990 a 2008. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 22 jul. 2010.
- Instituto Adolfo Lutz (1976) Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análises de alimentos. Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.

- Ishii K, Meng-Zhu L (2008) Testing the possibility of horizontal transfer of introduced neomycin phosphotransferase (nptII) gene of transgenic *Eucalyptus camaludulensis* into soil bacteria. *Forestry Studies in China* 10:134-136.
- Inoue-Nagata AK, Albuquerque LC, Rocha WB, Nagata T (2004) A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage ϕ 29 DNA polymerase. *Journal of Virological Methods* 116:209–211.
- ICTV International Committee on Taxonomy of Viruses (2006) 00.015.0.01.001. cauliflower mosaic virus. Disponível em: <<http://www.ictvdb.org/ICTVdB/00.015.0.01.001.htm>>. Acesso em: 20 nov. 2010.
- Ivanciuc O, Schein CH, Braun W (2003) SDAP: database and computational tools for allergenic proteins. *Nucleic Acids Research* 31:359–362.
- Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS (2003) Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nature Biotechnology* 21:635–637.
- Jackson AL, Burchard J, Schelter J, Chau BN, Cleary M, Lim L, Linsley PS (2006) Widespread siRNA "off-target" transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. *RNA* 12:1179–1187.
- Jones DD, Maryanski JH (1991) Safety considerations in the evaluation of transgenic plants for human foods. In: Levin MA, Strauss HS (ed) *Risk assessment in genetic engineering*. McGraw-Hill, New York, pp 64-82.
- Jood S, Chauhan BM, Kapoor AC (1989) Protein digestibility (*in vitro*) of chickpea and blackgram seeds as affected by domestic processing and cooking. *Plant Foods for Human Nutrition* 39:149-154.
- Kaldorf M, Fladung M, Muhs HJ, Buscot F (2000) Interactions between mycorrhizal fungi and transgenic trees. In: *Proceedings of the Workshop Release of Transgenic Trees - present achievements, problems, future prospects, 1999*, Humboldt University, Berlin, pp 81-86.
- Kaldorf M, Fladung M, Muhs HJ, Buscot F (2002) Mycorrhizal colonization of transgenic aspen in a field trial. *Planta* 214:653-660.

- Kami JA, Velasquez VB, Debouck DG, Gepts P (1995) Identification of presumed ancestral DNA sequences of phaseolin in *Phaseolus vulgaris*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92:1101-1104.
- Kaplan L (1981) What is the origin of the common bean? Economic Botany 35:240-254.
- Kaschuk G, Alberton O, Hungria M (2010) Three decades of soil microbial biomass studies in Brazilian ecosystems: Lessons learned about soil quality and indications for improving sustainability. Soil Biology and Biochemistry 42:1–13.
- Kay E, Chabrillat G, Vogel TM, Simoneti P (2003) Intergeneric transfer of chromosomal and conjugative plasmid genes between *Ralstonia solanacearum* and *Acinetobacter* sp. BD413. Molecular Plant-Microbe Interactions 16:74–82.
- Kay E, Vogel TM, Bertolla F, Nalin R, Simoneti P (2002) In situ transfer of antibiotic resistance genes from transgenic (transplastomic) tobacco plants to bacteria. Applied and Environmental Microbiology 68:3345–3351.
- Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD (2003) Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. Cell 115:209-216.
- Knupp AM, Martins CM, Faria JC, Rumjanek NG, Xavier GR (2009) Comunidade bacteriana como indicadora do efeito de feijoeiro geneticamente modificado sobre organismos não alvo. Pesquisa Agropecuária Brasileira 44:1692-1699.
- Koga-Ban Y, Sakanishi M, Ikegami M (1992) Changes in protein profiles of bean leaves infected by bean golden mosaic virus. Annals of the Phytopathological Society of Japan 58:347-353.
- Kokubo Y, Iso H, Ishihara J, Okada K, Inoue M, Tsugane S (2007) Association of dietary intake of soy, beans, and isoflavones with risk of cerebral and myocardial infarctions in Japanese populations: the Japan Public Health Center - based (JPHC) study cohort I. Disponível em: <<http://circ.ahajournals.org/cgi/content/short/CIRCULATIONAHA.106.683755v1>>. Acesso em: 8 out. 2010.
- Koske RE, Gemma JN (1989) A modified procedure for staining roots to detect V-A mycorrhizas. Mycological Research 92:486-488.

- Krieger EK, Allen E, Gilbertson LA, Roberts JK, Hiatt W, Sanders RA (2008) The Flavr Savr tomato, an early example of RNAi technology. *HortScience* 43:962–964.
- Krogh PH, Griffiths BS, Demšar D, Bohanec M, Debeljak M, Andersen MN, Sausse C, Birch ANE, Caul S, Holmstrup M, Heckmann LH, Cortet J (2007) Responses by earthworms to reduced tillage in herbicide tolerant maize and Bt maize cropping systems. *Pedobiologia* 51:219–228.
- Kumar S, Dudley J, Nei M, Tamura K (2008) MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics* 9:299-306.
- Kusaba M, Miyahara K, Iida S, Fukuoka H, Takano T, Sassa H, Nishimura M, Nishio T (2003) Low glutelin content1: a dominant mutation that suppresses the glutelin multigene family via RNA silencing in rice. *Plant Cell* 15:1455–1467.
- Kwak M, Kami J, Gepts P (2009) The putative Mesoamerican domestication center of *Phaseolus vulgaris* is located in the Lerma-Santiago Basin of Mexico. *Crop Science* 49:554-563.
- Lara FM (1997) Resistance of wild and near isogenic bean lines with arcelin variants to *Zabrotes subfasciatus* (Boheman). I- Winter Crop. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 26:551-560.
- Leister D (2005) Origin, evolution and genetic effects of nuclear insertions of organelle DNA. *Trends in Genetics* 21:655–663.
- Leterme P (2002) Recommendations by health organizations for pulse consumption. *British Journal of Nutrition* 88:239-242.
- Levenkova N, Gu G, Rux JJ (2004) Gene specific siRNA selector. *Bioinformatics* 20:430-432.
- Lewin A, Jacob D, Freytag B, Appel B (1998) Gene expression in bacteria directed by plant-specific regulatory sequences. *Transgenic Research* 7:403-412.

- Lin X, Ruan X, Anderson MG, McDowell JA, Kroeger PE, Fesik SW, Shen Y (2005) siRNA-mediated off-target gene silencing triggered by a 7 nt complementation. *Nucleic Acids Research* 33:4527–4535.
- Liu YG, Whittier RF (1995) Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics* 25:674–681.
- Liu YG, Mitsukawa N, Oosumi T, Whittier RF (1995) Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant Journal* 8:457-463.
- Lorenz MG, Wackernagel W (1994) Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiological Reviews* 58:563-602.
- Llave C, Kasschau KD, Rector MA, Carrington JC (2002) Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell* 14:1605-1619.
- Mackie WW, Smith FL (1935) Evidence of field hybridization in beans. *Journal of the American Society of Agronomy* 27:903-909.
- Macrae R (1998) Food science and technology: a series of monographs: HPLC in food analysis. 2nd ed. Academic Press, New York.
- Machado CM, Ferruzzi MG, Nielsen SS (2008) Impact of the hard-to-cook phenomenon on phenolic antioxidants in dry beans (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:3102- 3110.
- Malik PS, Kumar V, Bagewadi B, Mukherjee SK (2005) Interaction between coat protein and replication initiation protein of *Mung bean yellow mosaic India virus* might lead to control viral DNA replication. *Virology* 337:273-283.
- Marteleto PB, Lomônaco C, Kerr WE (2009) Respostas fisiológicas, morfológicas e comportamentais de *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) (Coleoptera: Bruchidae) associadas ao consumo de diferentes variedades de feijão (*Phaseolus vulgaris*). *Neotropical Entomology* 38:178-185.

- Mazur BJ, Chui CF, Smith JK (1987) Isolation and characterization of plant genes coding for acetolactate synthase, the target enzyme for two classes of herbicides. *Plant Physiology* 85:1110-1117.
- Mazzoneto F, Vendramim JD (2002) Aspectos biológicos de *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Coleoptera: Bruchidae) em genótipos de feijoeiro com e sem arcelina. *Neotropical Entomology* 31:435-439.
- McClellan PE, Lavin M, Gepts P, Jackson SA (2008) *Phaseolus vulgaris*: a diploid model for soybean. In: Stacey G (ed) *Genetics and genomics of soybean*. Springer, New York, pp 55-76.
- McGregor SE (1976) Insect pollination of cultivated crop plants. USDA, Washington, pp 100-101.
- Meier P, Wackernagel W (2003) Monitoring the spread of recombinant DNA from field plots with transgenic sugar beet plants by PCR and natural transformation of *Pseudomonas stutzeri*. *Transgenic Research* 12:293-304.
- Melo LC, Faria JC, Rosaria L, Yokoyama M, Brondani RVP, Del Peloso MJ, Brondani C, Faria LC (2005) Controle genético da reação do feijoeiro comum ao vírus do mosaico dourado In: VIII Congresso Nacional Pesquisa de Feijão. Anais. Embrapa Arroz e Feijão, Goiânia, pp 393-396.
- Menten JOM, Tulmann Neto A, Ando A (1980) Avaliação de danos causados pelo vírus do mosaico dourado do feijoeiro (WMDF). *Turrialba* 30:173-176.
- Mesquita FR, Corrêa AD, Abreu CMP, Lima RAZ, Abreu AFB (2007) Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): composição química e digestibilidade protéica. *Ciência e Agrotecnologia* 31:1114-1121.
- Miklas PN (2000). Use of germplasm in breeding pinto, great northern, pink, and red bean for the Pacific Northwest and intermountain region. In: Singh SP (ed) *Bean research, production and utilization: proceedings of the Idaho Bean Workshop*. University of Idaho, Moscow, pp 13-29.

- Milling A, Smalla K, Maidl FX, Schloter M, Munch JC (2004) Effects of transgenic potatoes with an altered starch composition on the diversity of soil and rhizosphere bacteria and fungi. *Plant and Soil* 226:23–39.
- Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (2010) Brasil exportador. Disponível em: <<http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/>>. Acesso em: 10 jul. 2010.
- Monteiro RC (2001) *Thrips palmi* (Thysanoptera: Thripidae). In: Vilela EF, Zucchi RA, Cantor F (ed) Histórico e impacto das pragas introduzidas no Brasil. Holos, Ribeirão Preto, pp 72-80.
- Moraes GT, Flechtmann CNW (2008) Manual de acarologia, acarologia básica e ácaros de plantas cultivadas no Brasil. Holos, Ribeirão Preto.
- Morales FJ, Jones PG (2004) The ecology and epidemiology of whitefly-transmitted viruses in Latin America. *Virus Research* 100:57–65.
- Morton JB, Bentivenga SP, Wheeler WW (1993) Germ plasm in the International Collection of Arbuscular and Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM) and procedures for culture development, documentation and storage. *Mycotaxon* 48:491-528.
- Müller J, Boller T, Wiemken A (1995) Trehalose and trehalase in higher plants: new developments. *Plant Science* 112:1-8.
- Muller S, Pereira PAA, Martin P (1993) Effects of different levels of mineral nitrogen on nodulation and N₂ fixation of two cultivars of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) *Plant and Soil* 152:139-143.
- Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59:695–700.
- Naito Y, Yoshimura J, Morishita S, Ui-Tei K (2009) siDirect 2.0: updated software for designing functional siRNA with reduced seed-dependent off-target effect. *BMC Bioinformatics* 10:392.

- Nakamura R, Teshima R, Takagi K, Sawada J (2005) Development of Allergen Database for Food Safety (ADFS): an integrated database to search allergens and predict allergenicity. *Kokuritsu Iyakuhin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku* 123:32–36.
- Nap JP, Bijvoet J, Stiekema WJ (1992) Biosafety of kanamycin-resistant transgenic plants. *Transgenic Research* 1:239-249.
- Nielsen KM, Townsend JP (2004) Monitoring and modeling horizontal gene transfer. *Nature Biotechnology* 22:1110-1114.
- Nielsen KM, Bones AM, Smalla K, Van Elsas J (1998) Horizontal gene transfer from transgenic plants to terrestrial bacteria—a rare event? *FEMS Microbiology Reviews* 22:79–103.
- Nielsen KM, Van Elsas J, Smalla K (2000) Transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413 (pFG4*DnptII*) with transgenic plant DNA in soil microcosms and effects of kanamycin on selection of transformants. *Applied and Environmental Microbiology* 66:1237-1242.
- Noad RJ, Turner DS, Covey SN (1997) Expression of functional elements inserted into the 35S promoter region of infectious cauliflower mosaic virus replicons. *Nucleic Acids Research* 25:1123–1129.
- Obiro WC, Zhang T, Jiang B (2008) The nutraceutical role of the *Phaseolus vulgaris* alpha-amylase inhibitor. *British Journal of Nutrition* 100:1-12.
- OECD Organisation for Economic Co-operation and Development (2002) OECD guidance for the designation of a unique identifier for transgenic plants. (Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology, N. 23). Disponível em: <[http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf?cote=env/jm/mono\(2002\)7&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf?cote=env/jm/mono(2002)7&doclanguage=en)>. Acesso em: 10 nov. 2010.
- O'Callaghan M, Glare TR, Burgess EPJ, Malone LA (2005) Effects of plants genetically modified for insect resistance on nontarget organisms. *Annual Review of Entomology* 50:271-292.
- Oliveira AR, Castro TR, Capalbo DMF, Delalibera Jr I (2007) Toxicological evaluation of genetically modified cotton (Bollgard®) and Dipel® WP on the non-target soil mite

- Schelorbates praeincisus (Acari: Oribatida). *Experimental and Applied Acarology* 41:191-201.
- Orozco BM, Hanley-Bowdoin L (1996) A DNA structure is required for geminivirus replication origin function. *Journal of Virology* 70:148-158.
- Ortega SV (1974) Polinización cruzada natural de la caraota (*P. vulgaris* L.) en Venezuela. *Agronomía Tropical* 24:27-32.
- Ow DW, Jacobs JD, Howell SH (1987) Functional regions of the cauliflower mosaic virus 35S RNA promoter determined by use of the firefly luciferase gene as a reporter of promoter activity. *84:4870-4874*.
- Pacova BEV, Rocha ACM (1975) Hibridação natural no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em Linhares, Espírito Santo. *Revista Ceres* 22:157-158.
- Paget E, Simonet P (1994) On the track of natural transformation in soil. *FEMS Microbiological Ecology* 15:109-118.
- Palmen R, Vosman B, Buijsman P, Breek CK, Hellingwerf KJ (1993) Physiological characterization of natural transformation in *Acinetobacter calcoaceticus*. *Journal of General Microbiology* 139:295–305.
- Palmer KE, Rybicki EP (1998) The molecular biology of mastreviuses. *Advances in Virus Research* 50:183-234.
- Pang SS, Duggleby RG, Guddat LW (2002) Crystal structure of yeast acetohydroxyacid synthase: a target for herbicidal inhibitors. *Journal of Molecular Biology* 317:249–262.
- Pariza MW, Foster EM (1983) Determining the safety of enzymes used in food processing. *Journal of Food Protection* 46:453-463.
- Park SJ, Michaels TE, Myers JR, Hunt DWA, Stewart-Williams K (1996) Outcrossing rates of common beans grown in Ontario and Idaho. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative* 39:90-91.
- Partearroyo MA, Fernández-Quintela A, Cid C (1995) Sustancias antinutritivas en alimentos de origen vegetal. Su significado en la alimentación humana. *Alimentaria* 267:115-120.

- Passos SR, Reis Jr FB, Rumjanek NG, Mendes IC, Baptista MJ, Xavier GR (2008) Atividade enzimática e perfil da comunidade bacteriana em solo submetido à solarização e biofumigação. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 43:879-885.
- Pauli S, Rothnie HM, Chen G, He X, Hohn T (2004) The cauliflower mosaic virus 35S promoter extends into the transcribed region. *Journal of Virology* 78:12120-12128.
- Pellet PL, Young VR (1980) Nutritional evaluation of protein foods: report of a working sponsored by The International Union of Nutritional Science and United Nations University World Hunger Programs. The United Nations University, Tokyo.
- Peña-Cabriales JJ, Grageda-Cabrera OA, Kola V, Hardarson G (1993) Time course of N₂ fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *Plant and Soil* 152:115-121.
- Pereira PAA, Yokoyama M, Quintela ED, Bliss FA (1995) Controle do caruncho *Zabrotes subfasciatus* (Boheman, 1833) (Coleoptera: Bruchidae) pelo uso de proteína da semente em linhagens quase-isogênicas do feijoeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 30:1031-1034.
- Pereira Filho IA, Cavariani C (1984) Taxa de hibridação natural do feijoeiro comum em Patos de Minas, Minas Gerais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 19:1181-1183.
- Pompeu AS (1963) Polinização cruzada natural no feijoeiro. *Bragantia* 22:53-57.
- Prado PI, Lewinsohn TM, Carmo RL, Hogan DJ (2002) Ordenação multivariada na ecologia e seu uso em ciências ambientais. *Ambiente e Sociedade* 10:69-83.
- Proctor JR, Watts BM (1987) Development of a modified Mattson bean cooker procedure based on sensory panel cookability evaluation. *Canadian Institute of Food Science and Technology* 20:9-14.
- Purseglove JW (1976) The origin and migrations of crops in tropical Africa. In: Harlan JR, Wet MJ, Stemler ABL (ed) *Origins of African plant domestication*. Mouton, The Hague, pp 291-310.
- Quintela ED (2002) Manual de identificação dos insetos e outros invertebrados pragas do feijoeiro. Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás.

- Rabakoarihanta A, Baggett JR (1983) Inheritance of leaf distortion tendency in bush lines of beans, *Phaseolus vulgaris* L., of blue lake background. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 108:351-354.
- Ramalho MAP, Santos JB (1982) Melhoramento do feijão. *Informe Agropecuário* 8:16-19.
- Ramos MLG, Parsons R, Sprent JI, James EK (2003) Effect of water stress on nitrogen fixation and nodule structure of common bean. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 38:339-347.
- Rasche F, Hödl V, Poll C, Kandeler E, Gerzabek MH, Van Elsas JD, Sessitsch A (2006) Rhizosphere bacteria affected by transgenic potatoes with antibacterial activities compared with the effects of soil, wild type potatoes, vegetation stage and pathogen exposure. *FEMS Microbiology Ecology* 56:219-235.
- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76 A rodent diet. *Journal of Nutrition* 123:1939-1951.
- Ren Y, Gong W, Xu Q, Zheng X, Lin D, Wang Y, Li T (2006) siRecords: an extensive database of mammalian siRNAs with efficacy ratings. *Bioinformatics* 22:1027-1028.
- Ren Y, Gong W, Zhou H, Wang Y, Xiao F, Li T (2009) siRecords: a database of mammalian RNAi experiments and efficacies. *Nucleic Acids Research* 37:146-149.
- Ribeiro SG, Lohuis H, Goldbach R, Prins M (2007) Tomato chlorotic mottle virus is a target of RNA silencing but the presence of specific short interfering RNAs does not guarantee resistance in transgenic plants. *Journal of Virology* 81:1563-1573.
- Richards TA, Soanes DM, Foster PG, Leonard G, Thornton CR, Talbot NJ (2009) Phylogenomic analysis demonstrates a pattern of rare and ancient horizontal gene transfer between plants and fungi. *Plant Cell* 21:1897-1911.
- Rieger R, Michaelis A, Green MM (1976) *Glossary of genetics and cytogenetics – classical and molecular*. 4th ed. Springer, New York.

- Romano N, Macino G (1992) Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular Microbiology* 6:3343-3353.
- Romeis J, Battini M, Bigler F (2003) Transgenic wheat with enhanced fungal resistance causes no effects on *Folsomia candida* (Collembola: Isotomidae). *Pedobiologia* 47:141-147.
- Royer MR, Gonçalves-Vidigal MC, Scapim CA, Vidigal Filho PS, Terada U (2002) Outcrossing in common bean. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 2:49-54.
- Saha S, Raghava GPS (2006) AlgPred: prediction of allergenic proteins and mapping of IgE epitopes. *Nucleic Acids Research* 34:W202-W209.
- Santana MP, Carvalho CF, Souza B, Morgado LN (2002) Abelhas (Hymenoptera: Apoidea) visitantes das flores do feijoeiro, *Phaseolus vulgaris* L., em Lavras e Ijaci, MG. *Ciência e Agrotecnologia* 26:1119-1127.
- Santos JB, Jakelaitis A, Silva AA, Costa MD, Manabe A, Silva MCS (2006) Action of two herbicides on the microbial activity of soil cultivated with common bean (*Phaseolus vulgaris*) in conventional-till and no-till systems. *Weed Research* 46:284-289.
- Sari LT, Ribeiro-Costa CS, Pereira PRVS (2003) Aspectos biológicos de *Zabrotes subfasciatus* (Bohemann, 1833) (Coleoptera, Bruchidae) em *Phaseolus vulgaris* L., cv. Carioca (Fabaceae), sob condições de laboratório. *Revista Brasileira de Entomologia* 7:621-624.
- Scacheri PC, Rozenblatt-Rosen O, Caplen NJ, Wolfsberg TG, Umayam L, Lee JC, Hughes CM, Shanmugam KS, Bhattacharjee A, Meyerson M, Collins FS (2004) Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:1892-1897.
- Schenck NC, Perez Y (1990) Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi. 3rd ed. Synergistic Publications, Gainesville.

- Schluter K, Futterer J, Potrykus I (1995) Horizontal gene transfer from a transgenic potato line to a bacterial pathogen (*Erwinia chrysanthemi*) occurs – if at all – at an extremely low frequency. *Bio/Technology* 13:1094–1098.
- Schmalenberger A, Tebbe CC (2002) Bacterial community composition in the rhizosphere of a transgenic, herbicide resistant maize (*Zea mays*) and comparison to its non-transgenic cultivar Bosphore. *FEMS Microbiology Ecology* 40:29-37.
- Schoonhoven A. Van, Cardona C, Valor J (1983) Resistance to the bean weevil and the Mexican bean weevil (Coleoptera: Bruchidae) in noncultivated common bean accessions. *Journal of Economic Entomology* 76:1255-1259.
- Schwarz DS, Hutvágner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115:199-208.
- Schwieger F, Tebbe CC (1998) A new approach to utilize PCR–single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 64:4870–4876.
- Selgrade MK, Bowman CC, Ladics GS, Privalle L, Laessig SA (2009) Safety assessment of biotechnology products for potential risk of food allergy: implications of new research. *Toxicological Sciences* 110:31–39.
- Sgarbieri VC (1996) Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações. Varela, São Paulo.
- Shewry PR, Jenkins J, Beaudoin F, Mills ENC (2006) Plant protein families as a basis for predicting the allergenicity of food proteins. In: Gilissen LJEJ, Wichers HJ, Savelkoul HFJ, Bogers RJ (ed) *Allergy matters: new approaches to allergy prevention and management*. Springer, Wageningen, pp 39-44.
- Shii CT, Mok MC, Mok DW (1981) Developmental controls of morphological mutants of *Phaseolus vulgaris* L.: differential expression of mutant loci in plant organs. *Developmental Genetics* 2:279-290.
- Sileshi G, Mafongoya PL (2006) Variation in macrofaunal communities under contrasting land use systems in eastern Zambia. *Applied Soil Ecology* 33:49–60.

- Silva ES (2002) Ácaros (Arthropoda: Acari) edáficos da mata atlântica e cerrado do Estado de São Paulo, com ênfase na superfamília Rhodacaroidea. Dissertação de mestrado, ESALQ, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Silva EE, Azevedo PHS, De-Polli H (2007a) Determinação da biomassa microbiana do solo (BMS-C). Embrapa Agrobiologia, Seropédica.
- Silva EE, Azevedo PHS, De-Polli H (2007b) Determinação da respiração basal (RBS) e quociente metabólico do solo (qCO₂). Embrapa Agrobiologia, Seropédica.
- Silva MB, Kliemann HJ, Silveira PM, Lanna AC (2007c) Atributos biológicos do solo sob influência da cobertura vegetal e do sistema de manejo. Pesquisa Agropecuária Brasileira 42:1755–1761.
- Singh S Taneja B, Salvi SS, Agrawal A (2009) Physical properties of intact proteins may predict allergenicity or lack thereof. PLoS ONE 4:e6273.
- Singh SP (1988) Gene pools in cultivated dry bean. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative 31:180-182.
- Singh SP (1989) Patterns of variation in cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). Economic Botany 43:39-57.
- Singh SP (1991) Bean genetics. In: Schoonhoven A Van, Voysest O (ed) Common beans: research for crop improvement. CAB International/Ciat, Cali, pp 199-286.
- Singh SP (2001) Broadening the genetic base of common bean cultivars: a review. Crop Science 41:1659–1675.
- Singh SP, Gutiérrez JA (1984) Geographical distribution of the *DL₁* and *DL₂* genes causing hybrid dwarfism in *Phaseolus vulgaris* L., their association with seed size, and their significance to breeding. Euphytica 33:337-345.
- Singh SP, Gepts P, Debouck DG (1991) Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*). Economic Botany 45:379–396.
- Sjoblad RD, McClintock JT, Engler R (1992) Toxicological considerations for protein components of biological pesticides products. Regulatory Toxicology and Pharmacology 15:3-9.

- Small I (2007) RNAi for revealing and engineering plant gene functions. *Current Opinion in Biotechnology* 18:148-153.
- Smalla K, Borin S, Heuer H, Gebhard F, Van Elsas JD, Nielsen K (2000) Horizontal transfer of antibiotic resistance genes from transgenic plants to bacteria – are there new data to fuel the debate? In: C. Fairbank C, Scoles G, McHughen A (ed) *The biosafety of genetically modified organisms: proceedings of Conference*. University of Saskatoon Press, Saskatoon, Canada, pp 146-154.
- Smartt J (1978a) Evolution and evolutionary problems in food legumes. *Economic Botany* 34:219-235.
- Smartt J (1978b) The evolution of pulse crops. *Economic Botany* 32:185-198.
- Smartt J (1979) Interspecific hybridization in the grain legumes: a review. *Economic Botany* 33:329-337.
- Smartt J (1981) Gene pools in *Phaseolus* and *Vigna* cultigens. *Euphytica* 30:445-449.
- Smartt J (1984) Gene pools in grain legumes. *Economic Botany* 38:24-35.
- Smith JL, Myung HU (1990) Rapid procedures for preparing soil and KCl extracts for ¹⁵N analysis. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 21:2273-2279.
- Soeria-Atmadja D, Lundell T, Gustafsson MG, Hammerling U (2006) Computational detection of allergenic proteins attains a new level of accuracy with *in silico* variable-length peptide extraction and machine learning. *Nucleic Acids Research* 34:3779-3793.
- Sparling GP, West AW (1988) A direct extraction method to estimate soil microbial C: Calibration in situ using microbial respiration and ¹⁴C labeled cells. *Soil Biology and Biochemistry* 20:337-343.
- Sseruwagi P, Maruthi MN, Colvin J, Rey MEC, Brown JK, Legg JP (2006) Colonization of non-cassava plant species by cassava whiteflies (*Bemisia tabaci*) in Uganda. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 119:145-153.
- Stegemann S, Hartmann S, Ruf S, Bock R (2003) High-frequency gene transfer from the chloroplast genome to the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:8828–8833.

- Sathasivan K, Haughn G, Murai N (1990) Nucleotide sequence of a mutant acetolactate synthase gene from an imidazolinone-resistant *Arabidopsis thaliana* var. Columbia. *Nucleic Acids Research* 18:2188.
- Stoetzer HAI (1984) Natural cross-pollination in bean in Ethiopia. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative* 27:99-100.
- Suarez R, Marquez J, Shishkoya S, Hernandez G (2003) Overexpression of alfalfa cytosolic glutamine synthetase in nodules and flowers of transgenic *Lotus japonicum* plants. *Physiologia Plantarum* 117:326-336.
- Suzuki JY, Tripathi S, Fermín GA, Jan F-J, Hou S, Saw JH, Ackerman CM, Yu Q, Schatz MC, Pitz KY, Yépes M, Fitch MMM, Manshardt RM, Slightom JL, Ferreira SA, Salzberg SL, Alam M, Ming R, Moore PH, Gonsalves D (2008) Characterization of insertion sites in rainbow papaya, the first commercialized transgenic fruit crop. *Tropical Plant Biology* 1:293–309.
- Szinay D, Chang CB, Khurstaleva L, Peters S, Schijlen E, Stiekema W, Van Ham RCHJ, De Jong H, Lankhorst RK (2008) High-resolution chromosome mapping of BACs using multi-colour FISH and pooled-BAC FISH as a backbone for sequencing tomato chromosome 6. *Plant Journal* 56:627–637.
- Tabatabai MA (1994) Soil enzymes. In: Weaver RM, Angle S, Bottomley P, Bezdicek D, Smith S, Tabatabai A, Wollum A (ed) *Methods of soil analysis*. Soil Science Society of America, Madison, pp 775-833.
- Tariq R, Hen LH, Krishnan A, Tang F, Li, KB (2005) WebAllergen: a web server for predicting allergenic proteins *Bioinformatics* 21:2570-2571.
- Taylor WH (1919) Bees and flower fertilization. *New Zealand Journal of Agriculture* 18:203.
- Thomas CV, Waines JC (1984) Fertile backcross and allotetraploid plants from crosses between tepary beans and common beans. *Journal of Heredity* 75:93-98.
- Timmermans MCP, Das OP, Messing J (1994) Geminiviruses and their uses extrachromosomal replications. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45:79-112.

- Trager JC (1991) A revision of the fire ants, *Solenopsis geminate* group (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae). *Journal of the New York Entomological Society* 99:141-198.
- Trasar-Cepeda C, Leiros C, Gilsotres F, Seoane S (1998) Towards a biochemical quality index for soils: an expression relating several biological and biochemical properties. *Biology and Fertility of Soils* 26:100–106.
- Tucker CL, Harding J (1975) Outcrossing in common bean *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 100:283-285.
- Tuteja JH, Clough SJ, Chan WC, Vodkin LO (2004) Tissue-specific gene silencing mediated by a naturally occurring chalcone synthase gene cluster in *Glycine max*. *Plant Cell* 16:819–835.
- Uebersax MA, Bedford CL (1980) Navy bean processing: effect of storage and soaking methods on quality of canned beans. *Agricultural Business* 410:1-11.
- Ui-Tei K, Naito Y, Nishi K, Juni A, Saigo K (2008) Thermodynamic stability and Watson–Crick base pairing in the seed duplex are major determinants of the efficiency of the siRNA-based off-target effect. *Nucleic Acids Research* 36:7100-7109.
- Ui-Tei K, Naito Y, Takahashi F, Haraguchi T, Ohki-Hamazaki H, Juni A, Ueda R, Saigo K (2004) Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. *Nucleic Acids Research* 32:936-948.
- Unkovich M, Herridge D, Peoples M, Cadisch G, Boddey RM, Giller K, Alves B, Chalk P (2008) Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems. ACIAR, Canberra.
- Van Den Eede G, Aarts H, Buhk HJ, Corthier G, Flint HJ, Hammes W, Jacobsen B, Midtvedt T, Van Der Vossen J, Von Wright A, Wackernagel W, Wilcks A (2004) The relevance of gene transfer to the safety of food and feed derived from genetically modified (GM) plants. *Food and Chemical Toxicology* 42:1127–1156.
- Vance ED, Brookes PC, Jenkinson DS (1987) An extraction method for measuring soil microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry* 19:703-707.

- Vasconcelos EAR, Nogueira FCS, Abreu EFM, Gonçalves EF, Souza PAS, Campos FAP (2005) Protein extraction from cowpea tissues for 2D electrophoresis and MS analysis. *Chromatographia* 62:447–450.
- Vavilov NI (1951) The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. *Chronica Botanica* 13:1-366.
- Vepsäläinen M, Kukkonen S, Vestberg M, Sirviö H, Niemi RM (2001) Application of soil enzyme activity test kit in a field experiment. *Soil Biology and Biochemistry* 33:1665–1672.
- Vert JP, Foveau N, Lajaunie C, Vandembrouck Y (2006) An accurate and interpretable model for siRNA efficacy prediction. *BMC Bioinformatics* 7:520.
- Vicente M, Kanthack RD, Noronha AB, Stradioto MFS (1988) Incidência do mosaico dourado em feijoeiros cultivados em duas épocas de plantio na região de Presidente Prudente. *Fitopatologia Brasileira* 13:373-376.
- Vieira C (1960) Sobre a hibridação natural em *Phaseolus vulgaris* L. *Revista Ceres* 11:103-107.
- Vieira C, Borém A, Ramalho MAP (1999) Melhoramento do feijão. In: Borém A (ed). *Melhoramento de espécies cultivadas*. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, pp 273-349.
- Vieira EHN, Rava C (2000) Características botânicas e fisiológicas da semente. In: Vieira EHN, Rava CA (ed) *Sementes de feijão: produção e tecnologia*. Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, pp 25-38.
- Vierheilig H, Alt M, Lange J, Gut-Rella M, Wiemken A, Boller T (1995) Colonization of transgenic tobacco constitutively expressing pathogenesis-related proteins by the vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Applied and Environmental Microbiology* 61:3031-3034.
- Vierheilig H, Alt M, Neuhaus J-M, Boller T, Wiemken A (1993) Colonization of transgenic *Nicotiana sylvestris* plants, expressing different forms of *Nicotiana tabacum* chitinase, by the root pathogen *Rhizoctonia solani* and by the mycorrhizal symbiont *Glomus mosseae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 6:261-264.

- Villas Bôas G, França FH, Macedo N (2002) Potencial biótico da mosca-branca *Bemisia argentifolii* a diferentes plantas hospedeiras. *Horticultura Brasileira* 20:71-79.
- Wallwork JA (1959) The distribution and dynamics of some forest soil mites. *Ecology* 40:557-563.
- Wallwork JA (1983) Oribatids in forest ecosystems. *Annual Review of Entomology* 28:109-130.
- Wallwork JA (1985) Distribution and diversity patterns of soil mites and other microarthropods in a Chihuahuan desert site. *Journal of Arid Environments* 9:215-231.
- Wander AE (2005) Perspectivas de mercado interno e externo para o feijão. In: VIII Congresso Nacional de Pesquisa de Feijão. Anais. Embrapa Arroz e Feijão, Goiânia, pp 892-895.
- Wander AE (2007) Produção e consumo de feijão no Brasil, 1975-2005. *Informações Econômicas* 37:7-21.
- Wander AE, Faria LC, Melo LC, Del Peloso MJ, Ferreira CM, Lacerda ACV, Freitas FCD (2005) Sistemas de cultivo e custos de produção de feijão no Brasil nas safras 2003/2004 e 2004/2005. Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás.
- Webster BD, Tucker CL, Lynch SP (1977) A morphological study of the development of reproductive structures of *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 102:640-643.
- White JA, Hart RJ, Fry JC (1986) An evaluation of the waters pico-tag system for the amino acid analysis of food materials. *Journal of Automatic Chemistry* 8:170-177.
- Williams PC (1973) The use of titanium dioxide as a catalyst for large scale Kjeldahl determination of the total nitrogen content of cereal grains. *Journal of the Science Food and Agriculture* 24:343-348.
- Wilson EO (1952) O complexo *Solenopsis saevissima* na América do Sul (Hymenoptera: Formicidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 50:49-59.
- Winham D, Webb D, Barr A (2008) Beans and good health. *Nutrition Today* 43:201-209.

- Wolfenbarger LL, Phifer PR (2000) The ecological risks and benefits of genetically engineered plants. *Science* 290:2088-2209.
- Wood DR, Keenan JG (1982) Registration of Olathe pinto bean. *Crop Science* 22:1259-1260.
- Yuan B, Latek R, Hossbach M, Tuschl T, Lewitter F (2004) siRNA Selection Server: an automated siRNA oligonucleotide prediction server. *Nucleic Acids Research* 32:W130-W134.
- Zhang ZH, Koh JL, Zhang GL, Choo KH, Tammi MT, Tong JC (2007) AllerTool: a web server for predicting allergenicity and allergic cross-reactivity in proteins. *Bioinformatics* 23:504-506.
- Zimmermann MJO, Teixeira MG (1996) Origem e evolução. In: Araujo RS, Rava CA, Stone LF, Zimmermann MJO (coord) *Cultura do feijoeiro comum no Brasil*. Potafos, Piracicaba, pp 57-70.