

ISSN 1678-9644

Novembro, 2013

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Arroz e Feijão
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 291

Embrapa 5.1 - O Feijoeiro Geneticamente Modificado Resistente ao Mosaico Dourado

*Josias Corrêa de Faria
Francisco José Lima Aragão*

Embrapa Arroz e Feijão
Santo Antônio de Goiás, GO
2013

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Arroz e Feijão

Rod. GO 462, Km 12
Caixa Postal 179
75375-000 Santo Antônio de Goiás, GO
Fone: (0xx62) 3533 2110
Fax: (0xx62) 3533 2123
www.cnpaf.embrapa.br
cnpaf.sac@embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Roselene de Queiroz Chaves*
Secretário-Executivo: *Luiz Roberto Rocha da Silva*
Membros: *Ana Lúcia Delalibera de Faria*
Flávia Aparecida de Alcântara
Heloísa Célis Breseghello
Fábio Fernandes Nolêto
Luís Fernando Stone
Márcia Gonzaga de Castro Oliveira
Camilla Souza de Oliveira

Supervisor editorial: *Camilla Souza de Oliveira*
Revisão de texto: *Camilla Souza de Oliveira*
Normalização bibliográfica: *Ana Lúcia D. de Faria*
Tratamento de ilustrações: *Fabiano Severino*
Editoração eletrônica: *Fabiano Severino*

1ª edição

Versão online (2013)

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Arroz e Feijão

Faria, Josias Corrêa de.

Embrapa 5.1 : o feijoeiro geneticamente modificado resistente ao mosaico dourado / Josias Corrêa de Faria, Francisco José Lima Aragão. – Santo Antônio de Goiás : Embrapa Arroz e Feijão, 2013.

48 p. - (Documentos / Embrapa Arroz e Feijão, ISSN 1678-9644 ; 291)

1. Feijão – Planta transgênica. 2. Feijão – Engenharia genética. 3. Organismo transgênico. I. Aragão, Francisco José Lima. II. Título. III. Embrapa Arroz e Feijão. IV. Série.

CDD 635.65233 (21. ed.)

© Embrapa 2013

Autores

Josias Corrêa de Faria

Engenheiro agrônomo, Ph.D. em Fitopatologia/
Biotecnologia, pesquisador da Embrapa Arroz e
Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO,
josias.faria@embrapa.br

Francisco José Lima Aragão

Engenheiro agrônomo, Doutor em Biologia
Molecular, pesquisador da Embrapa Recursos
Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF,
francisco.aragao@embrapa.br

Apresentação

O mosaico dourado do feijoeiro foi primeiramente observado em 1961 e passou a ser considerada doença séria na década seguinte, sobretudo em função da forte expansão da lavoura de soja, além de ser associada ao vetor da virose, a mosca branca. O mosaico dourado é uma doença causada por um geminivirus denominado pelo nome em inglês de *Bean golden mosaic virus* (BGMV) e provoca intenso amarelecimento das folhas, nanismo das plantas, deformação das vagens e grãos, além do abortamento das flores do feijoeiro. As perdas de produção de grãos podem variar de 40 a 100%, dependendo da incidência, da época de plantio e da cultivar utilizada.

A resistência genética às doenças é o mecanismo ideal de controle por ser de fácil adoção, custo baixo ao produtor, e por não apresentar impactos negativos ao meio ambiente e ao ser humano. Entretanto, no caso desta virose, não foi encontrada imunidade ou alto nível de resistência nos germoplasmas avaliados, tornando-a alvo de possível uso da tecnologia do DNA recombinante. Em decorrência, com a disponibilidade do genoma sequenciado de vários geminivirus, de diferentes culturas, e o avanço dos estudos moleculares deste grupo de vírus caracterizando a função das várias proteínas, foi possível investigar o uso da engenharia genética no controle desta virose. Outro ponto favorável foi o aprimoramento científico do corpo técnico da Embrapa bem como da infraestrutura necessária.

Neste contexto, o presente documento apresenta de modo sintético os passos que foram necessários no desenvolvimento do feijoeiro transgênico Embrapa 5.1, um grão importante na alimentação do povo brasileiro para o qual as grandes companhias não dão a devida atenção. O documento descreve, com clareza, o desenvolvimento da construção genética utilizada, a avaliação inicial da resistência ao mosaico dourado, a condução das etapas de biossegurança e a transferência da resistência para feijoeiros do grupo carioca. A leitura é fácil, com um conjunto de informações entre as quais muitas que ainda não foram disponibilizadas no formato de artigo científico.

Os autores

Sumário

Introdução	9
Caracterização do Agente Causal	10
Transgênicos	13
O Feijoeiro Embrapa 5.1	14
Construção Gênica Utilizada	15
Metodologia de Transformação	17
Métodos utilizados para a modificação genética	17
Plantas Transgênicas Obtidas	18
Análise da Resistência ao BGMV	18
Experimento de Campo	21
Biossegurança	22
Principais considerações	22
Informações relativas ao OGM	23
Caracterização Agronômica	25
Avaliação de Risco à Saúde Humana e Animal	33
Segurança alimentar	33
Alimentação Animal	35
Segurança Ambiental	37
Perspectivas	40
Referências	40

Embrapa 5.1 - O Feijoeiro Geneticamente Modificado Resistente ao Mosaico Dourado

Josias Corrêa de Faria
Francisco José Lima Aragão

Introdução

O mosaico dourado do feijoeiro é causado pelo *Bean golden mosaic virus* (BGMV), nomenclatura oficial para o vírus do mosaico dourado do feijoeiro (VMDF). A descrição original da doença data de 1961, por Costa (1965) que a descreveu em Campinas, SP, e dada a sua baixa incidência a julgou de pouca importância. Entretanto, nos anos seguintes o próprio autor notou a sua rápida disseminação simultaneamente ao incremento do cultivo da soja, hospedeira do seu agente vetor (*Bemisia tabaci* Gen.) e também do vírus agente causal (COSTA, 1975; FERNANDES et al., 2009). Nas décadas seguintes muito esforço foi despendido no sentido de encontrar as medidas de controle que pudessem conter os danos causados pelo mosaico dourado. Costa et al. (1975) apresentaram no congresso brasileiro de fitopatologia em Mossoró, RN, seus esforços no sentido de encontrar variedades de feijoeiro com resistência ao mosaico dourado, sem sucesso. Em 1977 foi publicada uma nota científica na qual eram apresentadas linhagens resistentes ao mosaico dourado do feijoeiro (POMPEU; KRANZ, 1977), linhagens estas que não se tornaram úteis no decorrer dos anos. Ao mesmo tempo, Bird et al. (1973) publicavam sobre o mosaico dourado amarelo do feijoeiro (*Bean golden yellow mosaic virus* – BGYMV) transmitido por mosca branca em Porto Rico. Galvez e Castaño (1976) descreveram a purificação do

vírus do mosaico dourado amarelo do feijoeiro, e finalmente Goodman (1977), trabalhando com isolado de Porto Rico, publicou a sequência do BGYMV. Na Embrapa Arroz e Feijão os trabalhos conduzidos até os meados da década de 1980 foram sempre orientados na avaliação de germoplasma buscando resistência à doença. Algumas fontes de tolerância foram identificadas e foi conduzido um estudo da herança desta tolerância (PESSONI et al., 1997). Devido à complexidade desta herança, o desenvolvimento de uma linhagem que pudesse controlar eficientemente o mosaico dourado não foi ainda conseguido. Bianchini (1999) sumariza o trabalho de melhoramento genético para resistência ao mosaico dourado conduzido até então no Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) nos quais desenvolveu linhagens com tipo de grão carioca em que afirma ter conseguido excelente nível de resistência. Deve-se notar que esta resistência não se confirmou em nossos experimentos sob inoculação controlada com o isolado de BGMV da Embrapa Arroz e Feijão. As avaliações de perdas incitadas pelo mosaico dourado podem ser realizadas em condições de casa de vegetação ou de campo. Costa e Cupertino (1976) foram os primeiros a avaliar detalhadamente as perdas, utilizado um estudo de casa de vegetação.

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 (São Paulo e Norte do Paraná) (WANDER, 2007).

Caracterização do Agente Causal

O BGMV pertence à família *Geminiviridae*, gênero *Begomovirus*, caracterizados pela sua morfologia de partículas dímeras, transmissibilidade pela mosca branca (*Bemisia tabaci* Gen.) de modo circulativo (não replicativo), persistente (HOHN, 2007). O genoma possui dois componentes denominados de A e B, os quais possuem aproximadamente 200 nucleotídeos em comum (região comum), na região intergênica, onde se localizam os elementos necessários para

iniciar o mecanismo de replicação em círculo rolante, característico deste grupo de vírus. Ambos componentes são necessários para a infecção das plantas, embora o componente A, por si só, possa infectar protoplastos, inclusive de plantas não hospedeiras. O BGMV foi clonado e completamente sequenciado (GILBERTSON et al., 1991, 1993), sendo que as sequências estão depositadas no GenBank com os números M88686 e M88687, respectivamente para os componentes A e B. Os agentes causais de outros vírus causando mosaico dourado amarelo em feijoeiro na América Central, Caribe e América do Norte são distintos do BGMV tanto em propriedades biológicas como na sequência do DNA.

A região comum possui alta identidade entre os componentes A e B (DNA-A e DNA-B) de um mesmo vírus (normalmente >91%), mas é diferente entre vírus distintos com exceção de um elemento de 30 nucleotídeos (nt), conservado entre os geminivirus que infectam um mesmo tipo de hospedeiro (dicotiledôneas ou monocotiledôneas) (TIMMERMANS et al., 1994). A estrutura em grampo encontrada na região comum possui uma sequência nonanucleotídica característica dos geminivirus (TAATATT↓AC) que constitui o sítio da origem (local da seta) de replicação do DNA viral, as sequências de ligação reconhecidas pela proteína REP, e sequências da regulação de transcrição bidirecional (OROZCO; HANLEY-BOWDOIN, 1996). A região intergênica contém sequências 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 ou 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 Figura 1 ilustra a descrição acima.

A capa protéica encapsida o ssDNA viral resultando nas partículas geminadas características e é a única proteína estrutural dos geminivírus, sendo inclusive capaz de multimerizar. Cada partícula geminada encapsida apenas um dos componentes virais. Sabe-se que a proteína 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 ela 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 à 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 o vírus (razão de sua escolha para a utilização em resistência derivada do patógeno – PDR).

A caracterização completa ao nível molecular, do vírus do mosaico dourado do feijoeiro ou *Bean golden mosaic virus* (BGMV) do Brasil, República Dominicana (*Bean golden yellow mosaic virus*– BGYMV-DR) e Guatemala (BGYMV-GT) foi realizada no final da década de 1980, e os trabalhos foram publicados no início da década seguinte (GILBERTSON et al., 1993; FARIA et al., 1994). Estes trabalhos permitiram concluir que o mosaico dourado presente nestas partes da América são distintos e, portanto, não é surpresa de que os germoplasmas de feijão analisados tenham apresentado reações distintas aos dois vírus. Não há imunidade e nem mesmo alto nível de resistência ao mosaico dourado do feijoeiro do Brasil nos germoplasmas tidos como resistentes na América Central e Caribe quando avaliados sob inoculação precoce, a qual causa fortes danos, semelhantes aos danos que acontecem nos campos de produtores.

Transgênicos

A descoberta de que uma estirpe de *Tobacco mosaic virus* (TMV) causando sintomas de “green mosaic” poderia tornar o seu hospedeiro resistente a outra estirpe de TMV causadora de sintomas de “yellow mosaic”, fenômeno conhecido como resistência cruzada, em trabalho publicado em 1929 (MCKINNEY, 1929), veio pavimentar a base para o desenvolvimento do conceito de resistência derivada do patógeno (PDR, em inglês) na década de 1980. De fato, os primeiros trabalhos, desenvolvidos pelo grupo de Roger Beachy com TMV foram baseados na estratégia de expressar um gene do vírus na planta, no caso fumo (POWELL-ABEL et al., 1986); uma análise de que isto estava próximo a acontecer havia sido publicada pouco antes por Sequeira (1984). Até então, acreditava-se que a expressão do gene correspondente à capa proteica do vírus era o responsável pela resistência observada.

Com o sucesso dos primeiros experimentos de engenharia genética (ZAMBRYSKI et al., 1983), associado ao fato de que em 1989 estavam prontos os clones completos e infectivos do BGMV pode-se afirmar que a base estava pronta para entrar na era da aplicação dos conhecimentos desenvolvidos pela ciência na solução dos problemas que afligiam a agricultura brasileira, especialmente para o caso em questão, em que não conhecemos imunidade à doença ou mesmo alta resistência. Sobretudo, a cultura do feijão não exerce atratividade para as empresas multinacionais por não se tratar de uma *commodity*. Assim foi que em 1991, percebendo a oportunidade estratégica, a Embrapa Arroz e Feijão liderou um projeto financiado pelo Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT/CNPq), especificamente visando desenvolver a transformação do feijoeiro utilizando metodologia da biobalística e sequências de BGMV, objetivando resistência ao mesmo vírus. A escolha de biobalística em detrimento do uso de *Agrobacterium tumefaciens* se deveu ao fato de que o feijoeiro não apresenta totipotência (que permite a regeneração “de novo”), sob as condições conhecidas, fato que prevalece até o presente (para revisão sobre este tema ver Veltcheva et al. (2005).

A expressão da capa proteica de geminivirus, então já avaliada no grupo do Prof. Maxwell, da Universidade de Wisconsin – Madison não conduziu a resultados promissores, e de fato, a idéia que passou a prevalecer foi a de que para vírus contendo DNA como material genético, a capa proteica viral não era essencial para infectividade, e, portanto, não era capaz de atuar efetivamente em PDR (RUSSELL et al., 1993).

Outra estratégia avaliada na mesma época era a de que sequências em antisenso gerariam transcritos na planta capazes de conter a replicação do vírus, talvez também por silenciamento gênico pós transcricional (DAY et al., 1991). Entretanto, reduções no tempo de aparecimento dos sintomas ou sintomas menos severos da doença não pareceu ser a solução, haja vista o número de trabalhos publicados (ARAGÃO et al., 1996, 2001; YANG et al., 2004; BEJARANO; LICHTENSTEIN, 1994; LUCIOLI et al., 2008), sem que se alcançasse um consenso sobre a melhor estratégia. Entretanto, para a tecnologia envolvendo transgenia, acredita-se que uma solução que fosse a convivência com a doença, ou seja, onde ainda há plantas com os sintomas da doença, no caso de viroses, poderia conduzir à descrença dos usuários na tecnologia e não ser conveniente.

O Feijoeiro Embrapa 5.1

As tentativas de gerar plantas transgênicas resistentes a geminivirose por métodos utilizando o antisenso de vários genes virais em conjunto ou isoladamente (DAY et al., 1991; BEJARANO; LICHTENSTEIN, 1994; BENDAHMANE; GRONENBORN, 1997; ZHANG et al., 2005) ou a tentativa de usar transdominante letal, com uma mutação no amino ácido 262, a partir do gene *rep* (FARIA et al., 2006), não conduziram à geração de plantas com completa resistência ao BGMV ou a expressão de genes truncados ou com várias modificações no caso de outros begomovirus (BRUNETTI et al., 2001; ANTIGNUS et al., 2004; BEJARANO; LICHTENSTEIN, 1994; YANG et al., 2004; LUCIOLI et al., 2008).

A descoberta de pequenos RNA interferentes (small interfering RNA ou siRNA) causando silenciamento gênico postranscricional como mecanismo de defesa contra sequência-específica dirigida a mRNAs virais ou celulares por Hamilton e Baulcombe (1999) abriu as portas a novas possibilidades no controle de doenças. Os autores descobriram que para o silenciamento ocorrer era necessário a presença dos siRNAs, e que para formar esses siRNAs era necessário ter as sequências correspondentes em senso e antisenso. Herr et al. (2005) definiu interferência de RNA como mecanismo de silenciamento gênico postranscricional que intermedia a resistência a ácidos nucleicos tanto endógenos como exógenos e ainda na regulação de genes. O conceito foi expandido de tal modo que estes siRNAs pudessem passar a ser induzidos no hospedeiro em resposta a certas construções especificamente desenhadas para este fim. Assim, Wesley et al. (2001) e Waterhouse et al. (2001) demonstraram o potencial deste tipo de construção codificando auto complementariedade na forma de grampo de RNA (hpRNA) no silenciamento efetivo de genes de plantas. Foi ainda descoberto que vírus contendo DNA, entre os quais os geminivirus, são capazes de induzir o silenciamento gênico (BIAN et al. 2006; AUER; FREDERICK, 2009).

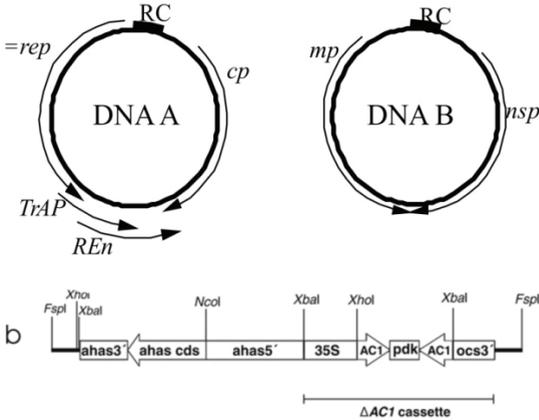
A escolha, no caso de BGMV, foi procurar silenciar o mRNA do gene *rep*, por estar envolvido em funções necessárias e suficientes para a replicação viral. Ao inativar este gene o vírus não poderia se replicar e com isto a planta se tornaria resistente.

Construção Gênica Utilizada

A proteína REP é a única proteína absolutamente necessária e suficiente para a replicação do genoma viral (FONTES et al., 1994). Sabe-se que ela é produzida mais extensivamente no início da infecção e tem mecanismo de autoregulação eficiente. A interferência na replicação precoce do vírus interrompendo a função da proteína REP, portanto, parece ser a melhor estratégia de obtenção de resistência aos begomovirus. Para escolher o fragmento a ser utilizado foram realizados estudos computacionais comparando o alinhamento das sequências do gene *rep* de geminivirus do novo mundo, especialmente aqueles de feijoeiro. Além deste critério de similaridade entre os diversos geminivirus, a escolha final do fragmento

baseou-se em análise *in silico* usando o programa Mfold do pacote GCG (ZUCKER, 2003). O fragmento contendo a sequência parcial do gene *rep* localizado entre as posições 1836 e 2247 acesso ao GenBank No. M88686 foi amplificado por PCR usando Taq DNA polymerase Platinum para evitar introdução de mutações indesejadas.

A



B

Figura 1. A. Organização genômica do *Bean golden mosaic virus*.

As setas representam as fases abertas de leitura (do inglês ORF). *rep* – proteína associada à replicação (REP); *cp* – capa protéica, *trap*- proteína ativadora da transcrição (TrAP), *ren*- proteína amplificadora da replicação (REn), CR- região comum, *nsp* – proteína de movimento nuclear (nuclear shuttle protein-NSP), e *mp* – proteína de movimento (movement protein – MP) nos componentes A e B de BGMV; B. Mapa do segmento do plasmídeo denominado depBGMVRNAiAHAS mostrando a parte contendo o gene *ahas* (*ahas cds*: *ahas*’, o promotor do gene *ahas*, região codante do gene *ahas*, região terminadora do gene *ahas* de *Arabidopsis thaliana*; segue o promotor 35S do Cauliflower mosaic virus; intron de *Flaveria trinervia* *pdk* intron; terminador *ocs*-octopine synthase. AC1 fragmento de interferência clonado nas orientações senso e antisense. Na parte superior do cassete encontram-se indicados sítios de enzimas de restrição, encontrados uma única vez, importantes na caracterização da construção gênica.

Metodologia de Transformação

Métodos utilizados para a modificação genética

Para a transformação genética foi utilizado o método descrito por Aragão et al. (1993, 1998) que consiste no bombardeamento do tecido meristemático apical dos eixos embrionários do feijoeiro, retirados de uma semente madura. O tecido meristemático é bombardeado com uma carga de micropartículas contendo o DNA de interesse. A partir destas células que recebem o transgene, obtêm-se as plantas geneticamente modificadas. Para que isto ocorra, a indução de morfogênese é feita a partir do cultivo dos embriões maduros em meio de cultivo contendo o hormônio de crescimento (citocinina) benzilaminopurina – BAP em concentração previamente definida (RECH; ARAGÃO, 1998).

O referido método, denominado de biobalística faz uso de microprojéteis, podendo ser ouro ou tungstênio, que são acelerados a altas velocidades os quais carregam e introduzem o DNA de interesse em células e tecidos *in vivo* (RECH; ARAGÃO, 1998). Os nomes alternativos a esta tecnologia vem sendo “método de bombardeamento de microprojéteis”, “método do gene *gun*”, “método de aceleração de partículas”, para citar alguns. Na literatura há referências a diferentes sistemas capazes de acelerar micropartículas para utilização em materiais biológicos vivos. As velocidades podem atingir valores superiores a 1500 km.h⁻¹. Em comum, os sistemas sempre se baseiam em onda de choque com energia capaz de fazer deslocar uma membrana de *kapton*, denominada de membrana carreadora, onde se deposita as partículas que foram recobertas com o DNA de interesse (RECH; ARAGÃO, 1998). O método utilizando o gás hélio em alta pressão, por ser este inerte, e o método que usa uma descarga elétrica de 20KW através de uma gota de água foram os que apresentaram maior espectro de utilização, maior eficiência, e conseqüentemente resultaram em melhores frequências de transformação. Muitas plantas, de várias espécies, foram geradas pelo método de bombardeamento, utilizando gás hélio desenvolvido na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (ARAGÃO et al., 1993). Ficou demonstrado, claramente, que as partículas são capazes de penetrar a parede e membrana

celular de feijoeiro Jalo Precoce, de modo não letal, levando à obtenção de plantas transgênicas. Deve ser notado que a maioria das plantas geneticamente modificadas desenvolvidas e que atingiram a comercialização foram geradas a partir do uso da biobalística.

Plantas Transgênicas Obtidas

Foram geradas 22 plantas transformadas, das quais duas apresentaram resistência ao BGMV. Entre as duas foi selecionado o evento Embrapa 5.1, o qual foi utilizado nas caracterizações iniciais por ter sido gerado ainda no início do projeto, enquanto o evento denominado ahas 3.2, igualmente resistente ao mosaico, dourado foi identificado mais tardiamente, quando vários estudos envolvendo o evento Embrapa 5.1 já estavam avançados.

Análise da Resistência ao BGMV

Cada planta transgênica gerada, identificada inicialmente através de análise por PCR, foi inoculada com BGMV utilizando uma colônia de moscas brancas virulíferas mantidas em fava (*Phaseolus lunatus*) e soja (*Glycine max*) (BONFIM et al., 2007). Da planta inicial (geração T_0), resistente ao BGMV, foram colhidas 15 sementes, que constituiu a geração T_1 . A Figura 2 ilustra o resultado da avaliação das gerações T_1 , T_2 e T_3 em comparação ao feijão Olathe Pinto que é a linhagem parental, não transgênica. Foram identificadas três plantas transgênicas na geração T_1 as quais foram resistentes ao mosaico dourado. Como houve três plantas sem sintomas de dez inoculadas na testemunha, o resultado não pareceu muito convincente, já que entre as 12 plantas não transgênicas em T_1 também houve cinco escapes à inoculação. As três plantas transgênicas foram colhidas separadamente e 20 sementes de cada uma das progênies, agora T_2 , foram inoculadas. Para a inoculação foi aumentado o período de exposição às moscas brancas virulíferas para seis dias, e a população de no mínimo 300 moscas brancas por planta. Foram colocadas também 20 plantas de Olathe Pinto como testemunhas. Na Figura 2, painel T_2 nota-se o resultado. As 20 plantas testemunhas apresentaram sintomas de mosaico, indicando que a inoculação teve sucesso incontestável. Nota-se que três plantas (aproximadamente 5%) do total de 42 transgênicas foram infectadas.

Embora o número de plantas não fosse totalmente adequado, notou-se que o transgene segregou na proporção de 3:1 indicando herança mendeliana de um único gene. No painel T_3 , 32 plantas transgênicas e 20 não transgênicas de Olathe Pinto foram avaliadas, semelhante à geração T_2 . Apenas uma planta T_3 apresentou sintomas de mosaico dourado (MD), enquanto todas as testemunhas apresentaram MD.

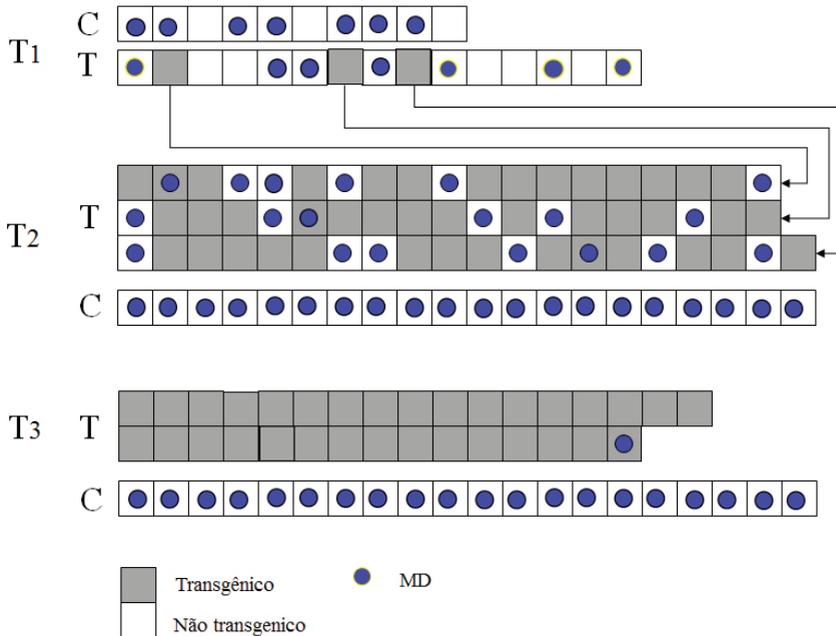


Figura 2. Esquema representativo das primeiras gerações do evento Embrapa 5.1. Plantas transgênicas (caixas cinzas) e não transgênicas (caixas brancas) da primeira geração (T_1), segunda geração (T_2 , descendentes das três plantas T_1 transgênicas) e geração T_3 (linhagem homocigota descendente de T_2 identificada como homocigota). Plantas exibindo sintomas de mosaico dourado foram identificadas com um círculo azul. C identifica plantas testemunhas da cultivar Olathe Pinto não transgênicas inoculadas.

Fonte: adaptada de Bonfim et al. (2007).

Para entender o fato de que um número reduzido (porém variável) de plantas transgênicas estava consistentemente apresentando sintomas de MD, foram feitos cruzamentos entre plantas homocigotas para o transgene e outras variedades de feijão, incluindo os tipos andinos e mesoamericanos. 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 F_1 quanto à herança e estabilidade do transgene e da resistência a BGMV e ainda para verificar se havia desvio em relação à dominância da herança do transgene (resistência ao MD), conforme observado para as gerações iniciais do Embrapa 5.1. Para cada cruzamento foi obtido um 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 F_1 . A presença do transgene foi detectada por PCR e todas as plantas foram submetidas à inoculação durante sete dias com uma população de mais que 300 moscas brancas virulíferas por planta. Os resultados deste experimento encontram-se na Tabela 1. A proporção de plantas transgênicas com sintomas variou de 10 a 36% em F_1 , enquanto que a linhagem Embrapa 5.1, homocigota, não apresentou nenhuma planta infectada.

Tabela 1. Segregação do transgene e da resistência ao mosaico dourado na geração F_1 .

<i>Cruzamento^a</i>	<i>GM</i>	<i>Resistentes</i>	<i>Suscetíveis</i>	<i>% Suscetíveis</i>
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).

Os resultados apresentados na Tabela 1 confirmaram e expandiram o conceito de que, no caso de plantas heterocigotas, o padrão observado de resistência ao mosaico dourado é coerente com o "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 (VANDERSCHUREN et al., 2009) o efeito de dosagem do silenciamento gênico mediado por RNAi. Outra conclusão interessante foi que a resistência se expressou igualmente em genótipos de diferentes origens geográficas (andino e mesoamericano).

As gerações segregantes dos cruzamentos com Pérola e BRS Pontal foram conduzidas até o quarto retrocruzamento. A partir da geração F_2 as populações transgênicas foram conduzidas pelo método de descendência de única semente até a geração F_8/F_9 , quando se obteve linhagens morfológicamente semelhantes aos parentais, e homocigotas para os transgenes.

Experimento de Campo

O evento Embrapa 5.1 provou-se resistente ao mosaico dourado em casa de vegetação e também a campo (BONFIM et al., 2007; ARAGÃO; FARIA, 2009). Foram conduzidos dois ensaios, sendo um em época de ocorrência de baixa incidência de mosaico dourado e outro em época de alta incidência da virose. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com cinco repetições e os seguintes tratamentos: Embrapa 5.1, Olathe Pinto; Linhagem Perola M1/4; Pérola, e BRS Pontal. As parcelas foram constituídas de 5 metros de comprimento com 5 linhas espaçadas de 0,5 m. Foram realizadas leituras da incidência de mosaico dourado a intervalos próximos a fim de detectar as variações na ocorrência do mosaico dentro do experimento.

Os resultados obtidos nas duas épocas indicaram claramente que o feijoeiro Embrapa 5.1 se comportou como resistente independentemente de outros fatores. Algumas parcelas testemunhas chegaram a 100% de incidência de mosaico na segunda época de plantio. A linhagem Embrapa 5.1 não apresentou nenhuma planta com mosaico (Figura 3).

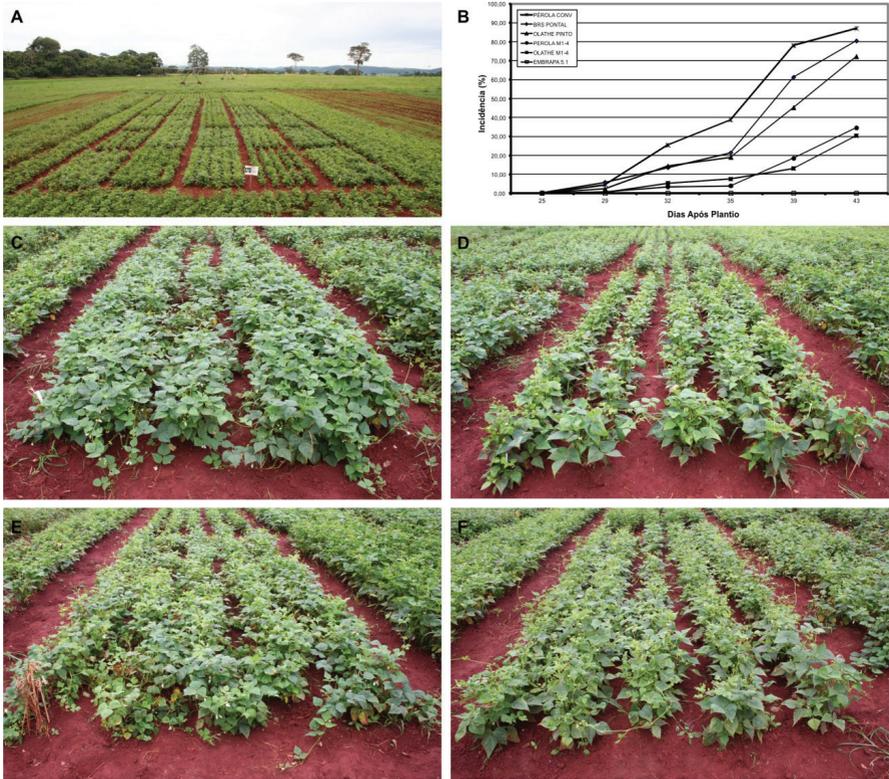


Figura 3. Avaliação a campo do feijoeiro Embrapa 5.1 em 2007/2008.

A. Vista parcial de experimento com linhagem resistente e cultivares comerciais suscetíveis ao mosaico dourado; **B.** Progresso de mosaico dourado nos genótipos avaliados, indicando incidência média em até 87% das plantas; **C.** Embrapa 5.1, livre de mosaico dourado; **D.** Olathe Pinto; **E.** Pérola; **F.** BRS Pontal. As cultivares convencionais apresentam sintomas severos de mosaico dourado.

Inoculações com alta população de moscas brancas virulíferas em casa de vegetação conduziu a resultados similares. As linhagens derivadas, após quatro retrocruzamentos, tendo como base as cultivares Pérola e BRS Pontal, em homozigose, apresentaram resistência completa em avaliações realizadas a campo na sede da Embrapa Arroz e Feijão.

Biossegurança

Principais considerações

A pesquisa com plantas geneticamente modificadas na Embrapa foi sempre pautada pela aderência estrita às leis do País. A normas

emanadas da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) foram seguidas em sua integridade, respeitando a Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) através da qual foi estabelecida a comunicação com a CTNBio obtendo-se todas as autorizações necessárias.

De acordo com a Resolução Normativa Nº 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.

De acordo com a Resolução Normativa Nº 5 da CTNBio, foram planejados os ensaios para a obtenção dos dados necessários à liberação comercial do feijão Embrapa 5.1 cobrindo as áreas de Informações Relativas ao OGM, Avaliação de Risco à Saúde Humana e Animal e Avaliação de Risco Ambiental.

O feijoeiro Embrapa 5.1 foi cultivado em três áreas escolhidas por serem representativas em termos edafoclimáticos e por se localizarem dentro das principais áreas de cultivo do feijoeiro no Brasil (Santo Antônio de Goiás, Goiás, Londrina, Paraná e Sete Lagoas, Minas Gerais) e possuem Certificado de Qualidade de Biossegurança, nos anos agrícolas de 2008 e 2009. Os experimentos foram conduzidos nesses campos em um sistema de produção convencional, aplicando-se todas as operações/tratamentos igualmente nos dois tipos de feijão – transgênico e convencional - inclusive bordaduras.

Informações relativas ao OGM

As análises envolvendo a caracterização molecular e genética indicaram claramente 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 retrocruzamentos com variedades comerciais de feijoeiro. A Figura 4 mostra a detecção da parte do cassete correspondente ao fragmento do gene *rep* do cassete de transformação, indicando a presença nuclear do transgene na geração T_2 . As análises de herança do transgene na geração T_2 indicaram herança simples e mendeliana do transgene, e que o mesmo se localiza em um único locus. O sequenciamento completo

do transgene foi realizado. Não foram encontradas sequências funcionais do gene de resistência a ampicilina de *E. coli* que codifica para uma beta-lactamase. Isso já era esperado uma vez que o vetor pBGMVRNAiAHAS, utilizado na transformação do feijoeiro, foi digerido com a enzima de restrição *FspI*, cujo sítio encontra-se dentro da sequência do gene *bla*. Há duas cópias completas do transgene $\Delta AC1hpRNA$ no genoma do feijoeiro (ARAGÃO et al., 2013). Pode ser notado que o cassete $\Delta AC1hpRNA$ foi devidamente expresso, uma vez que os pequenos RNA interferentes siRNAs puderam ser detectados em folhas de feijão coletadas de plantas dos experimentos realizados em Londrina, PR, Santo Antônio de Goiás, GO e Sete Lagoas, MG, locais estes com diferenças edafoclimáticas bastante acentuadas (ARAGÃO et al., 2013). Deduziu-se que houve a formação do grampo de RNA a partir da expressão do cassete $\Delta AC1hpRNA$, o qual não deve ser traduzido, mas ao contrário, deve ser processado pelas células para a formação dos siRNA correspondentes. Análise de folhas, e sementes em variados estágios de desenvolvimentos revelaram a presença dos siRNAs em folhas, mas apenas em quantidades traços nas sementes, sem contudo serem encontrados em grãos cozidos que é o formato em que o feijão é consumido (ARAGÃO et al., 2013).

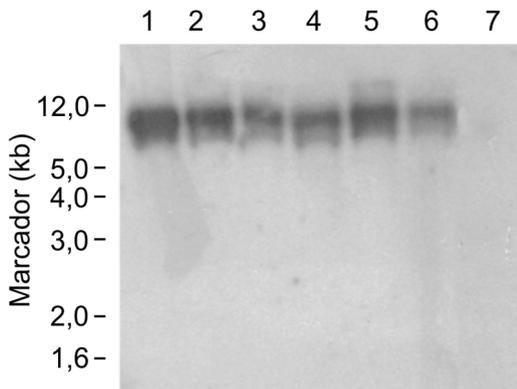


Figura 4. Análise de Southern do DNA genômico de feijoeiro Embrapa 5.1 para detectar o fragmento AC1 do cassete inserido nas plantas da geração T_2 . Poços de 1 a 6 plantas transgênicas; Poço 7 – planta não transgênica. Sonda utilizada fragmento de AC presente no cassete. Fonte: Bonfim et al. (2007).

Análises computacionais e das plantas não mostraram nenhuma evidência de efeitos não esperados, tais como a indicação de silenciamento não intencional de genes de leguminosas (cujo genoma está disponível, bem como o genoma humano e de animais) ou mesmo a possibilidade de alterações significativas de rotas metabólicas das plantas de feijoeiro, o que pode ser evidenciado pelas análises de caracterização agrônômica e de composição nutricional (processo apresentado à CTNBio, disponível em <http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/12786.html>). Os experimentos com os animais alimentados com os grãos processados de feijoeiro, bem como siRNA isolados de plantas GM não geraram alterações bioquímicas ou morfológicas dos diversos órgãos amostrados em relação ao grupo controle.

Caracterização Agrônômica

Não houve alterações fenotípicas e de produtividade do feijoeiro Embrapa 5.1 em comparação com o seu parental Olathe Pinto, nos dois anos de cultivo em três locais do Brasil com grandes variações edafoclimáticas.

Os dados completos dos experimentos de dois anos estão apresentados nas Tabelas 2 e 3. Para a produção (massa) de grãos o coeficiente de variação (CV) para o conjunto de dados foi de 15,8%, e a média da produção, para os três locais (Tabela 2) foi de 1.820,0 kg/ha. Não houve diferença significativa entre os dois acessos (evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe Pinto), ao nível de 5% de probabilidade. Houve diferença entre locais ($P \leq 0,0001$). 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 Pinto, ao nível de 5% de probabilidade. Não houve efeito de local sobre esta característica. 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 Pinto, ao nível de 5% de probabilidade. Houve diferença entre locais ($P \leq 0,0001$). 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 Pinto, ao nível de 5% de probabilidade. Houve efeito de local sobre esta característica ($P \leq 0,0001$). 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 Pinto ao nível de 1% de probabilidade. 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 Pinto, ao nível de 5% de probabilidade. Não houve efeito de local sobre esta característica. 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 Pinto, ao nível de 5% de probabilidade. Não houve efeito de local sobre esta característica. 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 Pinto, ao nível de 1% de probabilidade. Não houve efeito de local sobre esta característica. 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 Pinto, ao nível de 5% de probabilidade. Houve diferença entre locais ($P \leq 0,0025$). 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 Pinto aos níveis de $P \leq 0,008\%$ e $P \leq 0,011\%$, respectivamente, para local e tratamentos. 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 Pinto,

ao nível de 5% de probabilidade. Não houve efeito de local sobre esta característica. 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 Pinto, ao nível de 5% de probabilidade. Houve diferença entre locais ($P \leq 0,0001$).

A Tabela 3 mostra os resultados obtidos das observações agrônômicas no ano de 2009 em Santo Antônio de Goiás e Sete Lagoas onde podemos observar que: (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 ($\times 400 = \text{kg/ha}$). Não houve diferença significativa entre os tratamentos Embrapa 5.1 e Olathe Pinto 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 significantes 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 significantes 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 significantes 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 significantes estatisticamente entre os dois ambientes estudados ($P < 0,0399\%$), porém não houve diferenças significantes 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 significantes estatisticamente entre os dois ambientes estudados ($P < 0,0355\%$), porém não houve diferenças significantes 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 significantes entre os dois ambientes estudados ($P < 0,0053\%$), porém não houve diferenças significantes entre os dois tratamentos ($P < 0,7324\%$). O CV foi de 11,26% e a média da percentagem 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 significantes entre os dois ambientes estudados ($P < 0,5510\%$), bem como não houve diferenças significantes 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 significantes entre os dois ambientes estudados ($P < 0,0744\%$), porém houve diferenças significantes 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 2. 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 Pinto	Embrapa 5.1	N	Olathe Pinto	Embrapa 5.1	N	Olathe Pinto	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	89,69±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). *Número seguido de letras iguais não diferem estatisticamente (p<0,05).

Tabela 3. 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 Pinto	Embrapa 5.1	N	Olathe Pinto	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 diferenças significativas para algumas características entre o evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe Pinto 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, porque no Brasil não se cultiva a classe de grão “pinto” comercialmente.

A Figura 5 mostra a distribuição dos pontos referentes a Embrapa 5.1 e Olathe Pinto 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 Pinto formaram, basicamente, um único agrupamento. Caso os agrupamentos fossem um para Embrapa 5.1 e outro para Olathe Pinto (portanto dois conjuntos) isto indicaria diferença entre os dois tratamentos, no entanto essa análise mostra que não há agregação entre os pontos, por genótipo.

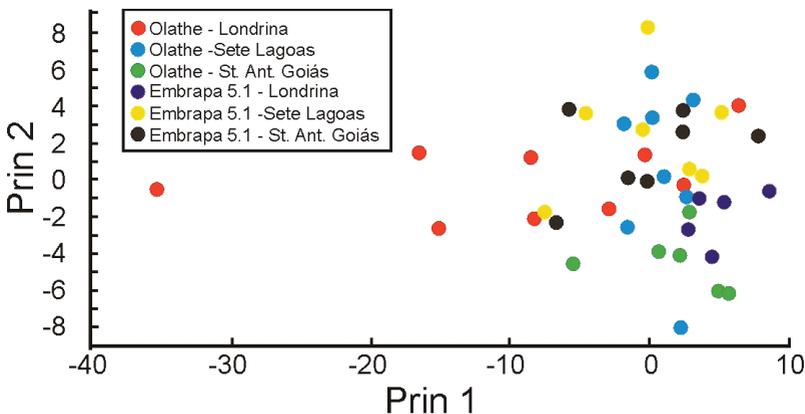


Figura 5. Gráfico dos pontos gerados em análise de componentes principais entre as duas componentes que mais contribuíram para a variância observada (Prin1 e Prin2) para o conjunto dos três locais do ano de 2008.

O fluxo gênico foi estudado em experimentos especialmente desenhados para esta finalidade, tendo sido encontrado o valor de 0,07%, e somente a até 6 metros da fonte (FARIA et al., 2010).

Avaliação de Risco à Saúde Humana e Animal Segurança alimentar

Acredita-se que por mais de 8000 anos, o feijão comum (*P. vulgaris*) vem evoluindo a partir de uma vinha selvagem das regiões da América Central e Andes para se tornar uma importante leguminosa produzida e consumida em várias partes do globo (GEPTS; DEBOUCK, 1991; GEPTS et al., 2008). O grão de feijão fornece excelente concentração de proteína, generosas quantidades de fibras, além da presença de carboidratos de composição complexa que o torna, em termos nutricionais, um alimento “quase perfeito” (COMMON BEAN, 2001). Os benefícios para a saúde humana associados ao consumo de feijões são amplamente documentados, tais como a 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).

A Resolução Normativa Nº 5, de 12 de março de 2008, lista cerca de dez tópicos a serem pesquisados no caso de OGMs consumidos como alimentos. Aqueles que se aplicam ao feijoeiro foram devidamente analisados. Assim, pode se afirmar que os efeitos da presença dos transgenes expressos no feijoeiro Embrapa 5.1 sobre a segurança alimentar humana e animal foram estudados e confirmaram que este evento é substancialmente equivalente ao de seu parental Olathe Pinto e comparável à de outros feijoeiros cultivados no Brasil. O feijão é fonte de fibras, proteínas, ferro e zinco entre outros minerais. Uma análise de composição extensa foi realizada em grãos colhidos de campos cultivado em Londrina (PR) em 2008, e Santo Antônio de Goiás (GO) e Sete Lagoas (MG) nos anos de 2008 e 2009. Foi ainda gerado um vasto banco de dados de composição, incluindo fatores nutricionais e antinutricionais presentes nos grãos de feijão cultivados em variadas partes do Brasil. As cultivares de feijoeiro incluídas foram o BRS Valente,

Diamante Negro, Pérola, Timbó e Olathe Pinto (parental do evento Embrapa 5.1) nos anos de 2003, 2004, 2005, 2006 e 2007. Os locais escolhidos foram áreas nos municípios de Santo Antônio de Goiás (GO), Simão Dias (SE), Lavras (MG), Ponta Grossa (PR), Anápolis (GO), Passo Fundo (RS); permitindo assim, estimar a variabilidade de composição que se poderia esperar para o feijão que é cultivado no Brasil. Em todos os casos os grãos foram colhidos, secos ao ar e em seguida foram submetidos a análises para determinação da composição dos teores 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). Foram ainda realizadas análises físico-químicas para determinação de umidade, cinzas, proteína total, extrato etéreo, ácido fítico e de inibidores de tripsina. No conjunto, o estudo mostrou que a composição de elementos nutricionais e antinutricionais encontrados no evento de feijoeiro Embrapa 5.1 são comparáveis aos níveis encontrados em seu parental não-GM (Olathe Pinto) e as outras quatro variedades convencionais cultivadas no Brasil. Houveram duas alterações pontuais, que não se repetiram em todos os anos e locais no caso do Embrapa 5.1, e por isto não foram consideradas como limitantes, ou importantes. Além das análises acima foram realizadas análises do perfil proteico em grãos colhidos de campos cultivados com o Evento Embrapa 5.1 e Olathe Pinto 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 protéico nos distintos campos e que não foi observada diferença marcante entre o evento Embrapa 5.1 e genótipo parental Olathe Pinto.

Assim, houve uma diferença estatisticamente significativa para o teor de cisteína entre o evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe Pinto cultivado em Londrina (PR) no ano de 2008, a qual não prevaleceu nos demais locais para esse mesmo ano, bem como no ano seguinte. Foi ainda observada uma diferença significativa entre o evento Embrapa 5.1 e Olathe Pinto para o extrato etéreo, nos grãos colhidos do campo de

Santo Antônio de Goiás no ano de 2008. De novo, esta discrepância não se repetiu em outros locais no mesmo ano ou no outro ano do estudo. Além disso, os valores obtidos tanto para cisteína como para o extrato etéreo, para o evento Embrapa 5.1 está dentro da faixa observada (em média) 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. No entanto, essa diferença não foi observada em outro local estudado naquele ano ou no ano de 2008 nos três locais estudados. As diferenças nas quantidades de componentes individuais de nutrientes que foram detectadas entre os grãos do feijoeiro Embrapa 5.1 e de seu parental podem ser atribuídas, provavelmente, à heterogeneidade que existe entre essas duas linhagens. Como o feijoeiro Embrapa 5.1 foi desenvolvido a partir de uma única semente, esse fato deve ser levado em consideração, uma vez que foi realizada uma seleção ao acaso de um único indivíduo o qual teria este menor teor do elemento, sendo portanto parte de 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 Pinto 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 cultivado no Brasil e considerado de uso seguro para a alimentação humana.

Em conjunto, esses resultados das análises de composição mostram que os níveis os principais açúcares, vitaminas, aminoácidos, minerais, proteína e fatores antinutricionais 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.

Alimentação Animal

Os estudos com alimentação animal não mostraram alterações em relação aos animais que foram alimentados com o feijoeiro parental Olathe Pinto.

Os animais utilizados foram ratos Wistar (machos e fêmeas) adquiridos para pesquisa no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Os ratos foram separados e distribuídos, aleatoriamente, em quatro grupos conforme quatro diferentes tratamentos para ambas as etapas de estudo: crescimento (30 dias) e exposição prolongada (180 dias). Foram usados 30 animais para cada tratamento. As dietas alimentares 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 única fonte proteica o feijão Embrapa 5.1 ou seu parental Olathe Pinto. 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 convencional (DFC). As dietas contendo proteína eram isocalóricas ($382,8 \pm 2,9$ kcal/100g) e isoprotéicas ($10,3 \pm 0,4\%$). 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 ± 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).

Notou-se diferença significativa na evolução do peso dos animais alimentados com feijoeiro (GM ou não GM) quando comparados àqueles alimentados com ração suplementada com caseína como fonte de proteína (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 convencional (Olathe Pinto). Estas observações se refletiram também nos índices de ganho de peso, nos quais não se observaram diferenças entre os animais alimentados com feijoeiro GM ou não-GM. Cabe ressaltar ainda que os animais alimentados com grãos sem cozimento de feijão têm seu desenvolvimento fortemente comprometido, levando os animais à morte com início a cerca de 20 dias após o início do experimento.

Segurança Ambiental

A segurança do cultivo do evento de feijoeiro Embrapa 5.1 para o meio ambiente foi demonstrada por estudos visando identificar possíveis efeitos sobre diversos organismos que interagem com a planta em condições de campo, ou controlada. 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, tanto pragas como os inimigos naturais das pragas. 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.

Foram ainda realizadas análises quantitativa e qualitativa da macro e mesofauna. 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.

Foi conduzido um estudo para avaliar o desenvolvimento de *Zabrotes subfasciatus*, que é o principal caruncho de grãos do feijão armazenado nas regiões mais quentes dos trópicos. Salienta-se que este inseto vive em íntimo contato com o interior da semente. 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 tratamentos incluíram além do Embrapa 5.1 e Olathe Pinto, a cv. Jalo Precoce (padrão de comparação como cultivar suscetível, grão utilizado na criação massal deste inseto), a cv. Pérola (padrão de comparação como cultivar suscetível), alinhagem 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). Os resultados demonstraram que o evento Embrapa 5.1 não interfere nos parâmetros de desenvolvimento biológico do *Z. subfasciatus*.

Foram realizados estudos para a determinação da produção de matéria seca e acumulação de nitrogênio. 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 dos dois genótipos (evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe Pinto) mostra 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 Pinto). Os resultados não mostraram diferenças entre os genótipos.

A nodulação e dependência pela fixação biológica de N_2 pelas plantas de feijoeiro foram também avaliadas 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 Pinto, 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 alfafroteobactérias 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 de solo com o feijoeiro transgênico Embrapa 5.1 e o convencional (Olathe Pinto) quanto às 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 da excreção 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.

Perspectivas

Espera-se que o evento Embrapa 5.1 venha a conferir a proteção esperada no controle do mosaico dourado do feijoeiro no Brasil. A comercialização de cultivares com o transgene deverá chegar ao mercado nos próximos anos. Um aspecto sempre presente é a durabilidade da resistência. Tendo em vista que a resistência foi baseada em um gene que por natureza, é bastante conservado nos geminivirus de feijão, espera-se que esta venha a ter duração prolongada. Em um caso semelhante em vírus de RNA – *Papaya ringspot virus* – cultivado no Hawaí, a resistência continua sendo completa ao longo de muitos anos. O monitoramento da resistência ao mosaico dourado ao longo com estudos sobre a variabilidade do BGMV deverá ser conduzido e altamente esclarecedor.

Referências

ANTIGNUS, Y.; VUNSH, R.; LACHMAN, O.; PEARLSMAN, M.; MASLENIN, L.; HANANYA, U.; ROSNER, A. Truncated rep gene originated from *Tomato yellow leaf curl virus-Israel* (Mild) confers strain-specific resistance in transgenic tomato. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 144, n. 1, p. 39-44, 2004.

ARAGÃO, F. J. L.; FARIA, J. C. First transgenic geminivirus resistant plant in the field. **Nature Biotechnology**, New York, v. 27, n. 12, p. 1086-1088, Dec. 2009.

ARAGÃO, F. J. L.; BARROS, L. M. G.; BRASILEIRO, A. C. M.; RIBEIRO, S. G.; SMITH, F. D.; SANFORD, J. C.; FARIA, J. C.; RECH, E. L. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 93, n. 1/2, p. 142-150, Jul. 1996.

ARAGÃO, F. J. L.; GROSSI DE SÁ, M. F.; DAVEY, M. R.; BRASILEIRO, A. C. M.; FARIA, J. C.; RECH, E. L. Factors influencing transient gene expression in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using an electrical particle acceleration device. **Plant Cell Reporters**, New York, v. 12, n. 9, p. 483–490, Jul. 1993.

ARAGÃO, F. J. L.; NOGUEIRA, E. O. P. L.; TINOCO, M. L. P.; FARIA, J. C. Molecular characterization of the first commercial transgenic common bean immune to the bean golden mosaic virus. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 166, n. 1/2, p. 42-50, June 2013.

ARAGÃO, F. J. L.; RIBEIRO, S. G.; BARROS, L. M. G.; BRASILEIRO, A. C. M.; MAXWELL, D. P.; RECH, E. L.; FARIA, J. C. Transgenic beans (*Phaseolus vulgaris* L.) engineered to express viral antisense RNAs show delayed and attenuated symptoms to bean golden mosaic geminivirus. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 4, n. 6, p. 491-499, 1998.

ARAGÃO, F. J. L.; VIANNA, G. R.; ALBINO, M. das M. C.; DIAS, B. B. A.; FARIA, J. C. Transgênico resistente a geminivirus. **Biociência & Desenvolvimento**, Brasília, DF, v. 3, n. 19, p. 22-26, mar./abr. 2001.

AUER, C.; FREDERICK, R. Crop improvement using small RNAs: applications and predictive ecological risk assessments. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 27, n. 11, p. 644-651, Nov. 2009.

BEJARANO, E. R.; LICHTENSTEIN, C. P. Expression of TGMV antisense RNA in transgenic tobacco inhibits replication of BCTV but not ACMV geminiviruses. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 24, n. 1, p. 241-248, Jan. 1994.

BENDAHMANE, M.; GRONENBORN, B. Engineering resistance against tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) using antisense RNA. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 33, n. 2, p. 351-357, Jan. 1997.

BIAN, X. Y.; RASHEED, M. S.; SEEMANPILLAI, M. J.; REZAIAN, M. A. Analysis of silencing escape of *Tomato leaf curl virus*: an evaluation of the role of DNA methylation. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 19, n. 6, p. 614-624, Jun. 2006.

BIANCHINI, A. Resistance to bean golden mosaic virus in bean genotypes. **Plant Disease**, St. Paul, v. 83, n. 7, p. 615-620, July 1999.

BIRD, J.; SANCHEZ, J.; VAKILI, N. G. Golden yellow mosaic of beans (*Phaseolus vulgaris*) in Puerto Rico. **Phytopathology**, St. Paul, v. 63, n. 12, p. 1435, Dec. 1973.

BONFIM, K.; FARIA, J. C.; NOGUEIRA, E. O. P. L.; MENDES, E. A.; ARAGÃO, F. J. L. RNAi-mediated resistance to bean golden mosaic virus in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 20, n. 6, p. 717-726, June 2007.

BRUNETTI, A.; TAVAZZA, R.; NORIS, E.; LUCIOLI, A.; ACCOTTO, G. P.; TAVAZZA, M. Transgenically expressed T-Rep of *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* acts as a transdominant-negative mutant, inhibiting viral transcription and replication. **Journal of Virology**, Washington, v. 75, n. 22, p. 10573-10581, Nov. 2001.

COMMON bean: the nearly perfect food. **Ciat in Focus**, Cali, 2001. Disponível em: <http://ciat-library.ciat.cgiar.org/articulos_ciat/ciatinfocus/beanfocus.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2013.

COSTA, A. S. Increase in the population density of *Bemisia tabaci*, a threat of widespread virus infection of legume crops in Brazil. In: BIRD, J.; MARAMOROSH, K. (Ed.). **Tropical disease of legumes**. New York: Academic Press, 1975. p. 27-49.

COSTA, A. S. Three whitefly-transmitted diseases of beans in the State of São Paulo, Brazil. **FAO Plant Protection Bulletin**, Roma, v. 13, n. 6, p. 121-130, 1965.

COSTA, C. L.; CUPERTINO, F. P. Avaliação de perdas na produção de feijoeiro causadas pelo vírus do mosaico dourado. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.1, n. 1, p. 18-25, 1976.

COSTA, A. S.; CUPERTINO, F. P.; KITAJIMA, E. W.; VIEIRA, C. Reação de variedades de feijoeiro aos vírus do mosaico dourado e do mosaico comum. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 8., 1975, Mossoró. **Trabalhos científicos: resumos**. Mossoró: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 1975. p. 54-55.

DAY, A. G.; BEJARANO, E. R.; BUCK, K. W.; BURREL, M.; LICHTENSTEIN, C. P. Expression of an antisense viral gene in transgenic tobacco confers resistance to the DNA virus tomato golden mosaic virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 88, n. 15, p. 6721-6725, Aug. 1991.

FARIA, J. C.; ALBINO, M. M. C.; DIAS, B. B. A.; CUNHA, N. B.; SILVA, L. M.; VIANNA, G. R.; ARAGÃO, F. J. L. Partial resistance to bean golden mosaic virus in a transgenic common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) line expressing a mutated *rep* gene. **Plant Science**, Limerick, v. 171, n. 5, p. 565-571, Nov. 2006.

FARIA, J. C.; CARNEIRO, G. E. S.; ARAGÃO, F. J. L. Gene flow from transgenic common beans expressing the bar gene. **GM Crops**, v. 1, n. 2, p. 94-98, Mar./Apr. 2010.

FARIA, J. C.; GILBERTSON, R. L.; HANSON, S. F.; MORALES, F. J.; AHLQUIST, P.; LONIELLO, A. O.; MAXWELL, D. P. Bean golden mosaic geminivirus type II isolates from the Dominican Republic and Guatemala: nucleotide sequences, infectious pseudo recombinants, and phylogenetic relationships. **Phytopathology**, St. Paul, v. 84, n. 3, p. 321-329, Mar. 1994.

FERNANDES, F. R.; CRUZ, A. R. R.; FARIA, J. C.; ZERBINI, F. M.; ARAGÃO, F. J. L. Three distinct begomoviruses associated with soybean in central Brazil. **Archives of Virology**, New York, v. 154, n. 9, p. 1567-1570, Sept. 2009.

FONTES, E. P. B.; EAGLE, P. A.; SIPE, P. S.; LUCKOW, V. A.; HANLEY-BOWDOIN, L. Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 269, n. 11, p. 8459-8465, Mar. 1994.

GALVEZ, G. E.; CASTAÑO, M. Purification of the whitefly-transmitted bean golden mosaic virus. **Turrialba**, San Jose, v. 26, n. 2, p. 205-207, abr./jun. 1976.

GEIL, P. B.; ANDERSON, J. W. Nutrition and health implications of dry beans: a review. **Journal of the American College of Nutrition**, New York, v. 13, n. 6, p. 549-558, Dec. 1994.

GEPTS P.; DEBOUCK D. Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: SCHOONHOVEN, A. VAN; VOYSEST, O. (Ed.). **Common beans: research for crop improvement**. Cali: CAB International: Ciat, 1991. p. 7-53.

GEPTS, P.; ARAGÃO, F. J. L.; BARROS, E.; BLAIR, M. W.; 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. Genomics of *Phaseolus* beans, a major source of dietary protein and micronutrients in the tropics. In: MOORE, P. H.; MING, R. (Ed.). **Genomics of tropical crop plant**. New York: Springer, 2008. p. 113-143.

GILBERTSON, R. L.; FARIA, J. C.; AHLQUIST, P.; MAXWELL, D. P. Genetic diversity in geminiviruses causing bean golden mosaic disease: the nucleotide-sequence of the infectious cloned DNA components of a Brazilian isolate of Bean Golden Mosaic Geminivirus. **Phytopathology**, St. Paul, v. 83, n. 7, p. 709-715, July 1993.

GILBERTSON, R. L.; FARIA, J. C.; HANSON, S. F.; MORALES, F. J.; AHLQUIST, P.; MAXWELL, D. P.; RUSSEL, D. R. Cloning of the complete DNA genomes of four bean-infecting geminiviruses and determining their infectivity by electric-discharge particle-acceleration. **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, n. 9, p. 980-985, Sept. 1991.

GOODMAN, R. M. Single-stranded DNA genome in a whitefly-transmitted plant virus. **Virology**, New York, v. 83, n. 1, p. 171-179, 1977.

HAMILTON, A. J.; BAULCOMBE, D. C. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. **Science**, Washington, v. 286, n. 5441, p. 950-952, Oct. 1999.

HANGEN, L.; BENNINK, M. R. Consumption of black beans and navy beans (*Phaseolus vulgaris*) reduced azoxymethane-induced colon cancer in rats. **Nutrition and Cancer**, Hillsdale, v. 44, n. 1, p. 60-65, 2002.

HERR, A. J.; JENSEN, M. B.; DALMAY, T.; BAULCOMBE, D. RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. **Science**, Washington, v. 308, n. 5718, p. 118-120, Apr. 2005.

HOHN, T. Plant virus transmission from the insect point of view. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, n. 46, p. 17905–17906, Nov. 2007.

KOKUBO, Y.; ISO, H.; ISHIHARA, J.; OKADA, K.; INOUE, M.; TSUGANE, S. **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.** 2007. Disponível em: <<http://circ.ahajournals.org/content/116/22/2553.full.pdf+html>>. Acesso em: 20 dez. 2012.

LETERME, P. Recommendations by health organizations for pulse consumption. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 88, n. 3, p. 239-242, Dec. 2002.

LUCIOLI, A.; SALLUSTIO, D. E.; BARBONI, D.; BERARDI, A.; PAPACCHIOLI, V.; TAVAZZA, R.; TAVAZZA, M. A cautionary note on pathogen-derived sequences. **Nature Biotechnology**, New York, v. 26, n. 6, p. 617-619, June 2008.

MALIK, P. S.; KUMAR, V.; BAGEWADI, B.; MUKHERJEE, S. K. Interaction between coat protein and replication initiation protein of *Mung bean yellow mosaic India virus* might lead to control viral DNA replication. **Virology**, New York, v. 337, n. 2, p. 273-283, July 2005.

MCKINNEY, H. H. Mosaic diseases in the Canary Islands, West Africa and Gibraltar. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 39, n. 8, p. 557-578, Oct. 1929.

OROZCO, B. M.; HANLEY-BOWDOIN, L. A DNA structure is required for geminivirus replication origin function. **Journal of Virology**, Washington, v. 70, n. 1, p. 148-158, Jan. 1996.

PALMER, K. E.; RYBICKI, E. P. The molecular biology of master viruses. **Advances in Virus Research**, San Diego, v. 50, p. 183-234, 1998.

PELLET, P. L.; YOUNG, V. R. **Nutritional evaluation of protein foods:** report of a working sponsored by The International Union of Nutritional Science and United Nations University World Hunger Programs. Tokyo: The United Nations University, 1980. 154 p.

PESSONI, L. A.; ZIMMERMANN, M. J. O.; FARIA, J. C. Genetic control of characters associated to bean golden mosaic geminivirus resistance in *Phaseolus vulgaris* L. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 20, n. 1, p. 51-58, Mar. 1997.

POMPEU, A. S.; KRANZ, W. M. Linhagens de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) resistentes ao vírus do mosaico dourado. **Summa Phytopathologica**, v. 3, n. 2, p. 162-163, abr./jun. 1977.

POWELL-ABEL, P. A.; NELSON, R. S.; DE, B.; HOFFMAN, N.; ROGERS, S. G; FRALEY, R. T.; BEACHY, R. N. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. **Science**, Washington, v. 232, n. 4751, p. 738-743, May 1986.

RECH, E. L.; ARAGÃO, F. J. L. Biobalística. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. de C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-Cenargen, 1998. p. 51-74.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. 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**, Philadelphia, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, Nov. 1993.

RIEGER, R.; MICHAELIS, A.; GREEN, M. M. **Glossary of genetics and cytogenetics**: classical and molecular. 4th ed. New York: Springer, 1976. 647 p.

RUSSELL, D. R.; WALLACE, K. M.; BATHE, J. H.; MARTINELL, B. J.; MCCABE, D. E. Stable transformation of *Phaseolus vulgaris* via electric-discharge mediated particle acceleration. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 12, n. 3, p. 165–169, Jan. 1993.

SCHOONHOVEN, A. VAN; CARDONA, C.; VALOR, J. Resistance to the bean weevil and the Mexican bean weevil (Coleoptera: Bruchidae) in non cultivated common bean accessions. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 76, n. 6, p. 1255-1259, 1983.

SEQUEIRA, L. Cross protection and induced resistance: their potential for plant disease control. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 2, n. 2, p. 25-29, 1984.

TIMMERMANS, M. C. P.; DAS, O. P.; MESSING, J. Geminiviruses and their uses extrachromosomal replications. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 45, p. 79-112, 1994.

VANDERSCHUREN, H.; ALDER, A.; ZHANG, P.; GRUISSEM, W. Dose-dependent RNAi-mediated geminivirus resistance in the tropical root crop cassava. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 70, n. 3, p. 265–272, June 2009.

VELTCHEVA, M.; SVETLEVA, D.; PETKOVA, S.; PERL, A. In vitro regeneration and genetic transformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)—problems and progress. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 107, n. 1, p. 2–10, Dec. 2005.

WANDER, A. E. Produção e consumo de feijão no Brasil, 1975-2005. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 37, n. 2, p. 7-21, fev. 2007.

WATERHOUSE, P. M.; WANG, M. B.; LOUGH, T. Gene silencing as an adaptive defense against viruses. **Nature**, London, v. 411, n. 6839, p. 834-842, June 2001.

WESLEY, S.; HELLIWELL, C.; SMITH, N.; WANG, M.; ROUSE, D.; LIU, Q.; GOODING, P.; SINGH, S.; ABBOTT, D.; STOUTJESDIJK, P.; ROBINSON, S.; GLEAVE, A.; GREEN, A.; WATERHOUSE, P. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. **Plant Journal**, Oxford, v. 27, n. 6, p. 581-590, Sept. 2001.

WINHAM, D.; WEBB, D.; BARR, A. Beans and good health. **Nutrition Today**, Baltimore, v. 43, n. 5, p. 201-209, Sept./Oct. 2008.

YANG, Y.; SHERWOOD, T. A.; HIEBERT, C. P.; POLSTON, J. E. Use of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) Rep gene sequences to engineer TYLCV resistance in tomato. **Phytopathology**, St. Paul, v. 94, n. 5, p. 490-496, May 2004.

ZAMBRYSKI, P.; JOOS, P. H.; GENETELLO, C.; LEEMANS, J.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. Ti-plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. **EMBO Journal**, Oxford, v. 2, n. 12, p. 2143-2150, 1983.

ZHANG, P.; VANDERSCHUREN, H.; FUTTERER, J.; GRUISSEM, W. Resistance to cassava mosaic disease in transgenic cassava expressing antisense RNAs targeting virus replication genes. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 3, n. 4, p. 385-397, July 2005.

ZUCKER, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 31, n. 13, p. 3406-3415, July 2003.