

COMISSÃO EUROPEIA

Área de Pesquisa Europeia

Alimentos, Agricultura, Pesca e Biotecnologia

Uma década de pesquisa em OGM financiada pela UE

(2001 – 2010)

INFORMAÇÃO SOBRE O PROJETO

Interessado em pesquisa europeia?

Research*eu é nossa revista mensal que o mantém em contato com os principais acontecimentos (resultados, programas, eventos, etc.). Está disponível em inglês, francês, alemão e espanhol. Um exemplar de amostra grátis ou assinatura grátis podem ser obtidos com:

Comissão Europeia
Diretoria-geral para Pesquisa
Unidade de Comunicação
B-1049 Bruxelas
Fax (32-2) 29-58220
E-mail: research-eu@ec.europa.eu
Internet: <http://ec.europa.eu/research/research-eu>

COMISSÃO EUROPEIA

Diretoria-geral para Pesquisa e Inovação
Diretoria E — Biotecnologias, Agricultura, Alimentos
Unidade E2 — Biotecnologias

COMISSÃO EUROPEIA

Uma década de pesquisa em OGM financiada pela UE

(2001 – 2010)

***EUROPE DIRECT é um serviço para ajudá-lo a encontrar respostas
para suas perguntas sobre a União Europeia***

Telefone grátis, número (*):

00 800 6 7 8 9 10 11

(*) Algumas operadoras de celulares não permitem acesso a números 00 800,
ou as chamadas podem ser cobradas

NOTA LEGAL

Nem a Comissão Europeia nem qualquer pessoa agindo em nome da comissão são responsáveis pelo uso que possa ser feito com as informações a seguir.

Os pontos de vista expressos nesta publicação são de única responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem os pontos de vista da Comissão Europeia.

Maiores informações sobre a União Europeia estão disponíveis na Internet (<http://europa.eu>).

Dados catalogados podem ser encontrados no final desta publicação.

Luxemburgo: Escritório de Publicações da União Europeia, 2010

ISBN 978-92-79-16344-9

doi 10.2777/97784

Fotos da capa: © Fotolia

© União Europeia, 2010

A reprodução é autorizada desde que citada a fonte.

Impresso na Bélgica

IMPRESSO EM PAPEL BRANQUEADO LIVRE DE CLORO ELEMENTAR (ECF)

Índice

Introdução	09
Prefácio	11
Uma década de pesquisa em GMO financiada pela UE [2001 - 2010]	13
Capítulo 1. Impactos ambientais dos OGM	15
ARROZ EUROPEU: TRANSGENES PARA PROTEÇÃO DE CULTURAS CONTRA DOENÇAS DE FUNGOS [EURICE]	19
TORNANDO PLANTAS RESISTENTES A NEMATÓIDES PARASITAS: SEM ACESSO – SEM ALIMENTAÇÃO [NONEMA]	22
AVALIANDO NOVAS CARACTERÍSTICAS PARA BATATA NOS ANDES CENTRAIS COM FOCO APROPRIADO NA POBREZA [CARACTERÍSTICAS DE BATATA PARA AN]	28
AVALIAÇÃO DA ADEQUAÇÃO AMBIENTAL E AGRONÔMICA DO ALGODÃO TRANSGÊNICO BT EM SISTEMAS IPM DE PEQUENOS PRODUTORES NA CHINA [COTRAN]	32
UM SISTEMA DE SELEÇÃO ECOLÓGICAMENTE SEGURO PARA CULTURAS TRANSGÊNICAS BASEADO EM GENES MODIFICADOS DE TUBULINA DE PLANTA [ECOTUB]	35
PESQUISA EM BIOSSEGURANÇA DIRIGIDA A PRODUÇÃO MAIS SUSTENTÁVEL DE ALIMENTOS [ECOSAFE]	39
CILIADOS COMO MONITORES DE SEGURANÇA AMBIENTAL DE OGM [CIMES]	43
EFEITOS E MECANISMOS DE TRANSGENES BT NA BIODIVERSIDADE DE INSETOS NÃO-ALVO: POLINIZADORES, HERBÍVOROS E SEUS INIMIGOS NATURAIS [BT-BIONOTA]	47
IMPACTO DE TRÊS ESTRATÉGIAS BIOTECNOLÓGICAS SELECIONADAS PARA CONTROLE DE PATÓGENO DE BATATA NA MICROBIOTA INDÍGENA DO SOLO [POTATOCONTROL]	52
TESTANDO SISTEMAS INTEGRADOS DE GM-RIZORREMEDIAÇÃO PARA BIORREMEDIAÇÃO DO SOLO [RIZORREMEDIAÇÃO]	56
OBTENÇÃO DE TRIGO COM MELHOR EFICIÊNCIA NO USO DO NITROGÊNIO VISANDO A UM SISTEMA SUSTENTÁVEL DE PRODUÇÃO [SUSTAIN]	59
ANÁLISE DE FLUXO GÊNICO DA CULTURA PARA FORMAS SILVESTRES EM ALFACE E CHICÓRIA E SUAS CONSEQUÊNCIAS POPULACIONAIS E ECOLÓGICAS NO CONTEXTO DA BIOSSEGURANÇA DAS CULTURAS GM [ANGEL]	62

FLUXO GÊNICO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS: AVALIAÇÃO E BIOTECNOLOGIA [TRANSBAC]	66
PROTEGENDO OS BENEFÍCIOS DAS TOXINAS BT DOS MELHORAMENTOS EM RESISTÊNCIA A INSETOS ATRAVÉS DO MONITORAMENTO E MANEJO [PROBENBT]	70
DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE RISCO DE UM BIOSSENSOR PORTÁTIL BASEADO NO CAMPO, USANDO BACTÉRIAS BIOLUMINESCENTES GENETICAMENTE MODIFICADAS [BIOGEM]	76
AVALIAÇÃO DO IMPACTO AMBIENTAL DE VIDEIRAS E AMEIXEIRAS TRANSGÊNICAS NA DIVERSIDADE E DINÂMICA DE POPULAÇÕES DE VÍRUS [TRANSVIR]	79
CONTROLE DA ÉPOCA DE FLORAÇÃO PARA UMA AGRICULTURA E SILVICULTURA SUSTENTÁVEIS E COMPETITIVAS [CONFLOW]	83
AVALIAÇÃO ECOLÓGICA E ECONÔMICA DO SOLO DE CULTURAS GENETICAMENTE MODIFICADAS [ECOGEN]	89
DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE CONTENÇÃO BIOLÓGICA EFICIENTES E ESTÁVEIS PARA PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS [TRANSCONTAINER]	94
INTRODUÇÃO SUSTENTÁVEL DE CULTURAS GM NA AGRICULTURA EUROPEIA [SIGMEA]	99
AVANÇOS EPIGENÉTICOS AMBIENTAIS ALCANÇADOS: DE <i>ARABIDOPSIS</i> AO MILHO [AENEAS]	110
Capítulo 2. OGM e Segurança Alimentar	112
NOVA TECNOLOGIA NA CIÊNCIA DE ALIMENTOS FACE À MULTIPLICIDADE DE NOVOS OGMS LANÇADOS [GMOCHIPS]	116
AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DA TRANSFERÊNCIA HORIZONTAL DE GENES DE ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS PARA A MICROFLORA DA CADEIA ALIMENTAR E O INTESTINO HUMANO [GMOBILITY]	120
REDE EUROPEIA DE AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DE CULTURAS ALIMENTARES GENETICAMENTE MODIFICADAS [ENTRANSFOOD]	124
DETECÇÃO CONFIÁVEL, PADRONIZADA, ESPECÍFICA E QUANTITATIVA DE ALIMENTO GENETICAMENTE MODIFICADO [QPCRGMOFOOD]	130
NOVOS MÉTODOS PARA TESTE DE SEGURANÇA DE ALIMENTOS TRANSGÊNICOS [SAFOTEST]	138
NOVA METODOLOGIA PARA AVALIAR O POTENCIAL DE EFEITOS NÃO DESEJADOS EM CULTURAS ALIMENTARES GENETICAMENTE MODIFICADAS [GMOCARE]	143

PERFIS DE EXPRESSÃO COMO IMPRESSÕES DIGITAIS PARA A AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DE NOVAS LINHAGENS, INCLUINDO OGMS USADOS EM ALIMENTO BIOPROCESSADO [EXPRESS FINGERPRINTS]	145
DESENVOLVIMENTO DE UM ANALISADOR DE IMUNODETECÇÃO BASEADO EM CAPACITÂNCIA PARA O ENSAIO DE OGMS EM ALIMENTOS [IMAGEMO]	148
ESTRATÉGIAS DE AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE RISCO PARA NOVOS ALIMENTOS [NOFORISK]	151
BIOMARCADORES PARA MONITORAMENTO PÓS-MERCADO DOS EFEITOS DE CURTO E LONGO PRAZO DE ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS NA SAÚDE HUMANA E ANIMAL [GMSAFOOD]	155
Capítulo 3. OGMs para biomateriais e biocombustíveis – Tecnologias emergentes	157
CULTURAS INDUSTRIAIS PRODUZINDO NOVOS ÓLEOS COM VALOR AGREGADO PARA NOVOS PRODUTOS QUÍMICOS [ICON]	159
MELHORANDO AS CARACTERÍSTICAS DE ÁLAMOS PARA NOVAS APLICAÇÕES EM ENERGIA [ENERGYPOPLAR]	161
PROJETO RACIONAL DE SISTEMAS VEGETAIS PARA A GERAÇÃO SUSTENTÁVEL DE PRODUTOS INDUSTRIAIS COM VALOR AGREGADO [SMARTCELL]	163
ANÁLISE SISTEMÁTICA DE FATORES QUE CONTROLAM A RECOMBINAÇÃO MEIÓTICA NAS PLANTAS SUPERIORES [MEIOSYS]	165
RECOMBINAÇÃO: UMA NOVA E ANTIGA FERRAMENTA PARA O MELHORAMENTO DE PLANTAS [RECBREED]	167
TERPENÓIDES VEGETAIS PARA A SAÚDE HUMANA: UMA ABORDAGEM QUÍMICA E GENÔMICA PARA IDENTIFICAR E PRODUZIR COMPOSTOS BIOATIVOS [TERPMED]	169
MELHORANDO A MEMBRANA CELULAR PARA USO COMO RAÇÃO INDUSTRIAL RENOVÁVEL [RENEWAL]	171
PRODUÇÃO E EXPLORAÇÃO COM BASE NA UE DE FONTES ALTERNATIVAS DE BORRACHA E LÁTEX [EU-PEARLS]	173
PRODUÇÃO DE VACINAS POR PLANTAS [PLAPROVA]	175
Capítulo 4. Avaliação de risco e manejo – apoio e comunicação da política	177
PLANTAS TRANSGÊNICAS RESISTENTES A VÍRUS: IMPACTO ECOLÓGICO DO FLUXO GÊNICO [VRTP IMPACT]	182
RESULTADOS E PERSPECTIVAS DA COEXISTÊNCIA E	

RASTREABILIDADE DAS CADEIAS DE SUPRIMENTOS GM E NÃO-GM [CO-EXTRA]	185
UMA INICIATIVA EUROPEIA PARA MELHORAR A COMUNICAÇÃO RELATIVA À PESQUISA DA BIOSSEGURANÇA DE GMOS [GMO RES COM]	192
ENVOLVIMENTO GLOBAL DE CIENTISTAS DA PESQUISA PÚBLICA NA REGULAMENTAÇÃO DA BIOSSEGURANÇA E BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA [SCIENCE 4 BIOREG]	196
PROMOVENDO A SEGURANÇA ALIMENTAR POR MEIO DE UMA NOVA ABORDAGEM INTEGRADA DE ANÁLISE DE RISCO PARA ALIMENTOS [SAFE FOODS]	200
OS CONSUMIDORES EUROPEUS COMPRAM ALIMENTOS OGM? [CONSUMERCHOICE]	207
REDE DE COMUNICAÇÃO DE PESQUISA EM BIOSSEGURANÇA [BIOSAFENET]	212
ESTUDO PILOTO DE ABORDAGENS INOVADORAS DA COMUNICAÇÃO PÚBLICA EM CIÊNCIAS NATURAIS E BIOTECNOLOGIA POR ESTUDANTES E PESQUISADORES JOVENS [BIOPOP]	217
PLATAFORMA DE COMUNICAÇÃO E AVALIAÇÃO DE SEGURANÇA DE OGMS [GMO-COMPASS]	222
EUROPEUS E BIOTECNOLOGIA EM RESULTADOS DE 2010 DO EUROBAROMETER 73.1[STEPE]	225

Introdução

Máire GEOGHEGAN-QUINN
Comissária para
Pesquisa, Inovação e Ciência
Comissão Europeia (CE)

A inovação científica e tecnológica assim como o entendimento fundamental da natureza estão entre os maiores impulsionadores do progresso. A descoberta da penicilina por Alexander Fleming em 1928 salvou a vida de inúmeras pessoas que lutavam contra a causa número um de morte no último século – infecção bacteriana. Os avanços de hoje no tratamento das doenças humanas tornaram-se possíveis com a descoberta da estrutura de dupla hélice do DNA por Watson e Crick em 1953. E a Revolução Verde, um sinônimo dos avanços nas ciências agrícolas e melhoramento de plantas, salvou milhões de pessoas da fome.

Os Programas Estruturais para pesquisa, desenvolvimento tecnológico e atividades de demonstração são os maiores projetos internacionais do mundo para a pesquisa colaborativa básica e aplicada e, representam os nossos meios de inovar para enfrentar os desafios globais.

Esses desafios estão ligados principalmente à mudança climática, segurança e garantia de alimentos, aos recursos limitados de combustíveis fósseis, a uma população em envelhecimento e às lutas contra a doença, pobreza e exclusão social. Aproveitando a notável evolução da biologia como uma disciplina científica, o conceito da Bioeconomia Baseada no Conhecimento fornece muitas soluções científicas e técnicas para aumentar as eficiências dos recursos, ao mesmo tempo em que reduz os rastros ambientais de modo economicamente viável e socialmente responsável.

As biotecnologias podem dar ferramentas úteis em setores como agricultura, pesca, produção de alimentos e indústria. A produção de culturas terá que enfrentar a demanda em rápido crescimento e ao mesmo tempo garantir a sustentabilidade ambiental. A preservação dos recursos naturais e a necessidade de amparar produtores e populações rurais em todo o mundo são preocupações importantes. Para alcançar as melhores soluções, devemos considerar todas as alternativas para enfrentar esses desafios, usando métodos independentes, cientificamente válidos. Essas alternativas incluem organismos geneticamente modificados (OGM) e seu uso potencial.

O aquecimento global e a diminuição dos recursos de combustíveis fósseis já estão em destaque nas agendas públicas e políticas. O desenvolvimento de matérias-primas alternativas para aplicações industriais, tais como as renováveis derivadas de plantas e resíduos, combinadas com as novas técnicas industriais para substituir processos termoquímicos por processos biológicos, tornaram-se o foco de nossas atividades de pesquisa.

A introdução de tais processos e materiais avançados, baseados na biotecnologia e OGMs, tem um enorme potencial, não apenas para melhorar a qualidade de vida e simultaneamente reduzir os rastros ambientais, mas também para melhorar a competitividade da indústria europeia.

Assim como em todas as novas tecnologias, os riscos e benefícios potenciais devem ser identificados e quantificados. Com base no princípio da precaução, a UE desenvolveu programas e práticas para avaliar os riscos e benefícios dos GMOs para

a saúde animal e humana, bem como para o ambiente. Outras organizações internacionais, tais como a OECD, seguem os mesmos princípios, não apenas para garantir a segurança do consumidor, mas também para harmonizar as abordagens de avaliação de risco e facilitar o comércio internacional de commodities agrícolas e produtos industriais.

Este é o segundo volume de resultados que analisa diferentes aspectos dos organismos geneticamente modificados. É parte de uma iniciativa dos programas de pesquisa e atividades iniciadas há 25 anos em resposta às preocupações dos dirigentes políticos e do público com respeito à segurança da tecnologia. O leitor poderá observar que os projetos recentes que tratam do desenvolvimento de novos produtos e processos baseados na tecnologia OGM integram totalmente as avaliações de segurança em sua concepção, experimentação e desenvolvimento.

Acreditamos que iniciativas como esta publicação estejam alinhadas com os princípios estabelecidos na Estratégia 'Europa 2020', em que construir a Bioeconomia é uma das metas principais, visando "*... refocalizar a política de P&D e inovação nos desafios que afetam nossa sociedade, tais como mudança climática, eficiência em energia e recursos, saúde e mudança demográfica. Cada elo deve ser reforçado na cadeia inovadora da pesquisa 'céu azul' à comercialização.*"

Esses princípios capacitarão a Europa a prosperar em uma economia global ainda mais competitiva e limitada em recursos, fornecendo educação, conhecimento, apoio à saúde e, acima de tudo, oportunidades de emprego para as gerações vindouras.

Prefácio

Maive RUTE
Diretora de Biotecnologias,
Agricultura e Alimentos
Diretoria-geral para a Pesquisa e Inovação
Comissão Europeia

A estratégia “Europa 2020”, adotada pelo Conselho Europeu em 17 de junho de 2010, tem a missão de dar à União Europeia uma economia inteligente, sustentável e inclusiva, para ajudá-la a emergir mais fortemente às dificuldades financeiras e econômicas do passado recente. A estratégia apresenta sete iniciativas principais, uma das quais é a criação de uma “União da Inovação” com foco em “Construir a Bioeconomia até 2020”.

A bioeconomia, como definida pela OECD, refere-se a atividades econômicas relacionadas à invenção, ao desenvolvimento, à produção e ao uso de produtos e processos biológicos. Aliado a expressivos avanços nas ciências naturais e biotecnologias, o conceito da bioeconomia aumentará a competitividade da Europa, a eficiência da utilização de recursos, reduzirá o rastro ambiental dos produtivos e processos produtivos e estimulará a criação de empregos baseados no conhecimento.

As estimativas indicam que a bioeconomia europeia vale 2 trilhões de euros e responde por cerca de 22 milhões de empregados. A UE já tem uma forte presença de pesquisa de campo, como nas biotecnologias farmacêutica e industrial e, inclui significativo conhecimento sobre os aspectos relacionados à saúde da bioeconomia.

Mas pesquisadores europeus e empresas têm que competir em nível global. Países como EUA, China, Índia e o Brasil estão planejando substanciais investimentos em biotecnologia, intensificando a competição com os líderes europeus. Se a Europa deseja manter-se na vanguarda da pesquisa e da inovação, iniciativas claras são necessárias para apoiar o desenvolvimento dessa economia europeia inteligente, sustentável e inclusiva.

Para contrabalançar o aumento previsto na população mundial até 9 bilhões até 2050, tendo em vista as implicações relacionadas com a mudança climática, a ciência deve desenvolver tecnologias que aumentem a produção e produtividade de modo sustentável, ao mesmo tempo em que diminua a demanda por fertilizantes e pesticidas e adapte as culturas para enfrentar os efeitos da mudança no ambiente.

Neste sentido, os principais desafios para a indústria serão aumentar a eficiência dos recursos, substituir o uso de recursos finitos por renováveis e desenvolver produtos e ciclos de vida mais ecoeficientes.

A pesquisa em biotecnologia também pode contribuir para o desenvolvimento de novas técnicas, tais como a valorização dos biorresíduos em biorrefinarias para a produção de biomassa e bioenergia, e do desenvolvimento de fábricas para a produção de macro e micro-algas para o mesmo fim, explorando ao mesmo tempo tecnologias emergentes, tais como a biologia sintética de um modo seguro e aceitável. A pressão econômica em um mundo globalizado, assim como a experiência com biotecnologia na Europa, deve encorajar-nos a buscar o desenvolvimento e a aplicação sem preconceito de todas as tecnologias disponíveis, sempre respeitando os princípios fundamentais de segurança e ética.

Esta publicação revisa os últimos dez anos de projetos de pesquisa sob os Programas Estruturais para pesquisa, desenvolvimento tecnológico e atividades de demonstração, focando os aspectos de segurança dos OGMs, mas também levando em conta o desenvolvimento no campo nesse período. Mais de 200 milhões de euros foram investidos por meio dos Programas Estruturais desde o ano de 2001, desenvolvendo técnicas de manejo agrícola para a coexistência, instrumentos de detecção na constituição, análises para alimentos e rações e métodos para análise de risco dos OGMs, respondendo assim à necessidade de fazendeiros, consumidores, indústria e dos responsáveis pelas políticas.

A boa política, enquanto precisa levar em consideração uma ampla gama de pontos de vista, deve ser baseada na boa ciência. De acordo com isso, continuaremos a apoiar a ciência em biotecnologias, incluindo os OGMs, de modo a garantir que haja evidências disponíveis para um debate construtivo em nossas sociedades.

Uma década de pesquisa em OGM financiada pela UE (2001 - 2010)

Ioannis ECONOMIDIS,
Danuta CICHOCKA,
Jens HÖGEL

Em 2001, a diretoria-geral para Pesquisa e Inovação publicou o primeiro apanhado dos resultados acumulados da 'Pesquisa Patrocinada pela UE sobre Segurança dos Organismos Geneticamente Modificados (OGMs)¹'. Essa publicação incluiu o trabalho apoiado nos 15 anos anteriores, do primeiro ao quinto Programas Estruturais para pesquisa, desenvolvimento tecnológico e atividades de demonstração (FP). Ela apresentou 81 projetos, envolvendo mais de 400 laboratórios e, os resultados cobriram uma variedade de assuntos: transferência horizontal de genes, impacto ambiental de plantas transgênicas, interações planta/micróbio, peixes transgênicos, vacinas recombinantes, segurança de alimentos e outros. A publicação de 2001 atraiu a atenção não apenas da comunidade científica, mas também de reguladores, serviços públicos, organizações não-governamentais e outros interessados.

A Comissão Europeia fornece agora uma sequência a essa publicação, apresentando os resultados e as conclusões de estudos apoiados em Programas Estruturais subsequentes. Além disso, o desenvolvimento do conceito de bioeconomia criou um significativo interesse no acompanhamento e desenvolvimento do debate sobre OGMs, não apenas tratando as preocupações públicas sobre a aplicação da engenharia genética na produção de commodities agrícolas e industriais, mas também oferecendo respostas a desafios para os quais atualmente não há solução disponível.

Esta nova publicação apresenta os resultados de 50 projetos, envolvendo mais de 400 grupos de pesquisa e representando verbas europeias de pesquisa de cerca de 200 milhões de euros. Essa quantia eleva o total de financiamentos da comissão para pesquisa em segurança de GMOs a mais de 300 milhões de euros desde seu início em 1982, no Programa de Engenharia Biomolecular. Além disso, muitos Estados-membros também lançaram suas próprias iniciativas, complementando aquelas coordenadas pelos esforços europeus de pesquisa.

Os 50 projetos de pesquisa podem ser agrupados nas seguintes áreas principais:

- Impactos ambientais dos OGMs;
- OGMs e alimentos seguros;
- OGMs para biomateriais e biocombustíveis – tecnologias emergentes
- Avaliação de riscos e manejo – apoio e comunicação das políticas

É evidente desse agrupamento que muitos dos projetos de pesquisa foram lançados para tratar do desconhecido científico, mas mais importante são as preocupações do público com o potencial impacto ambiental dos OGMs, com a segurança dos alimentos, com a coexistência das culturas GM e não-GM e com estratégias de avaliação de risco. Com a publicação prévia este livro fornece informação de background e descrições dos resultados dos projetos para cientistas e comunidades de regulamentação, assim como para o público. Os resultados e as conclusões desses projetos aumentam nosso conhecimento acumulado, capacitando a comissão e os criadores de políticas em geral a contribuir para o debate internacional e a dar apoio científico às estruturas de regulamentação e iniciativas.

1 Pesquisa sobre Segurança em Organismos Geneticamente Modificados patrocinada pela CE, editada por Charles Kessler e Ioannis Economidis, European Communities, 2001, EUR 19884. Ver também <http://ec.europa.eu/research/quality-of-life/gmo/>

A principal conclusão a ser tirada dos esforços de mais de 130 projetos de pesquisa, abrangendo um período de mais de 25 anos e envolvendo mais de 500 grupos independentes, é que a biotecnologia e, em particular os OGMs, não são, *per se*, de maior risco do que, por exemplo, tecnologias convencionais de melhoramento de plantas. Outra conclusão muito importante é que a pesquisa e as aplicações biotecnológicas de hoje são muito mais diversificadas do que eram há 25 anos, o que também é refletido pelo atual 7.º Programa Estrutural da UE.

Devido à sua grande diversidade, a biotecnologia tornou-se o componente-chave da Bioeconomia Baseada em Conhecimento, um conceito aplicável em uma gama de campos, estendendo-se da produção primária a aplicações industriais e farmacêuticas, e envolvendo tecnologias emergentes, tais com a biologia sintética. O conhecimento biológico moderno é usado para tratar de dificuldades sociais, incluindo a segurança de alimento e rações, o desenvolvimento de plataformas de recursos renováveis para a produção de biomateriais e bio-energia e, fármacos, ao mesmo tempo, para melhorar a sustentabilidade ambiental. Prediz-se que, enquanto o século passado foi transformado com a comercialização de computadores pessoais e o desenvolvimento da internet, o 21.º século será revolucionado pelo nosso crescente entendimento do funcionamento e interação dos sistemas biológicos, seja no nível molecular ou nos ecossistemas.

A biotecnologia não é puramente um exercício acadêmico. Suas descobertas e seus desenvolvimentos serão conduzidos a aplicações e produtos essenciais à sociedade. Entretanto, somente um diálogo estruturado com os criadores de políticas, interessados e o público, baseado em ciência e evidência empírica, irá aplinar o caminho para uma avaliação equilibrada dos benefícios e riscos da biotecnologia e OGMs na estrutura da bioeconomia.

A pesquisa descrita neste volume está centrada nos possíveis riscos associados com o uso dos OGMs em diferentes aplicações biotecnológicas. Baseado em um crescente corpo de evidências de que a biotecnologia não apresenta maior risco do que as tecnologias alternativas, os projetos de pesquisa de hoje financiados pelo FP7 estão agora mais integrados e visam os benefícios tecnológicos potenciais, assim como aos riscos. Um número de interessados, tais como o Grupo Europeu de Ética, facilitou grandemente essa abordagem, fornecendo reflexões e recomendações, como sobre a ética da biologia sintética.

Os esforços de pesquisa neste e em outros campos da biotecnologia continuarão levando em conta as preocupações ambientais, sociais e éticas, ao mesmo tempo em que procurarão soluções para os atuais e futuros desafios.

Capítulo 1 – Impactos Ambientais dos OGMs

Marc VAN MONTAGU
Presidente, Institute of Plant
Biotechnology for Developing
Countries (IPBO)
Ghent University, Belgium
<http://www.ipbo.UGent.be>
<http://www.psb.Ugent.be>
<http://www.efb-central.org>
<http://www.pubresreg.org>

INTRODUÇÃO

Inegavelmente, a tecnologia GM é uma importante ferramenta na luta contra a pobreza global e a insegurança alimentar. Produtores em todo o mundo enfrentam o desafio de duplicar a produção de alimentos para atender às necessidades de uma população que deve alcançar 9 bilhões de pessoas em meados do século – e tudo isso, enquanto mantém a qualidade do solo, da água e conserva a biodiversidade.

O desafio é particularmente amedrontador por precisar ser vencido com diminuição de terra agricultável e lidar com os imprevisíveis efeitos da mudança climática. Neste aspecto, a mitigação e adaptação de culturas para preparar a agricultura de hoje para a mudança climática são questões prementes. Nosso ambiente em evolução requer a pronta e disseminada adoção de práticas agrícolas mais eficientes e sustentáveis para melhorar a segurança alimentar e, ao mesmo tempo, reduzir os efeitos negativos da agricultura intensiva.

A tarefa de melhorar a produtividade pede maior inovação, não apenas a disseminação de conhecimento e o desenvolvimento da infraestrutura, mas também a geração de novas variedades de culturas mais adaptadas a ambientes locais específicos. Já as possibilidades oferecidas pela biotecnologia são ilimitadas. As culturas GM não apenas têm o potencial de assegurar suficiente disponibilidade de alimento, como também podem ajudar a domesticar culturas de alta biomassa, de rápido crescimento.

A produção de matérias-primas renováveis para uso industrial também representa uma alternativa às tradicionais técnicas químicas de manufaturas e tem o potencial de desempenhar um importante papel no crescimento da renda agrícola e redução da pobreza nos países em desenvolvimento. Culturas GM mais nutritivas podem ajudar a saúde do consumidor e trazer benefícios ambientais, como reduzir a necessidade de pesticidas e reduzir a erosão do solo.

Apesar dos benefícios potenciais, o desenvolvimento e uso de culturas GM enfrentou oposição significativa, levantada por medo de implicações sociais adversas e riscos à saúde e ao ambiente. O mais recente ponto, que tem sido debatido extensivamente, foca principalmente no conceito de biotecnologia moderna e as técnicas de engenharia genética usadas para desenvolver essas culturas. O fato de que os humanos podem “engenhar” um gene de uma espécie de um reino para produzir uma espécie de outro estimulou o imaginário e amedrontou o público.

A dispersão no ambiente de “genes estranhos” (por exemplo, os que codificam para a resistência a antibiótico) por meio de transferência horizontal de genes – por dispersão de sementes, fluxo de pólen ou simplesmente reprodução vegetativa – é uma

preocupação importante. O efeito adverso potencial sobre organismos não-alvo, e.g. a borboleta monarca, no caso de culturas modificadas *Bt*-resistentes, é frequentemente mencionado pelos ecologistas.

Mas pode uma cultura GM tornar-se uma “super erva daninha”, devastando nosso habitat num instante? Será que perturbamos o “equilíbrio da biodiversidade natural” mais quando cultivamos culturas GM do que quando mantemos as culturas tradicionais e monoculturas intensivas, onde são usadas grandes quantidades de produtos químicos? A disseminação involuntária e irreversível de genes representa tal perigo e justifica um cenário alarmante?

Como geneticistas moleculares vegetais, fomos relutantes em investir tempo, finanças e energia na avaliação de implicações das culturas GM. Para nós, nosso planeta é um grande conjunto genético natural onde todos os organismos vivos continuamente ativam e desativam genomas em resposta a estresses ambientais percebidos. A adaptação, sobrevivência e evolução das plantas dependem de sua habilidade de alterar genomas por meio da transposição dos elementos móveis, acúmulo de deleções, das inserções e ampliações gênicas e mutações pontuais.

Estudos genômicos da última década demonstraram que um genoma não é uma entidade estática, mas uma estrutura dinâmica que continuamente refina seu conjunto de genes. Portanto, para um cientista em genética, o ato de transformá-lo para gerar um organismo transgênico é um passo modesto quando comparado a todas as mudanças genômicas induzidas pelos ‘cruzamentos’ e eventos do melhoramento empregados na agricultura e na pecuária. Os instrumentos da biologia molecular apenas adicionam precisão, velocidade e um novo alcance a esse indispensável processo de domesticação das espécies.

Foi, portanto, uma surpresa para muitos cientistas descobrir que a opinião pública não “aderiu” a essa linha de raciocínio. Alguns grupos de interesse europeus até se opuseram à ideia de culturas GM com zelo religioso. O Princípio da Precaução – que alguns interpretam como dizendo que, se uma linha de ação implica mesmo numa remota chance de dano irreparável, então não se deve segui-la, não importando quão grandes possam ser os benefícios – deu aos europeus uma firme base filosófica para dizer não aos OGMs. Líderes políticos e funcionários públicos nos Estados-membros e as instituições da UE foram mal preparados para esse apelo emocional.

Enfrentar o desafio para “provar que as culturas GM são seguras” não é tão fácil. Parece uma questão científica, mas não é. A ciência pode certificar a existência de perigo, mas não a sua ausência. Mais ainda, os cientistas continuarão a questionar quaisquer resultados negativos que apareçam e certamente haverá reconhecimento para aqueles que identifiquem evidências de danos. A afirmação por um especialista de que uma variedade 100% GM aprovada para comercialização não é nem mais nem menos um problema ambiental ou de saúde do que sua cultura parental não responderá à questão.

O mundo da ciência deixou de dar-se conta de que não era suficiente apenas dizer que a agricultura intensiva causa ruptura ambiental, independentemente da cultura ser GM ou não e, que de qualquer modo podemos desenvolver novas variedades GM que sejam mais benéficas ao ambiente. A sociedade precisa de evidências de estudos que apoiem tais afirmações.

Agora, após 25 anos de testes de campo sem evidência de dano, o medo continua a acionar o Princípio da Precaução. Mas, a Europa precisa abandonar essa postura

reconhecidamente unilateral e chegar a um equilíbrio entre as vantagens e desvantagens da tecnologia com base em análises de avaliação de risco cientificamente corretas.

É por essa razão que a diretoria-geral para Pesquisa e Inovação merece congratulações por iniciar, apoiar e dirigir a pesquisa apresentada nesta publicação. Identificar e motivar os grupos de pesquisa responsáveis por estes resultados não é uma tarefa fácil. Foi essencial assegurar que apenas a melhor metodologia científica fosse aplicada, empregando pesquisa molecular conduzida em estreita colaboração com experientes ecologistas de campo.

Estes projetos de pesquisa trataram de aspectos-chave do melhoramento de culturas, tais como a resistência a patógenos – de fungos (EURICE) e vírus (TRANSVIR) a nematóides (NONEMA) – eficiência no uso de nitrogênio (SUSTAIN), e o uso de microorganismos transgênicos como biofertilizantes (ECOSAFE) e como biossensores para o monitoramento de biorremediação (RHIZOREMEDIATION).

Além das inovações prova-de-conceito em biotecnologia, os cientistas usaram abordagens multidisciplinares para entender a natureza e o impacto dos OGMs sobre o ambiente. Avaliaram uma ampla gama de culturas vegetais, assim como os diferentes aspectos da Avaliação de Risco Ambiental (ERA), do fluxo de genes em um centro de diversidade de uma cultura (POTATO TRAITS FOR AN) à transferência horizontal de genes (CIMES) e efeitos sobre organismos não-alvo (BT-BioNoTa) e ecologia do solo (ECOGEN, POTATOCONTROL).

Vários projetos focalizaram medidas para evitar o impacto ambiental e resultados significativos foram obtidos em uma nova seleção que não usa genes para resistência a antibióticos (ECOTUB), na contenção biológica (CONFLOW) e em mudanças epigenéticas induzidas ambientalmente (AENEAS). A coexistência de tipos diferentes de culturas também foi investigada, com recomendações em medidas para coexistências mais eficientes em custo (SIGMEA).

A qualidade dos resultados mostra que a iniciativa da diretoria-geral para Pesquisa e Inovação alcançou seus objetivos. O que foi entregue, incluindo cerca de uma centena de publicações com revisão por seus pares, será inestimável para pesquisadores em instituições públicas, assim como para especialistas em avaliação de risco e manejo de risco, não apenas na Europa, mas em outros lugares, especialmente em países em desenvolvimento. Compilar e submeter dossiês de regulamentação colocaria uma carga desnecessária no setor público com companhias iniciantes e, ironicamente, favoreceria corporações multinacionais e atrasaria o avanço da ciência e da tecnologia.

Atualmente, estudos como estes sobre o impacto ambiental são o único modo de diminuir a carga regulatória, restaurar a confiança na ciência e na tecnologia e desenvolver aplicações práticas. Somente a ciência, usando dados confiáveis, pode desarmar os detratores desta poderosa e inestimável tecnologia, demonstrando que as culturas GM não são mais prejudiciais ao ambiente do que qualquer outra cultura. Ao contrário, há benefícios ecológicos claros quando vistas dentro da perspectiva do papel dos sistemas agrícolas na manutenção da biodiversidade.

O atual foco na avaliação dos riscos ambientais de OGMs isoladamente de outras práticas agrícolas desafia a lógica. Somente análises equilibradas de risco-benefício e estratégias proativas de mitigação de risco, se necessárias, podem levar a uma construtiva tomada de decisão. A pesquisa descrita nesta publicação representa inestimável insumo para a estrutura regulatória e para as regras de coexistência.

Neste sentido, os dados objetivos aqui apresentados ajudarão a reduzir os custos da Avaliação de Riscos Ambientais na liberação futura de culturas GM e microorganismos, assim como na identificação de prioridades para estudos posteriores.

Arroz europeu: transgenes para proteção de culturas contra doenças fúngicas

<i>Acrônimo</i> EURICE <i>Acrônimo do Programa</i> FP5-LIFE QUALITY <i>Numero do contrato</i> QLK5-CT1999-01484 <i>Período</i> Março 2000 – Fevereiro 2003	<i>Coordenador</i> Elisabetta LUPOTTO CRA – Agricultural Research Council Rice Research Unit s.s.11 a Torino km 2.5 I-13100 Vercelli – Italy elisabetta.lupotto@entecra.it
---	---

<i>Parceiros</i> David B. COLLINGE Royal Veterinary and Agricultural Research University (DK) Michael R. DAVEY University of Nottingham (UK) Didier THARREAU Centre de Cooperation Internationale en Recherche Agronomique pour le Developpement (FR) Ulrich SCHAFFRATH Rheinisch-Westfalische Technische Hochschule Aachen (DE)	Dimitrios NTANOS NAGREF – Cereal Institute (EL) Blanca SAN SEGUNDO Centre for Research in Agricultural Genomics (ES) Joaquima MESSEGUER Centre for Research in Agricultural Genomics (ES) Corrado FOGHER Plantechno (IT)
---	--

BACKGROUND E OBJETIVOS

A brusone do arroz é uma importante fonte de dano à cultura na Europa, causada pelo fungo patogênico *Magnaporthe grisea* (*M.oryzae*). É um fungo altamente especializado e extremamente virulento ao arroz, atacando a planta no estado vegetativo (podridão da folha) assim como no estado reprodutivo (podridão do colo ou da panícula). Na Europa, as variedades de arroz são geralmente obtidas aproveitando a *O.sativa* temperada *japonica* ssp. e, em geral são sensíveis a moderadamente resistentes à brusone. Além disso, o *M.oryzae* está rapidamente evoluindo para novos patótipos e variedades resistentes mostram rapidamente perda de resistência em poucos anos. A proteção química e a resistência genética são os instrumentos mais eficientes disponíveis no combate ao patógeno.

A expressão constitutiva de genes antifúngicos em plantas transgênicas também tem sido provada como estratégia útil na produção de plantas resistentes à doença. O resultado varia, mas a resistência obtida com genes antifúngicos vegetais não contribuiu para a obtenção de variedades resistentes à doença. Entretanto, o uso de genes de origem não vegetal resultou em maiores níveis de resistência e/ou proteção de amplo espectro e, genes promotores constitutivos para acionar a expressão de um gene antifúngico podem ser adequados para experimentos de prova-de-conceito para avaliar a eficiência da expressão de transgenes.

Entretanto, essa abordagem apresenta um número de desvantagens potenciais se usada em culturas geneticamente melhoradas. Além da indutibilidade do patógeno, o

promotor usado para acionar a expressão do transgene não deve ser ativo em órgãos comestíveis. Em vez disso, a produção controlada do composto antifúngico pelo patógeno no sítio, onde e apenas quando o produto do transgene é necessário, representa uma estratégia mais desejável para a proteção contra patógenos.

O Projeto EURICE propôs usar uma abordagem transgênica no controle do brusone para melhorar e avaliar genes agindo como instrumentos antifúngicos durante o ataque de fungos, visando reduzir o uso de produtos químicos na proteção da cultura. A abordagem foi identificada ou como um instrumento para a obtenção avançada de novas variedades ou como uma medida específica dirigida para proteger variedades de elite já existentes que são difíceis de cultivar sem pesado tratamento químico. As variedades de arroz escolhidas para este estudo eram representativas dos principais produtores e arroz da Europa: Itália, Espanha, Grécia e França.

A abordagem tinha os seguintes objetivos gerais:

- identificar e usar genes antifúngicos eficientes de várias origens;
- expressá-los apenas em condições especiais sob promotores indutíveis;
- validar sua eficiência contra *M.oryzae*;
- usar plantas GM para monitorar o fluxo gênico e distribuição no ambiente.

No geral, o projeto objetivou identificar uma estratégia GM válida e segura em termos de proteção de culturas na Europa.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

Genes que se expressam após ataque de fungos, caracterizados previamente e clonados de diversos organismos, foram escolhidos com fonte potencial de resistência. Os genes selecionados foram: o gene *afp*, isolado do fungo *Aspergillus giganteus*, o gene de insetos antifúngico *CecA* que codifica a proteína antimicrobiana Cecropin A, e um gene vegetal, o gene do milho *b32* que codifica uma RIP (Proteína Inativadora de Ribosoma), uma albumina de endosperma comumente presente na semente do milho.

Ensaio transitório foram estabelecidos para testar a eficiência dos promotores indutíveis em cassetes de expressão *gus*, para identificar os mais adequados. Os três genes foram primeiramente inseridos em vetores de expressão de um modo constitutivo para monitorar sua expressão *in planta*. Para esse fim, os promotores *CaMV 35S* e *Ubiquitina-1* foram usados e sua presença foi verificada nos tecidos verdes de todas as plantas transgênicas.

O passo seguinte foi a construção de vetores de expressão nos quais os genes antifúngicos mais eficientes – o *afp* e o *CecA* – foram colocados sob o controle dos promotores indutíveis derivados de genes de cevada e milho. Plantas transgênicas foram subsequentemente regeneradas, caracterizadas no nível molecular e, levadas à homozigose em três gerações de autofecundação. Linhas transgênicas homozigóticas foram testadas com inoculações de *M.grisea* (*M.oryzae*) sob condições controladas e em ensaios com folhas destacadas. Genótipos parentais de arroz também foram testados no campo para estabelecer as melhores condições para os testes finais de campo. Plantas transgênicas de arroz, também portando o gene de resistência a herbicida *bar*, permitindo uma seleção fácil de manejar *in vitro*, foram usadas para experimentos de campo para controlar o fluxo gênico no ambiente. Os experimentos foram conduzidos na Espanha e na Itália, de acordo com a legislação atual.

PRINCIPAIS DESCOBERTAS E RESULTADOS

Foi constatada a proteção do arroz contra doenças fúngicas causadas por *Magnaporthe grisea*, usando genes sintéticos antifúngicos codon-otimizados expressos em altos níveis na planta: o gene (*afp*) da proteína antifúngica originário do bolor *Aspergillus giganteus* e o gene da *Cecropina A (CecA)* originário da mariposa gigante da seda *Hyalophora cecropia* foram os mais eficientes, enquanto o gene *b32* do milho foi ativo em menor extensão. A possibilidade de modular a expressão do gene para defesa por meio de promotores indutíveis, principalmente as sequências do promotor indutível do milho e da cevada, foi também constatada. O promotor de milho *ZmPR4* foi ativado nos sítios de invasão do patógeno na folha do arroz, mas esse promotor não estava ativo no tecido do endosperma da semente madura do arroz. Plantas de arroz que expressam o gene *afp* sob controle do promotor *ZmPR4* do milho apresentavam resistência a fungo do brusone, *M. grisea*. Ferramentas moleculares, bioquímicas e histológicas para rápido monitoramento e avaliação da resistência do arroz e em arroz GM contra patógenos (bioensaios) também foram criadas. Finalmente, o risco do fluxo gênico entre o arroz GM e a variedade erva daninha de arroz sob condições de campo foi avaliado e, condições experimentais para um experimento ambientalmente seguro foram criadas.

CONCLUSÕES

O protejo atingiu os objetivos propostos e, os resultados obtidos podem proporcionar insumos para o conhecimento sobre plantas GM, como base para regulamentações e desenvolvimento de planos para uma coexistência nacional entre os Estados-Membros. Também foi adquirido know-how para uma futura exploração dos genes de defesa nos programas de melhoramento europeus. A eficiência dos genes de defesa e a disponibilidade de uma resposta acionada por promotores indutíveis representa o principal resultado do projeto.

Principais publicações

COCA M., BORTOLOTTI C., RUFAT M., PENAS G., ERITJA R., THARREAU D., MARTINEZ del Pozo A., MESSEGUER J., SAN SEGUNDO B. (2004). Transgenic rice plants expressing the antifungal AFP protein from *Aspergillus giganteus* show enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Molec. Biol.* 54:245-259.

ZABBAI F., JAROSCH B., SCHAFFRATH U. (2004). Overexpression of chloroplastic lipoxygenases RC11 causes PR1 transcript accumulation in transiently transformed rice. *Physiol. and Molec. Plant Pathol.* 64:37-43.

MORENO A.B., PENAS G., RUFAT M., BRAVO J.M., ESTOPA M., Messeguer J., SAN SEGUNDO B. (2005). Pathogen-induced production of the antifungal AFP protein from *Aspergillus giganteus* confers resistance to the blast fungus *Magnaporthe grisea* in transgenic rice. *Mol. Plant Microbe Inter.* 18:960-972.

COCA M., PENAS G., GOMEZ J., CAMPO S., BORTOLOTTI C., MESSEGUER J., SAN SEGUNDO B. (2006). Enhanced resistance to the blast fungus *Magnaporthe grisea* conferred by expression of a Cecropin A gene in transgenic rice. *Planta* 223:392-406.

KATSANTONIS D., KOUTROUBAS S.D., NTANOS D.A., LUPOTTO E. (2007). A comparison of three experimental designs for the field assessment of resistance to rice blast disease (*Pyricularia oryzae*). *J. Phytopathol.* 155:204-210.

Tornando as plantas resistentes a nematóides parasitas de plantas: sem acesso – sem alimentação

<i>Acrônimo</i> NONEMA <i>Acrônimo do Programa</i> FP5-LIFE QUALITY <i>Número do contrato</i> QLK5-CT-1999-1501 e QLK5-2001-02855 (extensão NAS) <i>Período</i> Fevereiro 2000 – Janeiro 2004	<i>Coordenador</i> Hans HELDER Nematology Laboratory University of Wageningen PO Box 8123 10, Binnenhaven 10 NL-6701 ES Wageningen The Netherlands Hans.Helder@wur.nl
--	---

<i>Parceiros</i> John WHITE Durham University (UK) Rudy DE KEYSER Flanders Interuniversity Institut for Biotechnology vzw (BE) Włodzimirz KLUCINSKY Warsaw Agricultural University (PL)	Jean-Michel RABASSE Institut Nationale de la Recherche Agronomique (FR) Karin-Barbara SPINDLER Christian-Albrechts Universitat zu Kiel (DE) Herman VAN MELLAERT Cropdesign NV (NL) John HILLMAN Scottish Crop Research Institute (UK)
--	---

BACKGROUND E OBJETIVOS

Para garantir um suprimento constante, acessível e de alta qualidade de alimento aos cidadãos europeus é essencial uma agricultura em grande escala semi-industrial. Um dos mais indesejáveis efeitos colaterais da produção nessa escala é sua atração ou – visto por uma perspectiva diferente, sua vulnerabilidade – aos patógenos de vegetais. As culturas exóticas são as mais vulneráveis espécies de plantas que não evoluíram no continente europeu. Exemplos disso são a batata e o tomate que se originaram na América do Sul; a beterraba açucareira, que se originou no Mediterrâneo, mas é cultivada em toda a Europa; e o milho, uma espécie de planta importada da América Central. Resumidamente, a produção agrícola em larga escala é impossível sem um manejo adequado dos fatores bióticos que ameaçam nossas culturas, tais como fungos, oomicetos, nematóides e insetos.

Nematóides parasitas de plantas constituem uma categoria bastante problemática de patógenos por viverem principalmente no solo. Assim, os nematóides não parasitas que constituem uma importante, se não essencial, parte da cadeia alimentar do solo. Muitas culturas, incluindo a beterraba açucareira e uma gama de hortaliças, incluindo a batata, são atacadas pelos nematóides parasitas de plantas e, esses pequenos organismos do solo causam dano primário substancial, *viz* baixas produtividades e baixa qualidade do produto.

O controle químico usando nematicidas é uma prática comum para proteger as culturas. Infelizmente, não existem nematicidas *sensu stricto* e, fumigantes usados para controlar nematóides são, de fato, biocidas. Portanto, o controle químico de nematóides é acompanhado de dano colateral substancial, *viz.*, matar a vida do solo.

No caso da acetilcolinesterase ser aplicada, esse dano é restrito a organismos com um sistema nervoso que usa a acetilcolina como neurotransmissor. No caso de fumigantes, não há restrição nenhuma; todos os organismos que entram em contato com esses produtos químicos são mortos. Em suma, o dano causado pelas tentativas de controle de nematóides é pelo menos tão sério quanto o dano primário causado por esses patógenos. Restringir o uso de nematicidas naturalmente reduziria os danos secundários causados por eles. Entretanto, os nematóides de cistos e nódulos de raiz são parasitas altamente bem-sucedidos e, uma agricultura viável e competitiva requer o controle de suas populações.

Uma das alternativas poderia ser o uso de genes de resistência naturais da planta; vários genes de resistência relevantes (R) foram identificados nas últimas décadas, e uns poucos foram clonados recentemente. Entretanto, transferir a resistência de uma espécie de planta para outra está longe de ser direta e simples, porque isso representa apenas um componente inicial de um longo caminho de transdução de sinais, na maioria dos casos resultando em uma resposta local de hipersensibilidade.

O objetivo do NONEMA, que se soma aos projetos EC-BIOTECH e EC-FAIR, tem sido identificar elementos cruciais na interação compatível entre os nematóides parasitas de plantas e as plantas e, construir resistência ampla e durável contra nematóides de nódulos e cistos de raiz. Bloqueando elementos específicos múltiplos na interação da planta e esses nematóides, a resistência forte e durável da planta hospedeira estará disponível como um resultado. Como a resistência será baseada na ruptura de elementos básicos nas interações planta-nematóide, os resultados do NONEMA também fornecerão meios de criar resistência contra outros nematóides parasitas de plantas.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

A 'raison d'être' do projeto NONEMA era o fato de que a esterilização química do solo e o uso de pesticidas não seletivos para controlar nematóides parasitas de plantas são ainda prática comum em muitos países europeus, sem nenhuma alternativa realista disponível. A resistência duradoura do hospedeiro será criada pelo bloqueio de um número de passos no ciclo de vida do nódulo de raiz (*Meloidogyne spp*) e nematóides de cisto (*Globodera e Heterodera spp*). Experiências recentes com abordagens biotecnológicas mostraram que a resistência a organismos tais como nematóides e fungos é difícil de se obter usando um único fator de resistência. Em muitos casos a interação é complexa e o patógeno parece ter rota de escape inesperada. Neste projeto, a resistência será assegurada pela prevenção da penetração na planta ("sem acesso") assim como da alimentação ("sem alimentação"). Para cada um desses estágios do ciclo de vida, múltiplos alvos devem ser identificados e avaliados quanto a sua eficiência em conferir resistência durável.

Sem acesso. Sendo endoparasitas, formas jovens de ambos os nematóides de cisto e nódulo necessitam entrar na raiz da planta e migrar para o ponto onde formam seu sítio de alimentação. Os nematóides jovens estão equipados com uma agulha oca retrátil – um estilete – que é usado para furar as paredes das células. Além disso, os jovens secretam enzimas que degradam a parede celular, tais como as β -1,4-endoglucanases. Consequentemente, anulando essas enzimas resultaria numa incapacidade de penetrar na raiz de um hospedeiro potencial.

As primeiras celulasas de um nematóide (e mesmo de um animal) foram identificadas e caracterizadas por Smant *et al.* (1998) em nematóides de cisto em batata e soja. A descoberta dessas inesperadas enzimas endógenas de degradação de parede celular constituiu-se no ponto de partida para um levantamento entre muitos outros

nematóides parasitas de plantas. Todos os principais nematóides parasitas de plantas pareciam abrigar um espectro de genes que codificavam enzimas e proteínas de degradação de parede celular ou de afrouxamento da parede celular.

Após a penetração na rizoderme, os nematóides de nódulos migram entre as células, enquanto os nematóides de cisto migram por dentro das células até o feixe vascular. Nesse estágio a planta inicia seu mecanismo de defesa, produzindo espécies ativas de oxigênio (AOS) numa tentativa de matar o organismo invasor. Os nematóides secretam enzimas protetoras de alimentação (peroxidases, superóxido dismutase) para inativar os AOS. A migração do nematóide para no momento que uma célula é encontrada e é adequada como ponto de partida para a formação do sítio de alimentação.

Sem alimentação. O desenvolvimento e a reprodução do nematóide depende de uma bem-sucedida formação de um sítio de alimentação. A degeneração dessa exclusiva fonte de alimento é letal para o nematóide. A reativação do ciclo celular na célula inicial de alimentação é uma parte integral da indução da célula. Os nematóides de nódulo dependem da formação de 2-12 células gigantes, contendo cada uma 30-60 núcleos. Este é o resultado da mitose acitocinética induzida pelo nematóide. Usando inibidores do ciclo celular, demonstra-se que, tanto para o nematóide de nódulo como no de cisto, a reativação do ciclo celular não é um aspecto facultativo da formação da célula de alimentação, mas antes um elemento essencial nesse processo (de Almeida Engler *et al.* 1999). A resistência baseada no conceito “sem alimentação” será baseada em uma expressão dirigida de inibidores do ciclo celular. Os nematóides de cisto usam (ou abusam de) enzimas vegetais para fomentar a indução celular por uma altamente coordenada ruptura local da parede celular. O resultado é um sinstício, um conglomerado de protoplastos fundidos.

Outra meta importante do NONEMA foi a identificação de enzimas de degradação da parede celular da planta e das chamadas expansinas - enzimas envolvidas na desmontagem da parede celular induzida pelo nematóide. Uma vez que seja conhecido quais enzimas são empregadas para a proliferação do sinstício, a resistência será obtida pela inibição no nível do RNA ou da proteína.

Direcionamento . Além da identificação do alvo, NONEMA visou identificar promotores que sozinhos – ou mais provavelmente, em combinação – levariam ao preciso local e à expressão direcionada dos genes antinematóides.

Tabela 1

Panorama dos genes que codificam as enzimas de degradação da parede celular encontradas na espécie de nematóide de nódulos de raiz do Sul, *Meloidogyne incognita*, quando comparado com um nematóide bacterívoro, *Caenorhabditis elegans*.

Componente de parede celular	Nematóide	<i>M. incognita</i> (parasita de plantas)	<i>C. elegans</i> (bacterívoro)
Celulose	GH5 (cel)	21	0
Xilanase	GH5 (xil)	6	0
Arabinase	GH43	2	0
Pectinase	GH28	2	0
Pectato liase	PL3	30	0
Expansina	EXPN	20	0

(baseado em Abad *et al* (2008) *Nature Biotechnology* 26, 909 – 915).

PRINCIPAIS DESCOBERTAS E RESULTADOS

Um grande esforço de pesquisa foi empreendido na identificação e caracterização funcional de fatores de patogenicidade de nematóides de cisto e de nódulos de raiz. Nematóides parasitas de plantas empregam enzimas degradadores da parede celular para conseguir acesso a sua planta hospedeira. Após o final do projeto NONEMA, um dos parceiros, INRA Sophia-Antipolis da França, iniciou um projeto de sequenciamento de genoma do nematóide de nódulo de raiz do sul, *Meloidogyne incognita*. Esse importante passo para o entendimento da interação entre os nematóides de nódulos da raiz e seus hospedeiros revelou o espectro completo das proteínas degradadoras e modificadoras da parede celular (# = 81) usadas pelo nematóide de nódulo da raiz para explorar seus hospedeiros (Tabela 1).

Além disso, padrões de expressão de uma gama de genes de ciclo celular dentro e em torno de estruturas de alimentação induzidas por nematóides foram caracterizadas, incluindo as endoglucanases β -1,4 e as expansinas de vegetais que são recrutadas pelos nematóides de cisto durante a proliferação dos sinstícios. No volume de trabalho sobre direcionamento, estudos de deleção foram conduzidos em promotores que haviam sido identificados em um projeto EC anterior (ARENA; BIO4-CT96-0318). Isso resultou na identificação de fragmentos de promotores responsivos a nematóides que podem ser usados para impulsionar a expressão da proteína ou construção de dsRNA que poderiam inibir a invasão ou o estabelecimento de nematóides em um sítio de alimentação.

Durante o projeto NONEMA, os esforços de pesquisa foram gradualmente mudando da identificação de fatores de patogenicidade de nematóides de cisto e nódulo de raiz para a determinação do seu papel biológico e avaliação de sua importância relativa. A interferência do RNA, a degradação de mRNAs específicos pela exposição a RNA de dupla espiral homólogo, são ferramentas úteis para anular fatores individuais de patogenicidade em nematóides.

Foi alcançado um progresso encorajador no desenvolvimento de um protocolo para degradar mRNAs que estão (principalmente) residindo nas glândulas do esôfago dos nematóides infestantes. Para a geração de plantas resistentes a nematóides, o silenciamento pós-transcricional de genes (PTGS) parece ser uma abordagem prometedora, eficiente em tempo e trabalho. Os parceiros do projeto iniciaram transformação vegetal baseada em PTGS visando ou ao fator de patogenicidade do nematóide ou aos genes da planta recrutados pelo nematóide invasor. Paralelamente, um número de promotores de *Arabidopsis* foi identificado e mostra padrões de expressão similares em tomate.

Finalmente a prova-de –conceito – que a anulação de fatores específicos de patogenicidade resulta em resistência da planta hospedeira – foi apresentada. A batata foi transformada com as chamadas construções grampo que codificam RNA contra dois fatores de patogenicidade produzidas por formas juvenis infestantes do nematóide do cisto da batata, *Globodera rostochiensis*. Em ambos os casos, as plantas transformadas pareciam normais e várias linhas foram selecionadas e que eram resistentes *de facto* aos nematóides do cisto da batata. A resistência da planta hospedeira foi criada pelo silenciamento de genes vegetais, *viz.* genes que eram ativamente recrutados pelo nematóide invasor. Em duas abordagens diferentes, o silenciamento de genes de ciclo celular e enzimas degradadoras da parede celular (CWDE) resultou em um nível significativo de resistência; no caso dos genes de ciclo celular, a redução foi de cerca de 70%; no caso de CWDE, as fêmeas em desenvolvimento não continham ovos viáveis. Com isso, os esforços de pesquisa do NONEMA identificaram alvos em nematóides e plantas específicos que se mostraram

eficientes como instrumentos para criar resistência na planta hospedeira com limitados ou nenhum efeito indesejável na condição da planta hospedeira.

CONCLUSÕES

Essencialmente, há dois direcionamentos para o controle de nematóides endoparasitas mediado por engenharia genética: o nematóide ou seu sítio de alimentação. A estratégia antinematóide visa interferir com sua fisiologia, desenvolvimento ou comportamento para bloquear a invasão da raiz da planta, migração, formação do sítio de alimentação ou a alimentação. Até agora, uma gama de componentes antinematóides foi testada, incluindo exotoxinas de *Bacillus thuringiensis*, lectinas e peptídeos com propriedades de inibição da acetilcolinesterase.

No campo da engenharia de plantas para resistência a nematóides, o uso de inibidores de protease tem recebido grande atenção. Inibidores de serina e cisteína proteases serina e cisteína proteases (e seus derivados) produzidos em várias plantas, se mostraram capazes de interferir com as proteinases digestivas dos nematóides parasitas de plantas. Essa abordagem antialimentação bastante genérica levantou preocupações sobre sua segurança ambiental. Cowgill *et al.* (2002) mostraram que o risco de cistatinas aos invertebrados não-alvo depende do nível de expressão. Embora experimentos de campo recentes nos Andes Centrais com a batata transgênica não tenham detectado dano a organismos não-alvo, ocorreu o fluxo gênico a espécies silvestres da batata.

Nesta pesquisa identificamos proteínas expressas nas glândulas dorsais esofageanas dos nematóides de cisto e nódulo de raiz. Essas glândulas são cruciais para a indução do sítio de alimentação na raiz da planta. Mostramos que a inibição baseada no RNA de dupla espiral da biossíntese de algumas dessas proteínas pode levar a resistência da planta hospedeira.

Alternativamente, o desenvolvimento da célula de alimentação pode ser obstruído pela expressão de citotoxinas ou por impedir o recrutamento dos genes envolvidos na indução do sítio de alimentação. Os nematóides sedentários endoparasitas dependem completamente de um sítio de alimentação para seu crescimento e desenvolvimento e, no caso dos nematóides de cisto, o mau desenvolvimento do sinstício resultará em uma população fortemente desequilibrada em favor de machos e com resistência da planta. A indução e proliferação da célula de alimentação são obtidas por uma drástica mudança local na expressão dos genes da planta. Uma proporção substancial dos chamados genes de suscetibilidade é essencial para a planta hospedeira (e.g. genes envolvidos na reativação do ciclo celular) e a manipulação de tais genes irá previsivelmente dar origem a efeitos não intencionados indesejáveis. Entretanto, a manipulação de membros individuais de famílias de genes irá, em alguns casos, ter pequeno ou nenhum efeito na adequação da planta. Demonstramos aqui a perda de suscetibilidade de plantas de batata aos nematóides do cisto da batata, devido à manipulação de duas endoglucanases que são aparentemente essenciais para a indução do sinstício, na ausência de um fenótipo aberrante da planta.

Portanto, mostra-se que o conhecimento detalhado sobre a interação molecular entre a planta e o patógeno pode levar à identificação do seu calcanhar de Aquiles. O silenciamento baseado no RNA de dupla espiral de genes da planta ou do nematóide pode ter um drástico impacto no desenvolvimento do nematóide. Essa abordagem ilustra que o controle do patógeno pode ser obtido sem o uso de componentes tóxicos exóticos. Antecipamos que nossa abordagem interação-específica possa facilitar a aceitação do público quanto a soluções baseadas em engenharia genética para problemas de pragas e patógenos.

Principais publicações

ABAD *et al.* (2008). Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nature Biotechnology* 26:909 – 915 (NONEMA Partners P2, P1, P2, P4).

GHEYSEN G. and VANHOLME B. RNAi from plants to nematodes. *Trends in Biotechnology* 25(3):89-92 (NONEMA Partner P2).

QIN, L., KUDLA, U., EHA, R.; GOVERSE, A.; POPEIJUS, H.; NIEUWLAND, J.; OVERMARS H., JONES, JT.; SCHOTS, A.; SMANT, G.; BAKKER, J.; HELDER, J. (2004). Plant degradation: A nematode expansin acting on plants. *Nature* 427:30 (NONEMA Partners P1 and P4).

KARCZMAREK, A., FUDALI, S., LICHOCKA, M., SOBCZAK, M., KUREK, W., JANAKOWSKI, S., ROOSIEN, J., GOLINOWSKI, W., BAKKER, J., GOVERSE, A. and HELDER, J. (2008). Expression of Two Functionally Distinct Plant Endo-2-beta-1,4- Glucanases is Essential for the Compatible Interaction between Potato Cyst Nematode and Its Hosts. *Mol. Plant- Microbe Interact.* 21(6):791-798. (NONEMA Partners P1 and P7).

WIECZOREK, K.; HOFMANN, J.; BLOCHL, A.; SZAKASITS, D.; BOHLMANN, H.; M. W. G. F. (2008). *Arabidopsis* endo-1,4-b -glucanases are involved in the formation of root syncytia induced by *Heterodera schachtii*. *The Plant Journal* 53(2):336-51 (NONEMA Partner P.10).

Avaliando novas características de batata nos Andes Centrais com foco apropriado na pobreza

<i>Acrônimo</i> CARACTERÍSTICAS DA BATATA PARA AN <i>Acrônimo do Programa</i> FP5-INCO 2 <i>Número do Contrato</i> ICA4-2000-30019 <i>Período</i> Novembro de 2000 – Outubro de 2003	<i>Coordenador</i> Howard J. ATKINSON Centre for Plant Sciences University of Leeds Leeds LS2 9JT United Kingdom h.j.atkinson@leeds.ac.uk
---	---

<i>Parceiros</i> R. VISSER Wageningen Agricultural University (NL) J. FRANCO Promocion e Investigacion de Productos Andinos Cochabamba (BO)	E. CARBONELL Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) Lima (PE)
--	--

BACKGROUND E OBJETIVOS

O Conselho Nuffield de Bioética sugeriu que a possível introgressão de material genético estranho em espécies relacionadas em centros de biodiversidade de culturas é justificativa insuficiente para barrar a implementação de culturas GM em países em desenvolvimento. O conselho considera que aplicar a abordagem da precaução, renunciando a possíveis benefícios, lembra a falácia de pensar que não fazer nada em si evita qualquer risco para os pobres. O projeto estudou clones de batata GM resistente a nematóides que expressam o inibidor de cisteína proteinase (cistatina) como um exemplo de uma característica benéfica para os produtores de subsistência. Parte do estudo considerou aspectos de biossegurança ambiental para a batata GM em seu centro de biodiversidade, os Andes Centrais. A meta do projeto era desenvolver a base científica com a qual julgamentos pesando benefícios e preocupações possam ser conduzidos.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

O projeto estudou os efeitos ambientais de cistatinas em organismos não-alvo, mas não as questões de segurança alimentar, porque um caso prima facie para a segurança alimentar das cistatinas já havia sido estabelecido. Ele também considerou o risco ambiental particular do fluxo de genes da batata GM para as espécies silvestres. Os Andes Centrais são um centro de diversidade para a cultura da batata com cerca de 130 espécies silvestres de batata reconhecidas no Peru e na Bolívia.

PRINCIPAIS DESCOBERTAS E RESULTADOS

O estudo visou sustentar a biossegurança dos futuros testes de campo com plantas de batata GMNR-cistatina na América do Sul. Foi determinado o perfil fisiológico no nível da comunidade de bactérias da rizosfera na colheita, usando métodos que já haviam detectado tais efeitos para batata que expressava outro transgene. Cultivares de batata GMNR-cistatina obtidos para uso futuro na Bolívia não impuseram mudanças nesse perfil quando comparados com plantas não transformadas em testes de casa de vegetação. Essa ausência de efeito da cistatina contrasta com nossos resultados para

o solo da rizosfera de diferentes culturas convencionais plantadas em um campo experimental na Bolívia. A análise de agrupamento determinou que tal solo era associado aos cultivares nativos, mas distinto do qual a batata cultivar 'Desiree' ou fava ou tremoço estavam plantados.

Um teste de campo no Reino Unido também estabeleceu que a batata GMNR-cistatina não influencia a densidade ou o número de espécies de nematóides do solo sob a cultura madura da batata. A batata GMNR-cistatina não perturbou o índice de maturidade baseado na proporção entre as espécies colonizadora e persistente na comunidade de nematóides do solo. Isso contrastou com o efeito da aplicação de nematicida pré-plantio, o que favoreceu as espécies de crescimento rápido, vários meses depois.

Isso sugere que as populações de organismos do solo não seriam prejudicadas em um local de experimentos. Também sugere que os requisitos do princípio da precaução seriam atendidos com qualquer maior adoção de plantas GM, uma vez que não impõem maior impacto sobre o ambiente do que surge com as práticas agrícolas já comuns.

Com relação ao risco de fluxo gênico, seis espécies silvestres foram selecionadas para determinar se o fluxo gênico poderia ocorrer a partir dos testes de campo com a GMNR-cistatina. A seleção foi baseada em um levantamento preliminar em quatro zonas agro-ecológicas no Peru, para definir exemplos de espécies de *Solanum* que ocorrem próximo aos testes com batata. Primeiramente, foi confirmado que as acessões realmente se cruzavam como relatado previamente, em alguns casos usando força, polinizando-as à mão com variedades locais Andigenum, do grupo de cultivares *S. tuberosum* e cultivares melhoradas. As plântulas das sementes produzidas foram analisadas com marcadores AFLP e foram identificados híbridos envolvendo todas as seis espécies.

Como a polinização à mão pode não representar a polinização cruzada natural com confiança, estabelecemos cinco testes de campo de polinização aberta em diferentes zonas agroecológicas em Puno, Junin, Cajamarca e Cusco. Os resultados de AFLP determinaram que a progênie de cada um dos três parentes silvestres com acessões no teste incluíram umas poucas sementes que haviam sido fertilizadas por *S. tuberosum*, grupo de cultivares Andigenum. Isso confirma o fluxo gênico que ocorre de uma batata cultivada para espécies silvestres no campo. Assumindo que a planta mais próxima do parental masculino identificado por impressão digital AFLP foi o doador do pólen, sua distância média era de menos de três plantas do receptor do pólen. Isso é consistente com trabalho prévio em que somente 2% das plântulas foram transgênicas quando a distância de polinização cruzada de fêmeas não transgênicas aos doadores de pólen transgênicos era de 3 metros, e 24% quando os pais cresceram juntos um do outro.

O florescimento simultâneo das plantas de batata e *S. acaule*, *S. bukasovii* e *S. sparsipilum* durou 52 dias. Mesmo o valor de 32 dias para o florescimento precoce de *S. megistacrolobum* proporcionou ampla oportunidade para a polinização cruzada por insetos. Mamangavas e suas espécies próximas são os principais polinizadores de *Solanum*. O pólen é a única recompensa oferecida por *Solanum* spp., que é visitado por abelhas melíferas procurando néctar apenas infreqüentemente. As anteras dessas plantas também requerem efeitos de som pelos insetos para liberar o pólen, restringindo a gama de insetos polinizadores.

As mamangavas tipicamente se alimentam por 70-631m, mas o pólen de uma flor é geralmente depositado até um limitado número das que são visitadas posteriormente.

Isso e fatores como tempo de estadia em uma plantação favorecem a polinização cruzada localizada em plantas próximas da fonte de pólen. De acordo com visitas de insetos a flores em cinco locais no Peru, doze espécies de abelhas foram registradas, mas com diferenças entre locais. Concluiu-se que a extensão do fluxo de pólen entre as espécies de *Solanum* varia consideravelmente com o local nos Andes Centrais, e com as densidades e espécies de mamangavas, sua alimentação e o local de parentes silvestres dentro ou próximos das culturas de batata transgênica.

A introgressão de um transgene da batata GMNR-cistatina pode conferir resistência ao nematóide aos parentes silvestres que são atualmente suscetíveis a essa importante praga da batata *Globodera spp.* Descobrimos que esse nematóide de fato se reproduz em cinco ou seis espécies silvestres de *Solanum* estudadas, mas em menor extensão do que ocorre no sistema radicular muito maior oferecido por uma planta de batata cultivada. A possibilidade de um transgene para resistência a pragas introgridido estavelmente beneficiar um parente silvestre crescendo próximo a uma espécie cultivada requer um exame baseado em cada caso. A capacidade de invadir tanto da espécie cultivada como da silvestre de *Solanum* também necessita ser considerada. O princípio da precaução requer que essa possibilidade seja excluída, pelo menos até que essa questão seja avaliada.

A cultivar andina *Revolucion* é de particular interesse no atendimento a essa necessidade transitória. É uma das cultivares macho estéreis, originária de cruzamentos entre os grupos de cultivares *S. tuberosum* Andigenum e Tuberosum. Portanto, não tem pólen para fertilizar os óvulos de outra planta compatível durante a reprodução sexual. A *Revolucion* não floresceu abundantemente e a queda de flores ocorreu nos locais de teste, e seis linhas GMNR-cistatina foram transformadas e desenvolvidas. Testes de contenção no Reino Unido determinaram que eles conferiam resistência parcial a *G. pallida*, relativamente a plantas não transformadas de cultura de tecidos dessa cultivar. Esse nível de resistência é similar ao relatado anteriormente e é suficiente para evitar perda de produtividade devido ao nematóide, dentro da curta rotação que prevalece entre os produtores de subsistência na Bolívia. Foi proposto que a cultivar transgênica *Revolucion* proporciona uma base para testes iniciais de campo de resistência de nematóides ou outras características de valor, sem o fluxo gênico da batata sob testes.

CONCLUSÕES

Nenhuma base foi estabelecida para invocar o princípio da precaução para barrar os testes iniciais com a batata GMNR-cistatina por seus impactos sobre micróbios ou fauna não-alvo ou associados com a folhagem da cultura. Também não foi detectada nenhuma base para danos e qualquer efeito seria local. Por outro lado, qualquer fluxo gênico da batata para espécies silvestres de *Solanum* nos Andes que cresçam perto pode não permanecer localizado e isso requer mais estudos. Enquanto isso, uma barreira para o cruzamento pode ser dado pela cultivar macho-estéril *Revolucion*.

Isso fornece a base para o suporte do desenvolvimento de regulamentação para testes de campo geneticamente modificados biosseguros com batata nos Andes. O plantio de transgênicos deveria ser limitado a cultivares macho estéreis, enquanto as preocupações com a possível introgressão de qualquer característica são avaliadas por várias gerações de cruzamentos ao acaso entre indivíduos de uma espécie silvestre por métodos definidos. Quando tal informação estiver disponível, a biossegurança de uma cultivar macho-fértil transgênica para aquela característica poderá ser avaliada.

Avaliar tanto benefícios como problemas fornece uma base científica informada. Desta forma, é possível que as necessidades conflitem com o princípio da precaução ou não para a batata, em seus centros de diversidade.

Com relação ao impacto potencial das plantas GM sobre os organismos do solo, os autores também sugerem que o princípio da precaução seria respeitado para qualquer maior adoção subsequente de plantas GM pela prova de que elas não impõem maior impacto sobre o ambiente do que as práticas agrícolas comuns o fariam.

PRINCIPAIS PUBLICAÇÕES

CELIS, C., SCURRAH, M., COWGILL, S.E., CHUMBIAUCA, S., FRANCO, J., MAIN, G., KEIZENBRINK, D.T., GREEN, J. and ATKINSON, H.J. (2004). Environmental biosafety and transgenic potato in a centre of this crop's diversity. *Nature* 432:222-225.

ATKINSON, H. J., GREEN, J., COWGILL, S. and LEVESLEY, A. (2001). The case for genetically modified crops with a poverty focus. *Trends in Biotechnology* 19:91-96.

GREEN, J., FEARNEHOUGH, M.T. and ATKINSON, H.J. (2005). Development of biosafe genetically modified *Solanum tuberosum* (potato) cultivars for growth within a centre of origin of the crop. *Molecular Breeding* 16:285-293.

Avaliação da adequação agrônômica e ao ambiente do algodão transgênico Bt em sistemas IPM de pequenos produtores na China

<i>Acrônimo</i> COTRAN <i>Acrônimo do Programa</i> FP5-INCO 2 <i>Número do Contrato</i> ICA4-CT-2000-10197 <i>Período</i> Novembro de 2001 – Março de 2005	<i>Coordenador</i> Derek RUSSELL Natural Resources Institute (nri) University of Greenwich Chatham Maritime Kent ME4 4TB United Kingdom
---	---

<i>Parceiros</i> Gabor LOVEI Danish Institute of Agricultural Science (DIAS), Aarhus (DK) Jean-Michel VASSAL Centre de Cooperation Internationale en Recherche Agronomique pour le Developpement, (CIRAD) Montpellier (FR) Sean MURPHY CABIO Biosciences, Egham (UK)	Yidong WU Nanjing Agricultural University (CN) Fan HAO WAN Biological Control Institute of the Chinese Academy of Agricultural Sciences (BCICAS), Beijing (CN) Yang PUYUN National Agro-Technical Extension and Service Centre (NATESC), Beijing (CN)
---	---

BACKGROUND E OBJETIVOS

O objetivo geral do projeto era realçar a capacidade das organizações de extensão agrícola e pesquisa chinesas, europeias e internacionais a levar em conta toda a gama de impactos biológicos, econômicos e sociais ao avaliarem a adequação aos pequenos proprietários produtores de algodão das plantas geneticamente modificadas para produzir a toxina inseticida *Bt* (*Cry 1Ac* do micróbio do solo *Bacillus thuringiensis*) para o controle de lagartas que se alimentam dos frutos. A maior parte do trabalho concentrou-se em fornecer as ferramentas que os próprios produtores necessitam para tomar as decisões apropriadas em relação ao manejo do algodão transgênico *Bt*. O projeto trabalhou estreitamente com o projeto da escola IPM Farmer Field de algodão asiática, com seis países da UE/FAO, para ajudar a estender sua competência ao algodão *Bt*.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

Antes do projeto não havia nenhuma experiência na avaliação pelo pequeno proprietário dos benefícios, das fraquezas e opções de manejo para o algodão *Bt*. Foi conduzida uma avaliação participativa rural (PRA) (Produto 1- Relatório sobre as percepções dos fazendeiros do papel econômico, social e ambiental do algodão *Bt* no seu sistema de produção). Isso identificou áreas fortes e fracas do entendimento do produtor sobre o manejo do algodão *Bt* e uma apreciação de sua posição econômica na produção de algodão. Os produtores perceberam o controle da lagarta do capulho (pelo menos nos primeiros dois terços da estação), e benefícios em mão de obra e no custo, mas estavam incertos sobre o que esperar do algodão *Bt* e ainda pulverizavam uma média de 12 inseticidas, a maior parte para controle da lagarta do cartucho.

Desse melhor entendimento, foi desenvolvida uma série de exercícios participativos para fazendeiros, em conjunção com o programa de desenvolvimento de currículo do EC IPM em algodão no programa da Ásia (2000 - 2004) e apresentado como um manual de trabalho para uso na Escola de Campo para Fazendeiros e outros treinamentos IPM em algodão *Bt* na Ásia e além (Produto 3 – Manual participativo para fazendeiros para avaliar o algodão *Bt*). Os métodos usados formaram parte do Produto 4 – Manual de avaliação ambiental e econômico do algodão *Bt* para sistemas de pequenos proprietários.

PRINCIPAIS DESCOBERTAS E RESULTADOS

Melhorar o entendimento do impacto do algodão *Bt* sobre outras partes do agrossistema foi uma das importantes preocupações. Métodos de laboratório e de campo de aplicação global foram desenvolvidos para capacitar a análise rigorosa dos impactos sobre pragas alvo e não-alvo, parasitóides, predadores e organismos do solo (relacionados em trabalhos publicados e como capítulos no Produto 4 – Manual de avaliação ambiental e econômica para algodão *Bt* para sistemas de pequeno proprietário). O controle de lagarta do capulho foi satisfatório. Não houve efeitos significativos sobre lepidópteros, moscas brancas, pulgões do algodão ou decompositores de solo colêmbola não-alvo. A lagarta do capulho, lagartas da folha e pulgões do algodão poderiam concentrar a toxina *Bt* em seus tecidos pela alimentação e passá-la para os predadores. Nenhuma evidência, entretanto, foi encontrada de ruptura no complexo predador generalista em algodão *Bt* e, de fato, a diversidade de aranhas foi maior no algodão *Bt* do que no não *Bt*. Nenhum efeito prejudicial foi visto nas relações tritróficas em algodão, incluindo em um sistema simulado de gaiola no campo.

O risco de que o controle da lagarta do capulho pelo algodão *Bt* se mostre insustentável em sistemas de produção, onde não havia nenhuma estratégia para reduzir o risco da resistência à toxina evoluir, continua sendo uma preocupação na implementação desses materiais, especialmente na China, agora com 100 % de seu algodão na área nordeste ser de cultivo do algodão *Bt*. Usando cepas *Bt* resistentes à principal lagarta do capulho, *Helicoverpa armigera*, selecionadas em laboratório, foram desenvolvidos métodos para detectar a presença de genes de resistência em populações de campo e avaliar sua frequência (um em mil em populações de campo), dominância fenotípica (cerca de 0,27) no campo e os mecanismos envolvidos (uma caderina truncada no revestimento do intestino da lagarta do capulho).

Estes parâmetros foram então usados em um modelo de simulação de desenvolvimento de resistência para explorar as opções de manejo para o algodão *Bt*. A resistência ainda não é um problema de controle de campo. A modelagem sugere que impor (toxina não *Bt*) mortalidade adicional às lagartas do capulho sobreviventes nos campos de algodão *Bt* é sozinho o modo mais eficiente de atrasar o desenvolvimento de resistência. Os resultados são apresentados em trabalhos e Produto 4 – Manual de avaliação ambiental e econômica do algodão *Bt* para sistemas de pequenos proprietários.

O projeto trabalhou estreitamente com o sistema nacional de extensão da China (um parceiro do projeto) para assegurar a utilidade prática dos resultados e para estabelecer uma rota de adoção. Isso incluiu um diálogo sobre a biossegurança da EU e da China e processos de aprovação para o algodão GM (Produto 2- Documento de discussão sobre a política do algodão *Bt*).

Um simpósio final de disseminação (Produto 5), para apresentar os resultados e produtos, foi organizado em Beijing em março de 2005. Compareceram

representantes de todas as províncias que cultivam algodão *Bt*, as organizações de extensão e treinamento IPM e a comunidade científica de algodão GM.

Um sistema de seleção ecologicamente seguro para culturas transgênicas baseado em genes de tubulinas vegetais modificados

<i>Acrônimo</i> ECOTUB <i>Acrônimo do Programa</i> FP5-LIFE QUALITY <i>Número do Contrato</i> QLK3-2000-00060 <i>Período</i> Outubro de 2000 – Setembro de 2003	<i>Coordenador</i> Prof. Dr Peter NICK Albert-Ludwigs-Universitat Freiburg Institut fur Biologie II D-Freiburg Germany Endereço atual: Botanisches Institut Karlsruhe Institute of Technology Kaiserstr. 2 D-76128 Karlsruhe Germany peter.nick@bio.uni-karlsruhe.de
--	---

<i>Parceiros</i> Diego BREVIARIO Istituto Biosintesi Vegetali, Centro Nazionale de Ricercha, Roma (IT) Paul CHRISTOU John Innes Centre, Norwich (UK)

BACKGROUND E OBJETIVOS

Há uma substancial preocupação pública em relação a disseminação potencial de genes de resistência a antibióticos a partir de plantas transgênicas no solo e nas bactérias intestinais. Um sistema de seleção para os melhoradores de plantas, a ser usado durante a transformação de plantas, que é exclusivamente baseado na informação genética já presente na planta hospedeira e que não requer genes de resistência a antibióticos, evitaria qualquer risco dessa natureza.

Este projeto visa explorar a variabilidade natural de tubulinas vegetais como componentes essenciais do crescimento celular, divisão celular e tolerância a estresse nas plantas. Existe um painel de promotores de tubulina que pode dirigir a expressão, seja constitutivamente ou alternativamente, em diferentes tecidos ou em resposta a sinais diferentes. Pode fundir-se com um painel de diferentes isotipos de tubulina com aspectos fisiológicos distintos para produzir um kit versátil de combinações que irá conferir propriedades diferentes, tais como tolerância a estresse ou herbicida a especificados tecidos alvo. O resultado é então usado para construir um marcador para seleção, baseado em tubulinas alteradas, sem o sítio de ligação para herbicidas de acrilcarbamato. A produção de tubulinas defeituosas será dirigida pelos seus próprios promotores, em fragmentos de DNA sem sequências estranhas. A adequação deste sistema de seleção será analisado usando o arroz como cereal modelo.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

Um sistema ideal de seleção deveria preencher os seguintes requisitos:

- risco mínimo pela manipulação: efeitos colaterais indesejados para o ambiente e para o consumidor são evitados pela eliminação de tudo o que seja supérfluo em termos de função;

- uso otimizado de recursos naturais: somente o DNA já presente na planta da cultura é usado e seu potencial é explorado pela simples recombinação de genes e promotores de uma nova maneira.

Em combinação com as sequências codificadoras designadas para a tubulina da planta que confere tolerância a agentes seletivos direcionados aos microtúbulos, deve ser possível obter um marcador para seleção que consista exclusivamente de DNA que já está presente na planta.

Em todo este trabalho, a abordagem será baseada em tecnologia de “DNA limpo”, que envolve evitar o uso de sequências de vetores e estruturas centrais estranhas, culminando com a abordagem Eco Tub, indicando marcadores ecologicamente seguros baseados em tubulinas da planta.

PRINCIPAIS DESCOBERTAS E RESULTADOS

A versatilidade das tubulinas vegetais, combinadas com o forte impacto que tem em muitos aspectos da vida vegetal, são pré-condições ideais para manipulações biotecnológicas, tão sutis quanto poderosas. A resistência baseada em mutações na porção terminal C das tubulinas, em que uma alta variabilidade natural é observada, pode abrir um grande campo para a engenharia de novos marcadores para seleção. O aril clorprofame, que tem sido usado extensivamente como inibidor de brotação e herbicida de pré-emergência, liga-se com o terminal C das alfa-tubulinas.

Além disso, é possível discriminar entre subpopulações de alfatubulinas com diferentes afinidades para esses herbicidas. A presença de uma tirosina carboxiterminal que está presente em todas as alfatubulinas é crucial para a afinidade a esses herbicidas e, os 13 aminoácidos carboxiterminais podem conferir a afinidade ao portador ovalbumina. Essas descobertas indicam que a resistência a aril carbamatos pode ser gerada sem interferir com as funções essenciais da tubulina que estão localizadas mais acima da molécula. De fato, o mutante de arroz ER31, que é resistente a aril carbamatos, mostrou conter um isotipo de tubulina que reduziu a afinidade para esses herbicidas devido ao truncamento do carboxitermino em consequência de um códon de parada precoce. Quando a tubulina mutada é transferida para os calos, esses calos irão adquirir tolerância a doses de aril carbamato fenil uretano que seriam normalmente inibidores. Os aril carbamatos e outros produtos químicos eliminadores de microtúbulos ligam-se aos alfa-beta-heterodímeros e evitam sua incorporação nos microtúbulos.

Em uma situação na qual a tubulina do tipo selvagem (que se liga com o produto químico com alta afinidade) e a tubulina mutada (que não se liga ao produto) coexistem, os microtúbulos montados consistiriam preferencialmente de tubulina mutada. De fato, a resistência a aril carbamatos tem sido demonstrada como uma característica dominante-negativa, indicando que a tubulina modificada é progressivamente presa nos microtúbulos. É possível, portanto, usar o marcador em níveis moderados de expressão.

Promotores de tubulina podem fornecer uma grande variedade de perfis de expressão com potencial de modulação em amplitude e especificidade de tecidos ou em resposta a estímulos diferentes. A função moduladora de sequências de entrona permite mais flexibilidade no uso biotecnológico dos promotores de tubulina para cada dado isotipo de tubulina. Padrão e amplitude de expressão podem ser ajustados por simples subtração (ou adição) de sua própria ou sequência cognata de intron. Isso permitiria a afinação da expressão por uma ampla faixa, da mais fraca à alta, dependendo das exigências da aplicação real. Novamente, deve-se notar que esse ajuste pode ser

conseguido sem qualquer sequência de DNA que já não esteja presente na planta de interesse.

CONCLUSÕES

Promotores, introns e sequências UTR de tubulinas vegetais presentes em qualquer planta cultivável de interesse são versáteis o suficiente para qualquer padrão de expressão desejado. Em combinação com as sequências codificadoras designadas para tubulina vegetal que confira tolerância para agentes seletivos dirigidos a microtúbulos, deve ser possível obter um marcador para seleção que consista exclusivamente de DNA que já esteja presente na planta.

Para preencher os princípios ECO TUB, um sistema genético deve ter as funções essenciais (permitir a seleção após a transformação) e um alto grau de variabilidade natural. Ambas pré-condições são satisfeitas pelo sistema de tubulinas vegetais. Sequências codificadoras de tubulinas vegetais são modificadas para criar resistência contra produtos químicos eliminadores de tubulinas. Elas são fundidas com promotores de tubulina adequados, da própria planta hospedeira. A característica desejada pode ser obtida sem a introdução de informação genética estranha (espécie cruzada). Essa resistência é então usada para seleção após a transformação. Para definir exatamente este princípio, quaisquer sequências de DNA de vetor são evitadas usando a tecnologia de DNA limpo, envolvendo transformação com o mínimo de unidades de expressão (promotor, sem genes de resistência a antibióticos, nem origens bacterianas de repetição).

Promotores, introns e sequências UTR de tubulinas vegetais presentes em qualquer planta cultivável são versáteis o suficiente para gerar quase qualquer padrão de expressão desejado. Em climas temperados, a produtividade das culturas é limitada por baixas temperaturas. As plantas têm uma grande sensibilidade para o crescimento a baixas temperaturas. Como consequência, é o desdobrar retardado das folhas que restringe a produtividade durante a estação da primavera. Entretanto, a sensibilidade ao resfriamento é da mesma forma uma questão importante fora das regiões temperadas. De fato, em várias culturas, a estabilidade no frio dos microtúbulos mostrou ser correlacionada com a sensibilidade ao resfriamento, e observou-se que a desmontagem dos microtúbulos por compostos antimicrotubulares aumentou a sensibilidade ao resfriamento.

Parece que a desmontagem dos microtúbulos induzida pelo frio depende da região carboxiterminal. Além da resistência a arilcarbamato, espera-se que as mutações que alteram o terminal C das tubulinas, produzam tolerância ao frio nos microtúbulos. Planejamos no futuro, gerar plantas com tolerância ao frio aumentada pela engenharia no carboxi terminal de alfatubulinas.

PRINCIPAIS PUBLICAÇÕES

NICK, P., CHRISTOU, P., BREVIARIO, D. (2003). Generating transgenic plants by minimal addition of exogenous DNA – a novel selection marker based on plant tubulins. *AgBiotechNet* 5:ABN 105.

BREVIARIO, D., NICK, P. (2000). Plant tubulins: a melting pot for basic questions and promising applications. *Transgenic Res.* 9:383-393.

WIESLER, B., WANG, Q.Y., Nick P. (2002). The stability of cortical microtubules depends on their orientation. *Plant J.* 32:1023- 1032.

ABDRAKHAMANOVA, A., WANG, Q.Y., KHOKHLOVA, L., NICK, P. (2003). Is microtubule assembly a trigger for cold acclimation? *Plant Cell Physiol.* 44:676-686.

AHAD, A., WOLF, J., NICK, P. (2003). Activation-tagged tobacco mutants that are tolerant to

antimicrotubular herbicides are cross-resistant to chilling stress. *Transgenic Research*
12:615-629.

Pesquisa em biossegurança dirigida a uma produção de alimentos mais sustentável

<i>Acrônimo</i> ECOSAFE <i>Acrônimo do Programa</i> FP5-LIFE QUALITY <i>Número do Contrato</i> QLK3-2000-01759 <i>Período</i> Janeiro de 2001 – Dezembro de 2003	<i>Coordenador</i> Prof. Fergal O'GARA BIOMERIT Research Centre Microbiology Department UCC Ireland f.ogara@ucc.ie
---	---

<i>Parceiros</i> Jos VANDERLEYDEN Centre of Microbial and Plant Genetics, K.U. Leuven (BE) Marco P.NUTI Departimento di Chimica e Biotechnologie Agrarie, University of Pisa (IT) Jose Miguel BAREA CSIC Granada (ES) Peter YOUNG Department of Biology, University of York (UK) Yvan MOENNE-LOCCOZ UMRCNRS d'Ecologie Microbienne, Université Claude Bernard, Lyon (FR) Yaacov OKON Dept. Plant Pathology and Microbiology, Hebrew University of Jerusalem (IL) Stewart SMITH LIPHATECH Inc., Milwaukee WI (US) Allan DOWNIE John Innes Centre, Norwich (UK)	Yves DESSAUX CNRS, Gif-sur-Yvette (FR) Genevieve DEFAGO Swiss Federal Institute of Technololy, Zurich (CH) Ben j.j.LUGTENBERG Institute of Molecular Plant Science, Leiden University (NL) John BRODERICK Irish Sugar plc., Carlow (IR) Tomas RUIZ_ARGUESO Universidad Politecnica de Madrid (ES) Rupert FRAY Division of Plant Science University of Nottingham (UK) Dieter HAAS Laboratoire de Biologie Microbienne, University of Lausanne (CH) Paul WILLIAMS Pharmaceutical Sciences, University of Nottingham (UK) David KING International Federation of Agricultural Producers, Paris (FR)
--	---

BACKGROUND E OBJETIVOS

A questão do desenvolvimento sustentável, no que se relaciona com produção de alimentos e suprimento, se destaca à medida que avançamos no século 21. O rápido crescimento da população mundial, que se estima alcançar até 10 bilhões de pessoas até o ano de 2050, terá de ser pareada por um crescimento igualmente rápido na capacidade de se produzir alimento em todo o mundo. Se realmente vamos parear a população em rápida expansão e crescentemente urbanizada, então melhoramentos na produção de alimentos terão de ser encontrados. As práticas atuais, associadas com o uso de maiores produtividades e proteção de culturas, envolvem o uso de insumos agroquímicos, tais como herbicidas e pesticidas.

Questões óbvias de segurança alimentar e saúde humana levaram agora a comunidade científica a focar-se no desenvolvimento de novas alternativas

“ecocompatíveis”. A biotecnologia vegetal, seja por melhoramento convencional ou modificação genética, ofereceram novas variedades que exibem características favoráveis como maior resistência a pragas e doenças e melhor valor nutritivo. Entretanto, simplesmente focar-se na planta como entidade única ignora o importante papel que as comunidades microbianas presentes na rizosfera têm na promoção da saúde e produtividade de seu hospedeiro. Exemplos disso incluem o relacionamento mutualístico entre as bactérias de fixação de nitrogênio e as raízes das plantas, capacitando a planta a usar compostos nitrosos reduzidos que são supridos pelas bactérias.

Mais recentemente, certas bactérias, na presença de hormônios vegetais, apresentaram um aumento na massa da raiz da planta, permitindo com isso, aumentar a absorção de nutrientes. Além de aumentar o suprimento de nutrientes, demonstrou-se que os micróbios também conferiram um grau de proteção contra patógenos vegetais. Até agora, existe pouca informação sobre como esses micróbios interagem com a planta. Um maior entendimento disso, portanto, poderia fornecer novas estratégias no melhoramento da saúde e produtividade da planta de uma maneira ecocompatível.

O tema central do projeto ECO-SAFE foi a avaliação das consequências ecológicas do uso dos produtos da nova biotecnologia, baseados em plantas GM e inoculantes microbianos, para atender às metas da sustentabilidade da agricultura europeia.

Este projeto foi estabelecido como um grupo de dois projetos componentes relacionados, baseados em uma parceria envolvendo a indústria, uma ONG e 15 laboratórios acadêmicos. Cada projeto componente tinha um objetivo principal e tratava problemas importantes a serem resolvidos. Quando vistos juntos, estes projetos ofereceram uma estratégia eficiente em fornecer informações cruciais necessárias para a determinação do impacto ecológico e a segurança das plantas GM e inoculantes microbianos, bem como para prever seu destino no ambiente.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

Embora inoculantes de *Azospirillum* sejam usados comercialmente, há limitações associadas com seu uso. Essas bactérias afetam o crescimento da raiz em resposta a um hormônio secretado pela planta - o ácido indol acético (IAA). Tirando vantagem do conhecimento adquirido na regulação genética desse hormônio, fomos capazes de construir cepas do microrganismo geneticamente modificado (cepas GMM) com capacidade aumentada de promover o crescimento da planta. A eficiência dessas cepas foi testada, assim como o impacto potencial da biodiversidade local. Entretanto, antes que quaisquer cepas GMM fossem testadas, ficou claro que efeitos basais da inoculação com o tipo selvagem de *Azospirillum* tinham que ser analisados. Conduzimos extensivos ensaios de campo do inoculante tipo selvagem e testes com contenção de inoculantes GM (moratória da UE para aprovações para liberações abertas de OGMs durante esse período) para gerar estes dados.

O segundo tema mais importante do ECO-SAFE tratou do fato de que micróbios e plantas em sistemas biológicos nem sempre se comportam como esperado. Complexas interações entre hospedeiro e micróbio acontecem em toda a região do solo sob a influência da planta. Essa “comunicação” entre micróbio e planta é mediada via sinais exudados pelas raízes da planta e por sinais secretados pelo micróbio. Em bactérias, esses eventos de sinalização envolvem a produção de sinais extracelulares (tais como homoserina lactonas -HSLs)].

Interessantemente, foi também demonstrado que as plantas podem interferir nesse processo de sinalização, produzindo moléculas HSL “mímicas”. Em vista disso, o projeto ECO-SAFE utilizou técnicas modernas de genética para obter plantas transgênicas que podem produzir sinais bacterianos. Demonstrou-se que estas plantas modulam a expressão gênica e fenótipo das comunidades bacterianas residentes. Estas plantas foram avaliadas usando uma gama de critérios, incluindo saúde da planta, proteção contra doenças e impacto ecológico. Dada a importância destes sistemas de sinalização, não é inesperado que alguns microrganismos (tanto fungos como bactérias) tenham potencial para interferir com elas. Portanto, as bactérias que degradam esses sinais foram identificadas e há evidência de que fungos também possam interferir com os sistemas de sinalização. Por isso, conduzimos também pesquisa fundamental para estabelecer a base molecular para os sistemas de comunicações célula-célula.

PRINCIPAIS DESCOBERTAS E RESULTADOS

As cepas fitoestimulatórias de *Azospirillum* modificadas trabalharam eficientemente no estímulo de crescimento da raiz e na promoção de absorção de nitrogênio. Estas foram mais eficientes que as cepas originais do tipo selvagem. O projeto demonstrou a importância e o valor da pesquisa básica na determinação das bases biológicas subjacentes dos fenômenos aplicados. Projetos prévios UE (IMPACT I/II) financiaram alguns dos trabalhos que estabeleceram os passos moleculares para a produção de IAA por *Azospirillum*. Esse conhecimento foi aplicado em ECO-SAFE para re-regular os passos para gerar cepas melhoradas para aplicação. Usando cepas do tipo selvagem no campo e cepas modificadas em condições controladas em casa de vegetação, avaliamos os possíveis impactos negativos sobre a flora microbiana e sobre a biodiversidade.

A descoberta mais importante foi que qualquer impacto de inoculantes sobre a diversidade bacteriana foi menor que variações devidas à heterogeneidade natural do solo e variabilidade planta a planta, efeitos sazonais e idade da planta. Os inoculantes GM não causaram efeitos adicionais quando comparados com as cepas do tipo selvagem.

O maior resultado do trabalho sobre a comunicação célula-célula foi a geração de uma grande massa de dados, enfatizando a importância central da sinalização mediada por HSL para a função ecológica e o papel de tal sinalização na regulação da função ecológica. Uma descoberta importante foi que as plantas geneticamente modificadas não tiveram um impacto ecológico negativo. Foi também estabelecido que outra sinalização, não HSL, também ocorre entre os micróbios. Progresso significativo foi feito no estudo de vários outros sistemas de sinalização célula-célula.

Em um trabalho subsequente, que utilizou técnicas genômicas, foi demonstrado que sinais exudados de diferentes variedades de plantas têm efeitos diferenciais sobre a expressão de genes bacterianos. Foi também demonstrado que um subgrupo desses genes também tem um papel na capacidade das bactérias de colonizar a estrutura raiz-planta. Pelo entendimento dos genes induzidos obteremos uma visão esclarecedora deles (e das características que codificam) que influenciam a interação das bactérias em seu ambiente.

CONCLUSÕES

Na agricultura moderna, o uso de fertilizantes nitrogenados representa a principal fonte de contaminação por nitrogênio tanto da atmosfera (como óxidos de nitrogênio) como na água de superfície e subterrânea (como nitrato). A EU comprometeu-se com a

redução de nitratos de fontes agrícolas. O projeto ECO-SAFE mostrou que a inoculação com *Azospirillum* demonstra que é factível mudar da adubação pesada com N para níveis mais sustentáveis de adubação com N. Pelo uso de cepas geneticamente modificadas, a redução nas taxas de aplicação de fertilizante nitrogenado de até 25%-30% pode ser compensada pela presença de *Azospirillum*.

O efeito das cepas introduzidas nos micróbios locais é transitório, reversível e mostrou menos efeitos do que os causados pelas naturais flutuações sazonais, e podem, portanto, ser considerados não prejudiciais ao ambiente. Esses avanços com *Azospirillum* são o resultado a culminação de anos de pesquisa básica da biologia do sistema. A pesquisa que foi conduzida sobre a sinalização célula-célula gerou uma substancial massa de conhecimento básico que sustentará futuras aplicações no setor de biotecnologia. A meta final desta pesquisa é produzir um novo biocontrole e bactérias biofertilizantes que irão reduzir nossas exigências da aplicação de fertilizantes químicos e fungicidas, aproveitando os produtos microbianos compatíveis com o ambiente.

PRINCIPAIS PUBLICAÇÕES

MORRISSEY, J.P., WALSH U.F., O'DONNELL, A., MOENNE-LOCCOZ, Y. and O'GARA, F. (2002). Exploitation of genetically modified inoculants for industrial ecology applications. *Antonie van Leeuwenhoek*. 81:99-606.

DANINO, VE., WILKINSON, A., EDWARDS, A., DOWNIE, JA. (2003). Recipient-induced transfer of the symbiotic plasmid pRL1JI in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* is regulated by a quorum-sensing relay. *Mol Microbiol*. 50:511-25.

MORRISSEY, J.P., DOW, J.M., MARK, G.L. and O'GARA, F. (2004). Are microbes at the root of a solution to world food production? *EMBO Reports*. 5:922-926.

NEWTON, JA., FRAY, RG. (2004). Integration of environmental and host-derived signals with quorum sensing during plant-microbe interactions. *Cell Microbiol*. 6:213-24.

SOMERS, E., PTACEK, D., GYSEGOM, P., SRINIVASAN, M., VANDERLEYDEN, J. (2005). *Azospirillum* brasilense produces the auxin-like phenylacetic acid by using the key enzyme for indole-3-acetic acid biosynthesis. *Appl Environ Microbiol*. 71:1803-10.

Ciliados como monitores para segurança ambiental de OGMs

<i>Acrônimo</i> CIMES <i>Acrônimo do Programa</i> FP5-LIFE QUALITY <i>Número do Contrato</i> QLK3-2002-02151 <i>Período</i> Outubro de 2002 – Dezembro de 2005	<i>Coordenador</i> Dr. Johannes H.P. HACKSTEIN Dept. Evolutionary Microbiology Faculty of Science Radboud University Nijmegen Toernooiveld 1 6525 ED Nijmegen The Netherlands
---	---

<i>Parceiros</i> Prof. MARTIJN A. HUYNEN, Ph.D. Nijmegen Center for Molecular Life Sciences p/a Center for Molecular and Biomolecular Informatics, Nijmegen (NL) Prof. Dr. Karl-Heinz SCHLEIFER Lehrstuhl fuer Mikrobiologie – Technische Universitaet Muenchen (DE) Dr. Johannes FRIED Lehrstuhl fuer Mikrobiologie – Technische Universitaet Muenchen (DE)	Prof. Dr. C Jamie NEWBOLD The Institute of Rural Science – University of Wales, Aberystwyth (UK) Dr. Neil MCEWAN The Institute of Rural Science – University of Wales, Aberystwyth (UK) Dr Peter PRISTAS Institute of Animal Physiology, Slovak Academy of Sciences, Kosice (SK) Dr. T. MICHALOWSKI Kielanowski Institute of Animal Physiology and Nutrition, Jabłonna (PL)
--	--

BACKGROUND E OBJETIVOS

A transferência gênica horizontal (ou lateral) de OGMs para organismos que vivem em ambientes adjacentes foi vista como um risco potencial, uma vez que se demonstrou anteriormente que o DNA estranho no trato intestinal de camundongos podem ser absorvidos pelo organismo hospedeiro. Enquanto a transferência gênica horizontal (lateral) entre bactérias é bem conhecida e identificada como uma fonte importante de inovação evolucionária entre os procariotos, virtualmente nada é sabido sobre as taxas e mecanismos da transferência gênica horizontal (lateral) em eucariotos. Essa falta de informação inclui transferências potenciais bactéria e eucarioto, mas em particular transferências potenciais de planta para animal.

Notavelmente, a presença de cerca de cem genes “bacterianos” no genoma humano, o que foi suspeitado após uma análise inicial, não pode ser comprovada após a reanálise. Consequentemente, a transferência de um gene bacteriano para humanos é extremamente rara. Isto, entretanto, não inclui a possibilidade de transferências gênicas horizontais mais frequentes para animais, em particular para organismos eucariotos unicelulares vivendo no intestino.

Uma quantidade de ciliados – microrganismos eucariotos unicelulares, com uma peculiar organização do genoma – prospera no trato intestinal de vários animais. Exemplos bem conhecidos são os ciliados do rúmen, que vivem no rúmen dos animais domésticos, como os bovinos, as ovelhas e cabras, mas também os *Nyctotherus*, espécie no intestino posterior de baratas. Todos esses ciliados absorvem bactérias e,

potencialmente, também DNA, algumas espécies de ciliados do rúmen são capazes de ingerir e degradar material vegetal. Sua organização do genoma, i.e. a presença de um micronúcleo limitado às linhagens germinativas e um macronúcleo “somático” (que codifica os genes necessários para o crescimento vegetativo) deveria permitir não apenas uma identificação inequívoca de transgenes potenciais, mas também fornecer evidência se esses genes são expressos ou não. Postulamos, portanto, que os ciliados seriam monitores ideais para detectar a transferência gênica lateral potencial em tratos intestinais de animais.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

Qualquer julgamento de uma transferência gênica horizontal de plantas GM para eucariotos requer uma sólida validação de transferências gênicas horizontais que ocorreram em ciliados intestinais em escala evolucionária. Portanto, coleções de gDNA e cDNA foram construídas, sequenciadas ao acaso e analisadas através de bioinformática. Inicialmente, métodos convencionais (e.g. BLAST e análise filogenética) foram usados para identificar genes que poderiam ter sido adquiridos por transferência gênica horizontal. Bibliotecas de expressão também foram examinadas para a presença de genes fibrolíticos, que são candidatos prováveis para a transferência gênica horizontal. Além disso, técnicas mais avançadas baseadas em algoritmos para a identificação de transferência horizontal de genes e uma análise detalhada de uso de códon foram desenvolvidas para a confirmação da melhoria do uso de códons de transgenes em tempos evolucionários. Onde necessário, a biota bacteriana nos vários ambientes do intestino foi analisada com base em bibliotecas de 16S rRNA para identificar fontes potenciais de transferência gênica horizontal.

Para obter informações sobre as dimensões da escalas evolucionárias e a composição das comunidades de ciliados em vários hospedeiros, foram geradas bibliotecas 18S rRNA dos ciliados intestinais e analisadas filogeneticamente. Foram desenvolvidas técnicas FISH (Hibridização In Situ Fluorescência) para a identificação de ciliados particulares em seus ambientes. Para identificar transferências gênicas horizontais potenciais em “tempo real”, ciliados intestinais foram testados, alimentando-os com milho *Bt176* aos organismos hospedeiros (e.g. vaca ou barata) ou alimentando folhas pulverizadas de milho *Bt176* para espécies selecionadas de ciliados do rúmen que eram mantidos *in vitro* por até dois anos.

A organização do genoma macronuclear dos ciliados alvo foi analisada para permitir a identificação inequívoca da potencial transferência gênica horizontal em “tempo-real” para ciliados intestinais. Finalmente, “ciliados modelo”, tais como *Tetrahymena* e *Euplotes*, foram expostos ao DNA que codifica a proteína fluorescente verde (GFP) *in vitro* para analisar as vias potenciais da transferência gênica horizontal e para estudar a dependência da concentração potencial de DNA em transferências potenciais de DNA para ciliados. Alternativamente, ciliados *Euplotes* foram alimentados com células de *E. coli*, portando o plasmídeo pEGFP-N3.

Para testar se a pressão seletiva pode realçar LGTs em ciliados de rúmen cultivados *in vitro*, uma co-cultura de *Entodinium caudatum* e a bactéria resistente a mercúrio (rúmen) foi estabelecida e mantida por 16 meses com a adição de sais de Hg²⁺ ao meio de cultura.

PRINCIPAIS DESCOBERTAS E RESULTADOS

Análise de cerca de 5 mil ESTs (sequências de marcadores (tags) expressos) confirmaram que ciliados do rúmen, durante sua evolução, absorveram genes de bactérias por transferência gênica lateral a uma taxa que não tem precedentes em

eucariotos. A taxa de transferência de bactérias para ciliados aproxima-se de níveis até agora somente conhecidos para bactérias, i.e. mais de 4 %. Os dados corroboram a hipótese “você é o que come” de Ford Doolittle (1998); eles também mostram que apenas genes com vantagem evolucionária óbvia foram mantidos. Mais ainda, os dados analisados até agora não conseguiram provar qualquer evidência “firme” de que um número significativo de genes vegetais foi absorvido na escala evolucionária.

Uma análise comparável do ciliado *Nyctotherus ovalis* do trato gastrointestinal de baratas revelou um LGT muito mais baixo com um espectro completamente diferente de genes adquiridos.

A análise bioinformática dos dados de ciliados do rúmen mostrou que uma análise escrutinadora é bastante demorada, uma vez que a validação de cada potencial transferência gênica horizontal evolucionária requer uma análise filogenética sofisticada e uma detalhada análise do uso de codon. Os dados analisados até agora mostram que genes adquiridos por transferência gênica horizontal exibem uma completa melhoria do uso de codon do ciliado recipiente. Esta observação indica que essas aquisições de genes bacterianos por ciliados intestinais ocorreram há milhões de anos, potencialmente como adaptação à vida no trato intestinal de seus particulares hospedeiros, vertebrados ou invertebrados. Esta interpretação é apoiada pela observação de que um número significativo de genes envolvidos no metabolismo anaeróbico e, em particular a degradação de material vegetal é, de origem bacteriana. Concomitantemente, o ciliado bacterívoro *Nyctotherus ovalis* reteve predominantemente genes que favorecem sua adaptação a ambientes anaeróbicos e nenhum envolvido em degradação de material vegetal.

Uma vez que a detecção do potencial evolucionário das transferências eucarioto- (e.g. planta)-para-eucarioto pode ser prejudicada por uma origem comum desses genes, embora antiga, analisamos a estrutura gênica dos macronúcleos dos vários ciliados, usando eletroforese de gel de carga pulsátil (PFGE), isolamento de macronúcleos e clonagem molecular. Embora o ciliado anaeróbico *Nyctotherus ovalis* possua minicromossomos (ou micro) do tamanho de genes, os ciliados do rúmen possuem maiores “midicromossomos”, que são, entretanto, muito menores que os cromossomos macronucleares dos ciliados aeróbicos modelo *Tetrahymena* ou *Paramecium*. Mais ainda, o conteúdo AT de *Nyctotherus* e ciliados do rúmen é bastante diferente, assim como a presença e o tamanho dos introns. A análise detalhada desses introns poderá permitir a identificação de potenciais organismos eucariotos doadores.

A análise de células de *Nyctotherus* do intestino posterior de baratas alimentadas com folhas pulverizadas de milho *Bt176* por três anos não fornece evidência da aquisição de DNA-OGM do milho *Bt176*. Os experimentos com ciliados aeróbicos confrontados com FP-DNA também não revelaram absorção e expressão de genes GFP. Além disso, os experimentos visando a identificar a transferência de um gene de resistência a mercúrio sob pressão seletiva não foram bem-sucedidos.

CONCLUSÕES

A transferência gênica horizontal histórica teve um papel importante na evolução de ciliados anaeróbicos simbióticos, que prosperam no trato intestinal de grandes herbívoros mamíferos e baratas. Muitas das transferências gênicas pareceram ser relacionadas a processos de adaptação dos ciliados simbióticos, melhorando seu desempenho metabólico nos ambientes anaeróbicos intestinal proporcionado por seus hospedeiros em coevolução. A incidência extremamente alta da transferência gênica horizontal histórica em ciliados do rúmen confirma o postulado que ciliados intestinais

podem ser usados como poderosos monitores para a detecção de transferência gênica horizontal potencial de OGMs para eucariotos.

Até agora, nenhuma evidência foi encontrada sobre a aquisição evolucionária de genes “tóxicos” por ciliados, os quais, potencialmente, poderiam prejudicar seus hospedeiros. A incidência de aquisição de genes derivados de plantas na evolução também parece ser extremamente baixa – se é que ocorre. A análise dos ciliados tratados com milho *Bt176 in vitro* por dois anos, e de *Nyctotherus ovalis* que foi exposto a *Bt176* por três anos, não foi capaz de fornecer evidências para a absorção de genes relacionados com *Bt176*.

Os dados gerados para *Nyctotherus ovalis* também contribuíram para melhor entendimento da evolução de organelas das células: o hidrogenosoma de *Nyctotherus ovalis* pareceu ser o “elo perdido” no nível celular. A análise filogenética de genes hidrogenosomais revelou que a maioria deles tinha uma origem mitocondrial ciliada; apenas um punhado foi obtido por LGT de fontes bacterianas. Especialmente para o gene da hidrogenase, que foi montado em tempos evolucionários a partir de duas fontes bacterianas, uma aquisição por transferência gênica horizontal poderia ser inequivocamente estabelecida.

Foi mostrado que a transferência gênica horizontal é um fenômeno que ocorre naturalmente entre os ciliados simbióticos eucariotos, permitindo a coevolução com seus hospedeiros e uma adaptação a seu ambiente anaeróbico. No nível de organela, a aquisição evolucionária de genes de várias fontes é uma importante fonte de inovação. A aquisição potencial de genes que são desfavoráveis para a organela, para o simbionte ou para os hospedeiros, parece levar a sua rápida eliminação.

PRINCIPAIS PUBLICAÇÕES

KRZYSZTOF, W.; MCINTOSH, F. M.; MICHALOWSKI, T.; JOUANY, J.; NSABIMANA, E.; MACHEBOEUF, D.; MCEWAN, N.R.; NEWBOLD, C.J.; (2004). A cellulase produced by the rumen anaerobic protozoan *Epidinium ecaudatum* has an unusual pH optimum. *Endocytobiology and Cell Research*, 15(2):561-569.

BOXMA B., DE GRAAF R.M., VAN DER STAAY G.W.M., VAN ALEN T.A., RICARD G., GABALDON T., VAN HOEK A.H.A.M., MOON-VAN DER STAAY SY., KOOPMAN W.J.H., VAN Hellemond J. J., TIELENS A.G.M., FRIEDRICH T., VEENHUIS M., HUYNEN M.A.; HACKSTEIN J.H.P. (2005). An anaerobic mitochondrion that produces hydrogen. *Nature* 434:74-79.

NEWBOLD C.J., MCEWAN NR., CALZA RE., CHAREYRON EN., DUVAL SM., ESCHENLAUER SCP., MCINTOSH FM., NELSON N., TRAVIS AJ., WALLACE RJ. (2005). An NAD(+)-dependent glutamate dehydrogenase cloned from the ruminal ciliate protozoan, *Entodinium caudatum*. *FEMS Microbiol Letts* 247 (2):113-121.

RICARD G.; MCEWAN N.R.; DUTILH, B.E.; JOUANY, J.; MACHEBOEUF, D.; MAKOTO, M.; MCINTOSH, F. M.; MICHALOWSKI, T.; NELSON, N.; NEWBOLD, C. J.; NSABIMANA, E.; THOMAS, N.A.; JOHANNESK.U.; HACKSTEIN H. P.; M.A.;HUYNEN. (2006). Horizontal gene transfer from bacteria to rumen ciliates indicates adaptation to their anaerobic carbohydrates rich environment. *BMC Genomics* 7:22.

BOXMA, B.; RICARD, G.; VAN HOEK, A. H.; SEVERING, E.; YEO MOON-VAN DER STAAY, S.; VAN DER STAAY, G. W. M.; VAN ALEN, T. A.; DE GRAAF, R. M.; CREMERS, G.; KWANTES, M.; MCEWAN, N. R.; NEWBOLD, C. J.; JOUANY, JP.; MICHALOWSKI, T.; PRISTAS, P.; HUYNEN, M.A.; HACKSTEIN, J.H.P.; (2007). The [FeFe] hydrogenase of *Nyctotherus ovalis* has a chimeric origin. *BMC Evolutionary Biology* 7:230.

Efeitos e mecanismos de transgenes *Bt* sobre a biodiversidade de insetos não-alvo: polinizadores, herbívoros e seus inimigos naturais

<i>Acrônimo</i> BT-BIONOTA <i>Acrônimo do Programa</i> FP5-LIFE QUALITY <i>Número do contrato</i> QLK3-CT-2000-00547 <i>Período</i> Outubro de 2000 – Setembro de 2003	<i>Coordenador</i> Dr. Ruud DE MAAGD Plant Research International B.V. Business unit Bioscience P.O. Box 16 NL-6700 AA Wageningen The Netherlands ruud.demaagd@wur.nl
---	---

<i>Parceiros</i> Prof. Dr. Stefan VIDAL Georg-August-Universitaet Goettingen, Institute for Plant Pathology and Plant Protection, Goettingen (DE) Prof. Dr. Peter EDWARDS Swiss Federal Institute of Technology, Institute of Integrative Biology, Zurich (CH)	Dr. Maria-Carola FIORE Metapontum Agrobios s.r.l., Laboratory of Agronomy, Metaponto (IT) Prof. Dr. Jozsef KISS Department of Plant Protection, Szent Istvan University, Budapest (HU)
--	---

BACKGROUND E OBJETIVOS

Bt-BioNoTa é um projeto de P&D, que procurou tratar de importantes questões relacionadas com a segurança ambiental de plantas de culturas resistentes a insetos transgênicos que expressam toxinas de *Bacillus thuringiensis*. Mais especificamente, os efeitos de tais culturas na biodiversidade de insetos não-alvo investigados em uma abordagem multidisciplinar.

Embora as culturas resistentes a insetos que expressam toxinas *Bt* continuem a crescer em importância em países fora da UE, há grande preocupação em relação à segurança ambiental de tais culturas. Especificamente, relatos de possíveis efeitos negativos na biodiversidade de insetos não-alvo e em campos circundantes de culturas *Bt* alimentaram dúvidas públicas e políticas. Enquanto a redução esperada em insumos em inseticidas químicos em culturas *Bt* possa contribuir para a política da UE de desenvolver proteção de plantas segura e não hostil ao ambiente. Neste sentido, mais dados científicos são necessários para entender os riscos ambientais associados para apoiar a tomada de decisão baseada na ciência.

Os principais objetivos gerais do projeto foram:

- aumentar a massa de dados em experimentos de campo comparando culturas *Bt* e não *Bt*;
- identificar possíveis efeitos das culturas *Bt* sobre insetos não-alvo em experimentos de laboratório e casas de vegetação;
- aumentar o entendimento dos mecanismos dos efeitos observados;
- melhorar a previsão e o monitoramento de efeitos sobre a biodiversidade de insetos não-alvo no campo.

Experimentos de campo, assim como experimentos de laboratório, usando várias plantas de culturas transgênicas contendo diferentes genes para toxinas *Bt*, foram conduzidos para estudar o impacto de plantas transgênicas na biodiversidade. A experiência ganha contribuirá para o estabelecimento de protocolos de monitoramento para uso futuro. Os experimentos de laboratório irão destacar onde os efeitos negativos potenciais sobre a biodiversidade poderão ocorrer, apoiando processos regulamentadores no estabelecimento de testes de campo e monitoramento de protocolos. Também contribuirá para o entendimento dos mecanismos e a previsibilidade de um efeito letal observado da toxina *Bt* sobre um inseto predador importante, a crisopa verde. Uma ferramenta molecular para o monitoramento e a proteção de tais efeitos foi desenvolvida e aumentará a velocidade e eficácia do monitoramento.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

O plano de trabalho do projeto foi originalmente dividido em seis blocos de trabalho, consistindo no total de 19 “sub-blocos de trabalho”:

WP1: modo de ação do *Bt* sobre a crisopa verde;
WP2: cDNA microconjuntos para medição de efeitos de toxinas;
WP3: efeitos de transgenes *Bt* sobre interações tritróficas: biodiversidade parasitóide;
WP4: efeitos de transgenes *Bt* sobre a biodiversidade de polinizadores;
WP5: efeitos de transgenes *Bt* sobre interações tritróficas: biodiversidade de predadores;
WP6: efeitos de culturas transgênicas *Bt* sobre a biodiversidade de insetos não-alvo no campo.

Todos os experimentos e blocos de trabalho aqui descritos fizeram uso das mesmas quatro culturas/combinções do gene *Bt*, com suas respectivas pragas alvo:

- milho expressando a toxina Cry1Ab, para resistência à broca europeia do colmo;
- berinjela expressando a toxina Cry3B, para resistência a besouro da batata do Colorado;
- batata expressando a toxina Cry1Ab, para resistência à mariposa do tubérculo da batata;
- canola expressando a toxina Cry1Acn, para resistência à mariposa diamondback e a larvas da borboleta branca do repolho.

PRINCIPAIS DESCOBERTAS E RESULTADOS

Modo de ação da toxina *Bt* sobre o predador não-alvo *Chrysoperla carnea* (crisopa verde)

A interação milho *Bt*/lagarta da folha do algodão/larva de crisopa verde foi investigada, com os seguintes resultados:

- toxinas *Bt* Cry1Ab (encontradas em milho *Bt*) e Cry1Ac (encontradas em algodão *Bt*) não mostraram ligação com as membranas ciliadas da borda do intestino larval;
- a quantidade de toxina Cry1Ab ingerida pelas larvas de crisopa através da lagarta da folha do algodão, que estivera se alimentando de milho *Bt*, é apenas 1% da concentração determinada como tendo efeitos deletérios em experimentos de alimentação direta;
- a expressão gênica em larvas de crisopa, e alterações na resposta à exposição direta ou indireta da toxina *Bt*, foram investigadas usando um microconjunto de cDNA consistindo de 1.440 spots de DNA de crisopa: embora alimentação direta com a toxina tenha um efeito mensurável sobre a expressão gênica em larvas de crisopa, a

exposição indireta (através da presa) tem um efeito muito menor e há pouca sobreposição entre os dois tipos de resposta;

- baseados nessas observações com diferentes técnicas, concluímos que é improvável que as larvas de crisopa verde sejam diretamente afetadas por Cry1Ab em milho *Bt*.

Efeitos de transgene *Bt* em interações tritróficas:

Biodiversidade de parasitóides

Vários sistemas de culturas/herbívoro/sistemas de parasitóides foram estudados quanto a efeitos de transgenes *Bt* sobre este tipo de interações tritróficas.

Nossas descobertas foram:

- nenhuma diferença comportamental e nenhum efeito adverso de plantas milho *Bt* sobre a eficiência na alimentação e no desenvolvimento do parasitóide *Aphidius rhopalosiphi*;
- nenhuma influência comportamental e nenhum efeito adverso de plantas de canola *Bt* sobre a eficiência na alimentação e no desenvolvimento do parasitóide *Diaeretiella rapae*;
- nenhum efeito adverso de plantas de berinjela na eficiência de alimentação e na longevidade do parasitóide *Aphidiuservi*. A frequência de parasitismo foi maior em plantas *Bt*;
- nenhuma influência comportamental e nenhum efeito de plantas de berinjela na eficiência alimentar e no desenvolvimento do parasitóide *Encarsia formosa*;
- culturas diferentes mostraram consideráveis diferenças na quantidade de vôos detectáveis de parasitóides entre plantas *Bt* e linhas isogênicas;
- uma vez que poucas diferenças foram encontradas nos parasitóides, aparentemente existe uma considerável flexibilidade em seu comportamento quanto a sinais olfatórios.

Efeitos de transgenes *Bt* sobre biodiversidade de polinizadores

A polinização por insetos é um passo essencial na formação de frutos e sementes em muitas culturas, sendo importante, portanto, entender o impacto de transgenes a esses processos. Para contribuir no entendimento dos efeitos dos transgenes sobre os polinizadores, a atividade e a alimentação dos polinizadores foi estudada em duas das culturas usadas no projeto: canola e berinjela. De modo geral, nossos resultados indicam que os efeitos sobre polinizadores de plantas transgênicas, pelo menos aquelas que são fontes importantes de alimentos e/ou são dependentes de insetos como polinizadores, merecem maiores atenções. Os exemplos estudados indicam que o comportamento do polinizador pode ser afetado e também foi aparente que fatores externos, tais como local (por exemplo, distância de colônias comerciais de abelhas) podem afetar fortemente a composição da sociedade do polinizador e daí o resultado de estudo de comportamento.

Efeitos de transgenes *Bt* sobre interações tritróficas – biodiversidade do predador

Uma análise rigorosa foi feita de redes de alimentos (especificamente para artrópodes associados com culturas) em campos de batatas e berinjelas. Um número de interações bitróficas e tritróficas em ambas as culturas foram recomendadas como objeto de estudo ecologicamente significativo. Os efeitos das plantas de culturas *Bt* sobre diferentes insetos herbívoros não-alvo nessas culturas levaram às seguintes conclusões:

- a lagarta da folha do algodão teve maior mortalidade e tempo de desenvolvimento mais longo em dois tipos de milho *Bt* (MON810, *Bt*11);

- a mortalidade e o tempo de desenvolvimento do besouro da batata do Colorado podem ser negativamente afetados pela batata *Bt*;
- nenhum efeito estatisticamente significativo da berinjela *Bt* sobre a mortalidade ou desenvolvimento da mariposa do tubérculo da batata sob condições de laboratório ou de campo;
- ácaros aranhas mostraram preferência por berinjela *Bt*.

Diferentes espécies de predadores foram alimentados com toxinas *Bt* ativadas ou um controle livre de *Bt* em experimentos bitróficos ou com presas herbívoras criadas com plantas transgênicas *Bt* ou plantas controle não *Bt* em experimentos tritróficos:

- larvas dos predadores crisopa verde e duas espécies de joaninha (*Adalia bipunctata*; *Hippodamia variegata*) foram afetadas negativamente em vários experimentos quando alimentadas com as proteínas ativadas Cry1Ab ou Cry3Bb;
- o desenvolvimento das larvas de crisopa verde em um complexo herbívoro natural em berinjelas *Bt* em gaiolas foi mais lento;
- nenhum efeito significativo sobre joaninhas especialistas (*Stethorus punctillum*) alimentando-se de ácaros aranha sobre berinjela *Bt* ou milho *Bt*. entretanto a densidade de presas de ácaros aranha era maior em berinjela *Bt*;
- ácaros predatórios têm preferência por ácaros aranha de berinjela não *Bt*, mas não mostraram efeitos em milho *Bt* ou não *Bt*.
- O milho *Bt* não afeta negativamente uma espécie de aranha predadora, *Theridion impressum*;
- a sensibilidade à toxina e o nível de frequência da exposição desses predadores a toxinas *Bt* terão que ser levados em conta na condução de avaliação de risco de culturas *Bt*.

Efeitos de culturas transgênicas *Bt* sobre a biodiversidade de insetos não-alvo no campo:

- testes de campo com berinjela Cry3Bb: três estações de testes de campo com berinjela resultaram nas seguintes conclusões: a berinjela *Bt* não afetou a biodiversidade geral de artrópodes, embora, como esperado, a densidade do besouro da batata do Colorado fosse mais baixa nas parcelas *Bt* e, curiosamente, a dinâmica da população de afídeos foi diferente entre as parcelas.
- testes de campo com batata Cry1Ab: duas estações de testes de campo levaram à conclusão de que a batata *Bt* não afetou a biodiversidade geral dos artrópodes.
- testes de campo com canola Cry1Ac: duas estações de testes de campo produziram as seguintes conclusões: a canola *Bt* não afetou a biodiversidade geral dos artrópodes. Um importante herbívoro não-alvo (bicho mineiro) não foi negativamente afetado pela canola *Bt*.
- testes de campo com milho Cry1Ab: três estações de testes de campo com milho resultaram nas seguintes conclusões: o milho *Bt* não afetou a biodiversidade geral dos artrópodes por duas estações, enquanto, na terceira, a biodiversidade foi menor nas parcelas transgênicas. A lagarta do capulho do algodão é uma praga secundária significativa e apenas parcialmente controlada pelo milho *Bt* e, portanto, deveria ser levada em consideração no manejo de resistência de plantas. Outras espécies de herbívoros e predadores específicos testados não foram afetadas pelo milho *Bt*.

De modo geral, em testes de campo por várias estações, poucos efeitos negativos na biodiversidade de artrópodes foram encontrados para as culturas *Bt* testadas. Naturalmente os testes e experimentos tinham suas limitações em objetivo, tamanho e duração. O nível de certeza requerido determinará se mais experimentação e testes são necessários para a avaliação de risco ou não. O relatório final do projeto contém uma proposta para uma nova estrutura de avaliação de risco ambiental (ERA) para

plantas transgênicas e tentativas para solucionar as falhas dos procedimentos de testes derivados de produtos químicos que foram usados para plantas transgênicas no passado.

CONCLUSÕES

A interação da toxina expressa no milho *Bt* tem sido estudada de várias formas. Todos os dados apresentados aqui sugerem que, embora Cry1Ab em doses relativamente altas e exposição contínua possa afetar negativamente as lavas de crisopa verde, não é provável que a ação tóxica da proteína seja responsável pelo efeito negativo do milho *Bt* em uma interação tritrófica. Mais provavelmente, é a reduzida qualidade da presa (lagarta da folha do algodão exposta a Cry1Ab) ou outra interação ainda não caracterizada entre a dieta e a toxina que afeta negativamente as larvas de crisopa nessas circunstâncias. Se o efeito negativo observado exerce papel significativo no campo, é necessário determinar em testes de campo.

Em resumo, com uma exceção, nenhuma diferença importante no comportamento de parasitóides, taxa de parasitismo e longevidade de adultos foi observada entre as culturas *Bt* e suas linhas isogênicas. Naturalmente estes resultados devem ser julgados no contexto de seus limitados objetivo e duração, o que pode deixar de detectar diferenças menores ou que somente irão aparecer após várias gerações, ou com outras espécies. Não obstante, a única interação afetada que foi detectada mostra a utilidade destes experimentos para identificar riscos putativos.

PRINCIPAIS PUBLICAÇÕES

de Maagd RA. (2004). Biotechnology meets ecology. In: Nap J-P., Atanassov A., Stiekema WJ, eds. *Genomics for Biosafety in Plant Biotechnology*. Amsterdam: IOS Press:117-131.

Kiss J., Szentkiralyi F., Toth F., Szenasi A., Kadar F., Arpas K., Szekeres D. and Edwards C.R. (2003). Bt Corn: Impact on Non-Targets and Adjusting to Local IPM Systems. In: Lelley T., Balazs E., Tepfer M. (Editors): *Ecological Impact of GMO Dissemination in Agroecosystems*. *Facultas Verlagsund Buchhandels AG Wien*, p.157-172.

Rodrigo-Simon A., de Maagd RA., Avilla C., Bakker PL., Molthoff JW., Gonzalez-Zamora J., Ferre J. (2006). Lack of detrimental effects of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins on the insect predator green lacewing: A toxicological, histopathological, and biochemical approach. *Applied and Environmental Microbiology* 72: in press.

ROVENSKA, GZ.; ZEMEK, R.; SCHMIDT, JEU.; HILBECK, A. (2005). Altered host plant preference of *Tetranychus urticae* and prey preference of its predator *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Tetranychidae, Phytoseiidae) on transgenic Cry3Bbegplants. *Biological Control* 33:293.

TOTH, F.; ARPAS, K.; SZEKERES, D.; KADAR, F.; SZENTKIRALYI, F.; SZENASI, A.; KISS, J. (2004). Spider web survey or whole plant visual sampling? Impact assessment of Bt corn on non-target predatory insects with two concurrent methods. *Environmental biosafety research* 3:225-231.

ÁRPAS, K.; TOTH, F; KISS, J. (2005). Foliage-dwelling Arthropods in Bt-transgenic and in Isogenic Maize: A Comparison through Spider Web Analysis. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 40:347-353.

Impacto de três estratégias para o controle do patógeno da batata sobre a microbiota indígena do solo

<i>Acrônimo</i> POTATOCONTROL <i>Acrônimo do Programa</i> FP5-LIFE QUALITY <i>Número do Contrato</i> QLK3-CT-2000-01598 <i>Período</i> Janeiro de 2001 – Dezembro de 2004 <i>Webside do Projeto</i> http://www.plant.wageningen-ur.nl/projects/potatocontrol	<i>Coordenador</i> J. D. VAN ELSAS Plant Research International B.V. P.O. Box 16 NL-6700 AA Wageningen The Netherlands j.d.van.elsas@rug.nl
--	--

<i>Parceiros</i> Kornelia SMALLA Biologische Bundesanstalt (BBA), Braunschweig (DE) Andre TRIGALET INRA/CNRS, Toulouse (FR) Maria MILAGROS LOPES IVIA, Valencia (ES)	Julian SMITH CAB International, Surrey (UK) Janet JANSSON Sodertorns Hogskola Huddinge (SE) Angela SESSITSCH ARCS, Seibersdorf (AT)
---	---

BACKGROUND E OBJETIVOS

Fitopatógenos bacterianos, em particular aqueles que causam as podridões marrom e mole, são uma imensa ameaça à cultura da batata na Europa, com severas perdas econômicas relatadas em vários Estados-membros. Nos anos recentes, várias abordagens não químicas para controlar esses fitopatógenos foram propostas e desenvolvidas. Estas incluem a linhagens de batata transgênica que produzem a lisozima fago T4 e, portanto, afastam fitopatógenos; as linhagens de batata transgênica que produzem as enzimas líticas cecropina e/ou atacina; e o uso de mutantes avirulentos do patógeno, que compete com o tipo selvagem na rizosfera e eficientemente interfere em sua ação. Nenhuma dessas abordagens alcançou a comercialização até agora, e seus efeitos putativos sobre o ambiente permanecem desconhecidos. Particularmente, há preocupações relacionadas com seus impactos, por exemplo, sobre as populações microbianas indígenas presentes nos campos agrícolas ou associadas com a cultura da batata.

Este projeto objetivou explorar os efeitos de estratégias biotecnológicas selecionadas para proteger plantas de batata do ataque de patógenos sobre a diversidade microbiana da fitosfera. Os patógenos estudados foram *Ralstonia solanacearum* e *Erwinia carotovora* ssp. *Atroseptica*, que são os principais patógenos bacterianos da batata. Os objetivos principais do estudo foram:

- avaliar os efeitos de três estratégias para controle de patógenos bacterianos em batata sobre a biodiversidade estrutural e funcional da microflora associada com a batata;
- avaliar os efeitos de estratégias selecionadas de biocontrole sobre a diversidade genética das populações de patógenos visadas na rizosfera da batata;
- avaliar a factibilidade das estratégias selecionadas reduzirem a ameaça dos patógenos bacterianos à cultura da batata; e

- recomendar, com base em conhecimento profundo sobre o impacto ecológico, a estratégia mais viável para o controle não químico dos fitopatógenos bacterianos visados.

Para atingir essas metas, foram necessários extensivos testes em microcosmos, na casa de vegetação e no campo. Para todos os objetivos, um conjunto de métodos moleculares na vanguarda do desenvolvimento tecnológico teve que ser desenvolvido e empregado, em combinação com uma gama de métodos tradicionais disponíveis.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

As três estratégias selecionadas foram o uso de: (1) plantas de batata contendo lisozima T4, (2) plantas contendo determinantes cecropina e atacina e (3) formas avirulentas de *R. solanacearum* como “bloqueadoras de nicho”. Em uma primeira fase, os instrumentos necessários para avaliar os efeitos esperados foram desenvolvidos e validados. Foram desenvolvidos métodos de detecção para patógenos e agentes de biocontrole, e.g. tecnologias do gene marcador de proteína fluorescente verde (GFP) e um sistema iniciador específico visando ao *R. solanacearum* (fliC). Além disso, foram desenvolvidos ou avaliados instrumentos moleculares de “fingerprinting” gerais e grupos específicos para a comunidade microbiana para demonstrar efeitos eventuais relacionados com causadores liberados pelas plantas transgênicas. Foram construídas bibliotecas de clones a partir de reunião de amostras de DNA do solo, para determinar as espécies mais dominantes associadas com a batata em ambas as localizações, Espanha e Holanda.

Métodos baseados em atividade foram avaliados para explorar as frações microbianas em conjunto e solos da rizosfera de parcelas de campo com plantas transgênicas. A seguir, a “melhor” estratégia para proteger a batata do ataque de patógenos foi avaliada em experimentos em casa de vegetação. Infelizmente, permissões para aplicar formas modificadas (avirulentas) de patógenos não puderam ser obtidas das autoridades competentes dos Estados-membros, impedindo o teste de campo com agentes microbianos. Após a seleção da melhor estratégia, estudos de campo foram conduzidos em dois Estados-membros, Espanha e Holanda.

PRINCIPAIS DESCOBERTAS E RESULTADOS

Os mutantes avirulentos de *R. solanacearum* proporcionaram proteção contra a invasão das plantas de batata por *R. solanacearum* em verificações iniciais, mas falharam em fazer isso em experimentos subsequentes em microcosmo de solo. Uma linhagem de batata lisozima T4, DL-12, mostrou ter ótima proteção tanto contra *R. solanacearum* como contra *E. carotovora*. Outras linhagens de batata transgênica não conferiram resistência similar aos patógenos aplicados, portanto esta tecnologia (i.e. a linhagem DL-12) foi selecionada para teste de campo.

Primeiramente, um estudo básico executado no campo em dois Estados-membros avaliou a dinâmica em microflora natural associada com a batata silvestre. Foi encontrada uma variação considerável com o tempo, i.e. a fase de crescimento da batata era o determinante chave para a microflora associada à planta. Mais ainda, o local (Espanha versus Holanda) e a variedade da batata afetaram a diversidade microbiana ao redor das plantas. Consideráveis números de benéficos, a maioria identificada como tipos de *Lysobacter* spp., foram detectados e isolados nas plantas de batata cultivadas no campo, tanto da rizosfera como da endosfera. Em uma segunda e última fase, foi feito o teste de campo da linhagem transgênica DL12 versus tipo selvagem (Desiree) nos mesmos dois Estados-membros. Infelizmente, o experimento da Holanda foi destruído por ativistas; entretanto, parte deste

experimento pôde ser salva, até mesmo produzindo dados úteis. Conjuntamente, ambos os experimentos novamente indicaram que a fase de crescimento da planta e do local (Espanha versus Holanda) foram os mais importantes determinantes das estruturas microbianas associadas às plantas.

Uma diferença pequena e efêmera entre a diversidade microbiana associada à DL12 e o tipo selvagem foi notada mais especialmente no campo da Espanha. Entretanto, o efeito foi minúsculo e não pode ser atribuído à modificação genética *per se*, uma vez que as duas linhagens não eram estritamente isogênicas e revelaram diferenças em crescimento. Outros fatores importantes que controlam estas comunidades associadas à batata podem também ser responsáveis pelos efeitos observados, por exemplo, a origem e idade das batatas semente. Um efeito da linhagem transgênica sobre a diversidade de benéficos potenciais não foi notada.

As estratégias biotecnológicas selecionadas para controlar dois principais patógenos bacterianos têm claras desvantagens em sua aplicação. As cepas avirulentas aplicadas como agentes biocontroladores mostrou promessas, mas demonstrar proteção total foi problemático e maior exploração dessa abordagem torna-se necessária. Mais ainda, sua competência ecológica pode ser afetada pela modificação genética. Também neste estudo, a expressão da lisozima T4 em DL12 não forneceu proteção total contra *R. solanacearum* e deve-se portanto concluir que a população de *R. solanacearum* que infecta as plantas da batata não é completamente afetada pela lisozima T4. Possivelmente, as células de *R. solanacearum* que invadiram o tecido da planta estão protegidas do produto transgênico, ou a expressão da lisozima T4 é baixa demais para evitar a penetração de *R. solanacearum* nas raízes. A expressão gênica da lisozima T4 melhorada e controlada para tecido específico nas linhagens de batata transgênica pode ser necessária para melhorar ainda mais o biocontrole em linhagens transgênicas com lisozima T4.

CONCLUSÕES

Concluindo, apenas a linhagem de batata transgênica com o a lisozima do bacteriófago T4 mostrou promessa limitada como controladora dos patógenos bacterianos. Expressão aumentada e controle da expressão em tecido específico nas linhagens de batata transgênica podem representar um melhoramento importante para a supressão mais efetiva dos patógenos alvo.

Entretanto, todas as três estratégias propostas que visam a controlar os patógenos selecionados na batata mostraram sérias desvantagens para as aplicações. A modificação genética em batata com um proposto forte efeito na estrutura da comunidade microbiana (lisozima T4) não revelou mudanças drásticas na comunidade indígena do solo e associada à planta. Outros fatores ambientais como local e fase de crescimento causaram efeitos mais fortes à estrutura da comunidade microbiana dessas plantas. Pequenos efeitos observados nas estruturas da comunidade associadas à planta podem não estar relacionados com a modificação genética *per se*, mas serem atribuídos a pequenas diferenças em batatas semente. Batatas semente devem ser estritamente isogênicas e derivadas da mesma fonte quando se determina diferenças em estruturas de comunidades associadas às plantas entre plantas transgênicas e do tipo selvagem.

Derivados avirulentos de patógenos importantes geneticamente modificados podem ser bem sucedidos no combate às doenças, mas preocupações sobre a possível conversão para a virulência e competência ecológica reduzida limitam ainda mais a exploração desse tipo de abordagem. Mais ainda, esta tecnologia não pode ser submetida a testes completos devido a limitações regulamentares. A modificação

genética das plantas pela inserção de genes antagonistas a patógenos pode ser promissora, embora não possa ser excluído que a atividade de largo espectro do produto transgênico pode causar efeito sobre as comunidades antagonistas em plantas próximas.

Depois dos novos sistemas de detecção desenvolvidos por este projeto, as recomendações para as autoridades dos Estados-membros da UE sobre os efeitos das plantas transgênicas sobre a microbiota do solo representam o resultado mais importante deste projeto. A verificação da diversidade microbiana e de populações antagonistas em ou próximo às plantas transgênicas via uma abordagem independente da cultura foi desenvolvida e aplicada com sucesso. É, portanto, recomendado que essa verificação (polifásica) microbiana independente de cultura para testar efeitos de novas construções transgênicas em comunidades associadas a plantas seja aceita como procedimento de rotina nas regulamentações de biossegurança.

Testando sistemas integrados GM-rizorremediação para biorremediação do solo

<i>Acrônimo</i> RHIZOREMEDIATION <i>Acrônimo do Programa</i> FP5-LIFE QUALITY <i>Número do Contrato</i> QLK3-CT-2001-00101 <i>Período</i> Janeiro de 2002 – Dezembro de 2004	<i>Coordenador</i> D.N. DOWLING Institute of Technology Carlow Carlow Ireland
---	---

<i>Parceiros</i> R. RIVILA Universidad Autonoma de Madrid (ES) F. O'GARA / J. MORRISSEY BIOMERIT Research Centre, University College Cork (IE) U. KARLSON National Environmental Research Institute (NERI), Roskilde (DK) H-C PEDERSEN Danisco Seed, Seed Technology Department, Holeby (DK)	M. BITTENS/A. REIN University of Tuebingen, Tuebingen, and UFZ Centre for Environmental Research Leipzig-Halle, Leipzig (DE) T. MACEK Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague (CZ) S. FRANCISCONI Armed Forces Institute of Pathology, Washington DC (USA)
---	---

BACKGROUND E OBJETIVOS

Rizorremediação é a aplicação combinada de plantas e bactérias da zona da raiz para a limpeza de solo poluído. O primeiro objetivo deste projeto era desenvolver bactérias multifuncionais modificadas para degradação PCB *in situ*, para sinalizar a biodisponibilidade do poluente, a eficácia da cepa de biorremediação, a formação do produto intermediário clorobenzoatos (CBA), e a determinação dos pontos de medida da degradação.

O segundo objetivo era desenvolver métodos moleculares de detecção para rastrear as bactérias degradadoras no ambiente para quantificar as cepas de OGMs sob condições ambientais e, monitorar efeitos na comunidade microbiana em solo poluído. O objetivo final era conduzir modelagem ambiental matemática do processo e preparar uma detalhada avaliação de risco (e diretrizes) do organismo geneticamente modificado (OGM) e da biorremediação.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

Fusões do promotor Gfp foram usadas para gerar cepas biossensoras que pudessem monitorar o produto final do processo de biorremediação, clorobenzoatos. Foram construídas cepas com expressão realçada da marcha de degradação PCB usando promotores *nod box* e circuitos reguladores *nodD*. Metodologias de Cadeia de Reação de Polimerase (PCR) de tempo real foram usadas para identificar e quantificar os OGMs. O impacto dos OGMs introduzidos sobre populações bacterianas foi monitorado por meio de métodos moleculares de ecologia microbiana, tais como Eletroforese de Gel de Gradiente Termal (TGGE) e verificando grupos de genotecas

específicas. Culturas de tecidos vegetais foram avaliadas para degradação de PCBs e seus produtos finais. Os OGMs foram testados em mesocosmos realistas usando solos reais contaminados com PCBs. Os dados gerados foram usados em experimentos de modelagem para prever a redução do risco do processo conduzido pelos OGMs.

PRINCIPAIS DESCOBERTAS E RESULTADOS

Um dos mais entusiasmantes aspectos do projeto foi o desenvolvimento de cepas biossensoras integradas facilitando *in situ* o monitoramento da remediação PCB. O sistema desenvolvido permitiu a detecção dos PCBs biodisponíveis em níveis tão baixos quanto 100 nM. Em particular, esses instrumentos permitirão um monitoramento da eficácia dos inoculantes de biorremediação em situações reais. As descobertas irão levar a melhor entendimento dessas medidas para serem aplicadas para a otimização de tecnologias de biorremediação.

Instrumentos moleculares foram desenvolvidos para a identificação e quantificação não ambígua de cepas de bactérias geneticamente modificadas no ambiente. O OGM pode ser quantificado no nível de 1 a 10 células por grama de solo em aproximadamente 90 minutos. Demonstrou-se que o impacto do inoculante sobre a composição da comunidade microbiana afeta apenas a rizosfera da planta inoculada e não se dissemina significativamente além disso.

Extensivos testes do sistema em plantas de álamos e outras espécies de plantas indicaram que o OGM aumentou significativamente a remoção total dos PCBs na presença das plantas, em contraste com plantas com micróbios autóctones (indígenas).

A modelagem matemática confirma os dados de laboratório e sugere que o uso do processo OGM encurtaria significativamente o tempo de limpeza de solos contaminados. Foi conduzida uma avaliação detalhada do impacto sobre o uso de cepas OGM. Em geral, a redução de risco seria esperada se o processo fosse usado em situações reais. Um conjunto de diretrizes foi proposto sobre o uso seguro, as vantagens e limitações desta tecnologia de biorremediação baseada em OGM.

CONCLUSÕES

Embora trabalhando com um sistema modelo, o projeto trouxe resultados de interesse geral que podem ser aplicados na biorremediação e proteção ambiental. Incluem:

- rizoasera caracterizada/cepa(s) do solo para degradar PCB: o princípio pode ser estendido para outros compostos alvo;
- tecnologias de inoculação para introduzir cepas ao ambiente contaminado solo/rizosfera;
- funcionalidade de biossensoras das cepas para monitoração de atividade *in situ*: isso poderia ser estendido a outros compostos;
- sistemas de expressão gênica de alto nível para *Pseudomonas* (baseado em *Sinorhizobium nod* Box);
- avaliação de risco – OGMs, produtos finais metabólicos e modelagem matemática.

PRINCIPAIS PUBLICAÇÕES

AGUIRRE DE CARCER, DA.; MARTIN, M.; MACKOVA, M.; MACEK, T.; KARLSON, U.; RIVILLA, R. (2007). The introduction of genetically modified microorganisms designed for rhizoremediation induces changes on native bacteria in the rhizosphere but not in the surrounding soil. *ISME J.* 1 (3):215-223.

FRANCOVA, K.; SURA, M.; MACEK, T.; SZEKERES, M.; BANCOS, S; DEMNEROVA, K.; SYLVESTRE, M.; MACKOVA, M. (2003). Generation of plants carrying bacterial enzyme for degradation of polychlorinated biphenyls. *Fresenius Environmental Bulletin* 12 (3):309-313.

HOGAN, J.; SHERLOCK, O.; RYAN, D.; WHELAN, C.; FRANCESCONI, S.; RIVILLA, R.; DOWLING, D.N. (2004). Fluorescence resonance energy transfer (FRET) based molecular detection of a genetically modified PCB degrader in soil. *FEMS Microbiology Letters* 236:349-357.

LARRAINZAR, E.; O'GARA, F.; MORRISSEY, JP. (2005). Applications of Autofluorescent Proteins for In Situ Studies in Microbial Ecology. *Annu Ver Microbiol.* 59:257-77.

VILLACIEROS, M; WHELAN,C.; MACKOVA, M.; MOLGAARD, J.; SANCHEZ-CONTRERAS, M.; LLORET, J.; CARCER, D.A.; ORUEZABAL, }R.I.; BOLANOS, L.; MACEK, T.; KARLSON, U.; DOWLING, D. N.; MARTIN, M.; RIVILLA, R. (2005). PCB Rhizoremediation by *Pseudomonas fluorescens* F113 derivatives using a *Sinorhizobium meliloti* nod system to drive *bph* gene expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:2687-2694.

Desenvolvimento de trigo com eficiência no uso de nitrogênio melhorada, visando um sistema sustentável de produção

<i>Acrônimo</i> SUSTAIN <i>Acrônimo do Programa</i> FP5-LIFE QUALITY <i>Número do Contrato</i> QLK3-CT-2001-01461 <i>Período</i> Outubro de 2001 – Setembro de 2005	<i>Coordenador</i> Dimah Z. HABASH Rothamsted Research Harpenden, Hertfordshire, AL5 2JQ, UK
--	--

<i>Parceiros</i> Betrand HIREL Institut National de la Recherche Agriculture (FR) Jens WEYEN Saaten-Union GmbH (DE) Jan K. SCHJORRING The Royal Veterinary and Agricultural University (DK)	Gilles PELTIER Commissariat a l'Energie Atomique (FR) Jose L. ARAUS University of Barcelona (ES)
---	--

BACKGROUND E OBJETIVOS

A eficiência no uso de nitrogênio (NUE) é um novo impulsionador do melhoramento de trigo em resposta às preocupações com o uso excessivo de fertilizantes químicos, custos econômicos e poluição ambiental. É do interesse público apoiar os esforços de melhoramento para selecionar variedades capazes de usar o nitrogênio mais eficientemente, proporcionando a ciência de plantas que os sustentam. A diversidade genética é o material básico do melhoramento de plantas. Neste sentido, explorar a variação natural e a transgênica para obter cultivares com desempenho agrônomico melhorado com enfoque no metabolismo do nitrogênio é um projeto de alta relevância.

São necessários marcadores na planta para características-chave que possam ser usados em seleção molecular para aumentar tanto o nível quanto a estabilidade de eficiência para apoiar a agricultura sustentável. Estes marcadores podem então ser incorporados em variedades de alta produtividade, usando instrumentos convencionais ou biotecnológicos, no médio ao longo prazo. Este projeto propôs uma abordagem com dois caminhos para desenvolver novos genótipos de trigo usando modificação genética e desenvolver genética molecular para selecionar variação alélica e novas características moleculares.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

Uma abordagem de genética quantitativa foi usada para estudar o uso de nitrogênio (NU) em trigo porque é uma característica multigênica complexa. A análise de ligação fatorial foi usada para dissecar características componentes, identificar novas características e posicionar genes candidatos sob loci - o primeiro estudo de NU em trigo para panificação. Usamos uma população de mapeamento de trigo para panificação e estabelecemos fenótipos e loci de características quantitativas (QTL) relacionadas com características fisiológicas, de desenvolvimento, relacionadas com produtividade e bioquímicas. Para comparar loci e dados com os de arroz e milho, a genômica comparativa foi usada e a enzima do metabolismo primário do nitrogênio, a glutamina sintetase (GS), foi mapeada nessa população.

Foi usada a tecnologia mais moderna de modificação genética (GM) para produzir novos transgênicos de trigo para testar a importância da GS para a NU do trigo. Um número de linhagens transformadas independentemente em vários genótipos, linhagens homocigóticas duplo-haplóide foram produzidas, transformando um cultivar com uma construção de super-expressão de GS1 da soja, sem o marcador de transformação ampicilina. A aquisição primária de nitrogênio foi estudada, transporte de amônia, status do nitrogênio inorgânico, metabolismo do nitrogênio e fotossíntese de trigo selecionado DHL e linhagens transgênicas. A seleção subsequente de novos transgênicos de trigo para uso de nitrogênio e produtividade foi feita em testes de campo na Espanha.

A família do gene GS de trigo foi clonada e seu resultado foi comparado ao arroz e milho. A expressão e o perfil de proteína da família do gene GS do trigo durante o desenvolvimento da planta foram estudados em diferentes tecidos, durante jejum de N e alimentação, em plantas no campo, correlacionando com crescimento. Localizamos alguns dos genes GS usando as mais novas técnicas de imunolocalização em trigo e milho. Estudamos a função de GS citosólico em milho usando linhagens mutantes especiais.

PRINCIPAIS DESCOBERTAS E RESULTADOS

Os estudos genéticos da população de mapeamento de trigo de panificação demonstraram a importância da enzima glutamina sintetase no controle de aspectos do uso de nitrogênio no trigo. O conjunto de dados QTL de 21 características representa um valioso recurso para comparar com estudos similares em arroz e milho e nos capacitar a descobrir fatores de regulação genéricos ou específicos para espécies que governam o uso de nitrogênio. Nossos resultados demonstraram variação genética em NU, particularmente conteúdo e atividade de GS, no germoplasma e cultivares e, isso forma a base do teste para variação alélica em futuros programas de melhoramento.

Este projeto destacou a complexidade de modificar geneticamente enzimas do metabolismo primário em trigo com a finalidade de modificar uma característica quantitativa complexa. Embora tivéssemos produzido várias linhagens transgênicas, as expressões dos transgenes eram complexas e impediram-nos de usar essa tecnologia para produzir linhagens de trigo com NU mais alto. Infelizmente, a destruição dos testes de campo GM no verão de 2004, o primeiro incidente desse tipo na Espanha, incapacitou-nos para estabelecer qualquer fenótipo definitivo para nossas linhagens transgênicas no ambiente de campo.

Um importante produto para o projeto e para a comunidade científica é a clonagem, o mapeamento e estudo da expressão do gene GS em trigo. Isso representa o primeiro estudo dessa enzima do trigo e produzimos o primeiro perfil detalhado em uma matriz de desenvolvimento, tecido, estágio de desenvolvimento e ambiente. A comparação com estudos similares em arroz e milho permite formular um modelo genérico para NU em cereais.

CONCLUSÕES

Este projeto destacou a força em usar abordagens genéticas complementares para criar e testar o conhecimento científico em ciência de culturas. O uso de tecnologia transgênica não foi promissor em modificar nossa enzima candidata do metabolismo primário - glutamina sintetase e em criar germoplasma com NU melhorado. Isso foi ainda mais exacerbado pela destruição de nossos testes de campo com transgênicos experimentais no verão de 2004 na Espanha. A análise genética de ligação foi bem-

sucedida como um estudo complementar para identificar novas regiões genômicas que regulam aspectos do metabolismo, assimilação e remobilização de N. Isso deve ajudar os melhoradores de plantas em seleção assistida por marcadores e na busca de variação alélica em características que melhorem o uso do nitrogênio em trigo.

PRINCIPAIS PUBLICAÇÕES

Jahn T.P., Moller A.L.B., Zeuthen T., Holm L.M., Kl.rke D.A., Mohsin B., Kuhlbrandt W. and Schjorring J.K. (2004). Aquaporin homologues in plants and mammals transport ammonia. *FEBS Letters* 574:31-36.

Quarrie SA., Steed A., Calestani C., Semikhodskii A., Lebreton C., Chinoy C., Steele N., Pljevljakusic D., Waterman E.,

Weyen J., Schondelmaier J., Habash DZ., Farmer P., Saker L., Clarkson DT., Abugalieva A., Yessimbekova M., Turuspekov Y., Abugalieva S., Tuberosa R., Sanguineti MC., Hollington PA., Aragues R., Royo A., Dodig D. (2005). A high-density genetic map of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) from the cross Chinese Spring X SQ1 and its use to compare QTLs for grain yield across a range of environments. *Theor Appl Genet.* 110 (5): 865-880.

Martin A., Lee J., Kichey T., Gerentes D., Zivy M., Tatout C., Dubois F., Balliau T., Valot B., Davanture M., Terce-Laforge T., Quillere I., Coque M., Gallais A., Gonzalez-Moro MB., Bethencourt L., Habash DZ., Lea PJ., Charcosset A., Perez P., Murigneux A., Sakakibara H., Edwards KJ. and Hirel B. (2006). Two Cytosolic Glutamine Synthetase Isoforms of Maize Are Specifically Involved in the Control of Grain Production. *Plant Cell* 18:3252-3274.

LOPES MS.; CORTADELLAS, N.; KICHEY, T.; DUBOIS, F.; HABASH, DZ.; ARAUS, JL. (2006). Wheat nitrogen metabolism during grain filling: comparative role of glumes and the flag leaf. *Planta* 225 (1):165-181.

HABASH, DZ.; BERNARD S; SCHONDELMAIER, J.; WEYEN, J.; QUARRIE, SA. (2007). A genetic study of nitrogen use in hexaploid wheat in relation to N utilisation, development and yield. *Theor Appl Genet.* 114(3)403-419.

BERNARD, S.M.; MOLLER, A.L.B.; DIONISIO, G.; JAHN, T.P.; BAUDO, M.; Lopes, M.S.; TERCE-LAFORGUE, T.; FOYER, C.H.; PARRY, M.; FORDE, B.G.; ARAUS, J.L.; Hirel, B.; Schjoerring, J.K.; HABASH, D.Z. (2008). Gene expression and function of glutamine synthetase isozymes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Molecular Biology.* 67:89-105.

Análise do fluxo gênico da cultura para formas selvagens em alface e chicória e suas consequências populacionais-ecológicas no contexto da biossegurança de culturas GM

<i>Acrônimo</i> ANGEL <i>Acrônimo do Programa</i> FP5-LIFE QUALITY <i>Número do Contrato</i> QLK3-CT-2001-01657 <i>Período</i> Setembro de 2001 – Dezembro de 2005 <i>Website do Projeto</i> http://www.plant.wageningen-ur.nl/projects/angel	<i>Coordenador</i> C. VAN DE WIEL Plant Research International Droevendaalsesteeg 1 PO Box 16 NL-6700 AA Wageningen The Netherlands c.c.m.vandewiel@plant.wag-ur.nl
---	---

<i>Parceiros</i> H. DEN NIJS University of Amsterdam (NL) Andrew FLAVELL University of Dundee (UK) R. BAGGER JORGENSEN Riso National Laboratory Roskilde (DK)	F. FELBER Universite de Neuchatel (CH) M. VISCHI University of Udine (IT) A. SORENSEN Keygene N.V. Wageningen (NL)
--	---

BACKGROUND E OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto foi contribuir para uma estrutura para avaliação da segurança da introdução de organismos geneticamente modificados (OGMs) pelo estabelecimento dos riscos primários de escape e suas consequências para o ambiente natural. Plantas transgênicas têm um alto potencial para melhorar tanto a agricultura como o ambiente, mas sua introdução levou a sérias preocupações públicas sobre os riscos que as acompanham, entre outros, as consequências para o ambiente natural. Possíveis impactos relacionam-se com o escape de plantas transgênicas através do cruzamento com parentes selvagens. O medo é que o escape resultará no desenvolvimento de ervas daninhas perigosas que causem ruptura nos sistemas agrícolas ou em ecossistemas naturais vulneráveis.

Uma série de estudos apareceu sobre culturas como colza oleaginosa, enquanto este projeto se propôs estudar duas culturas modelo da família da áster, chicória e alface, em ambas das quais pouco havia sido publicado. A chicória é um exemplo de uma planta de fecundação cruzada obrigatória. A alface é tida como de autofecundação, mas sabe-se que a fecundação cruzada ocorre, embora sua intensidade e variabilidade tenham sido pouco estudadas. A forma selvagem da alface, a alface espinhosa, poderia também servir de espécie modelo (para aumento de característica de erva daninha), uma vez que expandiu sua distribuição enormemente na Europa em décadas recentes.

A pesquisa deste projeto tinha os seguintes objetivos:

- estabelecer o grau de fecundação cruzada sob circunstâncias de campo em chicória e alface;
- rastrear evidências de introgressão de chicória cultivada para selvagem e de alface cultivada para alface selvagem;

- estudar as consequências do fluxo gênico de cultivada para forma selvagem, avaliando os efeitos na aptidão em testes de campo e por monitoramento demográfico tanto das populações naturais como das de híbridos cultura-selvagem;
- obter insight na expansão recente da forma selvagem da alface pela caracterização da diversidade genética de populações através da Europa e pela comparação de dados de vegetação históricos com recentes para mudanças nos habitats nos quais ocorre a alface selvagem;
- integrar os resultados em um modelo a partir do qual recomendações possam ser derivadas para manejar aspectos ecológicos em procedimentos para avaliar a biossegurança de culturas GM.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

O grau de fecundação cruzada e o fluxo gênico em populações selvagens de alface e chicória foram determinados usando o método de microssatélites de marcadores moleculares co-dominantes em alface e o sistema marcador dominante multilocus de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) em chicória. Além disso, o cruzamento da cultura para a selvagem foi estudado em testes de campo em chicória, avaliando um marcador de cor na progênie e, em alface, pela avaliação da morfologia da progênie e subsequentemente verificação ou por RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) ou um marcador PCR em tempo real PCR (*Polymerase Chain Reaction*) designado por um locus SSR (*Simple Sequence Repeats*).

Para rastrear a evidência de introgressão da cultura para as formas selvagens, populações naturais foram verificadas com AFLP e SSAP (*Stage-Specific Activator Protein*), ambos tendo a vantagem de gerar eficientemente um grande número de marcadores por todo o genoma. Para assegurar uma amostra representativa do genoma, resultaram informações sobre o mapa de ligação genômica, de modo que a introgressão de partes específicas do genoma pudessem ser rastreadas. O SSAP é um método PCR inovador baseado em elemento transponível. Para rastrear a introgressão de características possivelmente relacionadas com aptidão, foi implementado um método PCR inovador, qual seja o NBS (Sítio de Ligação de Nucleotídeos)- que acessa a variação em torno de genes de resistência a doenças que são intensivamente usados no melhoramento.

Foram estudadas possíveis influências de introgressão na aptidão pela determinação de parâmetros relacionados com a aptidão em híbridos criados experimentalmente e populações de retrocruzamentos sob condições de campo e casas de vegetação, e combinando esses dados com avaliações de marcadores moleculares nas plantas sobreviventes. Para colocar esses parâmetros em perspectiva, ambas as populações híbridas experimentais e as populações naturais de alface também foram monitoradas demograficamente, levando a modelos de projeção de matriz. Esses modelos possibilitam a identificação de estágios cruciais no ciclo de vida da espécie, onde as mudanças em desempenho terão o maior impacto no crescimento e aptidão da população.

Em uma tentativa de reconstruir o recente aumento da alface selvagem no Noroeste da Europa, a variação genética foi verificada seguindo linhas norte-sul e leste-oeste cruzando a Europa, usando microssatélites codominantes e marcadores de DNA de cloroplastos herdados maternalmente. Amostras históricas e recentes da vegetação tiradas de bancos de dados foram comparadas para determinar se a alface selvagem também está invadindo novos tipos de vegetação.

PRINCIPAIS DESCOBERTAS E RESULTADOS

Em campos experimentais de chicória, as taxas de fecundação cruzada seguiram os padrões usuais para distância: máxima nos primeiros 20 m e caindo abruptamente a menos de 1% em 60-90 m. Com a alface, basicamente de autofecundação, as taxas de fecundação cruzada foram significativas, mas na maioria em nível não mais alto do que 5%, mas com mais avaliações fora desses limites em um dos anos estudados. Com populações naturais de alface, muito pouca heterozigosidade foi encontrada para estudar o fluxo gênico pelo pólen. Portanto, o fluxo de sementes foi testado para autocorrelação, o que mostrou a maior parte da dispersão dentro de 10 metros, mas evidência para dispersão pode ser encontrada até a mais de 100 m. Em populações naturais de chicória, o fluxo de pólen pode ser determinado nos primeiros poucos metros, mas alguns eram da ordem de 100 metros, a maior distância testada.

O método novo SSAP baseado em retrotransposon e o de marcador de estabelecimento de perfis NBS baseado em genes foram desenvolvidos com sucesso, e juntamente com o método de marcador AFLP já estabelecido, foram aplicáveis na confecção de mapas genômicos em cruzamentos de culturas e selvagens feitos para estudos de campo. Em chicória, foram encontradas amplas indicações de introgressão entre a cultura e a selvagem, com quantidade variando entre plantas. Autofecundando a alface, a introgressão pode ser baixa, dificultando o rastreamento. De fato, análises de haplotipos para rastrear evidência de introgressão da cultura para a alface selvagem, com a busca por segmentos genômicos combinando marcadores específicos para cultivares, provaram-se problemáticas. O problema principal com haplotipos supostamente específicos da cultura é fazer a distinção entre uma introgressão recente da alface cultivada e uma originária baseada na ancestralidade comum antes ou aproximadamente ao mesmo tempo da domesticação da alface. A comparação de grandes conjuntos de dados de microssatélites, tanto na cultura como na alface selvagem, não conseguiu melhorar essa dificuldade de modo significativo, embora raras indicações de introgressão fossem encontradas no sul da Europa.

Em chicória, o monitoramento das populações existentes consistindo de uma mistura de chicória cultivada e selvagem e, experimentos de campo com linhagens híbridas produzidas experimentalmente, mostrou que não há aparentemente barreiras à hibridização (retrocruzamento) além da geração F1 e, que os híbridos são, pelo menos, tão capazes de sobreviver quanto os tipos selvagens, dependendo das condições ambientais. Em alface, o monitoramento demográfico de populações naturais e testes de campo com linhagens híbridas criadas experimentalmente também mostraram boa sobrevivência de linhagens híbridas no campo, embora haja uma clara diminuição no vigor nas subseqüentes gerações híbridas. Entretanto, a modelagem dos resultados indicou uma clara possibilidade de deslocamento da alface selvagem ou desenvolvimento híbrido enxame, dependendo das condições ambientais e estocasticidade.

Um inventário intensivo de dados florísticos e de herbários mostrou que, durante o século XX, a alface espinhosa estendeu sua distribuição por toda a Europa, exceto na parte norte do Reino Unido e da Escandinávia. Uma associação dessa expansão com o aquecimento climático pode ser encontrada, mas ainda não é claro até que ponto outros fatores podem estar envolvidos, tais como perturbação crescente dos habitats por humanos ou introgressão por parte da cultura. Tanto os polimorfismos de DNA dos cloroplastos como a diversidade dos microssatélites nucleares indicaram vários eventos iniciadores da dispersão da alface espinhosa através da Europa, mas não um padrão geográfico claro na distribuição de sua diversidade genética. Isso é consistente com a dispersão ser em parte relacionada à atividade humana, em que migrações de curta e longa distância são possíveis, além de uma difusão histórica mais gradual. Análises de bancos de dados de vegetação mostram claramente um aumento na amplitude ecológica da alface espinhosa em direção a habitats mais sombrios. Isso

poderia estar indiretamente relacionado com o aquecimento do clima, ou ao fato de que grandes aumentos nos habitats normais de crescimento em áreas perturbadas poderiam aumentar a pressão de sementes em outros habitats

CONCLUSÕES

Os resultados de chicória mostram evidência da ocorrência de introgressão entre a cultura e as formas selvagens e, que híbridos são capazes de sobreviver e reproduzir, e, portanto, persistem no campo. Os resultados de alface mostram a possibilidade tanto de cruzamentos da cultura com formas selvagens como a persistência de híbridos no campo. Entretanto, nessa espécie, principalmente de autofecundação, a evidência de introgressão que na realidade ocorre no campo foi rara e difícil de obter até agora. A factibilidade de modelagem para o benefício da avaliação de risco foi demonstrada com a ajuda da análise de projeção de matriz de resultados de monitoramento geográfico. O aumento da amplitude geográfica e ecológica da alface (espinhosa) na Europa poderia ao menos ser relacionada em parte com o aquecimento do clima. Entretanto, outros fatores poderiam ainda ser relevantes, tais como aumentos em áreas perturbadas pelo homem com crescimento de plantas ou microevolução, possivelmente influenciadas pela introgressão da cultura.

PRINCIPAIS PUBLICAÇÕES

HOOFTMAN, D.A.P.; OOSTERMEIJER, J.G.B.; JACOBS M.M.J. & DEN NIJS, J.C.M. (2005). Demographic vital rates determine the performance advantage of crop-wild hybrids in Lettuce. *Journal of Applied Ecology* 42:1085-1095.

MEYER, G.; TVEIT, G.; JORGENSEN, R.B.; FOLKER, A.F.; VON KRAUSS, M.K.; SANDOE, P. (2005). The factualization of uncertainty: Risks, politics, and genetically modified crops – a case of rape. *Agricultural and Human Values* 22:235-242.

SYED, N.H.; SORENSEN, A.; ANTONISE, R.; VAN DE WIEL, C.; VAN DER LINDEN, C.G.; VAN 'T WESTENDE, W.; HOOFTMAN, D.A.P.; DEN NIJS, J.C.M. & FLAVELL A.J. (2006). A detailed linkage map of lettuce based on SSAP, AFLP and NBS markers. *Theoretical and Applied Genetics* 112:517-527.

VAN DE WIEL, C.; GROOT, M. & DEN NIJS H. (2005). Gene flow from crops to wild plants and its population-ecological consequences in the context of GM-crop biosafety, including some recent experiences from lettuce. In: Wesseler, J. (ed.) *Environmental Costs and Benefits of Transgenic Crops. Wageningen UR Frontis Series* vol. 7, Springer, Dordrecht.

VAN DE WIEL, C.; FLAVELL, A.; SYED, N.; ANTONISE, R.; ROUPPE VAN DER VOORT, J. & VAN DER LINDEN, G. (2004). Analysis of gene flow in the lettuce crop-weed complex. In: Den Nijs J., Bartsch D. & Sweet J. (eds.) *Introgression from genetically modified plants into wild relatives. CABI Publishing, Wallingford UK*, pp. 163-171.

Fluxo gênico de plantas transgênicas: avaliação e biotecnologia

<i>Acrônimo</i> TRANSBAC <i>Acrônimo do Programa</i> FP5-LIFE QUALITY <i>Número do Contrato</i> QLK3-2001-02242 <i>Período</i> Janeiro de 2002 – Junho de 2005	<i>Coordenador</i> Timothy M. VOGEL Universite de Lyon Villeurbanne Cedex France
---	--

<i>Parceiros</i> Philippe AURIOL Centre de Genie Electrique de Lyon (CEGELY), Ecully (FR) Ghyslaine TISSOT Aventis CropScience, Lyon (FR/DE) Asa FROSTEGARD Agricultural University of Norway, Aas (NO) Jan Dirk VAN ELSAS Plant Research International B.V., Wageningen (NL) Renaud NALIN Libragen, Caluire, Caluire (FR)	Yves DESSAUX ISV-CNRS, Gif-sur-Yvette (FR) Christoph C. TEBBE Bundesforschungsanstalt fur Landwirtschaft (FAL), Braunschweig (DE) Kornelia SMALLA Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry (BBA), Braunschweig (DE) Daniele DAFFONCHIO Universita degli Studi di Milano, Milano (IT)
--	--

BACKGROUND E OBJETIVOS

As metas do projeto TRANSBAC incluíram a avaliação do fluxo gênico de plantas transgênicas para bactérias do ambiente e o desenvolvimento de tecnologia para regularizar esse fluxo de genes. A planta transgênica era transplastômica, em que o transgene está no genoma do cloroplasto. O interesse nesse tipo de planta transgênica é devido à baixa probabilidade de que o pólen conterà o transgene e o grande número de transgenes na planta. Considera-se que o pólen da planta transplastômica não apresenta risco de fluxo gênico através da polinização cruzada. O alto número de genomas do cloroplasto relativo a genomas nucleares é parte da razão pela qual plantas transplastômicas podem ter quantidades maiores da proteína associada. Portanto, a atividade seleta das plantas transplastômicas pode exceder aquela das plantas transgênicas nucleares. Ainda, essas características das plantas transplastômicas podem realçar o fluxo gênico para bactérias ambientais devido ao maior número de transgenes e sua presença em genomas do cloroplasto, que têm maior similaridade com bactérias do que com genomas nucleares.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

O projeto TRANSBAC avaliou as barreiras contra o fluxo gênico (ou transferência de genes) para bactérias ambientais pelo exame de vários aspectos diferentes do fluxo gênico. Primeiramente, foi avaliado o destino dos transgenes na plantas morrendo e apodrecendo. O destino dos transgenes que chegam ao solo também foi explorado. Então, vários modelos biológicos de recipientes de transgenes foram estudados. Por exemplo, foi considerada a possibilidade de patógenos de plantas (e.g., *Ralstonia solanacearum*), que invadem a planta e degradam as células, serem expostos aos

transgenes e poderiam possivelmente incorporá-los em seus genomas. Além disso, outra bactéria modelo, *Acinetobacter* sp., que anormalmente tem altas frequências de transformação, foi usada para aumentar a probabilidade de transferência. Em ambos os casos, em que organismos modelo foram usados, foram implementadas construções genéticas especiais usadas para fornecer sequências homólogas ao genoma do cloroplasto com essas bactérias recipientes. Estas sequências homólogas aumentaram as frequências de transferência gênica.

Finalmente, duas abordagens mais naturais foram tentadas usando bactérias indígenas com recipientes para o transgene. Uma era sobre condições de planta sob apodrecimento como descrito acima com *Ralstonia solanacearum*, e a outra era em solo sujeito a raios. Além dos diferentes modelos e sistemas usados para avaliar o potencial para transferência gênica de plantas transplastômicas para bactérias, também foi conduzido trabalho sobre o desenvolvimento de biotecnologia que pudesse ajudar a reduzir ou eliminar este potencial.

Para poder monitorar o fluxo gênico de plantas transplastômicas para bactérias, foram construídas plantas que tinham os transgenes apropriados no genoma do cloroplasto. Essas construções tinham várias combinações diferentes de genes resistentes a antibióticos e genes degradadores de lindane entre dois genes do cloroplasto (*rbcl* e *accD*). Os genes de resistência a antibióticos usados foram *aadA* e *nptII*. O gene degradador de lindane (pesticida) era *linA*. A vantagem de acrescentar o gene degradador de lindane é sua raridade na maioria dos sistemas de solo. Os genes resistentes a antibióticos já existem em relativamente altas concentrações na comunidade microbiana do solo. Finalmente, também foi executada alguma exploração do marcador de fluorescência *gfp*.

Todos esses genes necessitavam expressar-se em uma ampla faixa de recipientes e serem relativamente seletivos para reduzir o limite de detecção de transferência de genes. Um possível ramo biotecnológico dessas construções de plantas é a planta contendo *linA* e que é capaz de degradar lindane. Essas plantas transplastômicas foram usadas para a série de experimentos sobre fluxo gênico. O resultado deste trabalho provavelmente se aplica a uma faixa muito mais larga de transgenes potenciais do que os genes modelo usados neste projeto.

PRINCIPAIS DESCOBERTAS E RESULTADOS

Experimentos subsequentes trataram do destino imediato dos transgenes *in planta* e depois no solo. A possível degradação do transgene *in planta* foi estudada com apenas as nucleases da planta sendo responsáveis pela degradação do transgene e uma série de condições patogênicas simuladas incluindo a presença de pectinases e celulases, e a invasão de *Ralstonia solanacearum*. Em geral, cerca de 98% do transgene foi degradado antes de chegar ao solo; entretanto, durante a invasão de *Ralstonia solanacearum*, muitas bactérias do solo foram capazes de coinfetar a planta, e daí ficaram em contato com o DNA da planta. Na avaliação da possibilidade da transferência gênica *in planta*, a transferência entre *Ralstonia solanacearum* e *Acinetobacter* foi demonstrada, assim como aquela entre a planta e *Acinetobacter* após a infecção da planta por *Ralstonia solanacearum* e quando o recipiente *Acinetobacter* continha sequência homóloga a *rbcl* e *accD* que foram inseridos artificialmente. A falta dessas sequências homólogas levou à ausência de transformantes mensuráveis contendo o transgene.

Tabela 1.
De Kay et al 2002 AEM.

Transformação <i>in vitro</i> 1 (frequências)					Transformação <i>in planta</i> 2 (número de transformantes)	
Cepas do recipiente	Plasmídeo pLEP01	Puro DNA vegetal	Tecidos Vegetais Esmagados (vaso)	Tecidos Vegetais Esmagados (Foliar)	Planta Transgênica Nuclear	Planta Transgênica Plastídio
<i>Acinetobacter</i> sp. BD 413 ³	<10 ⁻⁸	<10 ⁻⁸	<10 ⁻⁸	<10 ⁻⁸	0	0
<i>Acinetobacter</i> sp. BD 413 + pBAB2	6 (±3.4) x 10 ⁻³	4.1 (±2.3) x 10 ⁻⁶	2.6 (±2.1) x 10 ⁻⁸	6.4 (±2.8) x 10 ⁻⁸	0	31

- 1 Expresso como frequências de transformação: número de transformantes por célula de recipiente.
- 2 Expresso como o número total de transformantes. Para a combinação plantas transplastômicas – *Acinetobacter* sp. BD413 + pBAB2 – os experimentos foram conduzidos cinco vezes e independentemente. Três das cinco plantas produziram transformantes. Das 21 veias centrais da folha independentes colhidas de 3 plantas, 8 produziram 31 transformantes.
- 3 *Acinetobacter* sp. BD413 (sem qualquer sequência para promover recombinação homóloga com o DNA da planta).
- 4 *Acinetobacter* sp. BD413 + pBAB2 (contendo sequências portadas por plastídios nas quais a recombinação homóloga poderia ocorrer).
- 5 Plasmídeo pLEP01 não pode se duplicar em *Acinetobacter* sp. BD413. Os transformantes resultaram apenas de eventos de integração baseada em recombinação homóloga.
- 6 Baseado no uso de plantas transgênicas nucleares de tomate, pKHG3 e *Acinetobacter* sp. BD413 contendo ou não o plasmídeo pFG4ΔnptII, recombinação homóloga ocorrendo em sequências nptII.

Uma vez que o DNA da planta contendo 2% do transgene que sobreviveu à morte da planta chegou ao solo, as nucleases microbianas do solo foram capazes de degradar ainda mais o transgene. Entretanto, o transgene foi em parte protegido pela sua adsorção em superfícies minerais do solo e em parte pelo movimento descendente da água da chuva, que levou o transgene para fora da camada superior do solo microbianamente ativo. O destino de longo prazo do transgene é desconhecido, mas experimentos com duração de quatro anos ainda encontraram sinais do transgene no solo, e isso torna-se suscetível de incorporação por bactérias indígenas e ingestão pela macrofauna do solo.

Estes experimentos subsequentes com DNA de plantas transplastômicas demonstraram a baixa probabilidade de fluxo gênico de plantas para as bactérias do solo. Por outro lado, uma afirmação de resultados negativos é difícil. Bactérias indígenas contendo sequências que não são tão distantes relacionadas das sequências que flanqueiam o cloroplasto, *rbcL* e *accD*, de modo a permitir recombinação homóloga foram selecionadas, mas existiam muito poucas, e, para aquelas que existiam, o mecanismo de transferência gênica é desconhecido. No solo contaminado com DNA transplastômico, foram usados outros modelos para determinar se a transferência gênica poderia ocorrer mesmo sob condições artificialmente favoráveis. Novamente, a existência de sequências homólogas foi necessária para

observar qualquer transferência gênica. Uma vez que essas sequências eram sempre inseridas artificialmente na bactéria recipiente, foi feita uma seleção de bactérias indígenas contendo essas sequências. O número de hibridizações positivas foi limitado, mas não zero. A probabilidade de transferência não foi avaliada além disso.

A dependência aparente da transferência gênica de plantas transplastômicas para bactérias do ambiente e sequências homólogas levou à possibilidade de que a seleção metagenômica de sequências poderia identificar as sequência do cloroplasto com a menor e também a maior probabilidade de homólogos bacterianos. A seleção poderia então fornecer informações críticas para a construção de plantas transplastômicas, dependendo se o objetivo seria aumentar ou diminuir a probabilidade de transferência gênica. No caso em que a transferência gênica seria minimizada, as sequências do cloroplasto com o menor número de sequências homólogas nas bactérias do solo seriam escolhidas para o sítio de inserção do transgene.

Como mencionado acima, muitos genes marcadores de resistência a antibióticos contêm genes relativamente comuns no ambiente. Como resultado, os experimentos destinados a examinar a comunidade microbiana do solo após a transferência do gene deixaram de observar quaisquer diferenças resultantes dos transgenes. Por outro lado, o uso de *linA* é significativo, pois ele não apenas degrada lindane, mas também acrescenta ácido na forma de HCl (o Cl⁻), que vem da descloração do lindane. Essa transferência gênica poderia levar a diferenças significativas na estrutura da comunidade microbiana.

CONCLUSÕES

Este trabalho levou a uma série de conclusões relacionadas com o potencial de transferência gênica de plantas transplastômicas para bactérias do ambiente. As muitas barreiras a essa transferência gênica foram bem elucidadas durante este projeto, mas, mesmo assim, uma resposta definitiva é impossível. De qualquer modo, a presença ou ausência de sequências homólogas parece ser um fator importante na probabilidade de transferência gênica.

PRINCIPAIS PUBLICAÇÕES

KAY, E.; BERTOLLA, F.; VOGEL, T.M; SIMONET, P. (2002). Opportunistic colonization of *Ralstonia solanacearum* infected plants by *Acinetobacter* sp. and its natural competence development. *Microbiol.Ecol.* 43:291-297.

KAY, E.; BERTOLLA, F.; NALIN, R., VOGEL, T. M; SIMONET, P. (2002). Transfer of Antibiotic Resistance Genes from Transgenic (Transplastomic) Tobacco Plants to Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3345-3351.

KAY, E.; CHABRILLAT, G.; VOGEL, T.M.; SIMONET, P. (2003). Intergeneric transfer of chromosomal and conjugative plasmid genes between *Ralstonia solanacearum* and *Acinetobacter* sp. *BD413. Molecular Plant-Microbe Interactions* (IF=3.85), 16:74-82.

CECCHERINI, MT.; POTE, J.; KAY, E.; TRAN VAN, V.; MARECHAL, J.; PIETRAMELLARA, G.; NANNIPIERI, P.; VOGEL, T.M.; et SIMONET, P. (2003). Degradation and transformability of DNA from transgenic plants. *Applied Environmental Microbiology* (IF=3.35), 69:673-678.

POTE, J.; CECCHERINI, MT.; VAN TRAN, V.; ROSSELLI, W.; WILDI, W; SIMONET, P.; et VOGEL, T.M. (2003). Fate and transport of antibiotic resistance genes in saturated soil columns. *European Journal of Soil Biology*, 39:65-72.

ROBE, P.; NALIN,R.; CAPELLANO, C.; VOGEL, T.M. et SIMONET, P. (2003). Extraction of DNA from soil, *European Journal of Soil Biology*, 39:183-190.

Protegendo os benefícios das toxinas *Bt* contra o desenvolvimento de resistência pelos insetos pelo monitoramento e manejo

<i>Acrônimo</i> ProBenBT	<i>Coordenador</i> I. SCHUPHAN
<i>Acrônimo do Programa</i> FP5-LIFE QUALITY	Aachen University-RWTH Aachen
<i>Número do Contrato</i> QLK3-CT-2002-01969	Germany Ingolf.schuphan@oc.rwthachen.DE
<i>Período</i> Novembro de 2002 – Abril de 2006	

<i>Parceiros</i> P. CASTANERA Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid (ES)	H. RUDEL Fraunhofer Institute for Molecular Biology and applied Ecology, Schmallenberg (DE)
J. FERRE Universitat de Valencia (ES)	D. HECKEL University of Melbourne (AU)
D. BOURGUET Centre de Biologie et de Gestion des Populations (INRA), Montferrier (FR)	Max-Planck Institute, Jena (DE)
G.C. LOZZIA Universita degli Studi di Milano (IT)	D. ANDOW University of Minnesota, Minneapolis (US)
L. CAGAN Slovak Agricultural University, Nitra (SK)	J. JEHL Institute of Agriculture, Neustadt (DE)
M. SAVOPOULOU-SOULTANI Aristotle University of Thessaloniki (EL)	

BACKGROUND E OBJETIVOS

A introdução do milho transgênico *Bt* no mercado da UE oferece muitos benefícios no aumento do controle de pragas ao mesmo tempo em que reduz o uso de inseticidas. Esses benefícios poderiam ser perdidos se as pragas visadas, as brocas do colmo Europeia (BEC, *Ostrinia nubilalis*) e Mediterrânea (BMC, *Sesamia nonagrioides*), desenvolverem resistência à toxina *Bt* produzida por esta cultura transgênica. Para estender os benefícios do milho *Bt*, este projeto coletivo da UE desenvolveu resultados gerais com a determinação de níveis de suscetibilidades e frequências iniciais de alelos para resistência em populações de BEC e BMC coletados pelos parceiros envolvidos neste projeto, e resultados específicos de investigações direcionadas a aspectos da genética de resistência a *Bt* de BEC/BMC. Os resultados fornecem dados sólidos para o manejo sustentável do milho *Bt* para reduzir o risco de evolução de resistência ao *Bt* em BEC e BMC.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

Como a evolução da resistência ao *Bt* resulta em um grande declínio e suscetibilidade às toxinas *Bt*, a suscetibilidade básica à toxina *Bt* em BEC e BMC antes do cultivo do milho *Bt* deveria ser medida. Essa base foi medida em várias populações geograficamente distintas. Foram padronizados bioensaios usando a mesma cepas de referência de BEC e BMC e a mesma fonte de toxina *Bt*.

A evolução da resistência a *Bt* é significativamente influenciada pelo movimento em pequena escala e longa distância das pragas alvo. Para cada praga, estudos de genética de populações forneceram estimativas indiretas do movimento em uma ampla escala geográfica e experimentos de captura mediram o movimento em pequena escala.

Um dos parâmetros mais críticos, mas mais difíceis de estimar é a frequência dos alelos de resistência antes da seleção, quando ainda são raros. O consórcio conduziu seleções F2 para estimar essa frequência tanto em populações de BEC como de BMC.

Este esforço em escala europeia forneceu uma oportunidade sem precedentes para estabelecer amostras de arquivo que podem ser usadas na análise retrospectiva da evolução da resistência quando os genes de resistência a *Bt* forem clonados. Tal clonagem irá permitir o desenvolvimento de sistemas moleculares de detecção. As amostras podem ser usadas para fornecer um “alarme precoce” do aumento da resistência bem antes dos fracassos no campo, o que pode proporcionar tempo suficiente para alterar a estratégia de manejo da resistência e prolongar o uso do milho *Bt*.

Experimentos de seleção em laboratório de cepas resistentes têm sido feitos usando doses discriminatórias da toxina *Bt*.

Populações de BEC e BMC podem e irão desenvolver resistência a novas solicitações, como o milho *Bt*. Felizmente, os instrumentos genéticos e moleculares disponíveis podem ser usados para elucidar os complexos mecanismos de resistência e fornecer a informação necessária para o desenvolvimento de estratégias de manejo de resistência realistas e eficientes.

PRINCIPAIS DESCOBERTAS E RESULTADOS

Genética de populações: usando seletivamente marcadores “neutros”, mostramos que as populações de BEB e BMC eram levemente diferenciadas tanto dentro de países (Alemanha, BEC; Espanha, BMC) como dentro da Europa (Alemanha, Itália, França, Eslováquia, Espanha, Áustria, Bulgária, Romênia e Grécia). Isso sugere um alto nível de fluxo gênico e movimento entre populações em pequena e larga escala, o que pode possibilitar a estratégia de manejo de maior dosagem e refúgio (HDR) a efetivamente atrasar a evolução da resistência ao *Bt*.

Dispersão em pequena escala de BEC: foi estimada na Alemanha, França e República Eslovaca. A distribuição espacial das mariposas recapturadas em volta do ponto de liberação sugere que as mariposas provavelmente faziam dois tipos de movimento. Algumas delas se moviam apenas numa escala muito local, enquanto outras provavelmente deixavam a área em um tipo diferente de dispersão, de longa distância. Em uma escala local, as fêmeas residentes se acasalavam ao acaso, i.e. independentemente se os machos haviam passado por um prévio evento de dispersão ou não. Os resultados também indicaram que algumas mariposas (~20% para as fêmeas) acasalavam antes de envolver-se em uma dispersão de longa distância.

Influência da infecção com microsporídia (*Nosema pyrausta*) na suscetibilidade à toxina *Bt*: em estudos de campo, não encontramos relação entre o nível de infestação causado por BEC e o nível de infecção de larvas de BEC por microsporídia. Sob condições de laboratório, as populações não mostraram diferenças em suscetibilidade à toxina *Bt* Cry 1Ab coletada em locais infectados ou não infectados.

Suscetibilidade básica à toxina Cry1Ab: isso foi determinado para populações de BEC coletadas na Espanha, França, Itália, Alemanha, Eslováquia e Grécia, e para populações BMC amostradas na Espanha e na Grécia. Usando sobreposição, a CL50 (ng/cm²) para populações de BEC variou de 5,7 (na Espanha) a 473,06 (na Eslováquia). O nível de suscetibilidade não foi significativamente diferente entre populações com respeito à cepa de referência (lab cepa Aachen), exceto para aquelas coletadas na Espanha; a última tinha suscetibilidade maior do que a cepa de referência alemã. Usando o método de incorporação à dieta, os valores da CL50 (µg por ml de dieta) variaram de 8,5 (na França) a 43,50 (na Itália), mas não eram significativamente diferentes entre populações, nem significativamente mais altos ou mais baixos do que a cepa de referência. A CL50 para BMC variou de 16,1 ng/cm² (na Espanha) a 28,02 ng/cm² (na Grécia).

Seleção F2: populações de BEC foram coletadas na Alemanha, Eslováquia e Itália, e de BMC na Espanha e na Grécia. Cerca de 1.345 linhagens de BEC e 160 linhagens de BMC foram selecionadas e tecidos de milho *Bt*. Nenhum alelo importante de resistência ao milho *Bt* foi detectado. Isso implica que os alelos recessivos de resistência são suficientemente raros nas populações europeias para que a estratégia HDR efetivamente funcione.

Amostragem de campo de larvas em diapausa sobreviventes no milho Bt: três estratégias de monitoramento principais para detectar resistência ao *Bt* foram exploradas dentro do objetivo do projeto ProBenBt: a) comparar populações com um histórico de alta versus uma de baixa exposição à toxina (Espanha); b) gaiolas de armadilha de luz que atraem adultos e larvas selecionadas (Alemanha); e c) selecionar entre as larvas sobreviventes para estabelecer populações resistentes em laboratório (Eslováquia e República Checa). Nenhum inseto coletado no campo foi capaz de sobreviver com plantas de milho *Bt*.

Seleção em laboratório de cepas resistentes a toxina Cry1Ab: isso foi feito usando doses discriminatórias da toxina Cry1Ab (estratégias de dose alta e baixa). Com uma dose baixa para BEC, a suscetibilidade após 23 gerações de seleção declinou em nove vezes (tratamento de superfície) e 16 vezes (método de incorporação). Com a alta dose para BEC, a suscetibilidade declinou, dentro de 4 e 8 geração até 4- e 10-vezes.

Desenvolvimento de instrumentos genéticos para detectar genes de resistência a Bt: um mapa genético de ligação de BEC foi construído e usado para 1) localizar genes de resistência a *Bt* que já haviam sido identificados em outras espécies; 2) posicionar os genes de resistência candidatos mais prováveis baseado no conhecimento do modo de ação; e 3) identificar grupos de ligação homólogos com aqueles identificados em outras espécies que portam genes de resistência mapeados, mas desconhecidos. O mapa foi baseado em um cruzamento entre duas linhagens da área de Bonn, Alemanha, uma coletada em milho e a outra coletada em artemisa. A estrutura do mapa consistiu de mais de 200 marcadores AFLP, cobrindo todos os 31 grupos de ligação com um comprimento genético total de 1.872 cM. Genes de proteínas ribossomais foram mapeados para fornecer uma loci âncora para correspondência com outros genomas de lepidópteros. O mapa de ligação fatorial está agora disponível como um recurso valioso para a análise rápida e identificação de genes de resistência a *Bt* de BEC, se e quando eles aparecerem em campo.

Diversidade de tripsinas em BMC e sua interação com a toxina Cry1Ab: foram purificadas quatro tripsinas da luz do intestino médio de larvas de BMC, e uma diversidade dos genes para similares a tripsina foi identificada. As quatro tripsinas

purificadas em BMC pertencem aos três grupos filogenéticos bem definidos de sequências similares a tripsina detectadas. Mudanças na suscetibilidade da atividade similar a tripsina dos extratos do intestino médio de larvas de diferentes **instars** aos inibidores de protease específicos do tipo tripsina sugerem que a proporção relativa das enzimas purificadas varia com o desenvolvimento das larvas de BMC. Essas mudanças seriam relevantes primariamente para a resistência mediada por protease ao milho *Bt*, se isso se desenvolvesse.

Análise de sítios de ligação das toxinas Bt ativas contra BMC: estudos de ligação foram feitos com as toxinas *Bt* Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca, e Cry1Fa, consideradas como ativas contra BMC. Ensaio de ligação foram feitos com toxinas marcadas com I 125 ou biotina e vesículas da borda ciliada da membrana de larvas (BBMV). Experimentos de competição indicaram que essas toxinas se ligam especificamente às BBMV e que Cry1Aa, Cry1Ab, e Cry1Ac compartilham seu sítio de ligação. Cry1Ca e Cry1Fa ligam-se a sítios diferentes. Além disso, Cry1Fa liga-se a sítio de ligação de Cry1A com muito baixa afinidade e vice-versa (Fig 1.). A presença de sítios diferentes de ligação para Cry1Ab e Cry1Fa sugere que, acumulando essas duas toxinas na mesma planta de milho *Bt*, pode proporcionar um controle de longo prazo de BMC com um risco mínimo de resistência cruzada.

Toxinas ativas Bt Cry1 formam um poro e interagem com o cotransporte de leucina no BBMV do intestino médio de BEC e BMC: a atividade de formação de poro das toxinas Cry1Ab, Cry1Fa e Cry1Da e sua associação com o transporte de leucina mediado pelo cotransportador aminoácido neutro K⁺ foi estudada nas vesículas da borda ciliada de membrana (BBMV) isoladas do intestino médio de BEC e BMC. As toxinas Cry1Ab em BEC-BBMV e Cry1Ab e Cry1Fa em BMC-BBMV reduziram a absorção de um modo dependente de dosagem, independentemente da presença de K⁺, enquanto nenhum efeito foi visto com a toxina inativa Cry1Da. Portanto, a inibição do transporte de aminoácido estava estritamente conectado ao efeito tóxico *in vivo* e não estava relacionado com o canal formado pelas toxinas.

Análise de ligação de toxinas Cry1A em BEC resistentes e suscetíveis: a análise de ligação da toxina Cry1Ab foi conduzida para determinar se a resistência em BEC selecionada em laboratório está associada com alteração do sítio visado. Vesículas da borda ciliada de membrana (BBMV) foram preparadas usando intestino médio dissecado por instares tardios de linhagens suscetíveis e resistentes (Europa-R e RSTT) de BEC (Kansas State University). As análises por immunoblot indicaram três proteínas diferentes ligadas à toxina Cry1Ab e foram reconhecidas com um soro anticaderina. Em uma comparação de linhagens resistentes e suscetíveis, a redução da ligação de Cry1Ab foi aparente para todas as três bandas correspondendo a proteínas do tipo caderina na linhagem Europe-R, enquanto a redução de ligação foi aparente em apenas uma banda para a linhagem RSTT. Combinados, os resultados do presente trabalho sugerem que diferenças em suscetibilidade às toxinas Cry1A na linhagem Europe-R de BEC estão associadas à alteração na ligação ao receptor, embora a natureza exata desse mecanismo ainda não esteja clara.

CONCLUSÕES

Os estudos ProBen*Bt* forneceram elementos-chave para proteger os benefícios das toxinas *Bt* contra o desenvolvimento de resistência na Europa. Um mapa de ligação fatorial está agora disponível como um valioso recurso para análise rápida de identificação de genes de resistência a *Bt* em BEC, se e quando eles aparecerem no campo. Foi identificada uma diversidade de proteases similares à tripsina expressada no intestino médio de BMC.

Experimentos de competição de diferentes toxinas *Bt* indicam que elas se ligam especificamente às vesículas das bordas ciliadas de membranas (BBMV). A acumulação de Cry1Ab com Cry1Fa na mesma planta pode proporcionar controle no longo prazo de brocas do colmo do milho. A inibição de transporte de aminoácido na BBMV está estritamente conectada com o efeito tóxico *in vivo* e não está relacionada com o canal formado pelas toxinas.

A análise de linhagens resistentes de BEC indica que a resistência às toxinas *Bt* pode evoluir como um resultado de diferentes mecanismos. Uma linhagem mostrou ligação alterada ao receptor alvo, que é o mecanismo mais comum de alto nível de resistência. .

As populações de BEC e BMC têm um baixo nível de diferenciação genética tanto dentro de um país como entre países da Europa. Isso sugere um alto nível de migração entre populações, um aspecto que pode favorecer a eficácia da estratégia de manejo de resistência alta-dose/refúgio (HDR) . Ainda assim, estudos de captura-recaptura marcadas mostram que uma fração das mariposas BEC poderia acasalar-se localmente, um comportamento que pode reduzir a eficácia da estratégia HDR.

Devido ao baixo nível de diferenciação genética, somente poucas populações de BEC por país/região geograficamente similar poderia ser necessária como populações representativas para a seleção/monitoramento da suscetibilidade.

Nenhum alelo de resistência importante ao milho *Bt* foi detectado neste estudo. Isso tanto implica as frequências de alelos de resistência serem provavelmente abaixo de 10^{-3} nas populações europeias como ajuda a eficácia da estratégia HDR.

Amostras de diferentes populações de BEC e BMC foram preservadas a -130°C em um banco de espécimes para investigadores futuros.

PRINCIPAIS PUBLICAÇÕES

ANDREADIS, S.S.; ALVAREZ- ALFAGEME, F.; SANCHEZ-RAMOS, I.; STODOLA, T.J.; ANDOW, D.A.; MILONAS, P.G.; SAVOPOULOU- SOULTANI, M.; CASTANERA, P. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ab in Greek and Spanish population of *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 100. (2007). pp. 195-201.

BAILEY, R.I.; BOURGUET, D.; LE PALLEC, A.H.; PONSARD, S.. Turnover and dispersal of European corn borer in maize field borders. *Journal of Applied Ecology*. 44: pp. 385-394.

CAGAN, L.; BOKOR, P.; PLACKOVA, A.. Microsporidian infection of the BEC populations of Slovakia and Czech Republic. *Acta Fytotechnica et Zootechnica*, 9. (2007). No prelo.

DALECKY, A.; PONSARD, S.; BAILEY R.I.; PELISSIER, C.; BOURGUET, D.; Resistance evolution to *Bt* crops: predispersal mating of European corn borers. *PloS Biology*, 4. (2006). pp.1048-1057.

DIAZ-Mendoza, M.; FARINOs, G.P.; CASTANERA, P.; HERNANDEZ- CRESPO, P.; ORTEGO, F.; Proteolytic processing of native Cry1Ab toxin by midgut extracts and purified trypsins from the Mediterranean corn borer. *Journal of Insect Physiology*, 53. (2007). pp. 428-435.

DIAZ-MENDOZA, M.; ORTEGO, F.; GARCIA DE LACOBIA, M.; MAGANA, C.; DE LA POZA, M.; FARINOS, G.P.; Castanera, P.; Hernandez-Crespo, P.; Diversity of trypsins in the Mediterranean corn borer *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae), revealed by nucleic acid sequences and enzyme purification. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35. (2005). pp. 1005-1020.

BEL, Y; ESCRICHE, B. Common genomic structure for the Lepidoptera cadherin-like genes. *Gene*, 381. (2006). pp.71-80.

GONZALEZ-CABRERA, J.; PEREZ- FARINOS, G.; CACCIA, S.; DIAZ- MENDOZA, M.; CASTANERA, P.; LEONARDI, M.G.; GIORDANA, B.; FERRE, J. Toxicity and mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry

proteins in the Mediterranean corn borer, *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre). *Appl. Environ. Microbiol.* 72. (2006). pp. 2594-2600.

HUARONG, L.; GONZALEZ- CABRERA, J.; OPPERT, B.; FERRE, J.; HIGGINS, R.A.; BUSCHMAN, L.L.; RADKE, G.A.; ZHU, K.Y.; HUANG, F.; Binding analyses of Cry1Ab and Cry1Ac with membrane vesicles from *Bacillus thuringiensis*-resistant and –susceptible *Ostrinia nubilalis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323. (2004). pp. 52-57.

LEONARDI, G.; CACCIA, S.; GONZALEZ-CABRERA, J.; FERRE, J.; GIORDANA, B.; Leucine transport is affected by *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins in BBMV from *Ostrinia nubilalis* Hb (*Lepidoptera: Pyralidae*) and *Sesamia nonagrioides* Lefebvre (*Lepidoptera: Noctuidae*) midgut. *J. Membrane Biology*: *aceito*.

SAEGLITZ, C.; BARTSCH, D.; EBER, S.; GATHMANN, A.; PRIESNITZ, K.U.; SCHUPHAN, I.; Monitoring the Cry1Ab susceptibility of European corn borer (*Ostrinia nubilalis* Hubner) in Germany. *Journal of Economic Entomology*, 99. (2006). pp. 1798-1773.

SIQUEIRA, H.A.A.; GONZALEZ- CABRERA, J.; FERRE J., FLANNAGAN, R.; SIEGFRIED, B.D. Cry1Ab binding analyses in resistant and susceptible strains of European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hubner) (*Lepidoptera: Crambidae*). *Appl. Environ. Microbiol.* 72. (2006). pp. 5318-5324.

Desenvolvimento e avaliação do risco de um biossensor portátil baseado no campo usando bactérias bioluminescentes geneticamente modificadas

<i>Acrônimo</i> BIOGEM	<i>Coordenador</i> Tim HART
<i>Acrônimo do Programa</i> FP5-LIFE QUALITY	tim@cybersensebiosystems.com
<i>Número do Contrato</i> QLK3-2002-02063	<i>Website do Projeto</i> http://www.biomatnet.org/ secure/FP5/S1694.htm
<i>Período</i> Janeiro de 2003 – Janeiro de 2006	

BACKGROUND E OBJETIVOS

Anteriormente a 2004, havia pelo menos 300.000 sítios contaminados identificados na EU15 e muitos mais nos países em acesso à UE. Esses sítios foram contaminados com uma gama de poluentes que incluíam hidrocarbonetos, metais pesados, solventes clorados, pesticidas, explosivos e várias combinações dos citados. Limpar esses sítios é justificado puramente em termos de anular sua ecotoxicidade e ameaça à saúde humana; mas frequentemente são também de importância econômica para redesenvolvimento, particularmente no interior de áreas urbanas. Avaliação dos locais e remediação são portanto consideradas como indústrias em crescimento na Europa, e há muito mais pressão para empregar métodos rápidos e eficientes, particularmente para monitoramento, detecção e análise. A análise química convencional, embora precisa, pressupõe conhecimento dos contaminantes presentes e é demorada e cara.

Biossensores estão ganhando crescente importância para análise ambiental, fornecendo resultados analíticos rápidos úteis em avaliações de toxicidade de solos e operações de remediação. Uma abordagem comum é usar bactérias bioluminescentes, que indicam o nível de toxidez biodisponível em uma amostra pela redução na emissão de luz. Uma série de bios-sensores específicos para poluentes pode proporcionar um teste rápido feito no campo para uma gama de toxinas, para identificar pontos críticos de toxidez e excluir áreas limpas de maiores investigações.

Na última década, numerosos grupos de pesquisa em todo o mundo modificaram bactérias isoladas do solo para expressar o sistema de luciferase *lux*, que produz bioluminescência quantificável que pode ser induzida ou inibida na presença de toxinas específicas, incluindo fenóis, metais pesados e hidrocarbonetos. Entretanto, bactérias Geneticamente Modificadas (GM) não podem, atualmente, ser usadas em biossensores baseados no campo devido a riscos da liberação e contaminação GM do ambiente. Para que essa tecnologia seja de real valor para a indústria, devem ser desenvolvidos sistemas para capacitar bactérias a serem usadas no local. Essas medições em tempo real oferecem imensa economia de tempo e custos para a indústria.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

Foram desenvolvidos dentro do projeto BIOGEM vários métodos físicos e biológicos para assegurar a contenção das bactérias bioluminescentes geneticamente modificadas para permitir seu uso seguro no campo. Várias abordagens paralelas foram avaliadas com o objetivo de assegurar um alto nível de contenção de bactérias GM:

- projetar um invólucro para o biossensor com componentes autosselantes, para permitir a introdução de extratos de amostras de solo aquoso para teste, mas não

liberação acidental de bactérias, e também suportar quebra sob qualquer circunstância no campo;

- modificar célula para morrer, de modo que as bactérias não possam sobreviver fora da unidade;
- imobilização das bactérias em uma matriz de polivinil álcool.

Com relação ao projeto do biossensor, os parceiros do BIOGEM desenvolveram e fabricaram uma unidade selada multicâmaras para assegurar eficazmente a contenção de bactérias GM, mesmo quando a câmara for aberta para adição de amostras. O projeto do biossensor é diagramado na Fig 1. Essencialmente, bactérias GM inertes dessecadas por congelamento são contidas na câmara mais baixa, com paredes separando-as do meio de reidratação que requerem para ativação. A câmara superior recebe a amostra, mas, mesmo quando a tampa da câmara superior está aberta, paredes ainda impedem o acesso das bactérias ao ambiente. A tampa da unidade contém um selo irreversível, de modo que, quando um operador acrescenta sua amostra, ele sela toda a unidade irreversivelmente. A unidade então gira 90° de modo que o meio de reidratação entra em contato com as bactérias.

Após um período de incubação, uma outra rotação permite que a amostra da toxina acesse as agora regeneradas bactérias e a luminescência pode ser observada e quantificada por aparelhos sensíveis à luz tais como ROTAS (Sistema Local de Auditoria de Toxidez).

O biossensor foi testado com sucesso no campo na Áustria e na Espanha em cooperação com as instituições europeias de regulamentação e interessados. O novo biossensor permite rápidas análises locais de alto desempenho com risco desprezível de contaminação GM.

Com relação à modificação de células para morrer, uma estratégia adicional de contenção foi desenvolvida baseada na deleção do gene *dapB* em sensor relevante de bactérias. O gene *dapB* é necessário para a expressão do ácido diaminopimélico, um componente essencial da parede celular bacteriana. Quando as células são cultivadas na presença de um suplemento, as células sem *dapB* crescem eficazmente, mas, na ausência do ácido diamino pimélico, as células morrem rapidamente. Portanto, a adição de uma pequena quantidade de ácido diaminopimélico ao meio de reidratação efetivamente reidrata as bactérias sem o gene *dapB*, que produzem luz ao reidratarem, mas morrem em questão de minutos.

O projeto também previu a imobilização de células em polivinil álcool como um campo em rápido desenvolvimento e como um dos mais versáteis materiais capazes de formar uma variedade de estruturas, tendo sido usado previamente em biossensores de célula inteira. Entretanto, filmes de PVA são hidrófilos e, portanto, análises de elementos hidrófilos como os PAH são largamente incapazes de difundir-se na matriz.

Um importante objetivo do projeto foi a otimização da produção do gel de PVA por um crio-congelamento e procedimento de seca por congelamento para encapsular bactérias. Na eventualidade de quebra, nenhuma bactéria irá dispersar por uma grande área, mas irá, efetivamente, aderir à unidade do biossensor. O método é também adequado para armazenar bactérias no estado de seca por congelamento, prolongando a vida útil e otimizando as condições de armazenamento. Uma variedade de géis de PVA foi testada quanto à sua capacidade de permitir acesso de toxinas aos biossensores, como sinalizado por mudanças na emissão de luz. A pesquisa sugere que a vida útil de várias linhagens de sensores pode ser aumentada de dias a várias semanas.

PRINCIPAIS DESCOBERTAS E RESULTADOS

No projeto BIOGEM uma combinação de métodos de contenção foi utilizada não apenas para minimizar o risco de liberação deliberada de microrganismos geneticamente modificados, mas também para fornecer um alto grau de confiança para o usuário e as autoridades de regulamentação. O progresso tem sido positivo, com o invólucro da unidade do biossensor comprovadamente capacitando uma reidratação eficiente e reativação das bactérias dormentes quando expostas ao meio de reidratação. Maior confiança foi conseguida com o uso das linhagens bacterianas com deleção do gene *DapB*, que morrem rapidamente quando o suplemento mínimo contido no meio de reidratação se esgota. Um dos mais significativos fatores enfrentados pelos biossensores é a sua vida útil e seu desempenho após armazenamento prolongado. Se um usuário não pode ter confiança de que o produto irá fornecer um desempenho consistente e de alto nível, ele não irá utilizar a tecnologia. Passos foram dados para aumentar a vida útil de biossensores bacterianos por sua imobilização em matizes de PVA. Uma variedade de condições foi testada e a vida útil de várias linhagens de biossensores foi aumentada significativamente. Estão em andamento outros estudos para maximizar o desempenho e o armazenamento conveniente para as bactérias, de modo que faça seu uso no campo mais prático.

Avaliação do impacto ambiental de videiras e ameixeiras transgênicas sobre a diversidade e dinâmica de populações de vírus

<i>Acrônimo</i> TRANSVIR <i>Acrônimo do Programa</i> FP5-LIFE QUALITY <i>Número do Contrato</i> QLK3-2002-02140 <i>Período</i> Janeiro de 2003 – Junho de 2006	<i>Coordenador</i> Marc FUCHS Department of Plant Pathology New York State Agricultural Experiment Station 630 West North Street Geneva, New York 14456 USA mf13@cornell.edu
---	--

<i>Parceiros</i> Giovanni P. MARTELLI Universita degli Studi di Bari (UNIBA) (IT) Pierre PFEIFFER Institut de Biologie Moleculaire des Plantes, Centre National de La Recherche Scientifique et Universite Louis Pasteur (CNRS-ULP), Strasbourg (FR) Wilhelm JELKMANN Biologische Bundesanstalt fur Land und Fortwirtschaft (BBA), Braunschweig (DE) Natasa PETROVIC National Institute of Biology (NIB), Ljubljana (SI)	Michel RAVELONANDRO Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Bordeaux (FR) Mariano CAMBRA Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Valence (ES) Ioan ZAGRAI Statiunea de Cercetare si Productie Pomicola (SCPP), Bucarest (RO)
---	---

BACKGROUND E OBJETIVOS

A resistência a vírus em culturas transgênicas tem sido um importante avanço na aplicação bem sucedida de biotecnologia à agricultura. A resistência a vírus pode ser desenvolvida com a introdução de construções gênicas derivadas de vírus, como o gene da Proteína da Capa (CP), em culturas suscetíveis, seguida da seleção para o fenótipo desejado e características hortícolas.

Entretanto, uma vez que a maioria das plantas convencionais não contem genes derivados de vírus, preocupações com a segurança ambiental foram expressas com a liberação de culturas transgênicas resistentes a vírus. Uma preocupação importante é o resultado da recombinação entre transcritos de transgenes virais e RNAs de vírus do campo que infectam plantas transgênicas. Vírus recombinantes resultantes podem ter novas propriedades biológicas tais como mudanças na especificidade do vetor, maior faixa de hospedeiros e patogenicidade aumentada. A evidência de recombinação entre transcritos de transgenes e vírus infectantes foi obtida com plantas modelo em casa de vegetação. Limitada informação é disponível sobre o potencial de plantas transgênicas de importância agrônômica na mediação do desenvolvimento de vírus em condições de campo. O projeto tratou dessa importante questão com videiras e ameixeiras que expressam o gene CP, estabelecidas no campo em 1996.

O objetivo era: 1) analisar e comparar a dinâmica e a variabilidade de populações de vírus em plantas transgênicas versus não transgênicas; 2) monitorar a emergência de espécies de vírus recombinantes; 3) examinar se as videiras e ameixeiras transgênicas expressando genes virais CP aumentavam a probabilidade de emergência de vírus recombinantes além dos eventos naturais do background; 4) determinar a estabilidade do silenciamento do gene pós-transcricional em ameixeiras transgênicas sob múltipla infecção por vírus; e 5) avaliar a translocação dos produtos derivados do transgene da raiz da videira aos brotos não transgênicos.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

O material de teste consistiu de videiras transgênicas expressando o gene CP de *Virus fanleaf da videira* (GFLV), *Virus A da videira* (GVA) ou *Virus b da videira B* (GVB), e ameixeiras transgênicas expressando o gene do *Virus pox da ameixa* (PPV). Videiras e ameixeiras convencionais foram usadas como controle. Os locais do vinhedo e do pomar com plantas transgênicas foram na França, Romênia e Espanha, e plantas convencionais infectadas com vírus de interesse foram selecionadas na Alemanha, Itália, Eslovênia e outras partes da Europa.

A abordagem experimental foi baseada em uma caracterização comparativa das propriedades biológicas, sorológicas e moleculares de vírus em plantas transgênicas e não transgênicas. O gene CP e outros isolados de genes de vírus infectantes foram amplificados de plantas de teste reação de cadeia de polimerase de imunocaptura e transcrição reversa (IC-RT-PCR) ou RT-PCR, usando os anticorpos e iniciadores apropriados, e caracterizado por polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) ou confirmação de polimorfismo de cadeia única, (SSCP), e sequenciamento de nucleotídeos.

PRINCIPAIS DESCOBERTAS E RESULTADOS

Para videiras que expressam o gene CP de GFLV, algumas linhagens transgênicas mostraram resistência a transmissão mediada por *Xiphinema index* de GFLV durante um teste de campo em 1996 - 1999.

Nenhuma característica similar à linhagem F13, que forneceu o transgene CP, e nenhuma diferença estatisticamente significativa em variabilidade molecular foi encontrada para a maioria dos isolados de plantas transgênicas e não transgênicas. Estes resultados foram consistentes com o fato de que as videiras transgênicas não tiveram a emergência de recombinantes GFLV viáveis em níveis detectáveis, nem afetaram a diversidade molecular de populações GFLV indígenas durante o período de teste. Análises de isolados GFLV de diferentes cultivares de videiras e várias origens geográficas forneceram o nível básico da variabilidade molecular.

Interessantemente, recombinantes GFLV foram identificados em plantas convencionais que estavam localizadas fora dos locais no campo onde as plantas transgênicas foram testadas. Um desses isolados recombinantes GFLV tinha propriedades biológicas similares a isolados não recombinantes. Além disso, nenhuma evidência convincente foi encontrada para a translocação dos transcritos de transgene derivados de GFLV e siRNA de raízes de videira expressando o gene CP de GFLV aos brotos de videira não transgênicos. Também foi avaliado se a infecção com vírus pode deflagrar tal transferência de produtos derivados do transgene e subsequente movimento célula a célula e de longa distância. Pela análise da variabilidade genética de populações de vírus em videiras convencionais que tem proteção cruzada com isolados atenuados de GFLV e *virus Arabis do mosaicos*, os estudos foram expandidos. Assim, descobriu-se que as linhagens de vírus atenuados protetores não

contribuíram para o desenvolvimento de recombinantes, mas as linhagens atenuadas protetoras eram, elas próprias, recombinantes interespecies GFLV/ArMV.

O impacto de videiras transgênicas expressando o gene CP de GFLV sobre a variabilidade do *vírus l associado a enrolamento da folha da Videira* (GLRaV-1) foi investigado usando a diversidade de isolamentos de GLRaV-1 de videiras convencionais como referência; os resultados foram consistentes com ausência de diferença na diversidade da população de GLRaV-1 em convencional e GFLV em videiras transgênicas. Da mesma forma, o genoma de GLRaV-7 era determinado quase totalmente e a variabilidade de isolados de GVA e GVB que infectam videiras convencionais foi examinada. Videiras transgênicas expressando o gene CP de GVA ou GVB foram inoculadas por enxertia, transmissão cochonilha e heteroenxertia com *Nicotiana species*. Informações primárias de sequência não parecem revelar qualquer impacto significativo de videiras transgênicas sobre a variabilidade genética de populações de GVA e GVB.

Para ameixeiras expressando o gene PPV CP, árvores transgênicas C5, que exibem o silenciamento pós-transcricional do gene, foram altamente resistentes à infecção com PPV através de enxertia, e mediada por afídeos durante o teste de campo de 1996 - 2006. Árvores transgênicas C4 mostraram algum atraso no estabelecimento dos sintomas, enquanto outros clones e árvores não transgênicas foram suscetíveis. Estes dados foram obtidos em diferentes locais de campo sob várias condições ambientais. Além disso, nenhuma diferença estatisticamente significativa sorológica ou molecular na região terminal 3' do RNA viral, i.e. os genes NIb e CP, foi encontrada entre a maioria dos isolados de PPV que infectavam ameixeiras convencionais ou transgênicas. Portanto, ameixeiras transgênicas não alteraram a diversidade e dinâmica das populações de PPV em níveis detectáveis, nem deflagraram a emergência de PPV recombinantes durante o período do teste.

Populações de afídeos e outros insetos foram quantificadas e comparadas em ameixeiras transgênicas e não transgênicas e nenhuma diferença significativa foi registrada. Para testar o efeito dos vírus heterólogos na estabilidade do silenciamento transcricional do gene contra PPV, alguns galhos de árvores transgênicas C5 foram inoculadas por enxertia com *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) e PPV, ou *Apple chlorotic leaf spot* (ACLSV) e PPV, ou *Prune dwarf virus* (PDV) e PPV no campo e na casa de vegetação. Em todos os testes, a resistência modificada ao PPV em ameixeiras transgênicas foi estável na presença de vírus heterólogos.

CONCLUSÕES

Os experimentos de campo forneceram uma avaliação direta do impacto da videira e ameixeira transgênicas expressando os genes virais sobre a diversidade e dinâmica de populações de vírus, em particular sobre a emergência de vírus recombinantes. Eles também forneceram novos insights do impacto ambiental de videiras e ameixeiras transgênicas expressando os genes virais CP. Em conjunto, os estudos sugeriram que as videiras e ameixeiras transgênicas não são apenas altamente resistentes a GFLV e PPV, respectivamente, por um longo tempo (3 e 10 anos, respectivamente), mas também não têm efeito adverso, além de eventos de background naturais, sobre a diversidade e dinâmica de populações de vírus via recombinação.

A resistência a vírus devastadores é de grande interesse para a indústria europeia de videiras e frutas de caroço. Dada a necessidade premente de estratégias de controle para vírus eficientes e compatíveis com o ambiente, as descobertas devem auxiliar as autoridades nacionais e internacionais a tomar decisões regulatórias cientificamente baseadas quanto à liberação de videiras e ameixeiras resistentes a vírus, assim com

quanto a culturas transgênicas que contenham genes derivados de vírus e são de importância agrônômica.

PRINCIPAIS PUBLICAÇÕES

CAPOTE, N.; PEREZ-PANADES MONZA, C.; CARBONELL, E.; URBANEJA, A.; SCORZA, R.; RAVELONANDRO, M.; CAMBRA, M. ; (2008). Assessment of the diversity and dynamics of *Plum pox virus* and aphid populations in transgenic European plums under Mediterranean conditions. *Transgenic Research* 17:367-377.

FUCHS, M.; CAMBRA, M.; CAPOTE, N.; JELKMANN, W.; LAVAI, V.; MARTELLI, G.P.; MINAFRA, A.; PETROVIC, N.; PFEIFFER, P.; POMPE-NOVAK, M.; RAVELONANDRO, M.; SALDARELLI, P.; STUSSI-GARAUD, C.; VIGNE, E.; ZAGRAI, I.; (2007). Safety assessment of transgenic plums and grapevines expressing viral coat protein genes: New insights into real environmental impact of perennial plants engineered for virus resistance. *Journal of Plant Pathology* 89:5-12.

VIGNE, E.; BERGDOLL, M.; GUYADER, S.; FUCHS, M.; (2004). Population structure and genetic diversity within *Grapevine fanleaf virus* Isolates from a naturally infected vineyard: Evidence for mixed infection and recombination. *Journal of General Virology* 85:2435-2445.

VIGNE, E.; KOMAR, V.; FUCHS M.; (2004). Field safety assessment of recombination in transgenic grapevines expressing the coat protein gene of *Grapevine fanleaf virus*. *Transgenic Research* 13:165-179.

ZAGRAI, I.; CAPOTE, N.; RAVELONANDRO, M.; CAMBRA, M.; ZAGRAI, L.; SCORZA, R.; (2008). *Plum pox virus* silencing of C5 transgenic plums is stable under challenge inoculation with heterologous viruses. *Journal of Plant Pathology* 90:S1.63-S1.71.

Controle de tempo de florescimento para uma agricultura e silvicultura sustentáveis e competitivas

<i>Acrônimo</i> CONFLOW <i>Acrônimo do Programa</i> FP5-LIFE QUALITY <i>Número do Contrato</i> CONFLOW-QLRT-2000-01412 <i>Período</i> Janeiro de 2001 – Agosto de 2004	<i>Coordenador</i> Prof. Claus H. ANDERSEN DLF Trifolium A/S Hoejerupvej 31 DK-4660 Store Heddinge Denmark cha@dm.dtu.dk
---	--

<i>Parceiros</i> Dr. K. K. NIELSEN/ C. H. ANDERSEN DLF Trifolium A/S, Heddinge (DK) Dr. C. DEAN BBSRC John Innes Centre, Norwich (UK) Dr. G. COUPLAND Max-Planck-Gesellschaft zur Forderung der Wissenschaften E.V. Koln (DE) Dr. T. SOPANEN, Dr. K. KEINONEN University of Joensuu (FI) Dr. M. KATER University of Milano (IT)	Dr. G. ANGENENT Plant Research International B.V., Wageningen (NL) Dr. J.M. ZAPATER University of Madrid, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (ES) Dr. O. NILSSON Sveriges Lantbruksuniversitet Umea (SE) Dr. R. BAGGER JORGENSEN RISO National Laboratory, Roskilde (DK) Dr. J. NEGUEROLES FRUTARIA SAT, Zaragoza (ES)
---	---

BACKGROUND E OBJETIVOS

No verão de 2000 o projeto financiado pela UE, CONFLOW, reuniu dez parceiros (oito científicos e dois comerciais) com o objetivo de desenvolver ferramentas genéticas de larga aplicação que permitisse o controle genético do florescimento. A finalidade é a contenção dos transgenes por meio do controle do tempo de florescimento, assim como do ajuste fino do tempo de florescimento em culturas e árvores agriculturalmente importantes.

A contenção biológica via controle do florescimento é dirigida a culturas em que as partes vegetativas são colhidas, por exemplo, gramíneas forrageiras e algumas hortaliças. O ajuste fino do florescimento, ou acelerando ou atrasando, permite as variedades de culturas existentes serem colhidas no tempo ótimo e exploradas em novas áreas geográficas ou em resposta a mudanças de longo prazo das condições climáticas e políticas do uso da terra. O desenvolvimento de novas ferramentas de melhoramento para a indústria de silvicultura e fruteiras, baseadas em linhagens melhoradas de ciclo rápido, com uma fase juvenil encurtada, acelera o melhoramento de espécies lenhosas. Após o término do programa de melhoramento, o transgene dominante pode ser eliminado, seja por fecundação cruzada ou por estratégias de recombinação controlada, usando um sistema comprovado de recombinase sitioespecifica.

As tecnologias desenvolvidas foram dirigidas para serem aplicáveis a uma larga variedade de plantas, incluindo tanto dicotiledôneas como monocotiledôneas,

angiospermas e gimnospermas, e foram testadas inicialmente no projeto nos seguintes exemplos de aplicação: contenção biológica visando a impedir o escape de transgenes da principal forrageira europeia, o azevem perene (*Lolium perenne*); ajuste fino de tempo de florescimento focando em arroz (*Lolium*) e aceleração do melhoramento de espécies lenhosas, usando como modelos álamo, videiro e citrus.

Os objetivos específicos foram:

Contenção biológica: o desenvolvimento de métodos para o controle do florescimento tanto em dicotiledôneas com em monocotiledôneas conferindo uma completa contenção biológica. Plantas que não florescem serão desenvolvidas com o controle dos genes para o tempo de florescimento em combinação com um sistema para reversão induzida do fenótipo de não florescimento para a finalidade de produção de sementes. O desenvolvimento de tecnologias visa a culturas em que as partes vegetativas são colhidas, por exemplo, gramíneas forrageiras e algumas hortaliças.

Ajuste fino do tempo de florescimento: o desenvolvimento de ferramentas para o controle positivo e a otimização do tempo de florescimento de culturas e árvores importantes agriculturalmente para facilitar uma agricultura e silvicultura flexíveis e sustentáveis. Pequenas mudanças no tempo de florescimento, aceleração ou atraso, para otimizar o tempo da produção de sementes, irão permitir que as variedades existentes das culturas sejam colhidas no tempo ótimo e exploradas em novas áreas geográficas ou em resposta a mudanças de longo prazo nas condições climáticas e política de uso da terra.

Melhoramento acelerado de espécies lenhosas: o desenvolvimento de novas e revolucionárias ferramentas de melhoramento para a indústria de silvicultura e fruticultura baseadas em linhagens para melhoramento de ciclo rápido com a fase juvenil encurtada. Ao completar o programa de melhoramento, o transgene dominante será eliminado ou por fecundação cruzada ou por estratégias de recombinação controlada usando um comprovado sistema de recombinase sítioespecífica. As novas ferramentas de melhoramento para a conversão temporária de variedades de fruteiras e árvores de maturação vagarosa em linhagens para melhoramento de ciclo rápido irão revolucionar a capacidade de melhorar espécies lenhosas por meio de técnicas convencionais de melhoramento.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

A. Bloco de trabalho 1 – Contenção biológica

A riqueza de dados disponíveis do trabalho com o controle do tempo de florescimento em *Arabidopsis* será explorada para manipular as rotas genéticas e fisiológicas que controlam o florescimento em outras espécies, tais como *Lolium perenne*. Especificamente, a principal rota de repressão de florescimento (devido aos genes *FRI* e *FLC*)

Será fortalecida por superexpressão transgênica enquanto uma rota que normalmente reduz essa repressão, em resposta a um período de inverno de temperaturas baixas (a rota de vernalização), será enfraquecida pela expressão antisense de genes regulatórios importantes (*VRN1* and *VRN2*). Isso resultará em plantas que não florescem. Para as finalidades de produção de sementes, um sistema indutível de expressão será empregado para obter plantas com florescimento quando desejado. Finalmente, um componente crítico para esse objetivo será uma análise de avaliação de risco da eficácia e estabilidade da contenção biológica por meio de experimentos controlados em populações de plantas sem florescimento sob diferentes condições experimentais.

B. Bloco de trabalho 2 – Ajuste fino do tempo de florescimento

O objetivo será conseguido por meio de duas estratégias usando genes reguladores conhecidos do arroz (*OsMADS47* e *OsMADS18*) para manipular o tempo de florescimento do arroz, e pelo uso de abordagens genômicas com *Lolium* para descobrir novos genes envolvidos no processo de vernalização. A utilidade dos novos genes para a manipulação de tempo de florescimento será primeiramente avaliada usando o sistema bem caracterizado de *Arabidopsis*. Genes conhecidos e novos genes de juventude serão então usados em videiros para atrasar o florescimento. Genes candidatos serão então testados no arroz, *Lolium*, e videiro como exemplos de aplicação.

C. Bloco de trabalho 3 – Melhoramento acelerado de espécies lenhosas – novas ferramentas de melhoramento

Estratégias complementares serão usadas para conseguir o objetivo:

Abordagem de conservação funcional: o estudo examinará a capacidade de genes de tempo de florescimento de *Arabidopsis* (*LFY*, *AP1*, *FT* e *SOC1*) de suprimir a juventude (idade da planta quando floresce). Em citrus transgênico com juventude suprimida, genes que são regulados para cima e para baixo serão isolados com o uso de apresentação diferencial (DD) e testados para sua funcionalidade na supressão da fase juvenil em *Arabidopsis* e citrus. Os ortólogos desses genes serão isolados e testados quanto à sua conservação funcional pela expressão em *Arabidopsis*, citrus (e videiro quando apropriado).

Abordagem genômica: a descoberta de novos genes envolvidos no processo de florescimento será tratada usando tecnologia de microarranjo. Ativadores e repressores da transição floral em álamo e citrus serão identificados via seleção diferencial de uma coleção EST de híbridos de álamos (microarranjo). A função de genes isolados será testada como descrito acima. Genes que foram identificados acima, e cuja expressão dá origem ao florescimento precoce e flores férteis que podem ser usadas em cruzamentos, serão então testados como ferramentas em programas de melhoramento. Ao completar o programa de melhoramento, o transgene dominante será eliminado ou por fecundação cruzada ou por estratégias de recombinação controlada usando um comprovado sistema de recombinase sitioespecífica. Isso resultará em uma árvore não transgênica que simplesmente foi submetida a um programa de melhoramento acelerado. Uma importante parte do trabalho conduzido é assegurar que o conhecimento biológico básico ganho nesta pesquisa seja explorado para produzir produtos para o mundo real e soluções que beneficiem as companhias europeias, consumidores e o ambiente. O projeto visa a conseguir isso por meio de exemplos de aplicação e análise de avaliação de risco.

D. Bloco de trabalho 4 – Avaliação de risco ambiental

Finalmente, a eficácia e estabilidade da contenção biológica em *Lolium* serão submetidas a uma rigorosa análise de avaliação de risco.

PRINCIPAIS DESCOBERTAS E RESULTADOS

Contenção biológica

A meta era trabalhar no sentido de obter uma gramínea forrageira criando azevem sem florescimento que não respondesse a mudanças em fotoperíodo ou vernalização.

Para atingir a contenção biológica em *Lolium*, foi usado o conhecimento gerado por plantas modelo como *Arabidopsis* para identificar ortólogos de genes conhecidos de florescimento em *Arabidopsis* e testar diferentes instrumentos genéticos para controlar o florescimento em *Arabidopsis* assim como em gramíneas. Um resultado importante deste estudo foi que genes de diferentes espécies de plantas apresentando fortes homologias de sequência possam ter efeitos bastante diferentes – e, às vezes, mesmo opostos – no florescimento, como visto em plantas modelo. Mais ainda, para alguns genes de florescimento não era possível encontrar genes correspondentes na cultura investigada por meio da homologia de sequência.

Trabalho com *Arabidopsis* e *Lolium* por parceiros neste bloco de trabalho, rapidamente estabeleceu que manipular o tempo de florescimento via fatores que controlam *FLC* não era ideal para cereais, e uma nova abordagem foi adotada. Isso continuou a mostrar que há genes (tanto endógenos com de *Arabidopsis*) cuja superexpressão em monocotiledôneas pode atrasar significativamente o florescimento. Além disso, o demonstrou-se que o homólogo de *Lolium* de *Arabidopsis* CO, LpCO, era funcional em *Arabidopsis* e na monocotiledônea cevada.

Afinal, as ferramentas genéticas necessárias para controlar o florescimento em monocotiledôneas foram identificadas e gramíneas sem florescimento foram geradas com um comutador não químico indutível para induzir o florescimento sob comando para a finalidade de produção de sementes. Paralelamente, uma análise de avaliação de risco foi conduzida sobre a eficácia e estabilidade da contenção biológica por meio de experimentos em populações de plantas sem florescimento sob diferentes condições ambientais.

Ajuste fino do tempo de florescimento

As tentativas de modificar os níveis de expressão de genes MADS-box específicos de florescimento em arroz resultaram apenas em pequenas mudanças fenotípicas. Uma explicação para esse padrão poderia ser o conhecido efeito de redundância agindo nessa grande família de fatores de transcrição. Os resultados obtidos com genes de arroz na planta modelo *Arabidopsis* não são sempre transferíveis para a planta da cultura.

Enquanto as investigações de ajuste fino do tempo de florescimento em arroz não deram resultados claros com respeito a fenótipos com florescimento tardio ou precoce, resultados excepcionais foram conseguidos com videiro com a geração de linhagens transgênicas tanto precoces como tardias quanto ao florescimento. Mais ainda, experimentos de hibridização em microarray unigênico desenvolvido em *Lolium* com mais de 1.500 sequências, assim como a geração e uso de um microarranjo contendo 24.000 sequências únicas de álamo, identificaram novos genes importantes envolvidos no florescimento e processos de desenvolvimento nesses organismos.

A expressão do repressor de florescimento FLC de *Arabidopsis* em videiro resultou exatamente no fenótipo oposto nessa espécie lenhosa (florescimento precoce), enquanto a expressão antisense de um indutor de florescimento em videiro ou a superexpressão de um repressor de florescimento em *Populus* teve o efeito esperado e atrasou o florescimento em videiro. A aceleração do florescimento de videiro pela superexpressão de indutores de florescimento de videiro produziu os melhores resultados em termos de ajuste fino ou aceleração do florescimento.

Melhoramento acelerado de espécies lenhosas – Novos instrumentos de melhoramento

Abordagem da conservação funcional: o objetivo de desenvolver instrumentos para ciclo rápido em citrus e laranja doce pela superexpressão de genes de florescimento de *Arabidopsis* foi muito positivamente atingido com os resultados em citrange (híbrido de laranja doce com laranja trifoliada). Enquanto os genes específicos para florescimento demonstraram diferentes capacidades na aceleração de florescimento em citrange, o efeito positivo do gene não pôde ser transferido para *Citrus sinensis*, pelo menos não durante o projeto CONFLOW.

Em mais detalhes, o efeito de *FT* e *SOC1* foi demonstrado em citrange e mostrou que *FT* é muito mais eficiente que *SOC1* na supressão da juvenilidade. *FT* também acelerou o início do florescimento tão eficientemente quanto *AP1*, mas não é tão efetivo na supressão das características juvenis. Além disso, materiais genéticos foram gerados para testar o efeito da eliminação de *AP1* após a supressão da fase juvenil em citrange.

Em *Citrus sinensis*, árvores transgênicas foram geradas mas sem um efeito claro de *AP1* na supressão da juvenilidade e promoção do florescimento. Finalmente, um conjunto de genes foi identificado, cuja expressão é aumentada em citrange como uma consequência da super-expressão de *AP1*. Seu papel na supressão da juvenilidade e/ou promoção floral permanece para ser testado.

Abordagem genômica: essa abordagem foi bem-sucedida em gerar árvores de álamos com florescimento precoce que floresciam após poucas semanas ou meses em vez do normal de 12 a 15 anos. O florescimento induzido é próximo do normal, formando inflorescências em vez de flores isoladas anormais. Isso representa uma melhora significativa, comparada com resultados anteriores. A técnica provou trabalhar tanto para plantas masculinas como femininas. Mais ainda, o florescimento pode ser induzido à vontade, usando construções indutoras. Isso nunca havia sido demonstrado para árvores. Finalmente, o trabalho, pela primeira vez, caracterizou os perfis de expressão de genes para quase todos os genes de álamo durante a transição juventude à maturidade. Este trabalho, que identificou centenas de genes de álamo que são reguladores putativos dessa transição, irá constituir-se em uma base importante para futuros trabalhos sobre a regulação de florescimento e maturidade em árvores.

CONCLUSÕES

Uma importante descoberta deste projeto é que é possível transferir o conhecimento e os genes de plantas modelo como *Arabidopsis* para plantas de culturas, mas o resultado em diferentes culturas não é sempre previsível. Uma vez que o projeto envolvia espécies lenhosas assim como culturas com tempos longos de regeneração e transformação, não tem sido possível alcançar conclusões finais em todas as estratégias dentro da duração de três anos do projeto.

A eliminação do florescimento em culturas e árvores florestais transgênicas (contenção biológica) é geralmente considerada como sendo a mais importante meta para o uso com vantagens da biotecnologia na agricultura e na silvicultura. A contenção biológica provavelmente será um pré-requisito para a futura introdução de plantações de árvores geneticamente modificadas e pode facilitar a coexistência entre culturas geneticamente modificadas e convencionais nos campos. O desenvolvimento de plantas melhoradas biotecnologicamente pode levar a culturas com produtividade e qualidade drasticamente melhoradas e produção de madeiras, beneficiando os fazendeiros europeus e indústrias florestais, ajudando a aliviar a pressão sobre florestas naturais.

Árvores com florescimento precoce serão importantes para o melhoramento de árvores florestais e citrus. Isso resolve um importante problema em melhoramento de árvores, i.e. o fato de que muitas árvores europeias comercialmente interessantes não florescem antes de 5-20 anos de idade. Isso tem prejudicado severamente o desenvolvimento do melhoramento de árvores na Europa. Árvores superiores, altamente melhoradas, aumentarão significativamente a produtividade e a qualidade das florestas.

As ferramentas desenvolvidas no ajuste fino do tempo de florescimento ajudará a tornar previsível, mesmo em flutuações imprevisíveis do ambiente (e.g. condições do tempo), e ajudarão a adaptar variedades novas e já existentes, e culturas, à sua localização e condições de crescimento. Esses benefícios permitirão às variedades “elite” existentes serem cultivadas onde atualmente não o são, e aumentar a produtividade e competitividade da agricultura europeia em geral.

PRINCIPAIS PUBLICAÇÕES

MARTIN, J.; STORGAARD, M.; ANDERSEN, CH.; NIELSEN, KK.; Photoperiodic regulation of flowering in perennial ryegrass involving a CONSTANS-like homolog. *Plant Mol Biol.* 56 (2):159-69. (2004).

LEVY, Y. Y.; MESNAGE, S.; MYLNE, J. S.; GENDALL, A.; DEAN, C.; Multiple roles of Arabidopsis VRN1 in vernalization and flowering time control. *Science* 297, 243. (2002).

MYLNE, J.S.; GREB, T.; LISTER, C.; DEAN, C.; Epigenetic Regulation in the Control of Flowering. Cold Spring Harbour 69th Symposium: *Epigenetics*. (2004).

SEARLE, I.R. and Coupland G. Induction of flowering by seasonal changes in photoperiod. *EMBO J.* 23 (6): 1217-22. (2004)

Avaliação ecológica e econômica das culturas geneticamente modificadas

<i>Acrônimo</i> ECOGEN	<i>Coordenador</i> Paul Henning KROGH
<i>Acrônimo do Programa</i> FP5-LIFE QUALITY	Department of Terrestrial Ecology
<i>Número do Contrato</i> QLK5-CT-2002-01666	National Environmental Research Institute
<i>Período</i> Maio de 2002 – Abril de 2006	Aarhus University, P.O. Box 314 Vejlsovej 25, DK-8600 Silkeborg
<i>Website do projeto</i> http://www.ecogen.dk	phk@dmu.dk

<i>Parceiros</i> Jerome CORTET ENSAIA-INPL, Nancy (FR)	Mathias NEUMANN ANDERSEN Department of Agroecology and Environment Research Centre Foulum, Tjele (DK)
Bryan GRIFFITHS Teagasc, Carlow (IR)	Annette GOMOT DE VAUFLEURY Department of Chrono- Environment UMR UFC/CNRS 6249 USC INRA, Besancon (FR)
Christophe SAUSSE/ Antoine MESSEAN CETIOM, Thiverval-Grignon (FR)	
Sašo DŽEROSKI Department of Knowledge Technologies, Ljubljana (SI)	
Justus WESSELER Environmental Economics and Natural Resource Group Wageningen University (NL)	

BACKGROUND E OBJETIVOS

O ambiente do solo é afetado pelas atividades agrícolas, incluindo os elementos das práticas convencionais de produção, como pesticidas, aração e tipos de culturas. A introdução de culturas geneticamente modificadas (GM) ao ambiente do solo pede uma avaliação ecológica e econômica, especialmente porque as consequências dessa nova tecnologia não podiam ser previstas pela experiência anterior. A biodiversidade do solo inclui uma ampla gama de grupos taxonômicos, cada um pedindo uma especialização e experiência. Estes organismos desempenham múltiplas funções que, juntas, criam um ecossistema complexo. O projeto ECOGEN incluiu os principais grupos taxonômicos e a decomposição de matéria orgânica como o foco principal de sua investigação ecológica de sistemas de cultivo GM.

Uma avaliação de risco ecológico de sistemas de cultivo GM e sistema de cultivo convencional com relação a ecossistemas do solo foi baseada com testes de uma única espécie e investigações de campo de longo prazo (quatro anos). Protocolos de primeira linha de ecotoxicidade para testar produtos químicos foram modificados para a exposição a material vegetal GM e validados em um sistema escalonado de avaliação de risco.

Quando conduzindo avaliações de risco ecológico, tornou-se prática estabelecida analisar o risco em passos ou níveis sucessivos. Devido ao seu custo mais baixo, um teste de poucos níveis permite uma série mais ampla de questões (i.e. a inclusão de

muito mais fatores) do que testes de muitos níveis. ECOGEN abordou a avaliação de risco com uma perspectiva similar, mas sem requerer resultados de um teste com poucos níveis antes de deflagrar um teste de mais níveis. Em vez disso, três níveis foram empregados, usando resultados de menor número de níveis para corroborar a interpretação das observações com mais níveis (nível de campo).

O objetivo de avaliar o impacto ecológico e econômico dos sistemas de cultivo GM foi atingido com o estabelecimento de uma infraestrutura experimental de campo em três locais incluindo sistemas de cultivo GM e não-GM. Foram localizados em três zonas geográficas europeias correspondentes àquelas em peso pela autorização de produtos para proteção de plantas:

Zona A – Norte (Dinamarca), Zona B – Centro (aproximado por um local no Norte da França), Zona C – Sul (Sul Mediterrâneo da França). Mudanças na biodiversidade do solo foram medidas principalmente em relação a práticas de aração, tipos de solo e história, pesticidas e variedade de milho.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

A abordagem feita quanto à avaliação de custos e benefícios da introdução de culturas GM na Europa foi distinguir entre custos e benefícios que seriam temporários (reversíveis) e aqueles que seriam de natureza de longo prazo (irreversíveis). No contexto das culturas transgênicas, em que as preocupações estão mais focadas em custos potencialmente irreversíveis da tecnologia, informações úteis podem ser obtidas de valores limite que indicam os custos irreversíveis máximos sociais incrementais (MISTICs) que um indivíduo ou sociedade quer tolerar em troca dos benefícios da tecnologia. O estudo, portanto, também investigou o ponto em que custos irreversíveis incrementais excederem o MISTICs nos níveis nacionais, do produtor ou per capita UE.

Para enfrentar o problema de tomar uma decisão baseada no conhecimento originado em círculos científicos discrepantes, um modelo de suporte de decisão multiatributos é útil, uma vez que intrinsecamente não tem restrições quanto à natureza do conhecimento que integra o modelo – desde que o conhecimento sobre o sistema possa ser quebrado em atributos e a esses possam ser dados valores simbólicos qualitativos que influenciam propriedades agregadas. A avaliação de sistemas de cultivo é passível de modelagem multiatributo, porque trata de cenários que precisam ser avaliados, analisados e comparados uns com os outros. E um sistema de cultivo pode ser dividido em elementos menores, menos complexos, em que as relações entre os fatores podem afetar a avaliação dos cenários. O conhecimento ecológico com testes de espécie única, testes multiespécies, investigações de campo e informação econômica sobre práticas de cultivo foi levado via especialistas da área aos cientistas em computação, construindo o modelo baseado em norma a ser usado para a predição de processos econômicos de tomada de decisão.

A organização do projeto ECOGEN mostrou ser bem-sucedida, provavelmente por que os elementos na organização refletiam as principais metas, como divididas entre os blocos de trabalho. O modelo conceitual da organização do projeto combinou abordagens de economia, agronomia e avaliação de risco ecotoxicológico com um empreendimento de modelagem que usou busca de dados e apoio para decisões. Os estudos de campo subjacentes foram concebidos com base e infraestrutura do mundo real, sobre os quais as análises e interpretações foram construídas.

O projeto ECOGEN tratou das questões ecológicas e econômicas do solo relacionadas com a introdução de culturas GM na agricultura europeia. Isso se constituiu de:

- avaliações ecológicas do solo em sistemas de produção de milho GM em três níveis de organizações biológicas: espécie única, comunidades modelo e ecossistema de campo;
- avaliação socioeconômica dos benefícios e custos do milho Bt e milho HT no nível da fazenda e nível nacional para Estados-membros da UE;
- apoio à decisão para ajudar na avaliação de fatores econômicos e ecológicos concomitantes pelo emprego de uma ferramenta de apoio à decisão multiatributo.

Uma infraestrutura experimental foi estabelecida para dar aos participantes do projeto dados de gerenciamento agrícola, comparações delineadas experimentalmente sobre sistemas de cultivo e dados econômicos. Os estudos de campo foram localizados em cada uma das três zonas geográficas europeias como usadas para a autorização de produtos de proteção de plantas: Zona A – Norte (Dinamarca), Zona B – Centro (aproximado por um local no Norte da França), Zona C – Sul (Sul Mediterrâneo da França).

PRINCIPAIS DESCOBERTAS E RESULTADOS

Os protocolos de excitotoxicidade usados para o teste de produtos químicos foram modificados para ajustarem-se à exposição ao material vegetal GM. Uma ampla gama de grupos taxonômicos de organismos do solo, incluindo *Acari*, *Oligochaeta*, *Collembola*, *Protozoa*, *Nematoda* e *Mollusca*, foi investigada quanto à sensibilidade direta à toxina Bt, tanto na forma química pura quanto como parte da biomassa de milho em testes de laboratório. Estes testes não revelaram efeitos da toxina Bt e milho Bt, enquanto os inseticidas selecionados entre os pesticidas usados em locais de estudos de campo do ECOGEN teriam efeitos sobre os invertebrados do solo. A microfauna não foi, portanto, afetada pelos pesticidas nos níveis das doses de aplicação no campo e a conclusão geral é de esperar maior impacto sobre os invertebrados do solo de aplicação de inseticidas do que de milho Bt.

Sistemas modelo mesocosmo foram empregados visando incluir a complexidade ecológica do solo e o controle das condições experimentais da casa de vegetação. Foram estudados fatores de campo relevantes tais como tipo de solo, pesticidas e uma gama de variedades de milho Bt, comparados com seu quase isogênico não Bt. Os maiores efeitos observados foram do tipo de solo e estágio de crescimento da planta. A variedade de GM testada tinha efeitos sobre populações de solo e processos que eram menos pronunciados que os efeitos do pesticida. A comparação entre o milho Bt e o milho Bt quase isogênico não revelaram tendências gerais indicando efeitos adversos ou benéficos do milho Bt sobre organismos do solo. Em particular, quando se comparou a gama de variedades de milho Bt e milho Bt quase isogênico, demonstrou-se que não havia diferenças detectáveis na concentração da toxina Bt na planta ou no solo com quaisquer das variedades expressando Bt. Embora os nematóides do solo e a estrutura da comunidade microbiana diferirem entre as variedades de milho, as diferenças não poderiam ser relacionadas com a característica Bt.

Um programa ecológico extensivo de amostragem de campo de solo esteve em andamento por toda a vida do projeto, para microrganismos do solo (Bacteria), microfauna (*Protozoa* e nematóides), mesofauna (*Collembola*, ácaros, enquitreídeos) e macrofauna (minhocas). Para todos os principais grupos de organismos do solo nenhuma diferença foi observada com milho Bt que fossem maiores do que as

diferenças causadas pela estação, pelo tipo de solo, pela prática de aração ou cultivar. Efeitos observados no milho tolerante ao herbicida glufosinato de amônio foram interpretados como vindos da aplicação do herbicida Basta, que foi observado para *Collembola* e minhocas. Com relação à decomposição da matéria orgânica, o milho *Bt* não teve efeito negativo na decomposição em qualquer das três localidades.

Com culturas tolerantes a herbicidas (HT), a redução da aração tornou-se agronomicamente mais aceitável porque a eficiência do herbicida de amplo espectro não requer a assistência da aração para o controle de ervas daninhas. Maior abundância de fauna foi encontrada em aração reduzida tanto em milho *Bt* como no milho HT; entretanto, esse resultado depende de especificidades do sistema de aração reduzida usado. Reduções drásticas em minhocas foram encontradas quando o sistema consistia em omitir a aração de outono, mas mantendo um vigoroso solo superficial na primavera.

O complexo de fatores econômicos e ecológicos envolvidos na avaliação de sistemas de cultivo, incluindo as novas tecnologias como culturas GM, foi manejado e integrado por um modelo qualitativo multiatributos. O modelo foi baseado no conhecimento específico da área dos especialistas do ECOGEN e foi usado para avaliação, no nível da fazenda, de culturas de milho GM e não-GM. Sistemas de cultivo foram definidos por quatro grupos de aspectos: (1) subtipo de cultura; (2) contexto regional e no nível de fazenda; (3) proteção de culturas e estratégias de manejo de culturas; e (4) características esperadas na colheita. A avaliação do impacto dos sistemas de cultivo foi baseada em quatro grupos de indicadores ecológicos e dois grupos de indicadores econômicos: biodiversidade, biodiversidade do solo, qualidade da água, gases da casa de vegetação, custos variáveis e valor da produção. A avaliação dos sistemas de cultivo foi governada por normas definidas pelos especialistas da área e usada por modeladores para construir um modelo baseado em normas, ajudando os processos econômicos de tomada de decisão e na previsão do comportamento do ecossistema.

Quando o conhecimento ecológico de testes de uma espécie, testes multiespécies e investigações de campo de sistemas de cultivo de milho foram levados pelos especialistas da área aos cientistas de computação, ficou óbvio que a perturbação química, a fertilização do solo, e o estresse físico eram predominantes na determinação da biodiversidade do solo. Em uma avaliação prática e geral dos resultados ecológicos e econômicos, o modelo ordenou os sistemas de cultivo na seguinte ordem: organicamente manejado > sistemas GM incluindo as características *Bt* e HT > milho manejado convencionalmente.

CONCLUSÕES

As avaliações ecológicas do solo em três níveis de organizações biológicas, i.e. espécie única, comunidades modelo mesocosmo e ecossistemas de campo, produziram conclusões específicas em cada nível de complexidade:

- organismos do solo mantidos só em culturas de laboratório não responderam negativamente à toxina pura *Bt* ou material de planta de melhor contendo a toxina *Bt*;
- sistemas de teste experimentais mesocosmo responderam principalmente a propriedades de variedades de milho em vez de à toxina *Bt* e a pesticidas; e
- as respostas de campo da biodiversidade de solo foram detectadas principalmente para as práticas de aração, tipo de solo, tipo e histórico de cultura, pesticidas e variedade de milho.

Os dois níveis superiores não corresponderam bem com o primeiro nível, de modo que uma estratégia de triplo nível é sugerida quando avaliando o impacto de plantas GM

para também se beneficiar da força de cada nível no entendimento e na previsão dos efeitos no nível de campo.

A avaliação socioeconômica dos benefícios e custos do milho *Bt* e do milho HT no nível da fazenda e no nível nacional para Estados-membros selecionados da EU resultou em conclusões cruciais importantes para a política agrícola da UE:

- a análise econômica indica que os fazendeiros produtores de milho da UE perderiam benefícios econômicos diretos da ordem de 150 milhões de euros por ano pelo adiamento da introdução total do milho *Bt*. Com base na análise de impactos do ECOGEN do milho *Bt* e milho HT sobre a biodiversidade do solo, concluímos que os benefícios econômicos diretos são provavelmente suficientemente altos para compensar possíveis custos irreversíveis da introdução completa: maiores adiamentos são, portanto, injustificáveis;
- a decisão da Comissão Europeia de adiar mais aprovações de culturas GM até que sistemas de rotulagem e rastreamento para os OGMs estejam em vigor e regras de coexistência estabelecidas pode ser considerada sábia, embora essa decisão tenha um alto custo econômico;
- de uma perspectiva puramente econômica, poderia ter havido um ganho social com a espera de adotar o milho *Bt* até que mais informações fossem reunidas para reduzir a incerteza associada com os benefícios líquidos reversíveis de consumidores privados; e benefícios econômicos pequenos no nível per capita: isso pode contribuir para a relutância dos consumidores da EU a favorecer mais as culturas GM.

PRINCIPAIS PUBLICAÇÕES

BOHANEK, M.; MESSEAN, A.; SCATASTA, S.; ANGEVIN, F.; GRIFFITHS, B.; KROGH, P.H.; ŽNIDARŠIČ, M.; DŽEROSKI, S. (2008). A qualitative multiattribute model for economic and ecological assessment of genetically modified crops. *Ecological Modelling* 215, 247-261.

KRAMARZ, P.E.; DE VAUFLEURY, A.; GIMPERT, F.; CORTET, J.; TABONE, E.; ANDERSEN, M.N.; KROGH, P.H. (2009). Effects of Bt-maize material on the life cycle of the land snail *Cantareus aspersus*. *Applied Soil Ecology* 42, 236–242.

WESSELER, J.; SCATASTA, S.; NILLESEN, E.; (2007). The Maximum Incremental Social Tolerable Irreversible Costs (MISTICs) and other benefits and costs of introducing transgenic maize in the EU-15. *Pedobiologia* 51, 261-269.

CORTET, J.; GRIFFITHS, B.S.; BOHANEK, M.; DEMŠAR, D.; ANDERSEN, M.N.; CAUL, S.; BIRCH, A.N.E.; PERNIN, C.; TABONE, E.; DE VAUFLEURY, A.; KE, X.; KROGH, P.H.; (2007). Evaluation of effects of transgenic *Bt* maize on microarthropods in a European multi-site experiment. *Pedobiologia* 51, 207-218.

GRIFFITHS, B.S.; HECKMANN, L.H.; CAUL, S.; THOMPSON, J.; SCRIMGEOUR, C.; KROGH, P.H. (2007). Varietal effects of eight paired lines of transgenic *Bt* maize and near-isogenic non-Bt maize on soil microbial and nematode community structure. *Plant Biotechnology Journal* 5, 60-68.

KROGH, P.H.; GRIFFITHS, B.; DEMŠAR, D.; BOHANEK, M.; DEBELJAK, M.; ANDERSEN, M.N.; SAUSSE, C.; BIRCH, A.N.E.; CAUL, S.; HOLMSTRUP, M.; HECKMANN, L.-H.; Cortet, J. (2007). Responses by earthworms to reduced tillage in herbicide tolerant maize and *Bt* maize cropping systems. *Pedobiologia* 51, 219-227.

No Parliament Magazine e European Research & Innovation Review:

KROGH, P.H.; CORTET, J.; BOHANEK, M.; SCATASTA, S.; GRIFFITHS, B.S.; GOMOT-DE VAUFLEURY, A.; CAUL, S.; BIRCH, A.N.E.; ANDERSEN, M.N.; SAUSSE, C.; FERNANDEZ, S.; WESSELER, J. (2007). ECOGEN – Soil ecological and economic evaluation of genetically modified crops. *The Parliament Magazine*, p. 54.

KROGH, P.H.; MUNKVOLD, B.E.; BOHANEK, M.; DŽEROSKI, S.; HEYMANS, X.; AMAIKWU, E.; DAVIES, M. (2007). Collaborative systems for EU research projects. *Research – European Research & Innovation Review* 1, 4.

Desenvolvendo sistemas de contenção biológica eficientes e estáveis para plantas geneticamente modificadas

<i>Acrônimo</i> TRANSCONTAINER <i>Acrônimo do Programa</i> FP6-FOOD <i>Número do Contrato</i> 023018 <i>Período</i> Maio de 2006 – Outubro de 2009 <i>Website do projeto</i> www.transcontaner.org	<i>Coordenador</i> Ruud DE MAAGD Plant Research International B.V. Droevendaalsesteeg 1 NL-Wageningen, 6700 AA The Netherlands Ruud.deMaagd@wur.nl
--	---

<i>Parceiros</i> Ove NILSSON Sveriges Lantbruksuniversitet, Uppsala (SE) Giuseppe Leonardo ROTINO C.R.A. – Istituto Sperimentale per l'Orticultura (Research Institute for Vegetable Crops) Montanaso (IT) Alisher TOURAEV University of Vienna (AT) Martin KATER Universita degli Studi di Milano (IT) Philip John DIX National University of Ireland, Kildare (IE) Justus WESSELER Wageningen Universiteit (NL)	Sergio ARCIONI Consiglio Nazionale Ricerche, Roma (IT) Detlef Bartsch Bundesamt fuer Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Bonn (DE) Ivan MINKOV University of Plovdiv (BG) Joseph Petrus MARIA Schenkelaars Biotechnology Consultancy, Leiden (NL) Magnus HERZBERG SweTree Technologies AB, Umea (SE) Jensen CHRISTIAN DLF-Trifolium A/S, Heddinge (DK)
---	---

BACKGROUND E OBJETIVOS

A regulamentação da UE sobre modificação genética permitiu até agora que apenas uma cultura transgênica seja cultivada nos campos europeus. Entretanto, a possível liberação de plantas GM foi acompanhada por uma crescente preocupação pública (e científica) de que os transgenes fossem transferidos para cultura não-GM ou mesmo parentes selvagens, onde existem. Essa preocupação levou a uma forte demanda para a implementação de tecnologia que reduza a exposição tanto por razões ambientais (e.g. fluxo gênico entre culturas GM e parentes selvagens) como razões econômicas (e.g. fluxo gênico entre culturas GM e não-GM).

A coexistência de culturas GM e não-GM poderia ser facilitada pela implementação de estratégias de contenção biológica que reduzissem o fluxo de transgenes. O projeto TransContainer, que compreendeu 13 parceiros de universidades, pesquisa e institutos do governo, SMEs e indústria, visou a facilitar a coexistência da agricultura GM e não-GM (incluindo a orgânica).

Os principais objetivos do projeto eram:

- desenvolver estratégias de contenção estáveis, ambientalmente seguras e comercialmente viáveis em culturas relevantes para a Europa;
- investigar os impactos socioeconômicos, ambientais e sobre o consumidor da implementação dessas estratégias na Europa;
- aumentar o entendimento e aceitação, pelos interessados e o público em geral, da coexistência por meio de estratégias de contenção biológica, pela iniciativa de dialogar com e entre esses grupos, e por intermediar políticas informadas e debates públicos sobre suas consequências de medidas de coexistência.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

O projeto foi dividido em seis 'Blocos de Trabalho' (WPs):

WP1 Gerenciamento e coordenação.

WP2-4 Desenvolvimento de estratégias de contenção biológica.

WP5 Avaliação da tecnologia ambiental e econômica.

Blocos de Trabalho 2-4: Estratégias de Contenção Biológica

A meta destes WPs movidos a tecnologia foi desenvolver um número de estratégias para a contenção biológica dos transgenes. Onde necessário, essas estratégias foram complementadas com comutadores reversíveis para restaurar a fertilidade. Foram desenvolvidas e testadas técnicas para bloquear o florescimento ou a fecundação cruzada de modo reversível em espécies que dependem do florescimento para propagação e/ou para produção de semente (híbrida). As culturas usadas eram representativas de culturas plantadas por suas sementes (colza oleaginosa), por seus frutos (tomate e berinjela), ou por suas partes vegetativas (beterraba açucareira, azevem, festuca vermelha, álamo e videeiro). Para algumas dessas culturas várias estratégias foram testadas.

Em WP2, "Transformação de Cloroplasto", os objetivos eram o desenvolvimento de protocolos eficientes de transformação de plastídios para colza e beterraba açucareira, que seriam usados para gerar plantas resistentes a herbicida livres de marcadores de seleção antibióticos. A abordagem incluía a identificação das melhores variedades e condições de cultura de tecido para ambas as espécies, a produção de vetores de transformação modelados para o plastoma de cada espécie, e a seleção e caracterização molecular das plantas transplastômicas.

Em WP3, "Florescimento Controlável", o principal objetivo era desenvolver beterraba açucareira, gramíneas e árvores sem florescimento. O segundo objetivo principal era desenvolver sistemas para a restauração do florescimento em beterraba açucareira e gramíneas com florescimento reprimido. Estratégias de contenção dependentes de repressão do florescimento são adequadas para plantas que são cultivadas por suas partes vegetativas.

Em WP4, "Fertilidade Controlável", o objetivo era estabelecer estratégias de contenção biológica baseadas em mitigação de transgenes em pólen por meio de privação nutricional (colza oleaginosa, tomate [sem sementes]), mitigação de transgene em pólen através da interferência em fatores de transcrição basal (colza oleaginosa, berinjela), e mitigação de transgenes no pólen e na semente por ablação de células (gramíneas e colza oleaginosa). O trabalho em mitigação de transgenes através da privação nutricional em colza oleaginosa foi substituído no fim do segundo ano por um projeto de mitigação de transgenes por meio da apomixia (produção clonal de sementes).

Bloco de Trabalho 5: Impacto da Tecnologia

Este WP avaliou o impacto econômico, ambiental e sobre o consumidor associado com as estratégias de contenção biológica na Europa, com o objetivo de fornecer recomendações de uso prático das culturas transgênicas na agricultura europeia. A avaliação econômica considerou primeiramente os benefícios e custos econômicos incrementais a serem esperados da estratégia de contenção e, em segundo lugar, analisou as implicações da adoção de culturas transgênicas sob diferentes regras e regulamentações que governam a coexistência. A avaliação do risco de culturas GM contidas biologicamente foi conduzida em conformidade com os princípios diretores de avaliações ambientais e sanitários publicados pela Administração Europeia de Segurança de Alimentos (EFSA).

Bloco de Trabalho 6: Disseminação

O objetivo deste WP foi comunicar os resultados do projeto TransContainer ao público e interessados para intermediar políticas informadas e debate político sobre o potencial de culturas GM contidas biologicamente para adoção pelo mercado europeu. Várias atividades de comunicação pública foram executadas, incluindo:

1. organização de três reuniões de trabalho em diferentes localizações na UE;
2. entrevistas com mais de 40 representantes de organizações interessadas na Europa Ocidental e Oriental;
3. produção de um DVD com seis relatos filmados de interessados e uma impressão da reunião final de trabalho dos interessados europeus; e
4. provisão de informações em seguida a questões de organizações não-governamentais e a jornalistas.

PRINCIPAIS DESCOBERTAS E RESULTADOS

Transformação de cloroplasto

Duas culturas foram escolhidas para o desenvolvimento de protocolos de transformação de cloroplastos: beterraba açucareira e colza oleaginosa. Para a beterraba açucareira, foi desenvolvido um protocolo baseado em bombardeamento com partícula (método biolístico) de pecíolos de beterraba açucareira, que resultou na geração de um número de plantas resistentes a herbicida (De Marchis *et al.*, 2008). Foram inseridos dois transgenes, um marcador para seleção, e o gene para proteína fluorescente (*GFP*) para a seleção visual de plastídios transformantes (Fig 1.). Para colza oleaginosa, foi tentada tanto a transformação de cloroplasto por via biolística como a mediada por PEG. O último método produziu com sucesso tecido transformado homoplástico, entretanto a capacidade regenerativa da colza oleaginosa é altamente dependente da variedade e, nesse respeito, as plantas transplastômicas ainda não foram regeneradas com esta variedade.

Repressão floral

Estratégias parcialmente sobrepostas para redução da expressão de genes conhecidos ativadores de florescimento ou para expressão aumentada de genes conhecidos inibidores de florescimento foram empregadas para bloquear o florescimento em beterraba açucareira, gramíneas e árvores de madeira dura. A maior parte das estratégias foi implementada com sucesso, embora em alguns casos os testes ainda estejam em andamento. Linhagens transgênicas que não florescem foram obtidas para beterraba açucareira, azevem perene, festuca alta, álamo híbrido e choupo. Para beterraba açucareira e gramíneas, quando o florescimento é necessário para permitir o melhoramento de propagação por sementes, outros trabalhos foram

feitos para estabelecer um sistema de restauração indutível do florescimento usando um promotor indutível por etanol. Demonstrou-se que o princípio funciona em *Arabidopsis* e festuca alta (Fig 2.), e também foi introduzido em beterraba açucareira, mas requer mais testes e otimização em todos esses sistemas.

Fertilidade controlável

Várias estratégias foram testadas para tratar da transmissão de transgenes através do pólen ou semente em tomate, berinjela, colza oleaginosa, e gramíneas. Esterilidade masculina reversível através de privação nutricional funcionou bem em tabaco (Ribarits *et al.*, 2007), mas não tão bem em tomate. A esterilidade pela regulação para baixo dos fatores da transcrição basal funcionou bem para berinjela e podia ser revertida usando um sistema indutível por etanol. A prevenção de disseminação do transgene através de sementes foi obtida pela modificação da expressão do fator de transcrição requerido para a biogênese do cloroplasto durante o desenvolvimento do embrião (Colombo *et al.*, 2008). Essa abordagem chamada “Bloqueio Recuperável de Função” foi usada com sucesso para a recuperação indutível de sementes viáveis. Apomixia, a produção assexual de sementes, foi estudada como um modo potencial de assegurar produção de sementes com o mesmo genótipo parental em plantas machoestéreis, mas a pesquisa ainda está no estágio fundamental.

Impacto da Tecnologia

O impacto potencial da implementação de estratégias de contenção biológica para a coexistência na agricultura europeia e na saúde do consumidor foi avaliado. Concluiu-se que, para muitas culturas, a contenção pode não ser necessária sob as atuais condições de cultivo, uma vez que as medidas de coexistência seriam suficientes (Ansink and Wesseler, 2009). Entretanto, contenção biológica pode ser valiosa como um nível extra de proteção para culturas com usos como alimento ou ração, tais como plantas industriais ou que produzem insumos farmacêuticos. Como não se espera que nenhuma estratégia seja 100% eficiente, uma combinação de estratégias é aconselhável em tais casos. Efeitos adversos sobre a saúde humana ou ao ambiente resultantes de contenções biológicas específicas desenvolvidas neste projeto foram considerados como improváveis, mas serão necessárias análises mais detalhadas, especialmente para as novas abordagens para as quais não há precedentes na literatura (Koziolek, 2009).

Disseminação

Comunicação adequada ao público e envolvimento dos interessados são importantes metas deste projeto. Para essa finalidade, três reuniões de trabalho de um dia foram organizadas e entrevistas com interessados, assim como um DVD com relatos filmados foram produzidos para fornecer material de background para discussões. Todos os resultados estão sendo publicados em um site público (www.transcontainer.org) e os relatos filmados estão acessíveis através de www.youtube.com.

CONCLUSÕES

O projeto Transcontainer foi bem-sucedido em atingir muitos de seus objetivos. Um número de estratégias, tais como inibição de florescimento, transformação de cloroplastos e macho-esterilidade foram mais desenvolvidas e implementadas em várias culturas importantes, estendendo consideravelmente com isso as possibilidades para obter a contenção biológica. As plantas transgênicas desenvolvidas neste projeto podem ser usadas para testar a eficiência da contenção sob condições de casa de vegetação ou em experimentos de campo. Estudos sobre impactos socioeconômicos

potenciais e as atividades de disseminação revelaram que nossa pesquisa chega a um estágio bastante precoce na introdução de culturas GM na Europa, e que vários grupos de interessados não estão alertados das diferentes opções para contenção biológica. Quanto a esse respeito, nossas atividades de disseminação contribuíram para a crescente conscientização deste tópico.

Tem havido controvérsias em torno deste projeto, pois certos grupos olham as estratégias de contenção biológica estudadas no projeto como Tecnologias Genéticas de Restrição de Uso (GURTs), também conhecidas como “tecnologia do exterminador”. A modificação das propriedades reprodutivas da planta é inevitável em uma estratégia de contenção biológica e esse aspecto da contenção biológica, seja ele conseguido através de abordagens GM ou não-GM, permanecerá uma questão a ser tratada. De certo modo, portanto, este projeto foi bem atualizado com relação a levantar interesse quanto a estas questões.

PRINCIPAIS PUBLICAÇÕES

ANSINK, E.; WESSELER, J. (2009). Quantifying type I and type II errors in decision-making under uncertainty: the case of GM crops. *Letters in Spatial and Resource Sciences*, 1-6.

COLOMBO, M.; MASIERO, S.; VANZULLI, S.; LARDELLI, P.; KATER, MM.; COLOMBO, L. (2008). AGL23, a type I MADS-box gene that controls female gametophyte and embryo development in *Arabidopsis*. *Plant J* 54:1037-1048.

DE MARCHIS, F.; WANG, Y.; STEVANATO, P.; ARCIONI, S.; BELLUCCI, M. (2009). Genetic transformation of the sugar beet plastome. *Transgenic Res* 18:17-30.

KOZIOLEK, C. (2009). Biosafety assessment and benefits for co-existence of biological contained plants-regulatory assessment in the EU-project “transcontainer”. *Journal fur Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 3:41.

RIBARITS, A.; Mamun, ANK; LI, S.; RESCH, T; FIERS, M.; HEBERLE- BORS, E.; LIU, CM; TOURAEV, A. (2007). Combination of reversible male sterility and doubled haploid production by targeted inactivation of cytoplasmic glutamine synthetase in developing anthers and pollen. *Plant Biotechnol J* 5,483-494.

Introdução sustentável de culturas GM na agricultura europeia

<i>Acrônimo</i> SIGMEA <i>Acrônimo do Programa</i> FP6-POLICIES <i>Número do Contrato</i> FP6-2002-SSP1-501986 <i>Período</i> Maio de 2004 – Dezembro de 2007	<i>Coordenador</i> Jeremy SWEET National Institute for Agricultural Botany Huntingdon Road Cambridge CB3 0LE United Kingdom jeremy.sweet@niab.com
--	--

<i>Parceiros</i> Andre POUZET Centre Technique Interprofessionnel dès Oleagineux Metropolitains, Paris (FR) Antoine MESSEAN Institut National de la Recherche Agronomique, Paris (FR) Broder BRECKLING University of Bremen (DE) Thomas REI_ Fraunhofer-Gesellschaft zur Foerderung der angewandten Forschung eV, Munchen (DE) Emilio RODRIGUEZ Joint Research Centre, Brussels (BE) Saso DZEROSKI Jozef Stefan Institute, Ljubljana (SI) Roberto PAPA Universita Politecnica delle Marche, Ancona (IT) Enrico BIANCARDI Istituto Sperimentale per le Colture Industriali, Bologna (IT) B. VOSMAN Plant Research International, Wageningen (NL) John KILPATRICK ADAS Consulting limited, Wolverhampton (UK) Christine HENRY Central Science Laboratory, London (UK) Carola PEKRUN University of Hohenheim, Stuttgart (DE) Slavomir RAKOUSKY University of SouthBohemia,	Julian KINDERLERER University of Sheffield (UK) Joe PERRY Rothamsted Research, Harpenden (UK) Geoff SQUIRE Scottish Crop Research Institute, Dundee (UK) Howard THOMAS Institute of Grassland and Environmental Research, Aberystwyth (UK) Peter STAMP Swiss Federal Institute of Technology, Zurich (CH) M.C. CHUECA Instituto Nacional de Investigacion y Tecnologia Agraria y Alimentaria, Madrid (ES) Detlef BARTSCH Bundesamt fur Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Bonn (DE) Klaus AMMAN University of Bern (CH) Marc DE LOOSE Institute for Agriculture and Fisheries Research, Merelbeke (BE) Eric TOLLENS CatholicUniversity of Louvain, Leuven (BE) Josef SOUKUP Czech University of Agriculture in Prague (CZ) Morten GYLLING Danish Research Institute of Food Economics, Frederiksberg (DK) Bruno Henry DE FRAHAN
--	--

<p>Ceske Budejovice (CZ) Soren MIKKLESON Danish Institute of Agricultural Sciences – now University of Aarhus, Frick (DK) Otto RICHTER Technical University of Braunschweig, Braunschweig (DE) Peter WALKLATE Silsoe Research Institute, Bedford (UK) Heike BEISMANN Technische Universitaet Muenchen (DE) Julian HUNT Cambridge Environmental Research Consultants, Cambridge (UK) Gosta KJELLSON National Environmental Research Institute, Roskilde (DK) P.H. GOUYON University of Paris 11, Orsay (FR) Rodolphe DE BORCHGRAVE Arcadia International, Brussels (BE)</p>	<p>Universite Catholique de Louvain, Louvain-La-Neuve (BE) Pedro CASTANERA Consejo Superior de Investigaciones Cientificas, Madrid (ES) Joachim SCHIEMANN Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig (DE) Rikke BAGGER JORGENSEN Riso National Laboratori, Roskilde (DK) Iwano BARTOWIAK Plant Breeding and Acclimatisation Institute, Blondie (PL) Michael WILKINSON University of Reading, (UK) Daniel BLOC ARVALIS – Institut du Vegetal, Paris (FR) Klaus MENRAD University of Applied Sciences of Weihenstephan, Freising (DE) Joaquima MESSEGUER Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries, Barcelona (ES)</p>
--	---

BACKGROUND E OBJETIVOS

O Projeto de Pesquisa multidisciplinar europeu SIGMEA foi estabelecido para criar uma estrutura baseada na ciência para informar os tomadores de decisão sobre a coexistência apropriada e as medidas de rastreamento que seriam necessárias para o cultivo de culturas GM. Para informar a sustentabilidade das culturas GM, SIGMEA tem: (i) ordenado e analisado todos os dados europeus sobre fluxo gênico e os impactos ambientais das principais espécies relacionadas com OGMs (milho, colza, beterraba açucareira, arroz, trigo); (ii) projetado modelos de previsão de fluxo gênico no nível do panorama; (iii) analisado a exequibilidade técnica e a pertinência econômica da coexistência nas principais regiões de cultivo da Europa; (iv) desenvolvido novos métodos de detecção de OGMs; (v) tratado de questões legais relacionadas com a coexistência; e (vi) proposto instrumentos de tomada de decisão públicos e privados, assim com diretrizes racionadas com a administração e governabilidade.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

SIGMEA reuniu as principais equipes e principais programas que estudavam o fluxo gênico em vários países europeus e uma ampla gama de sistemas agrícolas, incluindo cultivo orgânico. Sete estudos de caso regionais foram conduzidos para projetar e avaliar cenários para coexistência

O projeto ordenou e sintetizou dados experimentais sobre fluxo gênico, identificou lacunas no conhecimento projetando e conduzindo novas avaliações, particularmente

em escala ambiental ou por vários anos de sequência de cultivo. Milho e colza oleaginosa foram as principais culturas visadas neste estudo – outras culturas sob consideração foram beterraba açucareira, arroz e trigo.

A informação disponível sobre estudos de campo passados ou em andamento sobre polinização cruzada, tiguerras, asselvajados e parentes selvagens foram reunidos de 22 parceiros SIGMEA baseado em um rigoroso processo de controle de qualidade. O banco de dados tinha mais de cem conjuntos de dados, constituindo-se em mais de 150 “experimentos-anos”. Cerca de dois terços dos dados são para colza oleaginosa e parentes próximos; há também informações sobre beterraba e milho e uns poucos conjuntos de dados para trigo e arroz. Dados sobre culturas e tiguerras constituem cada cerca de 35%, parentes selvagens 16% e asselvajados 6%. Dados sobre impactos ecológicos – distintos de fluxo gênico pela semente ou pólen – formam uma pequena parte do total.

Os conjuntos de dados cobrem a maior parte das informações recentes relevantes sobre essas culturas na Europa (ver Fig 1.), especialmente pesquisa na escala de “campo” ou “panorama”. Para colza oleaginosa, os conjuntos de dados sobre polinização cruzada, tiguerras e asselvajados compreendem todos menos um dos principais experimentos de campo conduzidos pelos parceiros do SIGMEA (e aquele está incluído na sínteses). Para milho, embora dois conjuntos adicionais principais realmente existam, esses dados não estavam disponíveis para inclusão, mas investigações baseadas nesses conjuntos de dados foram publicados e suas descobertas foram incluídas nas conclusões aqui fornecidas.

A maioria dos conjuntos de dados fornece muito mais detalhes do que aparece nas publicações de referência e foram extensivamente usados para proporcionar valor agregado através de meta-análise e busca de dados. Devido à alta repetição conseguida pela combinação de dados de diferentes locais, as conclusões específicas para a cultura em SIGMEA sobre fecundação cruzada e persistência de sementes (ver segundo capítulo abaixo) apresentam na maioria significação estatística muito alta e torna possível tirar conclusões gerais sobre certos tópicos, tais como dispersão de pólen no caso do milho.

Em resumo, o banco de dados, juntamente com a informação já publicada, forneceu uma base sólida para capacitar o SIGMEA a alcançar um conjunto de conclusões específicas individualmente para o milho, a colza oleaginosa e beterraba, como resumido abaixo. Adicionalmente, o banco de dados permitiu uma avaliação de três questões sobre a capacidade de transferência da informação: quão consistentes são as medições em escalas espaciais (ou temporais) diferentes; quão consistentes elas são entre as regiões agrícolas da Europa que têm climas e solos diferentes; e quão consistentes elas são entre espécies.

PRINCIPAIS DESCOBERTAS E RESULTADOS

1. Estudos de fluxo gênico informam a coexistência em milho, colza oleaginosa, beterraba açucareira, trigo e arroz

Milho. Os estudos são consistentes em numerosos locais e indicam (a) um forte declínio na polinização cruzada de três ordens de magnitude (um fator de mil vezes) com as distâncias de até 100 m da borda e um campo; (b) um forte efeito da direção do vento e fatores meteorológicos relacionados na porcentagem de polinização; e (c) uma geralmente consistente dependência de distância em escala de parcela e campo. Esta última consistência foi encontrada onde o campo doador e o receptor estão bem dispersos no ambiente e a uma geralmente baixa densidade.

Resumindo, o potencial da introdução da presença adventícia de material GM na produção de milho não-GM é:

- moderado para polinização cruzada entre campos, que podem ser manejados via separação, descartes ou tampões onde as culturas estão muito próximas;
- baixo através de tigueras, e mesmo assim no sul da Europa;
- baixo por introgressão de variedades locais por variedades modernas da cultura;
- zero através de parentes selvagens (não há nenhum na Europa).

Colza oleaginosa. A transferência por semente pode ser muito alta, uma vez que grandes quantidades de sementes podem sobreviver por vários anos produzindo tigueras. A semente pode dispersar em maquinaria agrícola e transporte. Uma gama de práticas agrônômicas é executada para limitar tigueras, mas a contribuição para a produtividade é ainda altamente imprevisível e pode variar de <0.01 % a mais de 10 % para a mesma variedade da cultura em diferentes manejos, solo e clima. O pólen é carregado pelo vento e por abelhas de colmeias e mamangavas e uma variedade de outros insetos, e a polinização cruzada é tanto maior quanto menos direcionada do que em milho. O cruzamento entre campos comerciais pode permanecer até em 0,1 % mesmo em distâncias entre 100m e 1 000m. A abundância de parentes selvagens e plantas asselvajadas difere entre regiões, mas em geral a fertilidade mais baixa e aptidão dos asselvajados e parentes selvagens significam que não constituem uma rota importante de transmissão de características de volta às culturas.

O potencial para a introdução de impurezas GM é:

- moderado para polinização cruzada entre campos de colza oleaginosa, que podem ser manejados através de separação espacial e uso de tampões ou descartes onde as culturas estão muito próximas;
- alto através de semente remanescentes no campo, resultando em populações de tigueras que se misturam com e polinizam culturas não-GM – tigueras são ubíquas, móveis e comumente em grande abundância e são da máxima importância à coexistência com o tempo e, em menor grau, no espaço;
- moderado no caso de parentes selvagens em áreas localizadas da Europa onde elas ocorrem em abundância nos campos (e.g., *B. rapa* na Dinamarca);
- moderado a baixa através de asselvajados (com algumas exceções locais) por causa de sua baixa densidade geral comparada com culturas e tigueras no ambiente;
- além disso, o potencial para baixos níveis de polinização cruzada entre culturas, tigueras, asselvajados e parentes selvagens por insetos e vento, até uma longa distância no ambiente pode potencialmente levar a níveis de background significativos para aumentar impurezas de outras fontes. Problemas de coexistência durante os primeiros anos de comercialização podem ser reduzidos pelo manejo da polinização cruzada (através de separação, etc.) e pureza de semente, mas grandes incertezas continuam sobre a capacidade de cultivar administrando o movimento e amplificação cumulativos e de longo prazo de tigueras e parentes selvagens.

Beterraba. A principal fonte de impureza está na semente reunida para plantio comercial. Para impedir a polinização cruzada, os campos de semente GM e não-GM a serem reunidos precisam ser plantados à considerável distância, possivelmente em diferentes regiões. A forma selvagem, beterraba do mar, é central ao movimento gênico no complexo *Beta*, e é importante na preservação da diversidade da beterraba do mar para a conservação de recursos genéticos e estudos por seus próprios méritos. Avaliações genéticas no SIGMEA, a partir de plantas que crescem ao longo da costa do Báltico e do Adriático, confirmaram que as populações continuam altamente diversificadas e distintas das variedades culturais. Após a característica

anual ser transferida da beterraba do mar para os campos de produção de sementes, ela aparece nos campos de beterraba açucareira como plantas que florescem no primeiro ano, enquanto as plantas puras da cultura de beterraba açucareira são colhidas antes que floresçam. Se for permitida a maturação, essas beterrabas anuais ervas daninhas dão origem a uma quantidade de sementes que irá durar por muitos anos, e durante o florescimento irão trocar material genético com beterrabas ervas daninhas em outros campos. Características, GM ou não, têm o potencial de espalhar-se em áreas de produção comercial, mas as beterrabas ervas daninhas são controláveis com a melhor prática agrícola. A disseminação de tais características constitui um problema potencial para o controle de ervas daninhas, mas não estritamente para a coexistência, desde que nada de seu material de raiz seja colhido junto com a beterraba açucareira.

O potencial para a introdução de impurezas GM é:

- baixo através da polinização cruzada entre as culturas de beterraba açucareira uma vez que a colheita é vegetativa;
- baixo através de populações de tigueras (beterraba erva daninha) que surgem de impurezas na semente usada – o melhor manejo deve impedir que qualquer material de raiz seja colhido dessas beterrabas;
- moderado a alto, embora localizado, através de asselvajados e parentes selvagens pelo movimento gênico para culturas de produção de semente, especialmente quando as plantas fêmeas machoestéreis (prontamente fecundadas por polinização cruzada) são frequentemente cultivadas para produção de sementes F1.
- potencialmente alto entre culturas para sementes de beterrabas que florescem, especialmente quando as plantas fêmeas machoestéreis são frequentemente cultivadas para produção de sementes F1 (embora haja pouca evidência direta sobre qual a forma do declínio na polinização cruzada com a distância entre tais culturas).

A coexistência deve ser atingível pelo melhor manejo, especialmente de cultivos para produção de sementes. Na produção comercial de sementes GM as áreas precisam ser suficientemente isoladas de áreas não-GM e de beterrabas selvagens ou erva daninha para manter a semente não-GM pura e reduzir a disseminação dos genes.

Trigo. O potencial de introdução de impurezas é provável de ser:

- baixo através da polinização cruzada entre as culturas;
- baixo através da hibridização com parentes selvagens nos locais onde eles ocorrem.

A contribuição de tigueras precisa ser esclarecida, mas sua importância para a coexistência temporal é provavelmente baixa ou moderada sob as condições europeias;

Maiores investigações em todos os aspectos da polinização cruzada e dinâmica de ciclos de vida são necessárias antes que firmes recomendações possam ser feitas sobre o manejo da coexistência em trigo.

Rice. O potencial para a introdução de impurezas é provavelmente:

- baixo através de polinização cruzada entre culturas;
- baixo através de tigueras;
- baixo a moderado através da erva daninha arroz vermelho, em áreas de locais onde ele ocorre, desde que práticas agrícolas para controlar essa erva daninha sejam aplicadas.

A coexistência deve ser atingível através da separação de culturas, controle de parentes ervas daninhas e usando semente de alta pureza.

2. Impactos ambientais de culturas GM no contexto dos sistemas de cultivo europeus

As conclusões para as principais culturas estudadas são as seguintes:

- **Milho** (Variedades *Bt*, visando a brocas do milho). Não há razão, sob o aspecto da biossegurança, para restringir a escala de plantio. A descoberta mais consistente é que o milho *Bt* em testes de campo na Europa até hoje não teve nenhum efeito sistemático e reprodutível sob quaisquer invertebrados ou organismos do solo estudados por vários anos onde, por período similar, outros fatores agrônômicos tiveram grandes e mensuráveis efeitos. O desenvolvimento de resistência em brocas do milho deve ser monitorado, assim como os efeitos potenciais sobre certos grupos bióticos não-alvo.

- **Colza oleaginosa** (Variedades HT, tolerantes a glufosinato de amônio ou glifosato) Impactos adversos ocorreram onde a) o herbicida usado em cultivos HT causou uma sistemática diminuição da flora de ervas daninhas e invertebrados dependentes, resultando na redução na biodiversidade nos campos; e b) a presença de tigueras HT limitou opções futuras para usar herbicidas e cultivar certas culturas como soja, (nas quais as tigueras são difíceis de controlar). Efeitos positivos podem ocorrer, como os herbicidas em cultivos HT serem menos tóxicos para organismos não erva daninha do que a maioria dos herbicidas e produtos químicos para proteção de culturas. Entretanto, os efeitos ecológicos das culturas HT no mesmo sistema de produção são menores do que aqueles resultantes de diferenças entre espécie de cultura, época de semeadura e práticas agrônômicas.

- **Beterraba**. Os vários tipos de beterraba – cultura, erva daninha, asselvajada, selvagem – estão em contato genético através da semente e do pólen. A beterraba selvagem precisa de conservação proativa, uma vez que é uma forma de planta biologicamente interessante, de habitat restrito, uma fonte de genes para o futuro melhoramento da beterraba e uma fonte de impurezas anuais para as beterrabas de cultivo. O cultivo de beterrabas HT também poderia exaurir a biodiversidade nos campos pelas mesmas razões discutidas para a colza oleaginosa, mas a maioria dos efeitos seria menor devido às operações agrônômicas em geral.

Há um aumento do consenso de que a avaliação futura das culturas GM deveria considerar tanto os impactos negativos como os positivos do cultivo GM de um modo mais holístico. Padrões e critérios para sistemas de cultivo ambientalmente resilientes são necessários, contra os quais o cultivo GM e a sua comparação não-GM possam ser avaliados. Estabelecer tais padrões ambientais é agora uma prioridade.

3. Análise de exequibilidade de coexistência e custos em vários cenários agrícolas europeus

Gerenciar a coexistência na prática tem sido estudado no nível regional pela avaliação do impacto do cultivo de culturas GM sobre o fluxo gênico sob vários cenários. Estudos de caso regionais foram conduzidos em três escalas: regiões inteiras; pequenas regiões agrícolas correspondendo a sistemas de cultivo homogêneo; e pequenas áreas de poucos km².

Sete estudos de caso foram escolhidos, mas a metodologia completa foi implementada apenas para dois deles. O trabalho executado em Aragon, Aquitaine e

Fife e visou a comparar o efeito de variáveis estruturais sobre fluxo gênico e o manejo de pontos críticos entre estudos de caso. Foram conduzidas simulações na Suíça e Schleswig Holstein para ilustrar problemas específicos ou fenômenos, tais como o manejo de fronteiras (Suíça/França) ou efeitos de diluição (Schleswig Holstein). Embora Beauce e Alsácia fossem os principais estudos, conclusões genéricas foram tiradas também para outras regiões.

O trabalho executado sugeriu uma estrutura para identificar e organizar os principais fatores que poderiam determinar a implementação da coexistência em contextos específicos:

1. Variáveis estruturais descrevendo as características do agroecossistema (sistemas de cultivo, panoramas, meteorologia, manejo de culturas) influenciando o fluxo gênico.

2. Variáveis organizacionais de operações de cultivo e colheita de grãos, armazenamento e distribuição, explicando como eles se adaptam a certas restrições e áreas de manobra.

3. Características da introdução dos OGMs. A implementação da coexistência também depende das condições do mercado (preços relativos de produtos GM e não-GM), dos limites considerados (que podem diferir do que é exigido pela regulamentação, e.g., exigências específicas do mercado) e das características (e.g. características *Bt* que requerem áreas de refúgios – podem facilitar ou restringir certos tipos de medidas de coexistência).

Baseado em resultados de simulação obtidos em estudos de casos regionais, o projeto identificou quatro situações principais, assim chamadas pré-cenários⁴, com os quais os interessados locais terão de tratar:

1. Segregação no nível do silo é exequível sem medidas específicas no nível do campo;
2. Medidas curativas na colheita (seleção de campos não-GM ou partes de campos) permite atender a exigências do mercado em termos de limites estabelecidos;
3. Medidas preventivas no nível da cultura (e.g., datas de semeadura) ou no nível do sistema (rotação, arranjo espacial das culturas);
4. A coexistência não é possível porque quaisquer que sejam as medidas agrônômicas tomadas no nível da cultura ou do sistema, o limite visado não pode ser atendido ou requer medidas irrealistas.

Três processos determinam como os pré-cenários podem ser embutidos em cenários de manejo global:

1. O sistema e as regras para ordenar e compartilhar informações no nível do território;
2. A estrutura e os procedimentos descrevendo a coordenação entre agentes;
3. E processos de aprendizagem (tanto individual como coletiva).

Com base nessas descobertas, contrastar cenários globais pode ser definido considerando diferentes abordagens regulamentadoras:

- Uma abordagem “do começo”, que permite livremente os agentes privados (coletores, fazendeiros) escolherem o melhor modo de atingir os objetivos da coexistência e cumprir as exigências regulamentares ou limites baseados no mercado;

⁴ A palavra “pré-cenário” é usada por que os pré-cenários apenas cobrem um componente do quadro geral e devem então ser integrados no manejo geral de cenários, levando em consideração outros fatores que não os que afetam a coexistência na fazenda (ver abaixo).

- Uma abordagem “de cima”, baseada na forte intervenção das autoridades públicas com a implementação de medidas uniformes e compulsórias (e.g., isolamento, distâncias);
- e uma abordagem “terceira via”, que proporciona uma resposta focada das autoridades em levantar certas restrições da informação e coordenação entre agentes privados e permite alguma flexibilidade nas medidas.

Cada abordagem tem vantagens e desvantagens: a abordagem “do começo” permite maior flexibilidade e custos menores e pode ajudar a lidar com problemas de manejo, além do objetivo das regulamentações GM, tais como exigências específicas para o mercado de Identidade Preservada (IP), mas pode não impedir a desconfiança do público e não resolve todas as questões de responsabilidade. A “terceira via” tira vantagem tanto do conhecimento local de interessados individuais como da capacidade das autoridades públicas de coletar e compartilhar informações em larga escala, para enfrentar problemas práticos levantados pela implementação de medidas de coexistência.

4. Custos da coexistência

A perspectiva econômica da coexistência de culturas GM e não-GM até a porteira da fazenda com aplicabilidade específica à colza oleaginosa (OSR) e milho em diferentes regiões da EU foi investigada pelo SIGMEA. Três níveis de custos de coexistência foram considerados:

- custos de cumprimento com as medidas de coexistência desenvolvidas para impedir a presença adventícia de material GM como resultado de polinização cruzada;
- monitorar custos (testando para a presença adventícia em culturas não-GM);
- custos devidos a falha do sistema (perdas devidas à contaminação de culturas convencionais).

Os custos de coexistência foram calculados com modelos espaciais de simulação, levando em consideração os incentivos econômicos à coexistência. Um conjunto de simulações de coexistência realista foi obtido usando um grupo de dados Sistema de Informações Geográficas (GIS) e software Arcview®. Os resultados mostraram que os custos da coexistência dependem do contexto da agricultura (ambientes, sistemas de cultivo, clima, práticas), a participação da cultura GM (milho e colza oleaginosa) na Área Usada na Agricultura (AUA) e a vontade de produtores GM e não-GM em cooperar. Regras uniformes não flexíveis de coexistência podem impor um grave ônus à produção de culturas GM nas regiões europeias investigadas neste estudo. De fato, a polinização depende grandemente de fatores estruturais como padrões de campo do ambiente, práticas agrônômicas, e condições climáticas e, na maioria dos casos, pequenas distâncias de isolamento seriam suficientes para atender ao limite oficial de 0,9%. Distâncias grandes e uniformes de isolamento, como implementadas na maioria dos países europeus, não são flexíveis e, portanto, não proporcionais ao real risco da presença adventícia. Além disso, exigências de grandes e/ou fixas distâncias de isolamento podem levar ao “efeito dominó”, de modo que os produtores teriam poucos⁵, se alguns, campos que cumprissem essas distâncias de isolamento e seriam incapazes de cultivar culturas GM.

⁵ O “efeito dominó” é um efeito dinâmico “respingando” da decisão dos fazendeiros induzida pela obrigatoriedade de grandes distâncias de isolamento sobre os adotantes potenciais de culturas GM. Ele consiste em um processo interativo de fazendeiros mudando suas intenções de plantio de ‘GM’ para culturas ‘IP’ para cumprir as distâncias de isolamento e daí restringindo as opções de plantio dos fazendeiros vizinhos.

O efeito dominó exacerba a desproporcionalidade de grandes distâncias de isolamento com a redução das opções de plantio de culturas GM no ambiente e aumentando os custos de oportunidade para os que adotam as culturas GM.

Medidas flexíveis baseadas em zonas tampão ou zonas de descarte requerem um alto nível de coordenação entre produtores, resultando em custos adicionais de transações e riscos financeiros. A média dos custos do manejo da coexistência por hectare, embora variável, foi relativamente independente da taxa de adoção de GM em áreas moderadamente densas tais como Aragon (milho) ou Escócia (colza oleaginosa). Há, entretanto, grandes diferenças nos custos de monitoramento relacionados com a taxa de adoção das culturas GM: quanto maior a taxa de adoção de GM, menores os custos adicionais por hectare da coexistência⁶.

Baseado na experiência de cultivo de milho *Bt* na Espanha, um levantamento face a face foi conduzido entre fazendeiros espanhóis produtores comerciais de milho, com o objetivo tanto de obter dados sobre o desempenho agrônomico e econômico do milho *Bt* durante três safras (2002–2004) como de comparar o perfil socioeconômico dos fazendeiros que adotaram o milho *Bt* versus aqueles que não o fizeram. O levantamento foi conduzido em três regiões líderes em cultivo de milho *Bt* (Aragon, Catalunha e Castilla-La Mancha), e uma província foi selecionada em cada região com base na presença de fazendeiros que cultivavam milho *Bt* (as províncias de Zaragoza em Aragon, Albacete em Castilla-La Mancha e Lleida em Catalônia).

Descobriu-se que o milho *Bt* produziu impactos variáveis sobre os campos de milho em diferentes províncias, variando de neutro a 11.8% de aumento de produtividade. A variabilidade regional depende principalmente da variação local de pressão e danos de pragas. As sementes de milho *Bt* foram mais caras do que as sementes convencionais, mas os fazendeiros reduziram o uso de inseticidas e custos. Ganhos em produtividade para os produtores de milho *Bt* foram traduzidos em aumento de renda e o impacto da adoção do milho *Bt* em margem bruta variou de neutro a 122 Euros/ha por ano. No levantamento, a razão mais citada pelos fazendeiros para adotar o milho *Bt* foi “diminuir o risco do dano pela broca do milho” seguido de “obter melhor produtividade”.

O SIGMEA também conduziu um grande levantamento para estimar a adoção potencial por fazendeiros de três culturas GM não ainda autorizadas na UE: colza oleaginosa Tolerante a Herbicida (HT), milho HT e milho *Bt*/HT (combinando tolerância a herbicida e resistência a insetos). Análises preliminares das respostas dos fazendeiros mostram que há um alto potencial de adoção de colza oleaginosa HT e milho HT, assim como milho *Bt*/HT. Na média, 41% dos fazendeiros no levantamento em seis países estão preparados para plantar essas culturas GM. Esse número, não obstante, depende em grande parte das medidas de coexistência colocadas em vigor pelos Estados-membros da UE.

5. Regimes regulatórios atuais da UE e Estados-membros, responsabilidade e questões de reparação

Nenhum problema novo apresenta-se no presente pelos OGMs em relação à responsabilidade e reparação. Há uma gama de instrumentos legais estabelecidos disponíveis para regular os OGMs. Regimes civis, regimes baseados em seguros e regimes estatais baseados em compensações, todos foram estudados e nenhum mostra quaisquer problemas técnicos particulares.

⁶ Custos de monitoramento de campos não-GM poderiam aumentar, mas seriam custeados por uma maior área de GM.

Há, naturalmente, a questão do modelo de seguro se um mercado pode estabelecer-se para fazer deste um regime viável.

A questão da responsabilidade claramente necessita de resolução antes que a escolha do regime regulador possa ser feita. Pareceria lógico que aqueles que encorajam o desenvolvimento da tecnologia, seja ele o Estado ou o consumidor, ativa ou passivamente, tenha níveis de responsabilidade pelas consequências dessas escolhas. Não há garantia de que os custos adicionais de um sistema que requer investigação da prova e culpa seja mais eficiente do que um esquema de compensação.

Questões transfronteiras relacionadas com OGMs fazem com que o desejo de um regime legal único para a UE toda seja muito forte, o que poderia eliminar a probabilidade de conflitos dispendiosos ou problema legais entre Estados-membros. Entretanto esse grau de concordância sobre OGMs é atualmente improvável.

CONCLUSÕES

A coexistência entre diferentes tipos de culturas é uma importante questão que deve ser tratada uma vez que as culturas GM sejam aprovadas pela UE. O SIGMEA produziu uma caixa de ferramentas para tratar do impacto de GM e essas ferramentas e resultados podem ser combinadas para avaliar a coexistência em várias escalas espaciais (campo, fazenda ou região) e vários níveis de tomada de decisão (fazendeiros, cerealistas, Estados-membros, UE).

Foi realçado que regimes de coexistência baseados em “distâncias uniformes de isolamento”, como implementadas em vários Estados-membros, não são otimizados, não são proporcionais e podem levar a custos adicionais desnecessários ou tornar a coexistência impossível.

O SIGMEA recomenda que as medidas de coexistência devem ser tão flexíveis quanto possível e depender de fatores locais climáticos, agronômicos e ambientais. Tal abordagem levaria a medidas mais eficientes em custos. Entretanto, a estrutura atual de regulamentação para apoiar tal abordagem ainda teria que ser desenvolvida.

Para assistir a avaliação de medidas de coexistência, o SIGMEA desenvolveu uma série de instrumentos práticos: *LandSFACTS*, um gerador de ambientes simulando ambientes agrícolas; *LandFlow-Gene*, uma plataforma prática e dinâmica de modelagem genérica de fluxo gênico; o *Grignon*, modelo qualitativo multiatributos para avaliação de impactos ecológicos e econômicos; o *SMAC Advisor*, que fornece conselhos a fazendeiros e outros tomadores de decisão, e um método pré-colheita para estimar o conteúdo GM de campos de milho convencional.

PRINCIPAIS PUBLICAÇÕES

In the year 2009: MESSEAN, A.; SQUIRE, G.; PERRY, J.; ANGEVIN, F.; GOMEZ, M.; TOWNEND P.; SAUSSE C.; BRECKLING, B.; LANGRELL, S.; DZEROSKI, S.; SWEET, J.; (2009). Sustainable introduction of GM crops into european agriculture: a summary report of the FP6 SIGMEA research project. OCL 16(1), 37-51.

BITOCCHI, E.; NANNI, L.; GIARDIN, A.; BUONAMICI, A.; VENDRAMIN, G.G.; PAPA, R. (2009). Introgression from modern hybrid varieties to landrace populations of maize (*Zea mays* ssp. *mays* L.) in central Italy. *Molecular Ecology*, 18:603-621.

COLBACH, N.; DEVAUX, C.; Angevin, F. (2009). Comparative study of the efficiency of buffer zones and harvest discarding on gene flow containment in oilseed rape: a modelling approach. *European Journal of Agronomy*. 30:187-198.

Para outras publicações antes de 2009, por favor verifique:
http://www.inra.fr/sigma/publications__1

Avanços epigenéticos ambientais adquiridos: de *Arabidopsis* ao milho

<i>Acrônimo</i> AENEAS <i>Acrônimo do Programa</i> FP7-KBBE <i>Número do Contrato</i> 226477 <i>Período</i> Abril de 2009 – Março de 2013	<i>Coordenador</i> Serena VAROTTO Via VIII Febbraio 2 I-35122 Padova Italy serena.varotto@unipd.it
--	---

<i>Parceiros</i> Vincenzo ROSSI Consiglio per la Ricerca e Sperimentazione in Agricoltura, Padova (IT) Jose GUTTIERREZ-MARCOS The University of Warwick (UK) Jerzy PASZKOWSKY Universite de Geneve (CH) Caroline DEAN John Innes Centre, Norwich (UK)	David Charles BAULCOMBE The Chancellor, Masters and Scholars of the University of Cambridge (UK) Detlef WEIGEL Max Planck Gesellschaft zur Foerderung der Wissenschaften e.v., Munchen (DE) Catherine GUICHARD BIOGEMMA, Paris (FR)
--	---

BACKGROUND E OBJETIVOS

O século XX presenciou um expressivo aumento de produtividade de culturas, principalmente devido a mudanças no potencial genético da cultura e a avanços nas práticas agrícolas. A crescente capacidade de produtividade das culturas obtidas no último século foi devida principalmente ao uso de melhoramento genético para aumentar a tolerância a estresse biótico e abiótico, somado à manutenção da capacidade de maximizar a produtividade por planta sob condições de cultivo sem estresse. Considerando a evidência de mudança climática global, fica claro que melhorar a capacidade da cultura de crescer em condições ambientais adversas permanece como o maior desafio para assegurar que o lado da demanda por produtos agrícolas seja atendido pelo lado da oferta.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

O projeto “Avanços Epigenéticos Ambientais Adquiridos: de *Arabidopsis* ao milho” (AENEAS) explora a fonte de variabilidade induzida ambientalmente e relacionada com epigenética como uma nova, largamente subestimada, fonte de variabilidade para o melhoramento de culturas. Como o Aeneas clássico, esta proposta visa a explorar mudanças epigenéticas ambientalmente induzidas como uma nova fronteira de variabilidade natural e artificial. O estudo irá focar em particular a exploração dessa fonte de variabilidade em milho, uma cultura de alta relevância agrônômica para a Europa (11 Mha de solo sob cultivo de milho) e no mundo todo (145 Mha).

Estímulos ambientais, particularmente estresses e choques, afetam seriamente o gene e a atividade genômica. O ambiente, além de induzir variabilidade genética devido à mutação na sequência de nucleotídeos do DNA, provoca a formação de epialelos herdados estavelmente, com efeitos relevantes no fenótipo. Isso ocorre pela ativação de mecanismos epigenéticos específicos que, agindo sobre a cromatina, acrescentam

marcas (metilação do DNA, modificações de histona, etc.) e alteram os padrões espaciais e temporais da expressão gênica.

Uma grande parte da informação sobre as formações de epialelos relacionadas com o ambiente vem de estudos conduzidos na planta modelo *Arabidopsis*, mas pouco se conhece sobre culturas agrícolas. Além disso, o preciso mecanismo da formação dos epialelos induzidos ambientalmente e, particularmente, de sua manutenção durante gerações, permanece largamente obscuro. O primeiro objetivo da proposta, portanto, é esclarecer esses fenômenos em *Arabidopsis* e usar indicações preexistentes para milho, sugerindo que mecanismos comuns a *Arabidopsis* regulam as formações dos epialelos relacionados ao ambiente e constituem a chamada plataforma “epigenética ambiental do milho”. Esta plataforma representará o passo inicial em direção à geração de sistemas epigenéticos no milho que realçam e otimizam a formação e exploração de epialelos induzidos ambientalmente.

Os instrumentos dentro da plataforma “epigenética ambiental do milho” representarão a base para novas tecnologias para sustentar a competitividade da União Europeia na produção de milhos híbridos superiores com desempenho agrônomico melhorado quando cultivados em ambientes adversos. Os produtos do projeto AENEAS serão os progenitores da próxima geração de programas de melhoramento, baseados na exploração da variabilidade epigenética induzida ambientalmente. A análise genômica comparativa permitirá melhor entendimento das semelhanças e diferenças entre duas espécies de plantas evolucionariamente distintas nos mecanismos da resposta do epigenoma a estímulos ambientais.

Capítulo 2 – OGMs e Segurança Alimentar

Dr. Harry, A. Kuiper
Anteriormente RIKILT
Instituto de Segurança Alimentar
Universidade e Centro de
Pesquisa de Wageningen

INTRODUÇÃO

A Comissão Europeia logo reconheceu a importância do desenvolvimento de novas abordagens biotecnológicas no contexto de políticas alimentares e proteção ao consumidor. De 1985 até o presente, a comissão tomou iniciativas importantes e forneceu substancial apoio para a pesquisa sobre aspectos de biossegurança e segurança de alimentos/rações dos organismos geneticamente modificados (OGMs), através de uma série de programas de pesquisa copatrocinados pela CE. Este capítulo focaliza os projetos conduzidos na área de segurança alimentar sob o Quinto, Sexto e Sétimo Programas Estruturais da CE para Pesquisa.

AVALIAÇÃO E SEGURANÇA

Vários projetos (ENTRANSFOOD, GMO CARE, SAFOTEST, NOFORISK, e GMOBILITY) focalizaram o desenvolvimento das abordagens de avaliação de segurança para alimentos/rações GM. É uma questão de grande importância científica e também de interesse do público em geral: examinar se os produtos de alimentos/rações derivados de OGMs constituem-se em riscos particulares para os humanos, animais e ao ambiente com longo tempo de exposição e consumo.

A Rede Temática ENTRANSFOOD, que consistiu de diferentes interessados, através da Europa, especializados em desenvolvimento e produção de culturas GM e alimentos derivados, em estratégias de avaliação, manejo e comunicação de riscos, delineou um procedimento detalhado, passo a passo, para a avaliação de risco de alimentos e rações derivados de culturas GM. O procedimento proposto foi um importante passo à frente na avaliação de risco da nova categoria de alimentos, uma vez que acrescentou um nível significativo de detalhes às exigências para a real avaliação da segurança. A abordagem de avaliação de risco como desenvolvida no ENTRANSFOOD também foi embutida na estratégia de avaliação de risco mais recentemente desenvolvida pela Autoridade Europeia de Segurança Alimentar e, está alinhada com diretrizes internacionais elaboradas pela FAO/WHO.

A possível ocorrência de alterações não desejadas na composição das culturas alimentares GM como resultado da modificação genética foi uma das questões-chave tratadas por ENTRANSFOOD. A detecção de efeitos inesperados em culturas alimentares GM depende primeiramente de uma abordagem *direcionada*, i.e. determinação comparativa em produtos GM e não-GM de níveis de macro e micronutrientes, antinutrientes *selecionados* e toxinas conhecidas. Para aumentar a probabilidade de detectar efeitos não desejados, técnicas de “*obter perfil*”- ou “*ômica*”- foram também desenvolvidas no projeto GMOCARE. Estas tecnologias e evolução incluem transcriptômica, proteômica e metabolômica e possibilitam a medição de milhares de compostos em plantas modificadas e não modificadas, que não são definidas antes da análise (*abordagem não direcionada*). A pesquisa concentrou-se em várias linhagens de batata transgênica modificadas em seu metabolismo de amido, aminoácidos ou glicoalcalóide, em linhagens de tomate transgênico com conteúdo elevado de fitosterol e isoprenóides e, em várias linhagens de *Arabidopsis* GM, com

regulagem diminuída em sua rota bioquímica de flavonóides. A aplicação de métodos de obtenção de perfis é promissora uma vez que extensiva informação é fornecida sobre a fisiologia do OGMs e seus parceiros não modificados, mas mais desenvolvimento e validação são necessários antes que possam ser usados no procedimento formal de avaliação de risco. A análise direcionada clássica da composição do OGM e seus correspondentes convencionais não modificados, juntamente com a informação da caracterização molecular e análise de propriedades agrônomicas dos OGMs, é um caminho correto e robusto para determinar se efeitos não intencionados possam ter ocorrido no OGM possivelmente devido à transformação genética.

Testes toxicológicos de novas proteínas expressas e dos alimentos GM completos foram examinados pelo projeto SAFOTEST. Uma combinação de modelos animais, sistemas toxicológicos *in vivo* e métodos selecionados de obtenção de perfis foi usada para caracterizar linhagens de arroz contendo lectinas, ou proteína *Bt*. Estudos de doses repetidas em ratos foram feitos com dietas contendo as proteínas alvo, ou o arroz GM acrescentado ou não com lectina. Os resultados demonstraram que a especificidade e sensibilidade do estudo de alimentação de 90 dias com ratos para detectar efeitos específicos relacionados com compostos e efeitos secundários não desejados é adequado para o objetivo, o que capacita o estabelecimento da segurança do alimento GM. Essa abordagem fornece diretriz relevante para abordagens futuras no estabelecimento da segurança para os consumidores.

Um crescente número de novos alimentos é comercializado com alegações de benefícios para os consumidores (alimentos funcionais), mas essas alegações são geralmente mal sustentadas. No projeto NOFORISK, uma abordagem interessante foi desenvolvida para avaliar a segurança, adequação nutricional e eficácia de tais novos alimentos. Três alimentos/ingredientes modelos foram testados: geneticamente modificados e tubérculos de batata melhorada com teores de glicoalcalóides alterados; um arroz melhorado convencionalmente baixo em ácido fítico; e ingredientes de alimentos funcionais de origem natural, fitosterol e esteres de fitosterol.

Um compreensivo conjunto de estudos foi conduzido, principalmente químicos, estudos animais *in vitro* e *in vivo*, expressão gênica e perfis de metabolitos, estudos de cenários de exposição humana baseados em estudos probabilísticos de consumo. Dados de um estudo de alimentação de hamsters de 90 dias sugeriram que a batata GM era tão segura como a batata não-GM. Descobertas de estudos que investigaram atitudes de consumidores quanto a novos alimentos mostraram que os consumidores tendiam a ver apenas poucos riscos e benefícios em três novos exemplos de alimentos, indicando que os novos alimentos estão hoje em baixa nas agendas da maioria dos consumidores.

A transferência gênica horizontal (HGT) de DNA recombinante de alimentos derivados de culturas GM para humanos e suas conseqüências para a saúde humana é uma importante questão a ser avaliada. Em especial, foram levantadas dúvidas sobre o uso de genes marcadores resistentes a antibióticos em plantas GM. A preocupação é a transferência potencial desses genes de material vegetal para microrganismos que podem levar a um maior nível de resistência de microrganismos a antibióticos, comprometendo o tratamento terapêutico de microrganismos patogênicos. O projeto GMOBILITY estudou os efeitos de alimentos e ambientes do trato gastrointestinal (GI) sobre a integridade do DNA usando vários modelos animais e um recém-desenvolvido modelo de simulação gastrointestinal controlado por computador. O processo de digestão no trato GI afeta rapidamente a disponibilidade do DNA transformação, e a HGT poderia ser demonstrada via transformação, aplicando um sistema de recuperação de marcadores sob condições ótimas, mas não poderia ser mostrado em

uma situação natural. Entretanto, a transformação de bactérias na cadeia alimentar não pode ser excluída, em particular quando sequências homólogas estão presentes.

ESTUDOS DE QUALIDADE DE MICRORGANISMOS USADOS EM FERMENTAÇÃO DE ALIMENTOS

Há uma busca contínua para novas cepas de bactérias a serem usadas na fermentação de alimentos para melhorar a qualidade, incluindo paladar, textura, conservação e possivelmente o valor nutritivo e efeitos de promotores de saúde de seus produtos. O projeto EXPRESS FINGERPRINTS focalizou a análise de perfil de expressão de proteoma e transcriptoma de diferentes cepas de *Lactococcus lactis*, incluindo cepas naturais e derivadas construídas por tecnologia clássica ou genética. Um importante foco do trabalho foi definir os efeitos da modificação genética sobre a expressão gênica geral, e avaliar se os métodos usados para obter as várias cepas têm impacto em seu comportamento. Os resultados sugerem que a modificação gênica induzida por biologia molecular tende a produzir menos eventos inesperados do que métodos clássicos.

DETECÇÃO DE OGMS

O intenso debate público sobre a aplicação de tecnologia do DNA recombinante para a produção de alimentos/rações levou a regulamentações rigorosas sobre detecção, rastreabilidade e rotulagem de alimentos e rações GM. Mais e mais OGMS foram aprovados nos últimos anos na UE e muitos novos OGMS estão disponíveis em diferentes partes do mundo, destacando a importância de termos métodos de detecção para OGMS confiáveis, específicos, sensíveis, rápidos e eficientes em custo. Neste sentido, alguns projetos RTD (QPCRGMOFOOD, GMOCHIPS, IMAGEMO) concentraram-se no desenvolvimento de métodos de detecção para alimentos GM, alimentos derivados de culturas GM com o desafio de projetar métodos capazes de detectar tantos quantos OGMS for possível em um único ensaio.

O projeto QPCRGMOFOOD focalizou o desenvolvimento de métodos quantitativos para culturas alimentares GM, assim como as novas estratégias para o desenvolvimento de métodos e validação, em particular de métodos multiplex e específicos de PCR em tempo real. Também foi incluída a identificação de genes de referência específicos como parte essencial da quantificação do OGM para as mais importantes culturas alimentares GM. Mais ainda, foi dada atenção para até que ponto o melhoramento de métodos de detecção de OGMS pode influenciar a confiança do consumidor na segurança alimentar, na ciência e nos reguladores de risco. Os resultados dessas atividades formaram uma fundação para trabalhos sucessivos pela European Network of GMO Laboratories (<http://engl.jrc.ec.europa.eu>) de documentos de orientação publicados pela European Commission GMO Community Reference Laboratory (<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu>).

No projeto GMO CHIPS, um microarray foi desenvolvido para a seleção de OGMS presentes naquela época no mercado da UE, com uma sensibilidade do limite de detecção abaixo de 0,9 %. Desenvolvimentos posteriores levaram a um ensaio que permite a detecção e identificação de múltiplos elementos genéticos potencialmente presentes em alimentos em uma única operação de detecção (DualChip® GMO, desenvolvido por Eppendorf Array Technologies, projeto UE CO-EXTRA, FP 6).

No projeto IMAGEMO foi desenvolvida uma abordagem alternativa para a detecção de OGMS, um analisador de imunodetecção para as proteínas relacionadas com os OGMS. Um analisador foi desenvolvido baseado na Quartz Crystal Microbalance

(QCM) capaz de monitorar a hibridização entre as espirais complementares de ácidos nucleicos.

MONITORAMENTO PÓS-MERCADO DE ALIMENTOS DERIVADOS DE OGMS

O monitoramento pós-mercado (PMM) para alimentos GM pode ser considerado sob certas circunstâncias como respostas a perguntas como: o uso do produto está de acordo com o previsto? Os efeitos conhecidos e os efeitos colaterais são como previstos? Este produto induz efeitos colaterais inesperados? Os objetivos do projeto GMSAFOOD são: identificar e qualificar biomarcadores para um protótipo alergênico OGM para uso com ferramenta para o monitoramento pós-mercado; relacionar esses perfis de biomarcadores com vários estágios em desenvolvimento de animais de teste; usar biomarcadores para identificar o movimento e os efeitos dos OGMS na cadeia alimentar; e estabelecer biomarcadores para imunogenicidade e alergenicidade induzidas por OGMS em animais e humanos. Este projeto está ainda em andamento. Deve ser destacado, entretanto, que PMM não substitui a avaliação de segurança pré-mercado, mas pode complementá-la.

ATITUDES DOS CONSUMIDORES EM RELAÇÃO AOS ALIMENTOS GM

Respostas da sociedade a aplicações de inovações tecnológicas podem, além de preocupações sobre possíveis efeitos adversos sobre o ambiente e a saúde humana, ser impulsionados por preocupações sobre o impacto da tecnologia na sociedade. Para entender como atitudes e valores das pessoas influenciam sua aceitação ou rejeição de alimentos GM, sua atitude com relação à ciência e tecnologia foi analisada no ENTRANSFOOD.

Resultados de levantamentos feitos em 2000 na UE indicam que os europeus parecem ter atitude neutra com relação a alimentos GM como uma tecnologia. Quando comparado com o levantamento anterior feito em 1996, as atitudes dos consumidores com relação aos alimentos GM tornaram-se mais negativas em termos de utilidade e aceitabilidade moral, mas permaneceu constante quanto à percepção de risco. O projeto concluiu que, se a confiança do público é para ser reconquistada, é importante explicitamente incorporar as preocupações do público no processo de tomada de decisões. Uma vez que as preocupações do público e os valores sobre os quais elas se baseiam sejam entendidos, elas podem ser mais efetivamente tratadas por práticas apropriadas de manejo de risco.

CONCLUSÃO

Extensiva pesquisa sobre OGMS, cofinanciada pela Comissão Europeia nas últimas duas décadas, tem contribuído significativamente com a capacidade de identificar e caracterizar possíveis riscos associados com alimentos/rações derivados de OGMS. Uma particular e exclusiva força da pesquisa financiada pela UE é a multidisciplinariedade dos projetos, necessária para tratar as questões de pesquisa multifacetadas. Os projetos sob os Programas de Estrutura de Pesquisa têm significativamente contribuído com o desenvolvimento de uma robusta estrutura para a avaliação de segurança de alimentos/rações GM. Essas atividades fornecem pelo menos garantia igual de segurança desses alimentos comparados com seu correspondente convencional, desde que esses produtos GM tenham sido aprovados pela UE e os procedimentos nacionais de segurança de alimentos. Mais ainda, em apoio às exigências legais da UE, métodos sensíveis e específicos de detecção para OGMS foram desenvolvidos, possibilitando o rastreamento de produtos derivados de OGMS e cumprimento dos níveis limite estabelecidos através de toda a cadeia alimentar. Isso proporciona uma base adequada para a tomada de decisões quanto à autorização de comercialização de alimentos/rações derivados de OGM.

Nova tecnologia na ciência de alimentos enfrentando a multiplicidade de OGMs recém-liberados

<i>Acrônimo</i> GMOCHIPS <i>Acrônimo do Programa</i> FP6-GROWTH <i>Número do Contrato</i> G6RDCT200000419	<i>Período</i> Janeiro de 2001 – Outubro de 2004 <i>Coordenador</i> Dr Jose REMACLE <i>Website do projeto</i> http://www.bats.ch/gmochips
--	--

<i>Parceiros</i> Prof. Jose REMACLE Laboratoire de Biochimie Cellulaire, Namur (BE) Dr Yves BERTHEAU INRA, Unite de Phytopathologie et Methodologie de la Detection, Versailles (FR) Dr Pierre BRIGNON TEPRAL, Brasseries Kronenbourg, Strasbourg (FR) Dr Neil HARRIS LGC, Laboratory of the Government Chemist, Teddington (UK)	Dr Philipp SEYLER Dir. generale de la concurrence, de la consommation et de la repression des fraudes, Laboratoire interregional, Illkirch (FR) Dr Pere PUIGDOMENECH CSIC, Consejo Superior de Investigaciones Cientificas, Barcelona (ES) Dr O. KAPPELI Centre BATS, Basel (CH)
---	---

BACKGROUND E OBJETIVOS

As Diretrizes Europeias 90/220/EEC e mais particularmente a última Diretriz 2001/18/EC, 'Novo Alimento' e as Regulamentações relacionadas com alimentos e rações GM (258/97/EC, 1139/98/EC, 49/2000/ EC, 50/2000/EC, 1829/03/EC, 1830/03/EC, etc.), implicam controlar a presença de OGMs, para fins de rotulagem e rastreamento. No contexto de um mercado aberto europeu e mais generalizadamente de um mercado global, as autoridades nacionais competentes europeias expressam uma necessidade clara de padronização de técnicas de detecção de OGMs facilmente acessíveis aos laboratórios.

Um objetivo do projeto GMOCHIPS e parte do projeto CO-EXTRA foi fornecer um ensaio para cobrir todos os OGMs aprovados na UE e pelo menos alguns não aprovados na UE, mas liberados em outros países, mais particularmente na América do Norte. A detecção de OGMs não aprovados na UE foi baseada na "Abordagem Matriz". Esta estratégia de decisão está atualmente em uso nos laboratórios europeus encarregados do cumprimento da regulamentação (ver o Grupo de Trabalho ENGL sobre detecção de GMOs não aprovados). O desafio é ser capaz de detectar um painel de OGMs tão grande quanto possível em um único ensaio, uma vez que mais e mais OGMs foram aprovados nos últimos anos no mercado da UE e muitos novos OGMs estão disponíveis em várias partes do mundo (aprovações assíncronas).

O projeto de pesquisa europeu (Projeto G6RD-CT-2000-00419) intitulado "Nova tecnologia de ciência de alimentos enfrentando a multiplicidade OGMs recém-liberados", Acrônimo: GMOCHIPS foi conduzido de 2000 a 2005 como parte do programa FP5. Durante este projeto, um microarray GMOCHIPS foi desenvolvido para a seleção de nove OGMs presentes no mercado da UE naquele tempo. O ensaio

permitiu a identificação de Bt11, Bt176, CBH351, GA21, Mon810, RRS, T25, T45 e Topas19/2. A sensibilidade da detecção foi suficientemente alta para conseguir detectar amostras de referência abaixo de 0.9 %. A conclusão do projeto foi que biochips são adequados como um instrumento de detecção para ensaio pós-PCR de diferentes OGMs.

Um novo ensaio baseado no uso do array foi desenvolvido por Eppendorf Array Technologies (EAT) que foi baseado na Abordagem Matriz para a determinação de OGMs. O ensaio foi então incorporado no projeto CO-EXTRA UE para validação no nível da UE (Enquadramento FP6 frame, contrato 007158, 2005 - 2009).

Este ensaio, DualChip® GMO desenvolvido por EAT, permite a detecção de múltiplos elementos genéticos potencialmente presentes em eventos GM em uma única execução de detecção. Os ensaios podem identificar 30 OGMs, incluindo os 24 OGMs plantas que foram aceitos para comercialização na UE em 2006. Igualmente, o método indica a presença de OGMs não aprovados na UE, assim como identifica os taxa da planta.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

A meta do trabalho conduzido sob o programa CO-EXTRA foi finalizar o instrumento de detecção e validar o método de acordo com o padrão ISO 5725. Isso foi um exemplo inédito de validação interlaboratórios de um ensaio para OGMs multiplex, baseado em microarray. A validação foi avaliar o desempenho do DualChip® GMO como um método de microarray para a detecção de OGMs aprovados na UE.

A validação foi coordenada pelo Joint Research Centre (JRC) da Comissão Europeia e organizada por Eppendorf Array Technologies (EAT) como parte do projeto europeu CO-EXTRA. A validação foi feita de acordo com as normas internacionais SO 5725 e 17 025. A tecnologia é baseada na identificação dos elementos genéticos primeiramente amplificados por PCR, seguido da hibridização em um microarray pré-definido, marcação, detecção, aquisição de dados e análise dos dados.

O ensaio é um método multiplex baseado em:

- a detecção de 12 elementos de seleção p35S, tNos, pat, cry1Ab (3 variedades de genes), cry3Bb1, EPSPS (3 variedades de genes), bar, pNos-nptII, usado na Abordagem de Matriz;
- sete sistemas de espécies vegetais de referência: milho, soja, colza oleaginosa, algodão, arroz, batata, beterraba açucareira;
- Onze marcadores específicos para eventos de transformação: Bt11, Bt176, GA21, GT73, MON531, MON810, MON863, MON1445, MON15985, RRS, T45;
- um controle de contaminação por vírus CaMV também estava presente para determinar a presença do vírus do mosaico da couve-flor, que pode induzir falsos resultados positivos com o elemento de seleção P35S.

Os resultados, incorporados no software para identificação de OGMs são baseados na comparação de diferentes elementos genéticos encontrados como positivos no ensaio e em sua presença nos OGMs. O software usa os diferentes elementos que constituem os OGMs, aprovados de acordo com a Regulamentação (EC) No 1829/2003 de janeiro de 2007, para indicar a presença putativa de OGMs não aprovados ao analista.

A validação do método foi baseada em critérios pré-definidos de aceitação. As amostras para teste foram fornecidas por EAT a 12 laboratórios de validação da UE, com as amostras cegas consistindo de amostras de referência de DNA

especificamente adaptadas para cada elemento GM. Para os ensaios de sensibilidade, as amostras continham concentrações de GM (expressas como % de cópias do genoma do DNA GM-específico e espécie-específico, como recomendado na Recomendação da Comissão (EC) 2004/787, de 0.045, 0.1, 0.5 e 1 %. O teste envolveu laboratórios de oito países da União Europeia, a maior parte deles membros do ENGL e do projeto CO-EXTRA. O JRC conduziu a análise dos dados e testou a nova abordagem fuzzy-based (software) para a validação de ensaios multiplex.

A validação foi conduzida em 36 amostras de DNA. Um total de 3.360 reações de PCR e 840 hibridizações foram feitas para a validação. Os dados foram identificados como de fora se sua probabilidade de pertencer à mesma população binomial fosse menor que 0,01, de acordo com os critérios da ISO 5725 (1994). A taxa de precisão do critério foi estabelecida em 95 %, que é também o limite usado no ENGL “Definição da Exigência de Desempenho Mínimo para Métodos Analíticos do Teste de OGM” (2005). Foi usado um indicador, baseado no princípio de um sistema especializado fuzzy-logic, para fins de uma avaliação compreensiva para abranger a capacidade do método de detectar todo o conjunto de alvos.

PRINCIPAIS DESCOBERTAS E RESULTADOS

A validação foi conduzida para avaliar se o desempenho geral esperado estava alinhado com os critérios de especificidade e sensibilidade. Os dados mostram que o método foi específico e atendeu ao critério de 95% de confiança com a concentração GM em 0,1% para os elementos alvos GM e 1% para as plantas alvo. O método, portanto, foi considerado como preenchendo as exigências do ENGL em termos de precisão e limite de detecção.

A detecção de elementos alvo GM mostrou uma precisão acima de 95% até a 0,1% de concentração de OGM para todos os alvos GM (0,1% corresponde ao nível de corte para sensibilidade estabelecido para o microarranjo). Sete elementos alvo GM entre nove mostraram taxa de precisão acima de 95%, também a 0,045%.

Para os controles, o CaMV detectou acima da taxa de precisão de 95% em todas as concentrações, variando de 500 a 20 cópias. A taxa de falsos positivos foi de 0% no extrato não vegetal na ausência de qualquer planta ou evento GM, como proposto nos critérios de aceitação.

A análise de agregação baseada em fuzzy-logic confirmou o atendimento aos critérios de aceitação esperados até 0,1% GM de concentração e 1% para os alvos vegetais.

PRINCIPAIS PUBLICAÇÕES

LEIMANIS, S.; HERNANDEZ, M.; FERNANDEZ, S.; BOYER, F.; BURNS, M.; BRUDERER, S.; GLOUDEN, T.; HARRIS, N.; KAEPELI, O.; PHILIPP, P.; PLA, M.; PUIGDOMENECH, P.; VAITILINGOM, M.; BERTHEAU, Y.; REMACLE, J. (2006). A microarray-based detection system for genetically modified (GM) food ingredients. *Plant Molecular Biology* 61, 123-139.

HAMELS, S.; LEIMANIS, S.; MAZZARA, M.; BELLOCCHI, G.; FOTI, N.; MOENS, W.; REMACLE, J.; VAN DEN EEDE, G. (2007). Microarray method for the screening of EUU approved GMOs by identification of their genetic elements. *JRC Scientific and technical reports*. <http://bgmo.jrc.ec.europa.eu/home/docs.htm>

HAMELS, S.; GLOUDEN, T.; GILLARD, K.; MAZZARA, M.; DEBODE, F.; FOTI, N.; et al; (2009). A PCR-Microarray method for the screening of Genetically Modified Organisms. *Eur. Food Res. Technol.* 228:531–541.

LEIMANIS, S.; HAMELS, S.; NAZE, F.; MBELLA, GM.; SNEYERS, M.; HOCHEGGER, R.; et al; (2008). Validation of the performance of a GMO multiplex screening assay based on microarray detection. *Eur. Food Res. Technol.* 227 (6): 1621-1632.

BELLOCHI, G.; BERTHOLET, V.; HAMELS, S.; MOENS, W.; REMACLE, J.; VAN DEN EEDE, G. (2009). Fuzzy-logic based strategy for validation of multiplex methods: example with qualitative GMO assays. *Transgenic Res.* DOI 10.1007/s11248-009-9293-9.

Avaliação da segurança da transferência gênica horizontal de organismos geneticamente modificados à microflora da cadeia alimentar e ao intestino humano

<i>Acrônimo</i> GMOBILITY <i>Acrônimo do Programa</i> FP5-LIFE QUALITY <i>Número do Contrato</i> QLK1-1999-00527 <i>Período</i> Março de 2000 – Fevereiro de 2003	<i>Coordenador</i> Jos M.B.M. VAN DER VOSSSEN TNO Nutrition and Food Research PO Box 360 NL-3700 AJ Zeist The Netherlands
--	---

<i>Parceiros</i> Henk J.M. AARTS RIKILT-Institute of Food Safety, Wageningen (NL) Walter P. HAMMES University of Hohenheim, Institute of Food Technology, Hohenheim (DE) Margaret DAVIES BIBRA International Ltd., Molecular Sciences Department, Surrey (UK)	Gerard CORTHER, Unite Ecologie et Physiologie du Systeme Digestif (UEPSD), Jouy-en-Josas (FR) Birgit NORRUNG, Danish Veterinary and Food Administration, Copenhagen (DK) Alexander HASLBERGER Institut for Microbiology and Genetics, University Vienna (AT)
--	---

BACKGROUND E OBJETIVOS

A transferência gênica horizontal (HGT) como uma questão de biossegurança tem sido tratada em vários estudos que focalizaram principalmente a transferência da resistência a antibióticos de plantas geneticamente modificadas (GM) para o solo e para microrganismos relacionados com as plantas. A HGT para bactérias foi mostrada nesses ambientes por experimento de recuperação de marcadores via recombinação homóloga. Entretanto, a HGT via transformação bacteriana na cadeia alimentar não pode ser excluída. O DNA livre persiste em alguns materiais por semanas se, além do mais, algumas bactérias desenvolvem competência natural/química para absorver DNA do ambiente. Além disso, o DNA pode permanecer estável por algum tempo no trato gastrointestinal do homem de animais domésticos, particularmente no colo.

O principal objetivo deste projeto é quantificar o risco da HGT de organismos geneticamente modificados (OGMs), e alimentos deles derivados, à microflora da cadeia alimentar e ao intestino humano. Além da análise das frequências de transferências gênicas, serão identificados os riscos, coletados dados de exposição a alimento OGM, e o impacto será discutido para quantificar e definir precisamente os riscos da HGT. Condições seletivas são particularmente relevantes para os genes marcadores de resistência a antibióticos, daí a relevância de um antibiótico em especial como agente terapêutico ser usado na avaliação de risco. Este projeto também visa a avaliar modelos que possam ser usados para estudar esses eventos HGT.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

Para coletar dados para uma avaliação de HGT para produtos alimentares transgênicos *in vivo* e *in vitro* sistemas modelo do trato gastrointestinal serão estudados, avaliados e validados. Uma vez que a transferência gênica pode ocorrer via diferentes mecanismos, dependendo do background genético, diferentes sistemas doador/recipiente serão estudados.. Além de examinar esses mecanismos, outros parâmetros relacionados com a frequência da HGT serão analisados, tais como a sobrevivência de bactérias, estabilidade do DNA, desenvolvimento da competência para transformação, possibilidade de recombinação e pressão seletiva. Os dados serão avaliados para quantificar o risco de HGT baseado no background genético, consumo diário de DNA transgênico, formulação do produto alimentício e a natureza dos genes marcadores.

PRINCIPAIS DESCOBERTAS E RESULTADOS

Integridade do DNA em alimentos. O processamento tem efeito sobre a integridade do DNA da cultura. Condições acídicas, calor e irradiação aumentam a taxa de danos no DNA. A despurinação catalizada por ácido não foi afetada pela matriz do alimento. Os componentes do alimento têm efeito na degradação enzimática do DNA do plasmídeos pela D. Compostos como a putrescina e a espermina e outras poliaminas protegem o DNA contra a atividade da DNase I.

Integridade do DNA no trato GI de mamíferos. O DNA pode ser detectado em material derivado de estômagos mesmo uma hora após a introdução. Na pasta do intestino delgado de rato e porcos, o DNA foi rapidamente degradado a um nível no qual não pode ser detectado por PCR. Isso pode ser imitado *in vitro* no modelo intestinal TIM de TNO. Em pasta do ceco de rato, o DNA permanece notavelmente íntegro. Apesar da rápida degradação do DNA no intestino delgado, demonstrou-se que algum DNA estava provisoriamente presente no trato intestinal de ratos após o consumo de DNA livre. Parece haver meios para uma pequena quantidade de DNA escapar da ação das nucleases, mesmo em um estado em que não está recoberto por uma membrana celular. Os ruminantes têm uma organização diferente do seu trato GI, comparado com os mamíferos monogástricos. Nesse grupo de mamíferos, o DNA liberado de material vegetal ingerido está em contato direto com a complexa flora do rúmen. Nessa flora o DNA é degradado pelas bactérias. No modelo de rúmen usado, o estudo detectou DNA por PCR até duas horas após a introdução.

Transformação na cadeia alimentar. Para estudar a transferência de genes de OGMs para bactérias associadas com alimentos e/ou trato gastrointestinal, um sistema de recuperação de marcador para bactérias grampositivas foi construído e estabelecido em *B. subtilis* e *S. gordonii*. Este sistema de recuperação de marcador é baseado no gene *nptII* contendo uma pequena deleção da open reading frame, a qual pode ser restaurada por recombinação homóloga com um gene *nptII* funcional completo. Foi demonstrado que o sucesso da recuperação do marcador é altamente dependente do tamanho do doador em *B. subtilis*. Quanto mais longa a sequência de borda, mais provável é a ocorrência da restauração. Entretanto, DNA não visado demais presente na planta GM prejudicou a recuperação do marcador. Usando o sistema de recuperação de marcador em *B. subtilis*, nenhuma transformação com o DNA genômicos de batata GM foi observada. Mesmo sob condições otimizadas de laboratório, o marcador não foi observado. *Acinetobacter* também foi usada como hospedeiro para experimentos de recuperação de marcadores. Usando DNA de uma batata GM transgênica, a transformação do marcador para recuperação em alimentos foi observada apenas quando a matriz de alimentos permitiu o crescimento do recipiente.

Mais abaixo da cadeia alimentar, o destino de possíveis transformantes ingeridos via alimento foi considerado no trato GI. As bactérias ingeridas sobrevivem até certo ponto às condições no trato GI, como foi monitorado com TIM. A transformação no trato GI foi estudada no rato, modelo de rúmen e TIM. Embora *E. coli* mostrou um comportamento bom no intestino delgado e é um microrganismo naturalmente presente no trato GI de mamíferos, não puderam ser obtidos transformantes com este organismo no ambiente do trato GI. A transformação de *S. gordonii* foi extensivamente testada sob condições do trato GI. Aquelas presentes na cavidade oral, colo e rúmen mostraram um efeito negativo na alta eficiência de transformação encontrada sob condições ótimas *in vitro*. Uma vez que a cavidade oral é o ambiente natural de *S. gordonii*, foram conduzidos cálculos de risco baseados nas eficiências de transformação neste ambiente em comparação com a transformação de *B. subtilis* no ambiente de alimentos.. Foi mostrado que *S. gordonii* é um organismo recipiente que pode ser transformado mais facilmente do que *B. subtilis*. Sob condições otimizadas, foi mostrado que a transformação streptocócica tem um desempenho 105 vezes melhor.

Não obstante, sob condições imitando a cavidade oral esperam-se os transformantes de recuperação de marcadores em uma frequência de 10-17 transformantes/recipientes com DNA de batatas GM processada e 3.2×10^{-9} /recipiente para batatas GM não processada. Com números mais realistas na ausência de recombinação homóloga, i.e. recombinação ilegítima, a hipótese é que essas frequências caiam por um fator de 1.4×10^{-9} , e foi determinado para *Acinetobacter*. Mais abaixo no trato GI, a transformação de *S. gordonii* não pode nem ser detectado no rúmen nem no colo. Mesmo na presença de altos números de DNA plasmídico para recuperação de marcadores, os transformantes não podiam ser detectados.

Conjugação no trato GI. Bactérias recombinantes são atualmente desenvolvidas para liberação intencional no ambiente com vacinas orais ou em alimentos fermentados. *Lactococcus lactis* como um representante do LAB é agora a primeira bactéria a ser explorada desse modo. Mais ainda, as bactérias que adquiriram genes de plantas GM ou bactérias podem também ser consideradas com bactérias recombinantes e podem transferir a nova informação genética a outra bactéria na cadeia alimentar, incluindo o intestino de mamíferos. Este mecanismo de transferência gênica horizontal (HGT) foi estudado com plasmídeos e transposons. Os sistemas modelo usados mostram apenas HGT se as funções de transferência e mobilização estiverem presentes. Um recipiente acessível bom parece também ser importante para conjugação bem-sucedida.

CONCLUSÕES

É geralmente aceito que a HGT contribuiu para a criação de diversidade bacteriana. A HGT tem sido descrita como acontecendo via mecanismos de transformação, conjugação e transdução. Visivelmente, a evidência vem da análise da dispersão da resistência a antibióticos nas últimas décadas como consequência do uso de antibióticos. Mostrou-se que a transferência conjugada é um mecanismo que funciona no trato GI de mamíferos, quando as moléculas de DNA, o organismo doador e o recipiente mostram as características adequadas. A transformação, por outro lado, com DNA de plasmídeo ou via recuperação de marcador foi demonstrada sob condições otimizadas. Entretanto, quando as condições pioram como consequência do baixo número de cópias no genoma da planta GM, a degradação do DNA, componentes do alimento no trato GI, a população microbiana concorrente, a transformação via recuperação de marcadores torna-se um evento raro. Mesmo sob condições seletivas, os transformantes poderiam não ser enriquecidos pelas plantas

GM. Uma redução maior na frequência de transformação leva ao fato de que a recombinação ilegítima é de longe muito mais ineficiente do que a recombinação homóloga encontrada em nossa comida e sistemas modelo de trato GI. A disseminação dos genes de resistência a antibióticos é portanto altamente improvável de ocorrer via HGT de plantas GM usadas como alimento e ração.

PRINCIPAIS PUBLICAÇÕES

ALPERT, CA.; MATER, DD.; MULLER, MC.; OURIET, MF.; DUVAL-IFLAH, Y.; CORTIER, G.; Worst-case scenarios for horizontal gene transfer from *Lactococcus lactis* carrying heterologous genes to *Enterococcus faecalis* in the digestive tract of gnotobiotic mice. *Environ. Biosafety Res.* 2003;2:173-180. Erratum in: *Environ. Biosafety Res.* (2003). 2:279.

BAUER, T.; HAMMES, WP.; HAASE, NU.; HERTEL, C.; Effect of food components and processing parameters on DNA degradation in food. *Environ. Biosafety Res.* (2004). 3:215-223.

KHARAZMI, M.; BAUER, T.;HAMMES, WP.; HERTEL, C.; Effect of food processing on the fate of DNA with regard to degradation and transformation capability in *Bacillus subtilis*. *Syst Appl Microbiol.* (2003). 26:495-501.

KHARAZMI, M.; HAMMES, WP.; HERTEL, C.; Construction of a marker rescue system in *Bacillus subtilis* for detection of horizontal gene transfer in food. *Syst. Appl. Microbiol.* (2002). 25:471-477.

KHARAZMI, M.; SCZESNY, S.; BLAUT, M.; HAMMES, WP.; HERTEL, C.; Marker rescue studies of the transfer of recombinant DNA to *Streptococcus gordonii* *in vitro*, in foods and gnotobiotic rats. *Appl. Environ. Microbiol.* (2003). 69:6121-6127.

VAN DEN EEDE, G.; AARTS, H.; BUHK, HJ.; CORTIER, G.; FLINT, HJ.; HAMMES, W.; et al. The relevance of gene transfer to the safety of food and feed derived from genetically modified (GM) plants. *Food Chem. Toxicol.* (2004). 42:1127-1156.

WILCKS, A.; VAN HOEK, AH.; JOOSTEN, RG.; JACOBSEN, BB.; AARTS, HJ.; Persistence of DNA studied in different *ex vivo* and *in vivo* rat models simulating the human gut situation. *Food Chem. Toxicol.* (2004). 42:493-502.

Rede europeia para avaliação de segurança de culturas alimentares geneticamente modificadas

<i>Acrônimo</i> ENTRANSFOOD <i>Acrônimo do Programa</i> FP5-LIFE QUALITY <i>Número do Contrato</i> QLK1-1999-01182 <i>Período</i> Fevereiro de 2000 – Janeiro de 2003	<i>Coordenador</i> H.A. KUIPER RIKILT – Institute of Food Safety Wageningen University & Research Centre P.O. Box 230 NL-6700 AE Wageningen The Netherlands Harry.Kuiper@wur.nl
--	---

<i>Parceiros</i> J.M. WAL Service de Pharmacologie et d'Immunologie Laboratoire Associe INRACEA d'Immuno-Allergie Alimentaire, Jouy-en-Josas (FR) K.H. ENGEL Department of General Food Technology Technical University of Munich (DE)	G. VAN DEN EEDE European Commission Directorate General Joint Research Centre, Ispra (IT) M. MIRAGLIA Istituto Superiore di Sanita Section of Cereal Chemistry, Rome (IT) L. FREWER Marketing and Consumer Group University of Wageningen (NL)
--	--

BACKGROUND E OBJETIVOS

Abordagens da avaliação de segurança de alimentos derivados de culturas geneticamente modificadas (GM) foram desenvolvidas nas últimas duas décadas por várias organizações intergovernamentais, e a Comissão Europeia fez contribuições para a pesquisa e as deliberações entre especialistas da área (ver Review of Results of EC-sponsored Research on Safety of Genetically Modified Organisms, 2001, <http://europa.eu.int/comm/research/quality-of-life/gmo>).

Apesar desses intensivos esforços em pesquisa, as culturas alimentares GM não foram largamente aceitas pelo consumidor europeu. Consumidores e organizações ambientais expressaram suas preocupações sobre a segurança dessas culturas, com respeito a efeitos de longo prazo sobre o ambiente e a saúde humana, e liberdade de escolha entre alimentos contendo GM e alimentos “livres de GM”, e o impacto que a tecnologia da produção do novo alimento possa ter sobre a sociedade.

A rede temática “Rede Europeia para a Avaliação da Segurança de Culturas Alimentares Geneticamente Modificadas(GM)” (ENTRANSFOOD) foi estabelecida para tratar de questões científicas e sociais relacionadas com a introdução das culturas GM. A rede consiste de projetos de grupos de trabalho focando o desenvolvimento de métodos e estratégias para teste de segurança, detecção e rastreabilidade de culturas alimentares GM, e sobre aspectos sociais da introdução de alimentos GM. Ela começou suas atividades em fevereiro de 2000.

Os objetivos da Rede Temática são:

- avaliar a adequação atual de métodos e estratégias de avaliação da segurança de alimentos, e identificar as possíveis necessidades de adaptação para alimentos derivados de culturas GM;
- projetar e avaliar novos métodos alternativos de teste (*in vitro*) para a avaliação de segurança de alimentos derivados de culturas GM;
- fornecer orientação detalhada a observadores e avaliadores de risco sobre como conduzir avaliações de alimentos derivados de culturas GM;
- avaliar o risco de transferência de DNA recombinante de culturas GM a micróbios e células humanas;
- examinar o destino das matérias-primas e processadas GM através da cadeia de produção (rastreamento);
- examinar novas estratégias para a detecção de matérias-primas, produtos processados e ingredientes de alimentos GM;
- examinar aspectos sociais e atitudes de consumidores relacionados com a introdução de Alimentos derivados de culturas GM.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

Participantes do consórcio ENTRANSFOOD foram recrutados da área acadêmica, centros de pesquisa, companhias e biotecnologia e melhoramento de plantas, indústrias de alimentos, varejistas de alimentos, agências de regulamentação e grupos de consumidores da Europa. No total, 45 centros de pesquisa participaram dos projetos RTD, e 62 especialistas nos grupos de trabalho. Muitos membros dos grupos de trabalho estão também envolvidos nos projetos de pesquisa.

A pesquisa foi conduzida no contexto de cinco projetos financiados pela UE e de custos partilhados:

1. novos métodos para teste de segurança de alimentos transgênicos (SAFOTEST);
2. nova metodologias para avaliar o potencial de efeitos não intencionados em culturas alimentares geneticamente modificadas (GMOCARE);
3. avaliação de segurança da transferência gênica horizontal de organismos geneticamente modificados para a microflora de a cadeia alimentar e intestino humano (GMOBILITY);
4. detecção quantitativa confiável, padronizada e específica de alimentos geneticamente modificados (QPCRGMOFOOD);
5. nova tecnologia em ciência de alimentos enfrentando a multiplicidade de recém-liberados OGMs (GMOCHIPS).

Atividades de avaliação e revisão foram conduzidas nos seguintes cinco grupos de trabalho:

1. Projeto de estratégias de avaliação da segurança para alimentos transgênicos;
2. Projeto e estratégias para a detecção de alterações não intencionadas em culturas alimentares GM devido ao processo de modificação genética;
3. Avaliação de risco de transferência de genes de alimentos GM a microrganismos no trato digestivo ou em células humanas;
4. Avaliação e projeto de estratégias para a detecção e rastreabilidade de alimentos e componentes de alimentos GM;
5. Entender as respostas da sociedade aos alimentos GM.

PRINCIPAIS DESCOBERTAS E RESULTADOS

Cada grupo de trabalho do ENTRANSFOOD gerou uma revisão científica para a sua tarefa particular. As revisões de todos os grupos de trabalho foram agrupadas em uma

edição especial do Food Chemical and Toxicology (Volume 42, número 7, Julho 2004). Esta publicação deve contribuir para as atuais atividades de avaliação de risco e percepção de consumidores. Ela deve apoiar a política da Europa sobre culturas GM e formar a base de mais discussões e atividades de pesquisa na Europa e também em todo o mundo.

Além disso, foi publicado um trabalho de cobertura financiado pela Comissão Europeia, escrito pelos participantes do ENTRANSFOOD, que resume as principais descobertas dos grupos de trabalho para informar os interessados, responsáveis pelas políticas, grupos de consumidores e do público interessado⁷.

Um panorama das principais conclusões dos grupos de trabalho é fornecido abaixo:

Teste de Segurança de Alimentos Transgênicos (Grupo de Trabalho 1)

A avaliação de segurança de alimentos derivados de culturas GM é conduzido de modo comparativo, i.e. as diferenças entre a cultura GM e da nova ou diferentemente cultivada cultura são identificadas e investigadas com respeito ao seu impacto sobre a saúde humana ou animal (Conceito de Equivalência Substancial). A idéia básica por trás dessa abordagem é que alimentos convencionais têm uma longa história de uso seguro.

O grupo de trabalho 1 do ENTRANSFOOD delineou procedimento escalonado e detalhado para conduzir a avaliação de alimentos derivados de culturas GM no método caso a caso. A abordagem compreende quatro passos: caracterização da cultura parental, que foi geneticamente modificada; caracterização do processo de modificação genética; avaliação toxicológica e alergênica dos novos produtos gênicos (proteínas e metabólitos); e avaliação da segurança da cultura alimentar GM inteira.

Uma combinação de métodos de teste existentes fornece um robusto regime de teste e assegura que os alimentos GM passaram pelo procedimento de teste e são tão seguros e nutritivos quanto os alimentos derivados de plantas atualmente consumidos. A abordagem delineada também é aplicável às novas gerações de culturas GM com mudanças composicionais extensivas.

Detecção de Efeitos não Intencionais (Grupo de Trabalho 2)

A alteração não intencional na composição de plantas é um fenômeno comum que ocorre quando se muda a informação genética de uma planta, seja por métodos de melhoramento clássico ou por tecnologia GM. Não há indicação que efeitos não intencionais sejam mais prováveis de ocorrer em culturas GM.

A detecção de efeitos inesperados em plantas que foram desenvolvidas por tecnologia GM depende principalmente da análise comparativa dos níveis de nutrientes-chave selecionados e compostos tóxicos presentes na cultura GM e sua contrapartida tradicional não modificada. As alterações modificadas na composição podem estar dentro da faixa natural de variações e, portanto, não ser uma preocupação toxicológica, ou estar fora dessa faixa e necessitar de maiores investigações toxicológicas e nutricionais. Essa abordagem direcionada mostrou-se eficaz no melhoramento de plantas convencional para a identificação de alterações na composição.

⁷ König A., Kleter G., Hammes W., Knudsen I., Kuiper H. (Eds.). Genetically Modified Crops in the EU: Food Safety Assessment, Regulation, and Public Concerns – Overarching Report. The European Network on Safety Assessment of Genetically Modified Food Crops. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, 2004.

Para aumentar a probabilidade de detectar efeitos inesperados, técnicas de obtenção do perfil estão em desenvolvimento. Estes métodos, baseados em genômica moderna, e técnicas de detecção de proteínas e metabólitos são capazes de fornecer um panorama “global” da expressão gênica e composição química da cultura GM e não-GM (abordagem não direcionada).

Transferência Gênica (Grupo de Trabalho 3)

Transferência gênica horizontal está na origem da variabilidade da própria vida. O impacto da transferência gênica horizontal dependerá, entre outras coisas, da vantagem seletiva para a população de bactérias. Há pouca razão científica para considerar que o consumo de alimentos derivados de culturas GM constitui-se em um risco específico.

Embora a incorporação de DNA recombinante (estranho) ingerido pelas células somáticas e mamíferos tenha sido demonstrada, não há evidência de que o DNA “consumido” irá para as células germinativas. A transferência de genes marcadores de resistência de antibióticos de variedades de plantas GM para a microflora do intestino humano e sua expressão é com toda probabilidade um evento raro, dadas as baixas quantidades ingeridas e condições degradativas no trato gastrointestinal.

Entretanto, uma vez que a transferência de genes não pode ser completamente excluída, o ENTRANSFOOD classificou os genes marcadores resistentes a antibióticos baseado em sua distribuição e importância terapêutica. Esta classificação de risco visa a contribuir com o debate atual na EU relacionado com a eliminação desses genes marcadores que apresentam risco para o ambiente ou a saúde humana (Diretriz da EU 2001/18/EC).

Rastreabilidade e Garantia de Qualidade (Grupo de Trabalho 4)

As regulamentações recentemente introduzidas pela UE impõem exigências de rotulagem de alimentos e rações contendo ingredientes derivados de culturas GM para alimentos ou rações ou contendo traços de culturas GM acima de certo limite (>0.9%).

Para facilitar o controle e verificar as alegações do rótulo, e para facilitar o recolhimento do produto quando necessário, sistemas confiáveis de documentação têm que ser desenvolvidos, remontando às origens dos ingredientes (sistema de rastreamento) e métodos analíticos para detectar e quantificar ingredientes derivados.

É recomendado disponibilizar métodos de detecção e/ou identificação às autoridades reguladoras e laboratórios de controle de alimentos. Com mais organismos geneticamente modificados (OGMs) sendo desenvolvidos em todo o mundo, mais métodos eficientes de detecção e identificação, baseados nos mais recentes métodos de biologia molecular, precisam ser desenvolvidos. Além disso, o uso de sistemas de rastreamento para aplicações pós-venda requer novos sistemas de rotulagem que passam todas as informações necessárias sobre a presença de variedades OGM individuais ao leitor.

Aspectos Sociais (Grupo de Trabalho 5)

A avaliação de risco de alimentos GM focalizou os efeitos adversos à saúde para humanos e ao ambiente, mas a preocupação do público é muito mais ampla, focalizando não apenas os riscos, mas também quem se beneficia, quais são as necessidades e como os OGMs contribuem para a agricultura sustentável. É importante explicitamente lidar com as preocupações do público e desenvolver novos métodos para o envolvimento dos interessados e consulta pública.

Para futuros projetos de pesquisa, é recomendado tratar de modos de formalizar o engajamento e consulta públicos nos procedimentos dos trabalhos, assim como o impacto sobre o processo de análise de risco, procedimentos regulatórios e instituições envolvidas.

Além disso, este grupo de trabalho considera que há necessidade de uma estrutura geral para análise de risco de todos os tipos de novos alimentos produzidos por diferentes métodos de melhoramento e produção, levando em conta aspectos científicos, econômicos e sociais.

CONCLUSÕES

ENTRANSFOOD foi primeiro designado para tratar de segurança de alimentos e preocupação dos consumidores relacionadas com a introdução de alimentos derivados de culturas GM. Entretanto, discussões durante as reuniões realçaram que as preocupações dos consumidores relacionadas com o possível impacto negativo do cultivo em larga escala de culturas GM no ambiente têm igual peso. Uma análise global de risco da inovação tecnológica na agricultura deve incluir esses aspectos.

O consórcio tem sido uma experiência única, com participantes de disciplinas e afiliações diferentes. Isso tornou possível examinar uma ampla gama de questões relacionadas com avaliação de risco, manejo e comunicação de alimentos derivados de culturas GM, e acrescentar um significativo nível de detalhe às atuais diretrizes para as estratégias científicas de avaliação de pré-comercialização para alimentos derivados de culturas GM. Foi alcançado um consenso de que uma avaliação de risco rigorosa, baseada na ciência, do impacto ambiental, e de possíveis efeitos sobre a saúde humana de alimentos derivados de culturas GM apenas, não é suficiente para ganhar o apoio público para a introdução de novas tecnologias de produção de alimentos na sociedade. Medidas apropriadas de manejo de risco e aspectos como sustentabilidade, benefícios e impacto sobre a sociedade devem ser levados em consideração.

O consórcio examinou os métodos existentes e em desenvolvimento para detectar a possível ocorrência de efeitos não-intencionais na composição de culturas alimentares GM como resultado da modificação genética. A detecção de tais efeitos deveria principalmente depender de abordagens direcionadas, medindo componentes isolados em plantas GM e não-GM que representam importantes rotas bioquímicas metabólicas. Isso deveria continuar sendo um princípio líder nos procedimentos regulatórios de avaliação de risco para culturas GM e alimentos e rações delas derivados.

ENTRANSFOOD examinou se genes que codificam a resistência a antibióticos podem ser usados como marcadores no evento de transformação. O debate público está focalizado nos riscos de transferência desses genes presentes nos alimentos derivados de culturas GM para micróbios residindo no intestino humano ou células humanas. Embora o risco real de transferência e subsequente disseminação da resistência seja desprezível, recomendamos uma abordagem cautelosa quanto ao uso desses genes marcadores, uma vez que ainda há falta de conhecimento das condições específicas sobre onde a transferência gênica pode ser possível. O consórcio dividiu os genes marcadores hoje disponíveis em três grupos, de acordo com sua presença no ambiente e importância do antibiótico para uso clínico. Isso implica que a presença de certos genes marcadores, como nptII e hpt, em alimentos derivados de culturas GM não apresentam riscos adicionais ao ambiente ou à saúde humana, portanto o uso desses genes como marcadores pode continuar.

PRINCIPAIS PUBLICAÇÕES

KONIG, A.; KLETER, G.; HAMMES, W.; KNUDSEN, I.; KUIPER H. (Eds.). Genetically Modified Crops in the EU: Food Safety Assessment, Regulation, and Public Concerns – Overarching Report. The European Network on Safety Assessment of Genetically Modified Food Crops. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg. (2004).

KUIPER, H.A.; KLETER, G.A.; KONIG, A.; HAMMES, W.P.; KNUDSEN, I.; (Eds.). Safety Assessment, Detection and Traceability, and Societal Aspects of Genetically Modified Foods. European Network on Safety Assessment of Genetically Modified Food Crops (ENTRANSFOOD). *Food Chem. Toxicol.* 42(7, special issue). (2004). pp. 1043-1202.

KONIG, A.; COCKBURN, A.; CREVEL, R.W.R.; DEBRUYNE, E.; GRAFSTROEM, R.; HAMMERLING, U., et al; Assessment of the safety of foods derived from genetically modified (GM) crops. *Food Chem. Toxicol.* 42(7, special issue). (2004). pp. 1047-1088.

CELLINI, F.; CHESSON, A.; COLQUHOUN, I.; CONSTABLE, A.; DAVIES, H.V.; ENGEL, K.H.; GATEHOUSE A.M.R., KARENLAMPI ; et al; Unintended effects and their detection in genetically modified crops. *Food Chem. Toxicol.* 42 (7, special issue). (2004). pp. 1089-1125.

VAN DEN EEDE, G.; AARTS, H.; BUHK, H.-J.; CORTHER, G.; FLINT, H.J.; HAMMES, W.; et al; The relevance of gene transfer to the safety of food and feed derived from genetically modified (GM) plants. *Food Chem. Toxicol.* 42(7, special issue). (2004). pp. 1127-1156.

MIRAGLIA, M.; BERDAL, K.G.; BRERA, C.; CORBISIER, P.; HOLST- JENSEN, A.; ; et al;. Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. *Food Chem. Toxicol.* 42. (7, edição especial). (2004). pp. 1157-1180.

FREWER, L.; LASSEN, J.; KETTLITZ, B.; SCHOLDERER, J.,; BEEKMAN, V.; BERDAL, K.G.; Societal aspects of genetically modified foods. *Food Chem. Toxicol.* 42 (7, special issue). (2004). pp. 1181-1193.

KUIPE, R H.A.; KONIG, A.; KLETER, G.A.; HAMMES, W.P.; KNUDSEN I. Concluding remarks. *Food Chem. Toxicol.* 42(7, special issue). (2004). pp. 1195-1202.

Detecção quantitativa confiável, padronizada e específica, de alimento geneticamente modificado

<i>Acrônimo</i> QPCRGMOFOOD <i>Acrônimo do Programa</i> FP5-LIFE QUALITY <i>Número do Contrato</i> QLK1-1999-01301 <i>Período</i> Fevereiro de 2000 – Julho de 2003	<i>Coordenador</i> Arne HOLST JENSEN National Veterinary Institute NO-0106 Oslo Norway arne.holst-jensen@vetinst.no
--	--

<i>Parceiros</i> Askild HOLCK Matforsk, Norwegian Food Research Institute, Aas (NO) Yves BERTHEAU INRA, Institut National de la Recherche Agronomique, Versailles (FR) Marc DE LOOSE DvP-CLO, Ministry of Small Enterprises, Traders and Agriculture, Agricultural Research Centre, Gent (BE) Neil HARRIS LGC Ltd., Teddington (UK) Andreas WURZ Gene-Scan GmbH, Freiburg (DE) Guy VAN DEN EEDE DG Joint Research Centre of the European Commission, Institute for Health and Consumer Protection, Food Products and Consumer Goods, Ispra (IT) Marc VAITILINGOM Tepral-Brasseries Kronenbourg, Strasbourg (FR)	Carlo BULKMANN Unilever Nederland, Vlaardingen (NL) Patrick PHILIPP DGCCRF-LIR67, Direction generale de la concurrence, de la consommation et de la repression des fraudes, Laboratoire interregional 67, Illkirch-Graffenstaden (FR) David ZHANG Bio-GEVES, Groupe d'Interet Public d'Etude et de Controle des Varietes et des Semences, Surgeres (FR) Lynn FREWER IFR, Institute of Food Research, Norwich (UK) Maria PLA CSIC, Consejo Superior de Investigaciones Cientificas, Barcelona (ES)
---	--

BACKGROUND E OBJETIVOS

Métodos disponíveis de avaliação para a detecção de materiais geneticamente modificados (GM) somente podem ser usados para verificar a presença material GM potencial, ou detectar e identificar material GM conhecido. Consequentemente, o perigo potencial surge da falha em detectar organismos GM não aprovados (OGMs). A aprovação do GMO cobre uma modificação genética específica (produto da transformação). Como a construção genética pode ser usada em mais de um OGM, esses elementos não são identificadores confiáveis de transformações específicas.

A necessidade reguladora de métodos de detecção que possam distinguir entre OGMs aprovados e não aprovados, e quantificar o conteúdo de OGM, motivou este projeto. Métodos de detecção específico para cada evento de transformação (usando a junção entre o DNA modificado e a parte do genoma do hospedeiro onde o DNA está

integrado) foram considerados necessários (ver Fig 1.). Muito poucos genes específicos para espécies vegetais que possam ser usados como referência para a quantificação de conteúdo OGM foram identificados. Uma análise quantitativa que possa detectar e identificar mais e um único OGM em uma única reação tem um claro potencial de eficiência em custo. Mais ainda, os métodos de extração de DNA que possam influenciar a sensibilidade e confiabilidade de ensaios de detecção baseados na reação em cadeia de polimerase (PCR) devem ser otimizados. Finalmente, a validação desses métodos é crítica para avaliar sua confiabilidade. Há também uma necessidade crescente e urgente de padrões europeus e internacionais para detecção de OGMs.

As principais metas deste projeto foram, primeiro, desenvolver testes confiáveis e específicos para cada evento de transformação para detecção qualitativa e quantitativa de modificações genéticas em alimentos para pelo menos 12 OGMs; em segundo lugar, desenvolver testes multiplex confiáveis e específicos para cada evento de transformação, da diversidade de modificações genéticas em alimentos. Finalmente, investigar como os métodos melhorados para a detecção de alimentos geneticamente modificados poderiam influenciar a confiança na segurança dos alimentos, na ciência e nos reguladores do risco.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

Este projeto constituiu-se de seis blocos de trabalho. O primeiro envolveu a identificação da aplicação e limitações de um protocolo padrão para a extração do SNA. Os efeitos de várias modificações no protocolo de extração foram examinados em uma variedade de tipos de produtos. A quantificação de OGMs baseada em PCR determina o número relativo de um OGM para um gene de cópia única específico para a espécie hospedeira GM.

O segundo bloco de trabalho identificou e caracterizou genes de referência adequados específicos para a espécie, e desenvolveu conjuntos de iniciador/sonda de referência específicos para a espécie para PCR qualitativa e quantitativa. Isso envolve verificação da literatura e bancos de dados de DNA, sequenciar genes candidatos não caracterizados, testes empíricos de iniciadores e sondas. O número visado de cópias por genoma foi examinado por técnicas padrão de hibridização de DNA.

O terceiro bloco de trabalho envolveu caracterização de sequências de eventos de transformação. Dados de sequências foram requisitados por companhias de biotecnologia ou outras fontes em uma base colaborativa, mas geralmente essas requisições não tiveram sucesso. Consequentemente, os fragmentos de DNA contendo as regiões da junção foram, em vez disso, isolados e sequenciados a partir de qualquer material de referência que estivesse disponível.

No quarto bloco, foram desenvolvidos e testados conjuntos de iniciador/sonda específicos para cada evento de transformação. Iniciadores e sondas PCR-específicos foram desenvolvidos para detecção qualitativa de OGMs em ensaios de OGM único e ensaios multiplex, assim como para detecção quantitativa com PCR tempo real.

No quinto bloco, os métodos desenvolvidos foram validados em testes colaborativos e multi-laboratórios.

O bloco final de trabalho examinou o impacto socioeconômico da regulamentação e detecção do OGM. Um levantamento por questionário no Reino Unido, na Noruega e

Itália forneceu informação do impacto sobre a confiança do consumidor nos métodos analíticos melhorados para OGMs.

PRINCIPAIS DESCOBERTAS E RESULTADOS

No bloco 1 métodos de extração do DNA para matrizes derivadas de milho e de soja foram comparados, modificados e avaliados, e protocolos sucessivamente selecionados foram submetidos à validação por experimentos colaborativos e de multilaboratórios no bloco 5. O relatório final do bloco de trabalho está publicado em <http://www.vetinst.no/eng/content/download/645/5811/file/Deliverable1.pdf>

No bloco 2 genes de referência candidatos para milho, soja, trigo, arroz, colza oleaginosa (canola), tomate, batata, beterraba açucareira e girassol foram examinados, caracterizados, avaliados e, para a maioria das espécies, pelo menos um método PCR tempo real quantitativa foi desenvolvido para ser usado como um sistema confiável de gene referência para quantificação de OGMs. O relatório final do bloco de trabalho está publicado em:

<http://www.vetinst.no/eng/content/download/644/5807/file/Deliverable2.pdf>.

No bloco de trabalho 3 a inserção e/ou junção entre o genoma do hospedeiro e a inserção foi caracterizada para soja GTS 40-3-2 (Roundup Ready), Bt11, Bt176, Mon810, CBH 351 (Starlink), GA21, DBT418 E milho T25, e para MS8, Rf3 e GT73 colza oleaginosa. Esforços foram feitos para obter material para eventos adicionais, sem sucesso. Para aproximadamente metade dos eventos, sequências inferidas estavam conflitando com dados fornecidos pelos notificadores dos eventos nos dossiês oficiais. Os mapas genéticos atualizados conseqüentemente corrigiram a informação disponível aos avaliadores de risco. O relatório final do bloco de trabalho está publicado em:

<http://www.vetinst.no/eng/content/download/643/5803/file/Deliverable3.pdf>.

No Bloco de Trabalho 4, os dados da sequência do bloco 2 e em particular do bloco 3 foram usados para desenvolver métodos únicos e multiplex de verificação, construção, detecção evento-específica e quantificação de OGMs e material derivado. Métodos selecionados foram submetidos a teste de validação colaborativo e multilaboratórios no bloco 5. O relatório final do bloco de trabalho está publicado em:

<http://www.vetinst.no/eng/content/download/642/5799/file/Deliverables4to6.pdf>

No bloco 5 os métodos desenvolvidos nos blocos 1,2 e 4 foram submetidos a testes de validação colaborativo e multilaboratórios, e os métodos validados com sucesso em testes colaborativos foram sucessivamente encaminhados ao CEN/TC 275/WG 11 como anexos propostos aos padrões europeus e internacionais (ISO). Os critérios para a avaliação, as características de desempenho e aceitação dos métodos foram discutidos, incluindo materiais de referência alternativos e validação e implementação modular do método. Os resultados das atividades do bloco de trabalho formaram um fundamento para trabalho sucessivo pela Rede Europeia de Laboratórios de OGM (<http://enq.jrc.ec.europa.eu>) e documentos de orientação publicados pelo Laboratório de Referência de OGM da Comunidade da Comissão Europeia (<http://qmo-crl.jrc.ec.europa.eu>). O relatório final do bloco de trabalho está publicado em:

<http://www.vetinst.no/eng/content/download/641/5795/file/Deliverable7.pdf>

No bloco de trabalho 6, os levantamentos por questionário foram infelizmente conduzidos antes que a maioria do trabalho de desenvolvimento do método tivesse sido feita, e na realidade a ligação entre as atividades de pesquisa molecular e a socioeconômica não foi explorada tanto quanto originalmente previsto. Entretanto, o diálogo próximo durante todo o projeto assegurou que as informações relevantes

fossem trocadas, e a contribuição das atividades moleculares podem ser exploradas mais efetivamente nos estudos socioeconômicos no futuro, O relatório final deste bloco está publicado em:

<http://www.vetinst.no/eng/content/download/653/5851/file/Deliverable8a.pdf>;

<http://www.vetinst.no/eng/content/download/640/5791/file/Deliverable8b.pdf>.

Além das atividades descritas acima, foram feitas outras cobrindo vários blocos de trabalho, incluindo um número de revisões e trabalhos de discussão. A maioria dos resultados obtidos diretamente dos blocos de trabalho está publicada em revistas científicas com revisão por pares e outras referências.

CONCLUSÕES

Este projeto forneceu informações e métodos essenciais para a detecção de OGMs e contribuiu para a formação do Laboratório de Referência de OGM da Comunidade da EU (CRL), incluindo o método de critérios de aceitação e abordagem para o método de validação do CRL. Também contribuiu para um melhor entendimento do impacto do conhecimento sobre métodos de detecção disponíveis sobre a confiança do consumidor e interessados envolvidos em produção e controle de alimentos ,e a confiança na estrutura de regulamentação e segurança de alimentos.

PRINCIPAIS PUBLICAÇÕES

BERDAL. K.G. & HOLST-JENSEN. A. (2001). Roundup Ready® soybean event-specific real-time quantitative PCR assay and estimation of the practical detection and quantification limits in GMO analyses. *Eur. Food Res. Technol.* 213: 432-438.

HERNANDEZ. M.; DUPLAN, M.-N.; BERTHIER, G.; VAITILINGOM, M.; HAUSER, W.; FREYER, R.; PLA, M. & BERTHEAU Y. (2004). Development and comparison of four real-time polymerase chain reaction systems for specific detection and quantification of *Zea mays L.* *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 4632-4637.

HOLST-JENSEN, A. & BERDAL, K.G. (2004). The modular analytical procedure and validation approach, and the units of measurement for genetically modified materials in foods and feeds. *J. AOAC Int.* 87: 927-936.

HOLST-JENSEN, A., RONNING, S.B.; LOVSETH A. & BERDAL K.G. (2003). PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). *Anal. Bioanal. Chem.* 375: 985-993.

TAVERNIERS, I.; VAN BOCKSTAELE, E. & DE LOOSE M. (2004). Cloned plasmid DNA fragments as calibrators for controlling GMOs: different real-time duplex quantitative PCR methods. *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (5): 1198-1207.

Novos métodos para testar a segurança de alimentos transgênicos

<i>Acrônimo</i> SAFOTEST <i>Acrônimo do Programa</i> FP5-LIFE QUALITY <i>Número do Contrato</i> QLK1-1999-00651 <i>Período</i> Fevereiro de 2000 – Julho de 2004	<i>Coordenador</i> Pr Ib KNUDSEN, DVM Executive Director Institute of Food Safety and Toxicology Danish Veterinary and Food Administration Morkhoj Bygade 19 DK-2860 Soborg Denmark ik@fdir.dk
---	--

<i>Parceiros</i> Ivo FEUSNER University of Gottingen, Gottingen (DE) Brigitte THOMASSETTE Centre National de la Recherche Scientifique, Paris (FR) Peter J. EASTMOND University of Warwick, Coventry (UK) Plant Research International, Wageningen (NL) Randall J. WESELAKE University of Alberta, Alberta (CA) Allan GREEN Australian Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Canberra (AU) Owen ROWLAND Carleton University, Ottawa (CA) Jan JAWORSKI Danforth Center, Saint Louis (US) Robert MULLEN University of Guelph, Guelph (CA)	Mark SMITH NRC-Plant Biotechnology Institute, Saskatoon (CA) Xiao QIU University of Saskatchewan, Saskatoon (CA) John OHLROGGE Michigan State University, East Lansing, Michigan (US) John DYER United States Department of Agriculture, Washington (US) Ljerka KUNST University of British Columbia, Vancouver (CA) Peter DORMANN University of Bonn, Bonn (DE) Edgar CAHOON University of Nebraska, Nebraska (US) Mikael GALLSTEDT Innventia (former STFIPackforsk), Stockholm (SE) Basil NIKOLAU Iowa State University, Ames (US)
--	--

BACKGROUND E OBJETIVOS

Em 1997, o Comitê Científico da União Europeia sobre Alimentos (SCF) emitiu um conjunto de recomendações para a avaliação da segurança de novos alimentos, incluindo os que foram preparados com Organismos Geneticamente Modificados (GM). O SCF sugeriu uma abordagem por árvore de decisão que, na parte toxicológica, pode incluir uma demanda por estudos separados com animais para fornecer a informação faltante. Entretanto, o SCF não deu conselhos específicos sobre como conduzir esses estudos, mas declarou que o delineamento deve ser feito com base em cada caso. Como consequência, na Europa, não há harmonização precisa para avaliar a segurança de produtos alimentares transgênicos, e tem sido difícil usar

os estudos tradicionais de alimentação animal para avaliações toxicológicas. Isso claramente cria questões de biossegurança para o uso de produtos GM em alimentos. Procedimentos de teste nutricionais e toxicológicos *in vivo* e *in vitro* validados são exigidos urgentemente.

O objetivo geral deste projeto foi desenvolver e validar a metodologia científica que é necessária para a avaliação da segurança de plantas GM, de acordo com o regulamento 258/97 de 27 de janeiro de 1997 da União Europeia, relacionado com novos alimentos e novos ingredientes de alimentos. O projeto foi designado para atender à necessidade imediata de uma estratégia de teste específica para alimentos GM de um modo cientificamente válido e economicamente exequível.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

O projeto, subdividido em sete diferentes estágios, examinou o procedimento de teste da segurança para alimentos derivados de plantas GM. No estágio 1, três linhagens de arroz GM contendo genes introduzidos foram desenvolvidas e caracterizadas. Os genes introduzidos codificam três proteínas potencialmente inseticidas: a lectina GNA do galanto (que não tem toxidez conhecida para mamíferos, mas que interage com o intestino); a lectina PHA-E do feijão comum (que tem alta toxicidade para mamíferos); e uma toxina bacteriana de *Bacillus thuringiensis*, que não tem nenhuma toxidez conhecida para mamíferos. Além disso, proteínas recombinantes foram expressas e purificadas para uso posterior como “materiais de ‘spiking’” para os estudos *in vivo* e material de teste para os estudos *in vitro*.

No estágio II, as três linhagens do arroz transgênico foram cultivadas em quantidades suficientes para testes *in vivo* e, sua identidade e estabilidade genética foram asseguradas. O estágio III envolveu identificações e medições de nutrientes críticos, os agentes tóxicos críticos e outras mudanças químicas críticas nas linhagens transgênicas de arroz. No estágio IV, um estudo baseado nas diretrizes do teste de 28 dias da OECD foi conduzido para assegurar uma composição ótima da dieta e para medir a lectina ou parâmetros sensíveis a *Bt* para aplicações no estágio VI. O estágio V envolveu medições dos efeitos de lectinas e toxina *Bt* em um número de sistemas *in vitro*, para ajustar a sensibilidade e especificidade de parâmetros que foram investigados no estudo animal com as espécies de arroz transgênico no estágio VI. Mecanística suplementar e estudos de resposta à dosagem também foram conduzidos *in vivo* para a avaliação final de risco. No estágio VI, um estudo de toxidez da OECD, de 90 dias, em ratos foi conduzido com as três linhagens transgênicas de arroz, com e sem a proteína teste relevante. Neste estudo, as medições da lectina e parâmetros sensíveis a *Bt* otimizados nos estágios IV e V foram incorporados.

No estágio final, os resultados, assim como o conhecimento adquirido dos primeiros seis estágios, foram avaliados para estimar a sensibilidade, especificidade e eficácia da abordagem de teste.

Os resultados obtidos deste projeto foram apresentados em reuniões de trabalho, publicados em revistas internacionais (Knudsen e Poulsen, 2007; Poulsen *et al.*, 2007a+b; Schroder *et al.*, 2007; Kroghsbo *et al.*, 2008) e discutidos em fóruns internacionais, fornecendo, portanto, uma plataforma sobre a qual metodologias e recomendações baseadas neste projeto podem ser transformadas em testes modelo aceitos internacionalmente para avaliar a segurança de alimentos GM.

Os resultados do SAFOTEST do estudo de 90 dias de alimentação de ratos com 60 % de PHA-E de arroz misturado na dieta purificada demonstraram que os efeitos biológicos/toxicológicos de PHA-E herdada na PHA-E de arroz correspondendo a uma

dose de 30 mg de PHA-E/kg de peso corporal/dia podem ser identificados no estudo de 90 dias, especialmente quando os resultados são comparados com os efeitos compostos específicos encontrados no grupo de teste adicional “spiked” com 70 mg PHA-E/kg de peso corporal/dia (Poulsen *et al.*, 2007a). Os resultados demonstraram, de acordo com o esperado, tanto a *especificidade* do estudo de 90 dias com ratos para detectar efeitos relacionados com compostos específicos, como a *sensibilidade* do delineamento do teste para detectar a PHA-E biodisponível, intrinsecamente formada no arroz (Poulsen *et al.*, 2007a). Dessa maneira os resultados também permitiram a distinção biológica entre o efeito primário causado pelo novo produto gênico e os efeitos de mudanças secundárias.

O conjunto completo de dados que apareceu com a abordagem SAFOTEST compreende os dados sobre as plantas parentais, as construções, os produtos gênicos, os dados da análise da composição, os dados dos estudos *in vitro/ex vivo*, e os dados dos estudos de 28 dias de toxidez com ratos sobre o produto gênico, resumido nos dados do estudo de 90 dias de alimentação de roedores com a própria planta intacta. A *caracterização do risco* baseada neste conjunto de dados tratou muito precisamente as *questões de segurança* e menos precisamente as *propriedades nutricionais* do alimento GM baseadas na comparação com seu parental correspondente. As experiências ganhas com o SAFOTEST indicaram que o elemento nutricional pode ser coberto tão precisamente quanto à questão de segurança em estudos futuros, mas que é difícil distinguir entre efeitos nutricionais e de segurança.

CONCLUSÕES

É importante que a abordagem SAFOTEST seja vista como um estudo de 90 dias de toxidez confirmando a segurança de novo produto gênico produzido, dando ênfase no estudo comparativo de segurança, que estabelece a segurança relativa entre o alimento GM e seu tradicional correspondente conduzindo uma verificação de efeitos na saúde de mudanças intencionais e não-intencionais. Na abordagem SAFOTEST, este estudo é a realização final em uma cadeia de coleta de informação. A avaliação de segurança no SAFOTEST baseia-se na identidade da mudança genética, assim como nos dados de composição do alimento GM e o estudo de 90 dias de toxidez no alimento GM com ou sem o material “spiked”, antes da caracterização do risco estar concluída. Ao usar os dados anteriores relativos à toxidez do novo produto gênico e ao “spiking” do novo produto gênico no alimento GM, o estudo de 90 dias no SAFOTEST é capaz de separar aspectos não-intencionais de segurança do novo produto gênico intrinsecamente produzido no alimento GM a partir de aspectos de segurança não-intencionais derivados da regeneração da planta GM após a transformação genética. A detecção biológica dos distúrbios nutricionais não-intencionais é refinada através de modificações direcionadas a compostos da dieta purificada para os grupos GM, de modo que sua ração se torna nutritivamente equivalente à ração do grupo parental com respeito a diferenças previamente identificadas (Poulsen *et al.*, 2007a).

Interpretamos as descobertas científicas do projeto SAFOTEST com foco no estudo de 90 dias com PHA-E, como sendo fortes o suficiente para concluir que:

- os dados do projetado estudo de alimentação de roedores de 90 dias, juntamente com dados que cobrem a inserção gênica, a análise da composição e a toxidez do novo produto gênico, formam a base ótima para uma avaliação comparativa da segurança do alimento GM e seu correspondente convencional na situação pré-comercialização;
- o estudo de alimentação de roedores de 90 dias com um nível de dosagem alta e um delineamento dietário baseado sobre dados de composição do alimento GM e dados de toxidez do produto gênico é sensitivo e específico o suficiente para verificar a

presença/ausência de efeitos biológicos/nutricionais/toxicológicos da nova inserção gênica no nível de consumo definido no teste e dentro da remissão do teste;

- o estudo de alimentação de roedores de 90 dias, com o uso de “spiking” com base em caso a caso e com um nível de dosagem alta e um delineamento dietário definido acima, é sensível e específico o suficiente para verificar a presença/ausência de efeitos biológicos/nutricionais/toxicológicos de efeitos secundários de mudanças genéticas nos níveis de consumo definidos no teste e dentro da remissão do teste;
- o conjunto completo de dados gerados na abordagem SAFOTEST será combinado com cenários adequados para o consumo humano potencial para permitir a avaliação da segurança de alimentos GM cobrindo tanto as questões de segurança com as nutricionais normalmente levantadas na situação pré-comercialização.

PRINCIPAIS PUBLICAÇÕES

KNUDSEN I. and POULSEN M. (2007). Comparative Safety Testing of Genetically Modified Foods in a 90-Day Rat Feeding Study Design Allowing the Distinction between Primary and Secondary Effects of the New Genetic Event. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 49, 53-62.

POULSEN M.; SCHRODER M.; WILCKES A.; KROGHSBO S.; LINDECRONA RH.; MILLER A.; et al (2007 a). Safety testing of GM-rice expressing PHA-E lectin using a new animal test design. *Food Chem. Toxicol.* 45, 364-377.

POULSEN M.; KROGHSBO S.; SCHRODER M.; WILCKES A.; JACOBSEN H.; MILLER A.; et al; (2007 b). A 90-day safety in Wistar rats fed genetically modified rice expressing snowdrop lectin *Galanthus nivalis* (GNA). *Food Chem. Toxicol.* 45, 350-363.

SCHRODER M.; POULSEN M.; WILCKES A.; KROGHSBO S.; MILLER A.; FRENZEL T.; et al; (2007). A 90-day safety study of genetically modified rice expressing Cry1Ab protein (*Bacillus thuringiensis* toxin) in Wistar rats. *Food Chem Toxicol.* 45, 339-349.

KROGHSBO S.; MADSEN C.; POULSEN M.; SCHRODER M.; KVIST PH.; TAYLOR M.; et al; (2008). Immunotoxicological studies of genetically modified rice expressing PHA-E lectin or Bt toxin in Wistar rats. *Toxicology* 245, 24-34.

Novas metodologias para avaliar o potencial de efeitos não intencionais em culturas alimentares geneticamente modificadas

Acrônimo GMOCARE	Coordenador Dr Hubert P.J.M. NOTEBORN
Acrônimo do Programa FP5-LIFE QUALITY	Dutch Food and Consumer Product Safety Authority
Número do Contrato QLK1-CT-1999-00765	(VWA) Office of Risk Assessment
Período Fevereiro de 2000 – Julho de 2003	P.O. Box 51095, NL-2500 CM The Hague The Netherlands Hub.noteborn@vwa.nl

<i>Parceiros</i> Arjen LOMMEN RIKILT-Institute of Food Safety, Wageningen (NL)	Ian COLQUHOUN Institute of Food Research, Food Quality and Materials Service Division, Norwich (UK)
Howard DAVIES SCRI, Cellular & Environmental Physiology, Dundee (UK)	Jean-Jacques LEGUAY Department d'Ecophysiologie Vegetale et de Microbiologie, Cadarache (FR)
Peter BRAMLEY University of London, Royal Holloway and Bedford New College, School of Biological Sciences (UK)	Sirpa KARENLAMPI Institute of Applied Biotechnology, University of Kuopio (FI)
Geert ANGENON Free University of Brussels-VUB (BE)	Jean-Michel WAL Lab Ass INRA-CEA d'Immuno-Allergie Alimentaire, Service de Pharmacologie et d'Immunologie, Jouy-en-Josas (FR)
Jan PEDERSEN Institute of Food Safety and Toxicology, Danish Veterinary and Food Administration (VFA), Aarhus (DK)	
Friedrich ALTMANN University of Renewable Resources and Applied Life Sciences (BOKU), Institut fur Chemie Vienna (AT)	

BACKGROUND E OBJETIVOS

A introdução de culturas produzidas por métodos de engenharia genética (culturas GM) no mercado estão na Regulamentação de Novos Alimentos (EC 258/97) que requer uma rigorosa avaliação de segurança pré-comercialização. O processo de avaliação presta particular atenção aos efeitos adversos potenciais que poderiam comprometer a saúde humana e animal e a bio-segurança ambiental. Este não é uma exigência para a introdução de novas variedades de sementes obtidas por melhoramento convencional, embora efeitos não-intencionais, i.e. efeitos que vão além da modificação original e que poderiam impactar primariamente a saúde, podem, na verdade, estar presentes nessas culturas tradicionais.

A segurança de culturas melhoradas convencionalmente é baseada em uma história de uso seguro. Entretanto, alguns casos extremamente raros foram relatados em que

efeitos não- intencionais (rearranjos do DNA) deram origem a preocupações com a segurança. Esses casos foram identificados quando a cultura já estava no mercado. A caracterização de culturas GM é, entretanto, uma exigência legal. Como resultado, as culturas GM são mais bem caracterizadas do que nunca no caso das culturas obtidas por melhoramento convencional, incluindo conhecimento sobre o sítio e natureza da modificação genética.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

Atualmente, a caracterização de segurança de culturas GM inclui experimentos de alimentação de animais com o alimento inteiro e/ou análise da composição de nutrientes pré-selecionados e toxinas conhecidas, e uma comparação é feita relativamente à composição de culturas convencionais (análise direcionada). Esta abordagem envolve o conceito de equivalência substancial. Críticas a esta atual estratégia de teste “analisado – único” e “alimento inteiro” é que está aberta a vícios e detectará efeitos não intencionais somente por sorte ou se antecipados. Relacionado com isto, há lacunas, tais como a disponibilidade de (i) conhecimento suficiente da biologia da planta e integração das rotas metabólicas e interconectividade; (ii) uma comparação com um background genético similar; e (iii) compostos “miraculosos” para descrever a complexidade (redes metabólicas) de plantas de culturas.

Foi, portanto, formulada a hipótese de que as técnicas de obtenção de perfis, baseadas nas inovações na área da genômica, poderiam ajudar no tratamento dessas limitações potenciais. Os novos métodos cogitados poderiam ser necessários para futuros OGMs, nos quais as modificações serão muito mais complexas, e para os quais a metodologia atual estabelece limites para os testes de segurança. Mas o objetivo geral focaliza a demonstração de que a cultura GM é tão segura quanto seu correspondente convencional, em que existe um, e, como tal, não introduz nenhum risco adicional ou novos riscos para a saúde do homem ou animais. Além disso, este desafio científico proporciona grandes vantagens para todos os tipos de programas de melhoramento, independentemente de terem suas raízes no cultivo tradicional, genotecnológico ou orgânico.

Para essa finalidade, foi pesquisado o valor potencial de aplicar instrumentos de “obtenção de perfis” ou “ômica” como abordagens assim chamadas de não-direcionadas, seleção não tendenciosa, para detectar efeitos não-intencionados devidos ao processo de mutagênese da inserção. Essas tecnologias incluem metabolômica (análise paralela de uma gama de metabolitos primários e secundários), proteômica (análise de complemento de polipeptídios), e transcriptômica (análise paralela da expressão gênica). As descobertas relacionadas com os procedimentos “ômicos” foram comparados com os resultados obtidos pela abordagem analítica convencional “direcionada”. Esta comparação holística, aumentada, molda a base na qual focalizar testes toxicológicos posteriores, se necessários.

O trabalho concentrou-se em uma gama de mais de 135 (pré-comercialização) Linhagens GM em experimentos autocontidos, tais como casas de vegetação, redes Tygan e testes politúneis com, por exemplo, linhagens de batata transgênica modificada em sua composição de amido, (deficiente) processamento de glicoproteína, poliamine- açúcar-, glicoalcalóide ou lisina e treonina amino acidmetabolismo; linhagens de tomate transgênico com elevado teor de fitosteróis e/ou isoprenóides (carotenóides) e, linhagens de *Arabidopsis* transgênicas deficientes em teores de flavonóides. Algumas linhagens eram evidentemente diferentes fenotipicamente (e.g. Mal1, SamPAT (superexpressão) em batata). As culturas foram continuamente caracterizadas pelo tamanho de T-DNA, integração do vetor backbone, número de cópias e níveis de expressão. O fenótipo morfológico (i.e. crescimento,

arquitetura de planta, número, forma e cor das folhas e tubérculos, precocidade) foi verificado e comparado com observações de culturas anteriores. As culturas foram cultivadas em quantidades que permitem às variações intra e inter serem avaliadas.

PRINCIPAIS DESCOBERTAS E RESULTADOS

Os resultados da análise química direcionada não revelaram efeito significativo não-intencional inesperado associado com construções específicas (características). De modo similar, quando linhagens individuais foram examinadas, ficou claro que desvios significativos dos valores do tipo selvagem controle também ocorrem com controles transformados apenas com o vetor (sem gene alvo) e também com linhagens que foram desenvolvidas usando apenas regeneração de culturas de tecido. Isso levanta a possibilidade de que a variação somaclonal (conhecida por ocorrer significativamente em, por exemplo, batata, dependendo do genótipo) também introduz desvios significativos dos níveis de metabolitos do tipo selvagem com base em linha por linha, caso a caso.

Técnicas de obtenção de perfis e fingerprinting tais como genômica (e.g. microarray de batata, altamente enriquecido por genes relacionados a estresse; e um array de tomate com genes em diferentes estágios de desenvolvimento) e metabolômica fornecem um panorama “global” da expressão gênica e composição química na cultura, sejam elas GM ou não-GM. Por outro lado, a proteômica 2D-SDSPAGE, incluindo a verificação para determinantes IgE e análise de N-glicanos presentes na manchas de proteína (glicômica), oferecem um meio de revelar diferenças em perfis de proteínas. Esta detecção de mudanças em proteínas também melhora a capacidade de fazer uma adequada avaliação de risco por (i) indicar mudanças em proteínas alergênicas e/ou tóxicas; e (ii) sugerir mudanças no padrão de alguns metabolitos que não seriam reveladas de outra forma. Entretanto, os resultados também sugerem que condições ambientais e diferenças genéticas têm um grande impacto na expressão de muitas proteínas, e isso pode ser a causa de muitas variações observadas em plantas cultivadas em condições de campos. Mais ainda, a identificação de proteínas de, por exemplo, batata e tomate, é hoje prejudicada pela limitada disponibilidade de dados de sequências e o desempenho da confirmação estrutural pelo espectrômetro de massa.

Não houve observações de efeitos deletérios sobre a fisiologia das plantas de tomate GM, que foi modificado na sua biossíntese de carotenóides, na qual os perfis de carotenóides (fitosterol) foram alterados significativamente. Mas as técnicas metabolômicas demonstraram que a engenharia metabólica pleiotrópica de rotas bioquímicas revelam ligações metabólicas desconhecidas (i.e. diferenças significantes dos tomates controle do tipo selvagem) e, linhagens de tomate GM modificadas em carotenóides, tocoferol (vitamina E), flavonóides ou fitosteróis, os quais podem ser explorados no delineamento de experimentação em engenharia ou melhoramento convencional para características qualitativas. Além disso, o grau de fenótipo exibido pode mudar de uma progênie para outra.

Enormes quantidades de dados puderam ser geradas com essas metodologias holísticas. Entretanto, a subsequente interpretação dos dados na atual velocidade é limitante. Por exemplo, análise de microarray de várias linhagens de *Arabidopsis* GM, com regulação para baixo da sua rota bioquímica de flavonóides, indicam genes que são diferentemente expressados, mas que são todos identificados como genes induzidos por estresse que variam enormemente, mesmo quando as plantas são cultivadas quase sob as mesmas condições. Esta descoberta mostra que nem todos os genes podem ser de valor para uma análise comparativa de segurança. Também indica que muito mais conhecimento sobre a variação natural de genes individuais é

necessário antes que qualquer conclusão possa ser alcançada no contexto de impactos à saúde. Mais ainda, uma variação genotípica natural existe em níveis de metabolitos, tais como são encontrados entre os perfis de ácidos graxos da variedade Desiree e Record. A capacidade de diferenciar o risco associado com eventos transgênicos específicos deve, portanto, depender de um detalhado conhecimento (banco de dados) da variação natural nos genes, proteínas e metabolitos medidos, provavelmente também sob uma gama de condições ambientais (padronizadas).

Idealmente, somente aqueles parâmetros que ficam fora da faixa de variação natural continuarão sendo considerados em uma avaliação de segurança. Entretanto, há uma falta de informações sobre a variação natural entre e dentro dos cultivares vegetais para todos os parâmetros que podem ser medidos agora ou no futuro. Mais pesquisas são necessárias para validar as metodologias de obtenção de perfis desenvolvidas.

CONCLUSÕES

O básico está pronto para produzir novos instrumentos que são de natureza genética e, portanto, podem provar-se valiosos também para o melhoramento convencional e orgânico. Por agora, as avaliações de culturas GM devem focalizar principalmente as novas características intencionadas – gene(s) e produto(s) direcionado(s). Efeitos não-intencionais ocorrem tanto nas culturas GM como nas não-GM, entretanto, as culturas GM são mais bem caracterizadas. Possivelmente as duas deveriam ser tratadas do mesmo modo em avaliações de segurança, tendo em mente que essas avaliações não são exigidas para as culturas não-GM. A aplicação da abordagem direcionada ainda tem um grande valor e resultado em um saudável e relativamente seguro volume de alimentos e rações. Com relação ao estágio de maturação das técnicas “ômicas” como DNA microarrays, estas deveriam ainda ser o princípio líder quando da avaliação das culturas GM.

Embora os estudos das técnicas de obtenção de perfis não deveria ser ainda uma exigência oficial, sua aplicação, por exemplo, a linhagens de tomate GM demonstrou que:

- a perturbação de um componente de uma rota bioquímica pode ter efeitos no equilíbrio dos metabolitos por toda a rota;
- perturbações em uma rota bioquímica específica podem resultar em efeitos inesperados sobre rotas relacionadas e não-relacionadas;
- o processo de transformação pode resultar em efeitos não-intencionais que parecem ser herdáveis;
- a expressão de uma proteína latente não-funcional pode resultar em efeitos não-intencionais;
- é importante conduzir experimentação sobre variedades homocigóticas estáveis com controles azigóticos apropriados, como em linhagens estáveis homocigóticas o número de inserções transgênicas parece ter pequeno efeito na contribuição a efeitos não-intencionais.

As novas técnicas visam a não serem tendenciosas em relação à escolha de analisados com perfil a ser obtido, sejam eles genes, proteínas ou metabolitos. De um lado, essas metodologias estão ainda em sua infância, mas estão se desenvolvendo rapidamente. Do outro lado, elas não estão validadas e são ainda (e podem nunca ser) compreendidas. Todas as abordagens atuais de obtenção de perfis são baseadas na comparação de materiais GM com controles selecionados em experimentos autocontidos. Os dados gerados têm um grande potencial de aumentar nosso conhecimento da fisiologia da planta e redes metabólicas e irão melhorar as análises direcionadas pela descoberta de componentes-chave adicionais. No caso de novas

linhagens de plantas GM sem comparação adequada ou história de uso (seguro), a aplicação das novas técnicas de obtenção de perfil são de grande valor para a caracterização de sua composição bioquímica e funções.

Acima de tudo, os instrumentos de bioinformática precisam ser desenvolvidos para extrair informações relevantes dos conjuntos de dados básicos. O desenvolvimento de bancos de dados publicamente disponíveis sobre composição de culturas e perfis é uma necessidade absoluta, para determinar a variação natural dos compostos dentro e dentre dadas espécies de planta. À medida que a informação é coletada, uma referência (em expansão) com quem comparar as novas culturas pode ser avistada. Estes bancos de dados também realçariam grandemente a robustez da análise direcionada.

Finalmente, a nova metodologia, baseada em avançada tecnologia “célula fábrica” ou “ômicas” e usada neste projeto, contribuiu para o desenvolvimento do projeto de pesquisa SAFE FOOD do sexto Programa Estrutural, em que uma maior combinação de conhecimento complementar foi estabelecido em toda a UE.

PRINCIPAIS PUBLICAÇÕES

CELLINI F.; CHESSON A.; COLQUHOUN I.; CONSTABLE A.; DAVIES H. V.; ENGEL K. H.; et al ; (2004). Unintended effects and their detection in genetically modified crops. *Food and Chemical Toxicology* 42:1089- 1125.

DEFERNEZ M. I.J.; COLQUHOUN. (2004). NMR approaches to detect unintended effects of genetic modification in plants, in 'Genomics for Biosafety in Plant Biotechnology', Ed. J.-P. Nap, A. Atanassov W. J. Stiekema, *NATO Science Series, IOS Press*, The Netherlands.

DEFERNEZ M., GUNNING Y. M., PARR J., SHEPHERD L. V. T., DAVIES H. V. AND COLQUHOUN I. J. (2004). NMR and HPLC/UV Profiling of Potatoes with Genetic Modifications to Metabolic Pathways. *J Agricultural and Food Chemistry*. ASAP Web Release Date: 10-Sep-2004; (Article) DOI: 10.1021/jf049522e

DOBSON G., Griffiths D. W., Davies H. V. & McNicol J. W. (2004). A comparison of the fatty acid and polar lipid content of tubers from two potato species, *Solanum tuberosum* and *Solanum phureja*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:6306 – 6314.

NOTEBORN H.P.J.M., DE WIT W. (2004). Scientific Challenges in Risk Assessment. In: Biological Resource Management in Agriculture – Challenges and Risks of GMOs – What Risk Analysis is Appropriate? *OECD Documents*, Paris, 139-141.

Perfis de expressão com fingerprints para a avaliação de segurança de novas linhagens, incluindo OGMs usados em alimentos bio-processados

Acrônimo EXPRESS FINGERPRINTS Acrônimo do Programa FP5-LIFE QUALITY Número do Contrato QLK3-2001-01473 Período Setembro de 2001 – Maio de 2005	Coordenador P. RENAULT Genetique Microbienne INRA F-78352 Jouy-en-Josas cedex France pierre.renault@jouy.inra.fr
---	--

<i>PARCEIROS</i> J. KOK University of Groningen – Molecular Genetics, Groningen (NL) P. BESSIERES Mathematique, Informatique, INRA, Jouy-en-Josas (FR) O. TRELLES Computer Architecture Dept., Univ. of Malaga, (ES)	Eric JOHANSEN Genetics and Microbiology, Copenhagen (DK) Stanislas VEILLET Vitavaleur, DANONE, Savigny-sur-Orge (FR) J. BARDOWSKI Department of Microbial Biochemistry, Torun (PL)
--	--

BACKGROUND E OBJETIVOS

As bactérias do ácido láctico são largamente usadas para a produção de alimentos fermentados, por exemplo, queijo, embutidos e vinho. Produtores de alimentos fermentados estão continuamente à procura de novas cepas para manter ou melhorar a qualidade de seus produtos.

A Tabela 1 apresenta fontes potenciais de novas cepas e seus principais aspectos. Uma série de projetos de pesquisa foi conduzida para decifrar características genéticas importantes para a qualidade e os processos de alimentos. Estas descobertas poderiam melhorar a qualidade de produtos, incluindo paladar, textura, conservação e possivelmente, no futuro, valor nutritivo e efeitos na saúde. Entretanto, estas aplicações não são desenvolvidas na UE devido às suspeitas que os consumidores abrigam sobre organismos geneticamente modificados.

Tabela 1.

Fonte e propriedades de microrganismos usados na indústria de fermentação de alimentos.

	Fontes	Características genéticas	Aceitabilidade e alimentos
Cepas Naturais	Isolado de um produto alimentar ou uma fonte ambiental. História desconhecida até o isolamento.	Definido como pertencendo à espécie alimentar já usada. Conteúdo gênico varia tipicamente 5%-25 % entre indivíduos da mesma espécie	Aceito sem maiores avaliações do que sua associação com uma espécie já usada na fabricação de alimentos.

Variantes Clássicas	Selecionado em P&D laboratórios de cepas já em uso em processos alimentares.	Conteúdo gênico modificado de modo não controlado (eg mutagênese química). Mais frequentemente isso implica mutações pontuais, deleções e eventualmente extensivos rearranjos cromossômicos.	Aceito sem maiores avaliações uma vez considerada substancialmente equivalente à bactéria já usada em processos alimentares.
Variantes construídas	Construído em P&D Laboratórios de cepas já usadas em processos alimentares, com técnicas de biologia molecular que podem envolver passos realizados em diferentes bactérias e o uso provisório de informação genética.	Conteúdo gênico modificado de um modo definido, mas não contendo DNA originado de espécie diferente.	<ul style="list-style-type: none"> • US: substancialmente equivalente à bactéria já usada em processos alimentares; • UE: avaliado como cepas geneticamente modificadas e rotuladas como tal.
Cepas transgênicas	Como "variante de construção", mas com a introdução de DNA de diferentes organismos.	Conteúdo gênico modificado de um modo definido, e contendo DNA originado de espécie diferente	Avaliadas por procedimento específico. Rotuladas como geneticamente modificadas (na UE) ou cepas bio-engenhadas (US).

OGMs levantam várias questões de segurança, tais como disseminação de novos genes no ambiente, possível impacto desses genes na saúde dos consumidores (por exemplo aumentando potencialmente a alergenicidade), e possivelmente questões ainda desconhecidas devido à novidade da técnica. Foi, por exemplo, alegado que nenhum teste poderia realmente garantir a segurança dos OGMs, por causa da complexidade dos organismos vivos, prejudicando qualquer predição confiável. Esta questão está ligada à possível retirada da regulamentação do metabolismo e expressão gênica, em seguida à introdução de novos genes. O presente trabalho trata dessa questão.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

Nos últimos anos, um progresso considerável foi realizado em tecnologia de alta produtividade, permitindo medições globais da expressão gênica na célula, por exemplo, por abordagens de proteômica e transcriptômica. Mais ainda, os sistemas de informação agora disponíveis para o trabalho com organismos vivos permitem a exploração de uma crescente quantidade de dados produzidos por tecnologia de alta produtividade e, mais amplamente, por toda a comunidade científica. Neste contexto, os microrganismos são os organismos de escolha para o desenvolvimento de modelos, por causa de sua simplicidade quando comparados aos organismos superiores, tais como plantas e animais. *L. lactis*, um microrganismo presente em alimentos amplamente utilizados na indústria de laticínios foi escolhido como modelo para este programa. A disposição do teste de avaliação durante este trabalho usou tecnologia de alta produtividade para desenvolver uma metodologia aplicável à resolução de questões de segurança que podem resultar da retirada da regulamentação do organismo pela introdução de um novo gene.

Mais geralmente, o objetivo do consórcio Express-Fingerprint é fornecer à comunidade da UE um novo instrumento para avaliação da segurança de novas cepas iniciantes obtidas por métodos clássicos ou técnicas de biotecnologia (frequentemente chamados de OGMs). Nesse respeito, o consórcio desenvolveu:

- perfis de expressão (proteoma e transcriptoma) de diferentes cepas de *Lactococcus lactis*, incluindo cepas naturais e derivadas desses, construídas por genética ou tecnologia clássica

- um conjunto de instrumentos de bioinformática para comparar globalmente os resultados e avaliar sua equivalência substancial ou não;
- um conhecimento biológico sobre os efeitos potenciais da modificação genética, especialmente os que foram inesperados pro modelos preexistentes;
- uma primeira proposta para um instrumento de avaliação de risco baseado em padrões de expressão.

PRINCIPAIS DESCOBERTAS E RESULTADOS

Cepas naturais e bactérias avaliadas no programa:

Uma coleção de 30 diferentes cepas de *L. lactis* natural foi constituída de cepas provenientes de diferentes produtos e países. Nenhuma dessas cepas tinha um padrão similar na eletroforese de gel, sugerindo que as cepas coletadas apresentavam uma ampla diversidade genética. Entre as cepas naturais estavam derivados de *L. lactis* cepa IL594 (isolada em queijo Comte em 1955) que perdeu alguns de seus sete plasmídeos naturais. Estes plasmídeos foram todos sequenciados para melhor caracterização de seu conteúdo genético, uma vez que plasmídeos são naturalmente transmitidos entre bactérias vivendo nos mesmos ambientes (incluindo cepas da mesma ou outra espécie de bactéria). Sob alguns pontos de vista, sua introdução poderia ser considerada um modo natural de produzir bactérias geneticamente diferentes.

Mais ainda, três tipos de cepas modificadas foram construídas:

O primeiro conjunto de cepas compreende variantes derivadas de uma cepa industrial de *L. lactis* subsp. *diacetylactis* produzindo um aroma que contribui para o paladar de produtos de leite fermentados frescos, tais como leitelho, creme fermentado e queijos cottage. Foram desenvolvidas variantes dessa cepa inativada para o gene *aldB* e codificando alfa-acetolactato decarboxilase. As cepas modificadas produzem mais diacetil, permitindo a produção do leitelho com um sabor mais pronunciado.

O segundo conjunto de cepas compreende mutantes resistentes a fagos. O OGM foi construído com a inserção de quatro bases extras no gene que codifica a proteína de infecção do fago (*pip*). Essas cepas são menos sensíveis ao ataque do fago do que seus parentais, o que assegura processos mais confiáveis e qualidade do produto.

O terceiro conjunto de cepas contém um sistema de clonagem baseado em tRNA padrão alimentar. A base desse sistema é a restauração do potencial de biossíntese de pirimidina em cepas modificadas pela introdução de um códon de parada no gene *pyrF*. A síntese de *pyrF* é restaurada pela expressão de um gene tRNA modificado *supD*, que pode ser usado como um marcador para seleção. A expressão bem-sucedida de diferentes genes transportados por um vetor contendo *supD* foi obtida. O sistema foi inicialmente designado para plasmídeos, mantidos estavelmente em produção de células no leite, uma vez que o meio não contém pirimidina.

Dois tipos de técnicas foram usadas para construir essas cepas:

- mutagênese química, que é uma técnica clássica, não se enquadrando na legislação da UE sobre liberação de OGMs ou alimentos/rações GM, não requerendo, portanto, uma avaliação profunda; e
- técnicas GM (como definidas pela legislação da UE: “organismos nos quais o material genético foi alterado de um modo que não ocorre naturalmente por cruzamento ou recombinação natural”). Essas cepas, se usadas para produção, levariam à “rotulagem OGM” específica, por que DNA estranho foi introduzido em um estágio da construção.

Foi feita a comparação detalhada fenotípica e genotípica dos OGMs, mutantes químicos e suas respectivas cepas parentais, incluindo o sequenciamento das mutações nos genes alvo.

Foram obtidos os perfis de expressão por análise proteômica e transcriptômica. Para essa finalidade, condições padronizadas de experimentação foram organizadas pelos parceiros para obterem dados comparáveis em todos os laboratórios. Para desenvolver um conceito de prova, a maioria dos experimentos foi conduzida fora das células, em um meio definido quimicamente. Entretanto, foi desenvolvido um procedimento para medir perfis de expressão de células crescendo em leite, meio natural para a fermentação com *L. lactis*.

Foram delineados DNA microarrays contendo mais de 2.000 PCR sondas, correspondendo a genes anotados de *L. lactis* IL1403 e DNA microarrays produzidos com o mesmo conjunto de amplicons estão agora disponíveis comercialmente. Foi desenvolvido um software para permitir (i) busca de dados; e (ii) processamento de alta velocidade dos extensivos dados obtidos dos perfis de expressão e comparação paralela da transcrição e análise estatística dos dados.

Comparação de tecnologias tradicionais e GM para produzir variantes:

Um importante foco do trabalho foi melhor definir os efeitos das modificações genéticas sobre a expressão gênica em geral e, avaliar se os meios usados para obter cepas têm impacto no seu futuro comportamento. Perfis proteômico e transcriptômico foram obtidos dos três conjuntos de cepas descritos acima.

Os resultados de nosso trabalho mostram que:

- a extensão da modificação dos perfis proteômicos e transcriptômicos é sempre tão ou mais importante em “mutantes clássicos” do que em seus correspondentes GM. O resultado sugere fortemente que o modo pelo qual a modificação foi feita pode influenciar o padrão de transcrição e, que as técnicas de biologia molecular estão produzindo menos efeitos colaterais do que as técnicas classicamente usadas;
- as mutações geradas por ambas as técnicas não produzem sistematicamente perturbações na expressão dos outros genes da célula. Em particular, nenhuma mudança significativa foi observada nos padrões de expressão dos mutantes *aldB* e *pip*. Em tais casos, pode ser proposto que as cepas modificadas obtidas por quaisquer das duas técnicas são substancialmente equivalentes, embora a legislação da UE não permita a aplicação deste conceito para cepas obtidas com técnicas moleculares;
- a modificação da expressão do gene em seguida a mudanças genéticas pode frequentemente ser explicada por bom conhecimento de biologia. Este é o caso de (a) um dos dois mutantes químicos para os quais o metabolismo do ferro foi modificado, e (b) cepas *pyrF* contendo apenas uma cópia do supressor sem sentido *supD* ou nas quais o sistema de expressão não foi inteiramente restaurado.

Tomados conjuntamente, esses dados corroboram com a ideia de que as técnicas de biologia molecular são ferramentas valiosas para obter variantes simples de cepas naturais e não apresentam risco quando comparadas com as metodologias clássicas.

Avaliação do efeito da troca natural de genes nos perfis de expressão:

Os perfis de expressão da cepa natural IL594 foram comparados com aqueles de seus derivados sem plasmídeos IL1403. Entre genes plasmídeos, caracterizamos genes potencialmente herdados de transferência gênica horizontal de bactérias vivendo no mesmo nicho ecológico, tais como *Lactobacilli* e *Enterococci*. Os perfis de expressão mostraram que metade dos 151 genes plasmídicos foram expressos na IL594. Mais ainda, um número significativo de genes cromossômicos foi reprimido ou induzido, tais como os genes envolvidos no metabolismo do açúcar, catabolismo de aminoácidos e

profagos. Estes resultados mostram que a introdução de genes por meios naturais pode mudar significativamente a expressão de genes celulares e, portanto, o metabolismo da célula.

Diversidade natural de perfis de expressão:

O último foco foi na comparação da variabilidade da expressão gênica em cepas naturais usadas em alimentos, comparada com aquela obtida por modificações genéticas. Perfis proteômicos e transcriptômicos de 12 cepas naturais foram comparados entre si e depois com os perfis das variantes previamente estudadas. Os resultados deste trabalho mostraram que os perfis de cepas naturais diferem substancialmente um do outro e que, na maioria dos casos, o conhecimento biológico não pode dar explicações simples para as diferenças observadas. Esses dados foram mais bem analisados para periciar o nível de equivalência das variantes obtidas pelas diferentes tecnologias e cepas naturais. Isto mostrou que, independentemente da técnica usada para sua construção, os perfis das variantes estão muito mais próximos da respectiva cepa-mãe do que elas estão de qualquer outra cepa natural ou do que a maioria das cepas naturais estão uma da outra.

CONCLUSÕES

Neste trabalho desenvolvemos um conceito de prova para a avaliação de risco de novas cepas, com *L. lactis* como modelo. Este instrumento é baseado na medida das mudanças de expressão induzidas pelas modificações genéticas produzidas por quaisquer meios em um conjunto de cepas. Ele gerou listas de genes cuja expressão é modificada e liga genes a bancos de dados especializados. Isto permite ligar mudanças genéticas a funções celulares que podem ser perturbadas e então direcionar a perícia para melhor avaliação de segurança, se necessário. Procedimentos similares podem ser organizados para qualquer microrganismo cuja sequência seja conhecida. Os resultados científicos obtidos em estudos de casos reais sugerem que as modificações gênicas feitas por biologia molecular tendem a produzir menos eventos inesperados do que os métodos clássicos. A esse respeito, a legislação da UE, que enfatiza o modo pelos quais os organismos devem ser construídos para classificá-los como OGM, pode parecer cientificamente irrelevante e potencialmente enganosa para a escolha do consumidor.

PRINCIPAIS PUBLICAÇÕES

RENAULT P. Genetically modified lactic acid bacteria: applications to food or health and risk assessment. *Biochimie*. (2002). Nov,84(11):1073-87. Revisão.

PEDERSEN MB., IVERSEN SL., SORENSEN KI., JOHANSEN E. The long and winding road from the research laboratory to industrial applications of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* (2005). Aug,29(3):611-24. Revisão.

JAN KOK, GIRBE BUIST, ALDERT L. ZOMER, SACHA A.F.T. van Hijum and Oscar P. Kuipers. Comparative and functional genomics of lactococci. *FEMS Microbiol. Rev.* (2005). Aug,29(3): 411-433. Revisão.

VAN HIJUM SA., DE JONG A., BAERENDS RJ., KARSENS HA., KRAMER NE., LARSEN R., et al. A generally applicable validation scheme for the assessment of factors involved in reproducibility and quality of DNA-microarray data. *BMC Genomics*. (2005). May 20,6(1):77.

BARRIERE C., VEIGA-DA-CUNHA M., PONS N., GUEDON E., VAN HIJUM SA., KOK J., KUIPERS OP., EHRLICH DS., RENAULT P. Fructose utilization in *Lactococcus lactis* as a model for low-GC gram-positive bacteria: its regulator, signal, and DNA-binding site. *J Bacteriol.* (2005). Jun,187(11):3752-61.

Desenvolvimento de um analisador de imunodeteção baseado em capacitância para ensaios de OGMs em alimentos

<i>Acrônimo</i> IMAGEMO <i>Acrônimo do Programa</i> IMAGEMO <i>Número do Contrato</i> QLK3-2002-02141 <i>Período</i> Janeiro de 2003 – Janeiro de 2006	<i>Coordenador</i> T. ALBANIS University of Ioannina P.O. Box 1186 GR-45110 Ioannina Greece talbanis@cc.uoi.gr <i>Website do projeto</i> http://users.uoi.gr/imagemo
---	--

<i>Parceiros</i> B. HOCK Technische Universitat Munchen (DE) C. MARTELET Ecole Centrale de Lyon (FR) P. MILLNER University of Leeds (UK) C. EFSTATHIOU University of Athens (EL)	T. FRELINK ECO CHEMIE B.V., Utrecht (NL) M. PIGHINI TECHNOBIOCHIP S.c. a r.l., Latina (IT) Th. MICHAS SKYLAB-MED S.A., Athens (EL) D. KORAKI ENGINE S.A., Athens (EL)
---	---

BACKGROUND E OBJETIVOS

O intenso debate público sobre a aplicação de engenharia genética na produção de alimentos resultou em elevada controvérsia entre consumidores e indústrias. Há hoje dois métodos em uso comercial geral para detectar OGMs em culturas de campo. Um método envolve a detecção de proteínas que foram produzidas através da biotecnologia na cultura; a outra está baseada na detecção de sequências de DNA inseridas na cultura. O ELISA e Ensaio de Fluxo Lateral são usados para o ensaio de proteína e a PCR (Reação de Cadeia de Polimerase) e Southern Blot para DNA.

A meta deste projeto foi desenvolver um analisador genérico de imunodeteção baseado em capacitância para proteínas relacionadas com OGMs. As CP4 EPSPS (CP4-sintase) e Cry1(A)b-proteína foram usadas como alvos modelo relevantes, correspondendo aos “Roundup Ready (RR)-Soja” e “Milho *Bt*” OGMs, respectivamente. Para alcançar o objetivo geral, a produção de anticorpos monoclonais (MAbs) específicos para as proteínas alvo, o projeto e fabricação de um analisador portátil capaz de monitorar interações entre biomoléculas e, o desenvolvimento de arquiteturas de eletrodos impedimétricos diferentes foram conduzidos em paralelo.

Considerando os problemas associados com a detecção de proteínas alvo em alimentos altamente processados (e.g. extensivas mudanças na confirmação dos antígenos), o desenvolvimento de anticorpos para sequências de peptídeos características – bem como o desenvolvimento de um analisador baseado na Microbalança de Cristal de Quartzo (QCM) capaz de monitorar a hibridização entre as fitas complementares de ácidos nucleicos – também foram incluídos durante as primeiras reuniões do projeto. Além disso, estudos de métodos baseados em PCR e o uso de novos iniciadores foram incluídos nos objetivos do projeto.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

Para atingir esses objetivos, o projeto se concentrou nos diferentes tipos de imunossensores capacitivos baseados em eletrodos de óxido metal/metall e, monocamadas auto-montáveis mistos e, eletrodos de ouro e filmes Langmuir–Blodgett depositados na superfície hidrófoba de 1-octadecanotiol (ODT) de eletrodos de prata modificados. O desenvolvimento de MAbS específicos para as proteínas alvo foi tentado seguindo diferentes estratégias de imunização:

- antígenos foram extraídos e purificados do material bruto da planta contendo os antígenos CP4 EPSPS e Cry1Ab, com a aplicação de consecutivos esquemas de purificação que consistiam e troca de íons e cromatografia de exclusão de tamanho;
- peptídeos específicos, que descrevem diferentes famílias de toxinas Cry e sintase CP4, foram sintetizadas e acopladas a neutravidin como uma proteína transportadora;
- adicionalmente, a síntese de anticorpos recombinantes contra peptídeos de OGM foi empreendida. A razão por trás dessa última abordagem foi a disponibilidade de bibliotecas e, nenhum procedimento de imunização era necessário, o que essencialmente economizou tempo.

Também foram desenvolvidos o projeto, a construção e otimização de um aparelho eletrônico auto-suficiente, de baixo custo e capaz de monitorar interações entre biomoléculas que podem mudar a capacitância de um eletrodo. Atenção particular foi dada a reduzir ou eliminar o componente constante (dc) da corrente não capacitiva fluindo através da célula, o que foi observado nos eletrodos caracterizados por uma camada dielétrica de resistência relativamente baixa.

Para o desenvolvimento de um método baseado em uma QCM para sondar a interação do DNA, um analisador comercial QCM, μ -Libra, foi usado e o método introduziu o gene Cry1A(b). Usando a sequência de Bt-176 DNA como molde, um fragmento de 200-pb do gene Cry1A(b) foi amplificado e purificado. O produto do fragmento de PCR foi clonado ainda mais, usando o pGEM®–T Easy Vector System. Após a digestão do vetor (EcoRI) e purificação do fragmento, o gene Cry 1A (b) foi marcado com biotina e usado como sonda para tornar funcional a superfície do quartzo.

PRINCIPAIS DESCOBERTAS E RESULTADOS

Os imunossensores capacitivos resultantes foram testados com anticorpos pilotos, mostrando sensibilidade com um limite de detecção de ng/ml ode antígeno piloto. Para reduzir o custo e criar uma geometria adequada para medidas no campo, em combinação com o analisador palm-sized, foram projetados e fabricados o chamado Multipulser e sensores.

A aplicabilidade dos sensores às proteínas específicas ao OGM foi restrita aos anticorpos de baixa afinidade, que haviam sido produzidos até o momento.

A operação do Multipulser está baseada no carregamento repetitivo da capacitância de célula eletroquímica pela aplicação de pulsos de voltagem de curta duração e baixa amplitude (pulsos de perturbação). Todos os pacotes de carga são acumulados em um integrador analógico, cuja voltagem de saída é proporcional à capacitância da célula. O Multipulser apresenta três modos de operação selecionáveis pelo usuário, cada um deles caracterizado pela forma dos pulsos de perturbação aplicados. O “Modo 3” parece particularmente de interesse para os eletrodos caracterizados por uma camada dielétrica de resistência relativamente baixa, uma vez que ela efetivamente reduz ou elimina a contribuição desse componente da corrente ao sinal medido. O Multipulser foi usado com sucesso para monitorar a ligação de moléculas

biotiniladas com duas diferentes montagens de eletrodos modificados tipo SAMS em ouro e outro baseado em um Ti/TiO₂ semiconductor. Medições conduzidas em paralelo com um analisador comercial de resposta de frequência resultou em padrões similares de reação.

O desempenho analítico do analisador de DNA baseado em QCM foi avaliado usando materiais de referência certificados IRMM-413. O total de DNA extraído dos produtos IRMM de pó de milho seco com diferentes frações de massa (de 0,1 % a 5 %) de farinha de milho geneticamente modificado MON 810 foi analisado com o sensor de DNA. A aplicabilidade do analisador em amostras reais foi testada pela extração de DNA de biscoitos transgênicos (farinha de milho geneticamente modificado MON 810 certificada).

No contexto deste projeto, um método baseado em PCR para milho e soja GM também foi desenvolvido e validado. Para esta finalidade, um conjunto de iniciadores 35S foi projetado, e os sucessivos procedimentos de extração da amostra, preparação e análise foram validados.

Experimentos de validação foram feitos em vários Materiais de Referência Certificados e amostras comerciais. Finalmente, as amostras comerciais foram selecionadas para a presença de soja GM e milho GM. Amostras positivas para a presença de 35S foram analisadas por PCR (TaqMan™) de tempo real para quantificação da porcentagem de GM.

CONCLUSÕES

Este projeto forneceu informações sobre o desenvolvimento de imunossensores capacitivos, nova instrumentação para monitorar interações entre biomoléculas e métodos baseados em QCM e PCR para a detecção de OGMs.

PRINCIPAIS PUBLICAÇÕES

HOU Y., TLILI C., JAFFREZIC-RENAULT N., ZHANG A., MARTELET C., PONSONNET L., ERRACHID A., SAMITIER J., et al. Study of mixed Langmuir-Blodgett films of immunoglobulin G/amphiphile and their application for immunosensor engineering *Biosensors and Bioelectronics*, 20 (6). (2004). 1126-1133.

CHAKER T; HOU Y., YOUSSEFI H. K., PONSONNET L., MARTELET C., ERRACHID A., et al Impedancemetric probing of mixed amphiphile-antibody films transferred onto silver electrodes *Sensors Letters* 2. (2005). 1-6.

MANTZILA A.G., PRODRONIDIS M.I. Development and Study of Anodic and Thermal Ti/TiO₂ Electrodes. Potential Use as Impedimetric Immunosensors, *Electrochimica Acta no prelo*. (2005).

MANTZILA A.G., PRODRONIDIS M.I. Performance of Anodically Formed Ti/TiO₂ Based Architectures as Impedimetric Biosensors, *Electroanalysis* 17 (20):1878. (2005).

BOLIS S.D., CHARALAMBOUS P.C., EFSTATHIOU C.E., MANTZILA A.G., MALAMOU C.A., PRODRONIDIS M.I. Monitoring of the Avidin – Biotinylated Dextran Interaction on Au and Ti/TiO₂ Electrode Surfaces Using a Charge Integrating Device, *Sensors and Actuators no prelo*. (2005).

HAYS H.C.W., MILLNER P.A. PRODRONIDIS M.I. Development of Capacitance based Immunosensors on mixed-seldassembled monolayers, *Sensors and Actuators no prelo*. (2005).

PASSAMANO M., PIGHINI M. QCM DNA sensor for GMOs detection. (Submetido a *Sensor & Actuators B*).

PRODRONIDIS M.I. Development of a kit for the construction of Voltametric Electrodes, Patent GR200401001172.

Estratégias quantitativas de avaliação de risco para novos alimentos

<i>Acrônimo</i> NOFORISK <i>Acrônimo do Programa</i> FP6-FOOD <i>Número do Contrato</i> 506387 <i>Período</i> Abril de 2004 – Março de 2007	<i>Coordenador</i> Morten POULSEN Danish Institute for Food and Veterinary Research (DFVF) Morkhoj Bygade 19 DK-2860 Soborg Denmark
--	---

<i>Parceiros</i> Ad PEIJNENBURG RIKILT-Institute of Food Safety, Wageningen (NL) Derek STEWART The Scottish Crop Research Institute, Dundee (UK) Michael GIBNEY The Provost Fellows and Scholars of the College of the Holy and Undivided Trinity of Queen Elizabeth near Dublin (IR) Karl-Heinz ENGEL Technische Universitat Munchen (DE) Angharad GATEHOUSE University of Newcastle (UK)	Qingyao SHU Zhejiang University (CN) Joachim SCHOLDERER The Aarhus School of Business, Aarhus (DK) Catherine LECLERCQ Istituto Nazionale di Ricerpa per gli Alimenti e la Nutrizione, Rome (IT) Ingmar WESTER Raisio Bencol Ltd (Raisio), Kuopio (FI) Dieter LUTJOHANN University of Bonn (DE) Wout SLOB National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven (NL)
---	---

BACKGROUND E OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto é desenvolver e validar a metodologia científica necessária para a avaliação de segurança de novos alimentos de acordo com a Regulamentação 258/97 de 27 de janeiro de 1997 da UE, relacionada com novos alimentos e novos ingredientes de alimentos e, comunicar a importância das abordagens aos usuários finais principais, incluindo os consumidores.

O propósito de todo protocolo de teste de segurança é capacitar a avaliação pré-comercialização, o que fornece garantia de que o novo alimento é seguro para consumir e nutricionalmente adequado no nível antecipado de consumo, em respeito ao seu conteúdo de substâncias tóxicas e compostos nutricionalmente importantes. Um crescente número de novos alimentos, particularmente os chamados “alimentos funcionais”, é geralmente comercializado com alegações de benefícios aos consumidores. A natureza de tais alegações pode ser ampla, mas a eficácia de tais benefícios precisa ser determinada.

Este projeto trata do desafio científico de desenvolver abordagens de primeira linha para avaliar a segurança, adequação nutricional e eficácia de novos alimentos em conjunto aos estudos.

As novas abordagens empregadas são testadas em três exemplos modelo, que ou já estão, ou podem ser introduzidos no mercado. Os modelos selecionados são:

- tubérculos geneticamente modificados (GM) e tubérculos melhorados convencionalmente com conteúdo e equilíbrio de tóxicos intrínsecos alterados (glicoalcalóides);
- uma linhagem mutante de arroz melhorado convencionalmente para redução de um constituinte antinutritivo (ácido fítico); e
- ingredientes de alimentos funcionais de origem natural (fitosterol e fitostanol ésteres).

O resumo do projeto focalizará principalmente os tubérculos de batata GM com proporção alterada dos glicoalcalóides solanina e chaconina.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

Para conduzir uma avaliação de risco quantitativa probabilística, as batatas foram desenvolvidas, cultivadas e reunidas na Escócia, enquanto a solanina e a chaconina pura foram compradas em companhias comerciais. Foram feitos estudos comparativos de genômica, proteômica e metabolômica das linhagens de batata geneticamente modificadas por vários contratados. Comparações composicionais das batatas GM e não-GM quanto aos conteúdos de proteínas, gorduras, carboidratos, fibras, principais vitaminas e minerais, assim como análises para resíduos de pesticidas e contaminantes acidentais também foram conduzidas.

Estudos de toxicidade *in vitro* dos glicoalcalóides da batata e estudos genômicos de amostras de estudos *in vitro* e *in vivo* foram escolhidos para examinar a exequibilidade da obtenção de perfis de expressão (transcriptômica) e obtenção de perfis de metabólitos (metabolômica), juntamente com cultura de células *in vitro* para a identificação do risco de glicoalcalóides e extratos de batata contendo glicoalcalóides. Para esta finalidade, foram usadas as linhagens de células humanas Caco-2 e HepG2, derivadas de intestino e fígado, respectivamente.

Para os estudos com animais, o criceto (hamster) foi escolhido como o melhor modelo animal para o teste de toxicidade de glicoalcalóide. Um estudo de toxicidade de 28 dias foi realizado com fêmeas de hamsters Golden Syrian que receberam até 33,3 mg glicoalcalóide total/kg de peso corporal, em proporções de solanina e chaconina, que podem ser comparadas com as proporções observadas em uma batata parental e uma geneticamente modificada, respectivamente. Um estudo de 90 dias foi conduzido alimentando fêmeas de hamsters Golden Syrian com dieta purificada contendo 20%, 40% e 60 % de ou batata GM ou não-GM. Para aumentar a sensibilidade do estudo, glicoalcalóides puros foram introduzidos na dieta de um grupo até um total de 33 mg de glicoalcalóide/kg de peso corporal/dia.

Cenários de exposição humana à batata e solanina/chaconina foram desenvolvidos com base em estudos de ingestão usando dados de consumo humano. Estimativas de consumo para solanina, chaconina e glicoalcalóides totais foram feitas usando dados de consumo coletados na Itália e Irlanda. “Fatores de receita” e “fatores de perda de água” foram usados para expressar os dados de consumo de alimentos do Raw Agricultural Commodities. Fatores de receita foram usados para calcular as quantidades de batatas consumidos em pratos misturados, enquanto os fatores de perda de água foram usados para refletir as mudanças nos pesos dos alimentos devido a ganhos e/ou perdas de umidade durante a preparação do alimento. A exposição à solanina, chaconina e glicoalcalóides totais foi avaliada primeiramente usando uma abordagem determinística.

A percepção do consumidor dos riscos e benefícios relacionados com alimentos em geral e em relação à batata GM foi examinada. A utilidade dos dados do NOFORISK

para avaliações probabilísticas de risco e benefícios da batata GM também foi considerada. Finalmente, os resultados gerais do estudo foram apresentados para discussão em uma reunião de trabalho com interessados/especialistas para obter conclusões e recomendações em face do trabalho executado.

PRINCIPAIS DESCOBERTAS E RESULTADOS

Com respeito à batata GM, a análise southern blot mostrou a presença de dois eventos de inserção do cassete de transformação no genoma da linhagem de batata transgênica. A análise detalhada da composição da linhagem parental e da GM usadas nos estudos com animais mostrou relativamente outras diferenças significativas. Os dados do microarray conduzido como parte dos estudos in vivo com glicoalcalóides puros indicaram que estes, particularmente na proporção presente na batata não-GM, aumenta a expressão de muitos genes envolvidos na síntese do colesterol. As descobertas mais proeminentes dos experimentos de microarray foi a regulação para cima dos genes da biossíntese de colesterol nas células Caco-2. A biossíntese do colesterol, portanto, pode servir de biomarcadores precoces da toxidez de glicoalcalóides.

No estudo de 28 dias com hamsters, doses de até 33 mg de glicoalcalóide/kg de peso corporal, na mesma proporção como presente na batata do tipo selvagem, foram mais fortemente tóxicas do que a proporção da batata GM. Um aumento significativo em distensão do estômago e dos intestinos, com uma clara dose-resposta, foi determinado após exames macroscópicos. Dados do estudo de 90 dias com hamsters sugerem que a batata GM é tão segura quanto a batata não-GM, quando dada por 90 dias misturada em uma dieta purificada em concentrações de 20% - 60%. Vários parâmetros mostraram diferenças entre animais alimentados com 0% ou 20%, comparados com os alimentados com 40% ou 60% de batata. Essas diferenças foram o resultado da concentração de batata na dieta e não do tipo de batata ou proporção de glicoalcalóide.

Os níveis de consumo para diferentes grupos de “produtos alimentícios baseados em batata” são relatados para a Itália e Irlanda. Em geral, verificou-se que cenários de exposição em geral estavam abaixo do limite para toxidez para humanos. Descobertas de estudos investigando atitudes do consumidor em relação a novos alimentos mostraram que os consumidores tenderam a ver apenas alguns riscos e benefícios bem definidos em três exemplos de alimentos novos. Interessantemente, os consumidores estão muito mais preocupados com questões fora da abrangência da atual legislação. Mais ainda, os especialistas participantes tenderam a definir risco e benefício em termos de cadeias detalhadas de relações de causa-efeito entre variáveis, para as quais existem claras definições e regras de medição. Tal nível de detalhe não pode ser encontrado em dados de consumidores.

Os estudos de consumidores indicaram mais ainda que, comparados com outras questões sociais, os novos alimentos estão muito embaixo nas agendas da maioria dos consumidores. Das três novas tecnologias de alimentos investigadas no levantamento, o melhoramento por mutações foi avaliado mais negativamente pelos consumidores. A modificação genética foi avaliada levemente negativa, e o enriquecimento de alimentos, de modo neutro. Ao mesmo tempo, os consumidores sentiram-se menos certos sobre suas atitudes com relação ao melhoramento por mutações e consideravelmente mais certos sobre suas atitudes com relação à modificação genética e ao enriquecimento de alimentos, sugerindo que a incerteza subjetiva sobre a nova tecnologia de alimentos pode ser vista pelos consumidores com um risco em si mesmo.

CONCLUSÕES

Em geral, NOFORISK foi um projeto muito ambicioso, tanto em termos de conceitos como em metodologias com o trabalho a ser feito em tempo curto. O trabalho, entretanto, levou a um número bastante grande de publicações científicas com revisão por pares e teses de doutorado. Não é possível, entretanto, tratar totalmente da segurança, adequação nutritiva e/ou eficácia em relação à saúde em um único estudo com animais e, em segundo lugar, combinar os resultados da avaliação risco/eficácia e da exposição em uma avaliação risco/benefício quantitativa derivada da probabilística exageradamente abrangente. As respostas a essas perguntas ainda são importantes em uma avaliação pré-comercialização e também de grande importância para as atitudes do consumidor quanto à introdução social de novos alimentos no mercado, como pode ser visto nos resultados dos estudos do consumidor.

PRINCIPAIS PUBLICAÇÕES

FRICKE CB., SCHRODER M., POULSEN M., VON BERGMANN K., WESTER I., KNUDSEN I., MORTENSEN A., LUTJOHANN D. (2007). Increased plant sterol and stanol levels in brain of Watanabe rabbits fed rapeseed oil derived plant sterol or stanol esters. *British Journal of Nutrition* 98:890-899

LANGKILDE S., SCHRODER M., STEWART D., MEYER O., CONNER S., DAVIES H., POULSEN M. (2008). Acute toxicity of high doses of the glycoalkaloids, solanine and chaconine, in the Syrian Golden hamster. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:8753-8760.

HEARTY AP., DUFFY E., GIBNEY MJ. (2009). Intake estimates of naturally occurring phytosterols using deterministic and probabilistic methods in a representative Irish population. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 60(6):533-546.

LANGKILDE S., MANDIMIKA T., SCHRODER M., MEYER O., SLOB W., PEIJNENBURG A., POULSEN M. (2009). A 28-day repeat dose toxicity study of steroidal glycoalkaloids, α -solanine and α -chaconine in the Syrian Golden hamster. *Food and Chemical Toxicology*, 47:1099-1108.

HAGEMANN KS., SCHOLDERER J. (2009). Hot Potato: Expert- Consumer Differences in the Perception of a Second- Generation Novel Food. *Risk Analysis*, 29(7):1041-1055.

Biomarcadores para monitoramento pós-comercialização dos efeitos de curto e longo prazo de organismos geneticamente modificados na saúde de animais e humana

Acrônimo GMSAFOOD Acrônimo do Programa FP7-KBBE Número do Contrato 211820 Período August 2008 – July 2011 Website do projeto http://www.gmsafood.org	Coordenador Herbert HONIGSMANN Medizinische Universitaet Wien Spitalgasse 23 A-Wien 1090 Austria Herbert.Hoenigsmann@ meduniwien.ac.at
---	--

<i>Parceiros</i> Helen BARKER Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Canberra (AU) Knut BORVE Norges Veterninaerhogskole, Oslo (NO) Mark RYAN Teagasc – Agriculture and Food Development Authority, Carlow (IE)	Erzsebet NEMEDI Kozponti Elelmsizer Tudomanyi Kutatointezet, Budapest (HU) Nuri AKKAS Troyka Makine Gida Sanayii Danismanlik Ve Pazarlama Ltd Sirketi, Ankara (TR)
---	---

BACKGROUND E OBJETIVOS

A função do monitoramento pós-comercialização é avaliar o potencial nutricional e os efeitos na saúde de alimentos GM autorizados em populações mistas de consumidores humanos e animais.

Atualmente, há pouco conhecimento sobre a previsibilidade de efeitos adversos em seguida à liberação no comércio de alimentos GM. Nossa abordagem é identificar biomarcadores, que poderiam ser usados para prever efeitos danosos dos OGMs após a autorização do produto. De particular interesse é a especulação de alguns interessados que a crescente prevalência de doenças alérgicas em décadas recentes pode estar relacionada com o potencial alergênico dos novos alimentos GM. Por esta razão, os parceiros decidiram focalizar o potencial alergênico dos OGMs em sua abordagem.

Os objetivos do projeto GMSAFOOD são:

- identificar e qualificar biomarcadores para um protótipo alergênico OGM usado como instrumento para o monitoramento pós-mercado de OGMs;
- relacionar esses perfis de biomarcadores aos estágios de desenvolvimento, incluindo gestação, maturação e vida adulta;
- usar biomarcadores para identificar o movimento e os efeitos de OGMs na cadeia alimentar; e
- estabelecer biomarcadores para imunogenicidade e alergenicidade induzidas por OGMs e animais e humanos.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

Para atingir esses objetivos, os parceiros estão usando um alergênico protótipo, o inibidor da α -amilase (AAI) da ervilha GM (*Pisum sativum* L.) que expressa o gene AAI normalmente encontrado no feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L. cv. *Tendergreen*). A enzima α -amilase inserida protege as ervilhas de danos pelo gorgulho (*Bruchus pisorum*), que é uma das principais pragas da cultura da ervilha. De importância, este OGM difere da maioria das plantas GM comercializadas porque a proteína transgênica acumula-se na semente em altas concentrações. Esta nova abordagem à produção de OGMs pode resultar na produção de proteínas transgênicas que são tratadas diferentemente no trato digestivo e pelo sistema imunológico dos animais e do homem. Muitas culturas GM sendo atualmente desenvolvidas com fármacos biológicos, tais com imunoglobulina, estão usando este tipo de metodologia e pouco é conhecido sobre sua segurança. Um OGM autorizado, o milho *Bt*, também será testado neste projeto.

O projeto visa a extrapolar biomarcadores que correlacionam potenciais efeitos de OGMs durante a gestação, o crescimento e a maturidade em vários modelos animais com o do homem. Está estudando porcos, salmões, ratos e camundongos alimentados com OGM durante estados críticos do ciclo de vida, além dos efeitos indiretos da alimentação com GM na cadeia alimentar comparando ratos alimentados com OGMs com ratos alimentados com peixes e carne de porco que foram alimentados com OGM. Para extrapolar os dados para o homem, os parceiros estabeleceram um banco de dados comparativo com epitopos antigênicos e reatividade cruzada de anticorpos em pacientes alérgicos a leguminosas e a quimera humano-camundongo, na qual um sistema imunológico humano foi transplantado em um sistema imunológico ausente em camundongos. Esses experimentos produzirão dados sobre a saúde em geral, com foco específico em alergia e imunologia e estabelecerão a base para uma abordagem para o monitoramento pós-comercialização de OGMs autorizados.

CAPÍTULO 3 – OGMs PARA BIO-MATERIAIS E BIO-COMBUSTÍVEIS — TECNOLOGIAS EMERGENTES 18

Lene LANGE
Professor and
Dean of Research
Aalborg University
Denmark

INTRODUÇÃO

A Europa, por um considerável espaço de tempo, discutiu o melhoramento de culturas baseado em tecnologia OGM. O ceticismo face a essa tecnologia foi mais pronunciado na Europa do que em qualquer outra parte do mundo. A aceitação do consumidor em colocar alimentos OGM na mesa do jantar permaneceu limitada. Entretanto, há dois fatores principais, a saber: emissões de gases com efeito estufa e a depleção de reservas de petróleo de fácil acesso acentuaram a necessidade de soluções mais ambientalmente benignas e sustentáveis, baseadas em produtos e processos biológicos, fornecendo uma nova contribuição às discussões sobre biotecnologia e OGMs na Europa. Interessantemente, a Diretoria Dinamarquesa de Tecnologia documentou, através de uma abordagem de Reunião de Consenso, que o povo dinamarquês permanece não desejando aceitar plantas GM como alimento, mas estava, entretanto, mais aberto para aceitar plantas GM no futuro, proporcionando uma produção mais sustentável e econômica de fármacos e materiais melhorados para fins industriais.

O portfólio de projetos FP7 dentro do campo de biomateriais e tecnologias emergentes constitui-se em um novo capítulo da pesquisa europeia em tecnologias emergentes aplicadas em pesquisas vegetais. Ela focaliza a produção de produtos terapêuticos para o homem em plantas e em fornecer novos materiais vegetais, otimizados para o uso com base de soluções biológicas mais sustentáveis, substituindo materiais baseados em fósseis ou produzindo alternativas para outros recursos naturais escassos. E, importante, em alguns casos, o objetivo pode ser atingido sem projetar uma construção de planta OGM!

A necessidade urgente de culturas melhoradas para alimentar e fornecer combustível para os logo 9 bilhões de pessoas na Terra, juntamente com o crescente conhecimento molecular da biologia da planta, levou a um novo foco em melhoramento de plantas: podemos usar os OGMs como instrumento de pesquisa aplicada para produzir novas culturas que não são OGMs, mas o resultado de melhoramento normal? Os dois projetos, MEIOSYS e RECBREED ambos construídos usando biologia molecular avançada (e.g. estudos de recombinação homóloga e direcionamento de genes – tanto de células somáticas como meióticas) para gerar diversidade que pode ser explorada pelo melhoramento de culturas. Isso poderia servir para acelerar os processos do melhoramento tradicional de culturas, em que o resultado não é um OGM, uma vez que nenhum DNA estranho é inserido.

O projeto FP7 para produção de novas drogas em sistemas de plantas focalizou o grande grupo de metabólitos vegetais, os terpenóides. TERPMED tem por objetivos resolver os três obstáculos mais importantes para o desenvolvimento e a promoção de terpenóides vegetais para a saúde humana: pouca disponibilidade de material vegetal contendo os terpenóides em demanda; concentração baixa demais dos compostos nos materiais vegetais; e dificuldades intrínsecas em obter compostos puros de materiais vegetais. Eles focalizam neste trabalho dois tipos: sesquiterpenos e diterpenos fenólicos (ambos os grupos com alta atividade biológica). O objetivo é melhorar as tecnologias de produção e também fazer novas descobertas para futura

avaliação como novas drogas para a saúde humana. O projeto SMART CELL foca os terpenóides tanto para o câncer como para a malária e tem o objetivo de desenvolver quantidades em maior escala dos terpenóides pela produção em culturas de células e tecidos de pervinca e em novas características de plantas de tabaco OGM.

O projeto PLAPROVA tem o objetivo de melhorar a expressão da proteína heteróloga em plantas. Mais especificamente, pretende refinar as tecnologias de expressão provisórias, capacitando a clonagem e expressão de quantidades em miligramas de novos compostos em apenas duas a três semanas. Tal tecnologia facilitaria a seleção de séries de novos produtos, até aqui não avaliados. Os compostos em foco são proteínas que formam polipéptidos complexos/partículas semelhantes a vírus, possivelmente abrindo o caminho para novos candidatos a vacinas.

O portfólio FP7 de novos materiais vegetais para uso industrial vai de bioenergia a substitutos para a borracha clássica até a novos sistemas de produção para ésteres cerosos. O RENEWALL tem o objetivo de identificar características que produzem paredes celulares de plantas com digestibilidade aumentada, com isso otimizando os níveis de sacarificação, portanto também potencial aumentado para biocombustíveis. O ENERGYPOPLAR visa a identificar materiais vegetais melhorados, fáceis de processar, com alto nível de celulose combinando com baixo nível de lignina. EnergyPoplar expande o foco para também assegurar boa solidez na agricultura, e possivelmente, apropriada a ser feita em terra marginal.

O projeto EU PEARLS do FP7 transformará as plantas que ocorrem naturalmente, que não são usadas para a produção de alimentos, para serem capazes de agir como material inicial para a produção de borracha e látex. A necessidade aumentada de tais materiais, quando substratos baseados em fósseis substitutos da borracha terão que para de serem fabricados, é óbvia. A seringueira será superexplorada e o acesso às quantidades necessárias serão severamente restritos. O projeto ICON é baseado na hipótese de que culturas oleaginosas industriais conhecidas podem ser modificadas, através de apenas duas enzimas, para produzir ésteres cerosos em vez dos triagliceróis normais. Nenhum risco de disseminação para as culturas alimentares é intrínseco.

Como parece, o portfólio do FP7 de projetos em ciência vegetal no campo de novos materiais para uso industrial e farmacêutico tem potencial para criar um real valor para a sociedade: fornecer a base para produtos biológicos e processos biológicos, contribuindo para apresentar soluções para problemas importantes.

O portfólio apóia-se não apenas em ciência vegetal avançada. Ele constitui um portfólio de projetos em que biólogos trabalham junto com engenheiros, assim como doutores em medicina. Além disso, apóia-se na estreita colaboração entre cientistas vegetais e microbiologistas, usando em paralelo tanto plantas (*Arabidopsis*) e espécies fúngicas modelo (*Sacharomyces cerevisiae*). Mais ainda, e mais importante, isso mostra claramente que a genômica, a metabolômica e as tecnologias OGM podem ser usadas com instrumentos de pesquisa em que o produto final não será necessariamente, e apenas se necessário, um OGM. O principal foco das atividades é utilizar a tecnologia de forma mais aplicada. Para todo o portfólio aspectos de bioética, segurança e sustentabilidade foram levados em consideração de maneira integrada, um pré-requisito para ser considerado para financiamento. Ele também indica que a Europa está se movendo para uma fase em que soluções mais sustentáveis a problemas importantes terão de vir de materiais vegetais.

Culturas industriais produzindo óleos com valor agregado para novos produtos químicos

Acrônimo ICON	Coordenador Sten STYMNE
Acrônimo do Programa FP7-KBBE	Swedish University of Agricultural Science
Número do Contrato 211400	Arrheniusplan 2C PO Box 7070
Período Março de 2008 – Fevereiro de 2013	SE-Uppsala – Sweden sten.stymne@ltj.slu.se
Website do projeto http://icon.slu.se/ICON/	

<i>Parceiros</i>	
Cecilia VAG Axel Christiernsson International AB, Nol (SE)	Johnathan NAPIER Rothamsted Research Station, Harpenden (UK)
Peter DENOLF Bayer Crop Science, Geel (BE)	Margit FRENTZEN Aachen University of echnology, Aachen (DE)
Baungquan HUANG Hubei University, Wuhan (CN)	
Antoni BANAS University of Gdansk, Gdansk (PL)	

BACKGROUND E OBJETIVOS

Substituir o óleo fóssil por recursos renováveis é talvez a mais urgente necessidade e a mais desafiante tarefa que a sociedade humana enfrenta hoje. Afinal, a quebra de hidrocarbonetos fósseis, obtendo os produtos químicos desejados com química orgânica avançada geralmente requer muitas vezes mais energia do que é contida no produto final. Portanto, usar material vegetal na indústria química não apenas substitui o material fóssil contido no produto final, mas também economiza substancial energia no processamento.

Os óleos vegetais são de particular interesse para a indústria química porque suas estruturas químicas são muito similares às do óleo fóssil. Os óleos vegetais mostram uma grande variação em sua composição entre diferentes espécies de plantas. Muitas das qualidades dos óleos encontrados em espécies selvagens seriam muito atrativas para a indústria química se pudessem ser obtidos a um custo moderado em grandes quantidades e com um suprimento seguro. A engenharia genética das qualidades do óleo vegetal em culturas de culturas oleaginosas de alta produtividade poderiam gerar tais produtos – e em um espaço de tempo relativamente curto. O projeto ICON visa a desenvolver tais óleos de valor agregado em dedicadas culturas industriais oleaginosas. O resultado do projeto, portanto, economizará energia, protegerá o ambiente e melhorará as economias rurais. Uma vez que as tecnologias GM a serem usadas no projeto são ainda vistas com grande ceticismo na Europa, a palavra-chave de estratégias de comunicação serão transparência e apreço pelas preocupações do público.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

ICON reprojeterá as sementes para produzir óleos ésteres cerosos em vez de óleos triagliceróis comuns. Os ésteres cerosos são muito mais resistentes a altas temperaturas e pressões do que triagliceróis (comumente chamados triglicerídios), tornando-os adequados para lubrificantes em que outros óleos naturais se decompõem. ICON desenvolverá uma gama de diferentes qualidades de ésteres cerosos com diferentes pontos de fusão e outros aspectos para melhorar seu uso como lubrificantes.

Para minimizar o risco de misturar inadvertidamente com sementes com fins alimentares e, para prevenir para qualidades industriais de cruzarem com culturas oleaginosas com fins alimentares, o projeto não usará nenhuma cultura alimentar em suas atividades. Os parceiros usarão duas culturas oleaginosas não-alimentares, *Crambe abyssinica* e *Brassica carinata*, como veículos para as qualidades industriais. Nenhuma dessas duas culturas é usada para consumo humano devido à alta porcentagem de ácido erúxico no óleo da semente. Elas também não e cruzam facilmente com as culturas alimentares *Brassica* relacionadas, tais como *canola* (colza oleaginosa⁰ ou hortaliças *Brassica*. O projeto introduzirá nessas sementes oleaginosas, por engenharia genética, uma enzima chamada FAR (Redutase de Ácidos Graxos) que converte alguns dos ácidos graxos em alcoóis graxos. Uma segunda enzima introduzida, chamada WS (Sintase de Cera) ligará o álcool graxo produzido com outros ácidos graxos, produzindo ésteres cerosos em vez de triacilglicerois nas sementes.

As enzimas FAR e WS ocorrem em todos os tipos de organismos vivos, tais como bactérias, fungos, plantas e animais. Elas podem ter especificidades amplamente diferentes, *i.e.* reagem com diferentes tipos de ácidos graxos e alcoóis graxos. Como o uso de enzimas com especificidades para os tipos de ácido graxo e álcool graxo exigido, e também alterando os tipos de ácidos graxos produzidos na semente, os parceiros desenvolverão uma ampla gama de ceras funcionalmente diferentes adequadas para várias aplicações.

Melhorando as características do álamo para aplicações em energia

<i>Acrônimo</i> ENERGYPOPLAR <i>Acrônimo do Programa</i> FP7-KBBE <i>Número do Contrato</i> 211917 <i>Período</i> Março de 2008 – Fevereiro de 2012 <i>Webside do projeto</i> http://www.energypoplar.eu/	<i>Coordenador</i> Francis MARTIN INRA Rue De L'Universite 147 F-75338 Paris France fmartin@nancy.inra.fr
--	---

<i>Parceiros</i> Ingrid RAGNARSDOTTER Sveriges Lantbruksuniversitet, Uppsala (SE) Klaus PALME Albert-Ludwigs-Universitaet Freiburg, Freiburg (DE) Wim GOEMAERE Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology, Zwijnaarde (BE) Richard TROWBRIDGE University of Southampton (UK) Raffaele TESTOLIN Associazione Istituto di Genomica Applicata, Udine (IT)	Ute KROEKEL Georg-August-Universitaet Goettingen Stiftung Oeffentlichen Sechts, Gottingen (DE) Magnus HERTZBERG Swetree Technologies ab – stt, Umea (SE) Brooke ALASYA Imperial College of Science, Technology and Medicine, South Kensington (UK) Luc OZANNE INRA Transfert s.a., Paris (FR)
---	--

BACKGROUND E OBJETIVOS

Com a crescente demanda mundial por energia, combustíveis líquidos derivados de biomassa lignocelulósica oferecem uma alternativa importante aos combustíveis fósseis convencionais. Biocombustíveis, tais como etanol, podem minimizar a dependência da importação de energia, reduzir os gases do efeito estufa e contribuir para o desenvolvimento da agricultura. O bio-etanol pode ser produzido da celulose, um açúcar presente na parede celular de plantas lenhosas. Árvores, em particular o álamo (*Populus*), são atraentes culturas para bioetanol de “segunda geração” que podem crescer com custos reduzidos em solos marginais inadequados para culturas alimentares.

O ENERGYPOPLAR visa a desenvolver novas árvores de álamo tanto com as características da parede celular como alta biomassa para uso como uma fonte eficiente, renovável e sustentável de matéria-prima lignocelulósica para a produção industrial de bioetanol. Para atingir essa meta, o projeto irá:

- estudar os mecanismos genéticos a) determinar produtividade otimizada em *Populus* e b) controlar a síntese dos polissacarídeos da parede celular e lignina para produzir álamos com “alta celulose/baixa lignina” para um potencial de sacarificação melhorada (a conversão da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentáveis é chamada de sacarificação);
- desenvolver ensaios de alta produtividade para qualidade lignocelulósica e potencial de sacarificação lignocelulósica;

- estabelecer uma plataforma para descoberta rápida de genes e testes para identificar novos genes que controlam características de interesse;
- criar um canal de produção de árvores de álamo melhoradas portando características de interesse e começar o processo de comercialização;
- estabelecer instrumentos para avaliações de sustentabilidade ambiental de sistemas de cultivo de álamos SRC *Populus* com respeito à diversidade microbiana do solo, mitigação dos gases estufa, água e outros insumo relevantes para uma mudança climática;
- promover ativamente a transferência de tecnologia e materiais biológicos para comercialização para companhias de bioenergia, melhoradores vegetais, setor florestal europeu, cientistas, responsáveis pelas políticas e consumidores.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

O projeto ENERGYPOPLAR estabelecerá testes de campo sob cultura de curta rotação como para poda (SRC) com álamos transgênicos existentes que contêm menos lignina. SRC é um método de cultivo no qual as árvores são plantadas em alta densidade para maximizar a produção de biomassa (~15.000 árvores por /ha). Uma vez que lignina é o principal fator que limita a sacarificação, os parceiros escolheram os álamos transgênicos com baixo conteúdo de lignina. Essas árvores contêm genes silenciados ou contrasentido regulados para baixo envolvidos na rota da biossíntese de lignina, tais como CAD, COMT, CCR e CCoAOMT.

O projeto também desenvolverá novos álamos transgênicos combinando genes que melhoram a produtividade com genes que reduzem lignina. Um aumento em biomassa e modificações no polímero lignina pode ser atingido independentemente, seguindo manipulações de um único gene em álamos transgênicos. Novas linhagens transgênicas estão sendo obtidas pelo acúmulo de genes. Os genes usados são CAD, F5H, 4CL, CCR (modificação de lignina) e GS, CEL1, GA20-oxidase (biomassa aumentada).

Finalmente, o projeto identificará novos genes envolvidos na formação da madeira para estudar seu papel biológico alterando sua expressão no álamo transgênico e para investigar seu potencial para melhores da qualidade da madeira.

Como resultado, o ENERGYPOPLAR irá:

- melhorar o conhecimento da estrutura da parede celular e desenvolver árvores com “baixa lignina/alta celulose” com maior eficiência no uso de nutrientes;
- desenvolver álamos como um sistema SRC de cultura, adequado para Implementação em larga escala na Europa em área pouco prováveis de serem usadas para produção de culturas alimentares;
- promover sustentabilidade ambiental de novas plantações para energia na Europa.

Projeto racional de sistemas de plantas para a geração de produtos industriais com valor agregado

<i>Acrônimo</i> SMARTCELL <i>Acrônimo do Programa</i> FP7-KBBE <i>Número do Contrato</i> 222716 <i>Período</i> Janeiro de 2009 – Dezembro de 2012 <i>Website do projeto</i> http://www.smart-cell.org/	<i>Coordenador</i> Kirsi-Marja OKSMANCALENTEY VTT Technical Research Centre of Finland Vuorimiehentie PO Box 1000 Finland kirsi-marja.oksman@vtt.fi
--	--

<i>Parceiros</i> Alain GOOSSENS VIB Gent (BE) Robert VERPOORTE The Institute of Biology Leiden (NL) Josep M. SENTIS SUNE Universidad de Lleida (ES) Stefan SCHILLBERG Fraunhofer IME Forschung (DE) Enrico MARTINOIA University of Zurich (CH) Marc BOUTRY Universite Catholique de Louvain (BE) Denis FIX Centre National de La Recherche Scientifique, Paris (FR) Regine EIBL Zurich University of Applied Sciences (CH) Anne OSBOURN John Innes Centre, Norwich (UK)	Barbara Ann HALKIER Copenhagen University (DK) Alisdair FERNIE Max Planck Institut fur Molekulare Pflanzenphysiologie, Munchen (DE) Lee SWEETLOVE University of Oxford (UK) Harro J. BOUWMEESTER Wageningen University (NL) Frederic BOURGAUD Plant Advanced Technologies SAS, Vandoeuvre (FR) Jan PEN SoluCel Ltd, Espoo (FI) Markus KLEIN Philip Morris Products SA, R&D, Neuchatel (CH) Ronald MACIAK Dow Agrosience LLC, Indianapolis (US)
--	--

BACKGROUND E OBJETIVOS

SMARTCELL é um projeto colaborativo com quatro anos de idade que visa obter um conhecimento secundário do metabolismo em plantas e usar esse conhecimento para desenvolver plantas que produzam moléculas de valor, tais como fármacos, de uma maneira sustentável. Mais de um quarto de todos os ingredientes ativos nos medicamentos atuais foram originados de plantas e, em muitos casos eles ainda são extraídos de material vegetal porque são complexos demais para a síntese química. Infelizmente, os mais úteis tendem a ser sintetizados em minúsculas quantidades entre muitas moléculas similares, sendo, portanto, difíceis e dispendiosos para isolar e purificar de plantas cultivadas.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

O projeto SMARTCELL focalizará uma rota metabólica – a rota do terpenóide – que dá origem a uma ampla gama de moléculas úteis, incluindo as drogas anticâncer paclitaxel, vinblastine e vincristine, e a droga antimalárica artemisinina. Estudando como as enzimas e os genes correspondentes são controlados, o SmartCell visa estabelecer novos modos de modificar células vegetais e desenvolvê-las em Fábricas Verdes produzindo moléculas específicas valiosas. Para atingir essas metas, o projeto desenvolverá a descoberta de novos genes, transformação de multigenes e métodos de clonagem, e transferirá combinações de genes para plantas para equipá-las para a produção de terpenóides específicos.

O componente de engenharia do projeto será complementado por um componente analítico, que usará métodos sofisticados para avaliar as plantas modificadas e determinará quais metabólitos serão produzidos. O projeto focalizará duas espécies: pervinca e fumo. As plantas de pervinca (*Catharanthus roseus*) já produzem terpenóides úteis, tais como vinblastine e vincristine, mais em níveis tão baixos que toneladas de biomassa devem ser coletadas para isolar uma única grama do produto. Aqui a meta será usar culturas de células e tecidos (e.g. raízes pilosas, que crescerão indefinidamente em cultura) para aumentar a produção dessas moléculas valiosas e desenvolver culturas em larga escala que atendam às necessidades da indústria manufatureira.

O fumo (*Nicotiana tabacum*) não produz os mesmos terpenóides como a pervinca, mas a planta cresce rapidamente e produz grande quantidade de biomassa em curto espaço de tempo, tornando-a útil para produção em larga escala. Aqui a meta é introduzir genes que conferem ao fumo a capacidade de produzir novas moléculas de terpenóides, e então explorar seu crescimento prodigioso para fazer uma produção econômica e sustentável. O fumo também é muito conveniente para transformação genética e cresce bem em qualquer lugar do mundo, fazendo dele uma plataforma altamente versátil e transferível.

Assim como fazer engenharia metabólica em plantas muito além do estado da arte, o SMARTCELL também irá gerar um conhecimento secundário compreensivo que irá aumentar a competitividade da P&D da Europa pela geração de um ambiente positivo para a acumulação de nova propriedade intelectual. SMARTCELL também reservou fundos para encorajar a disseminação e atividades de longo alcance para promover o projeto e um interesse em ciência em geral. As atividades de longo alcance incluem um website de acesso aberto (<http://www.smart-cell.org>), e iniciativas envolvendo o SAW Trust (<http://www.sawtrust.org>), que promove ciência em escolas ensinando as crianças a apreciar a ciência através da arte e escrita.

Análise sistemática de fatores que controlam a recombinação meiótica em plantas superiores

<i>Acrônimo</i> MEIOSYS <i>Acrônimo do Programa</i> FP7-KBBE <i>Número do Contrato</i> 222883 <i>Website do projeto</i> www.meiosys.org	<i>Período</i> Julho de 2009 – Junho de 2014 <i>Coordenador</i> Dr Sue ARMSTRONG and Prof Chris FRANKLIN University of Birmingham
--	--

<i>Parceiros</i> Peter SCHLOGELHOFER University Vienna (AT) Karl MECHTLER Research Institute of Molecular Pathology, Vienna (AT) Dr Raphael MERCIER/ Dr Christine MEZARD Institut National de la Recherche Agronomique, Versailles (FR) Marie-Pascale DOUTRIAUX Universite Paris XI (FR)	Juan L SANTOS Universidad Complutense de Madrid (ES) Clara CONICELLA Consiglio Nazionale delle Ricerche – IGV (IT) Tom GERATS Radboud Universiteit Nijmegen (NL) Robbie WAUGH Scottish Crop Research Institute (UK)
--	--

BACKGROUND E OBJETIVOS

Cereais e outras culturas vegetais tiveram um papel preponderante no atendimento às demandas de alimentos da humanidade nos últimos dez milênios. Hoje, as plantas são o coração da indústria de alimentos europeia com uma produção anual de mais de 1 trilhão de euros. O melhoramento intensivo aumentou a produtividade, qualidade e resistência a estresse das plantas, mas previsões atuais sugerem que, com o crescimento da população e a mudança climática nos próximos 50 anos, teremos que produzir mais alimento do que foi criado nos últimos 10 mil anos. Para conseguir isso, precisaremos adotar abordagens ainda mais novas de melhoramento de plantas, incluindo o desenvolvimento de culturas ajustadas a populações individuais do mundo. Uma chave do sucesso pode ser a exploração mais efetiva da diversidade genética natural.

A meiose, que é a base da reprodução sexual nas plantas e animais, é essencial para a transmissão precisa dos cromossomos de uma geração para a outra. Acreditamos que desenvolvimentos em genômica, bioinformática e modelagem de sistemas, em conjunção com análise funcional, fornecem uma oportunidade especial para um novo patamar no conhecimento sobre como a meiose é controlada na planta modelo *Arabidopsis* e aplicar esse conhecimento em espécies cultivadas.

O projeto MEIOSYS é a primeira abordagem combinatorial totalmente integrada da análise dos genes/proteínas que baseiam a meiose nas plantas. Reunindo nove participantes europeus, ele visa a capacitar os programas de melhoramentos de culturas, domesticação de novas culturas e inovação industrial pelo desenvolvimento –

sem modificação genética – a estratégia mais avançada para acelerar o melhoramento tradicional.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

O projeto MEIOSYS pretende criar um modelo preditivo, compreensivo das redes gene/proteína responsáveis pela distribuição controlada de eventos de recombinação homóloga durante a meiose de planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Estes dados formarão a base para a manipulação da frequência e distribuição da recombinação genética (CO) em cevada e brassica – duas das mais importantes espécies de culturas na UE. Usando uma abordagem integrada baseada na especialização complementar dos membros do consórcio, visamos a elucidar as redes de genes/proteínas que são a base da recombinação meiótica e seu controle através de uma combinação de sistemas biológicos e abordagens genômicas. Nossos cientistas determinarão o papel funcional de novas proteínas meióticas e suas interações com os componentes da maquinaria de recombinação. O projeto investigará o padrão da distribuição “ponto quente” de recombinação e estabelecerá seu inter-relacionamento com a organização cromossômica para atingir um modelo compreensivo, no nível de sistemas da rede gene/proteína que controla a frequência e a distribuição das recombinações genéticas nas plantas. Os membros irão validar as previsões que surjam da modelagem da rede em *Arabidopsis* nas importantes culturas da UE, cevada de brassica. Linhagens da cultura mostrando recombinação modificada serão então regeneradas.

O projeto MEIOSYS pretende entregar a tecnologia necessária para fornecer um sistema eficiente para modular a recombinação em plantas de culturas. Os benefícios incluirão aumentar a margem de competitividade para os melhoradores de plantas e da pesquisa europeia, com a geração e disseminação do melhor conhecimento científico da recombinação meiótica. Ao fornecer uma base sólida para a futura pesquisa nessa arena, o projeto também irá produzir significativos benefícios tecnológicos, sociais e ambientais.

Recombinação: um velho e novo instrumento para o melhoramento de plantas

<i>Acrônimo</i> RECBREED <i>Acrônimo do Programa</i> FP7-KBBE <i>Número do Contrato</i> 227190 <i>Período</i> Março de 2009 – Fevereiro de 2013 <i>Website do projeto</i> http://recbreed.eu	<i>Coordenador</i> Holger PUCHTA Universität Karlsruhe Kaiserstrasse 12 D-76131 Karlsruhe Germany holger.puchta@bio.uka.de
--	--

<i>Parceiros</i> Avraham LEVY The Weizmann Institute of Science, Rehovot (IL) Charles WHITE CNRS, Clermont-Ferrand (FR) Jerzy PASZKOWSKI University of Geneva (CH) Paul HOOYKAAS Leiden University (NL)	Michiel DE BOTH Keygene, Wageningen (NL) Wyatt PAUL Biogemma, Clermont-Ferrand (FR) Pnina DAN OSM-DAN Ltd, Rehovot (IL)
--	--

BACKGROUND E OBJETIVOS

O melhoramento de plantas sempre dependeu da recombinação homóloga (HR) para gerar a variação necessária para desenvolver novas variedades. O objetivo da atual proposta é melhorar a pesquisa de melhoramento, aumentando as taxas de HR em células somáticas e meióticas. Os resultados esperados de tal aumento são o estabelecimento de uma eficiente tecnologia de direcionamento gênico (GT) para engenharia precisa de genomas de plantas e aumentar a taxa de recombinação meiótica entre cromossomos.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

Há muitos fatores da maquinaria de HR que são comuns a células somáticas e meióticas. Isso permite que ambos objetivos possam ser tratados de um modo sinérgico. A HR pode ser dividida em diferentes passos: a iniciação, por quebras na dupla fita (DSBs), seguida de remodelação da cromatina, invasão da sequência homóloga e a resolução dos intermediários da recombinação. Cada um desses estágios contém um gargalo de HR que iremos tratar aqui.

O Bloco de Trabalho (WP) 1 visará ao aumento de GT e HR meiótica através de indução DSB direcionada. DSBs será induzida por nucleases zinc-finger que podem ser feitas sob encomenda para sequências alvo em qualquer lugar do genoma.

No WP 2, testaremos a influência dos fatores HR envolvidos na invasão homóloga ou modulação da estrutura de cromatina em GT e HR meiótica. Isso inclui homólogos RAD51, genes que afetam a metilação da citosina, estrutura da cromatina e o reparo de desenparceamento, o que influencia a recombinação entre sequências divergentes.

No WP 3 iremos nos concentrar nos fatores envolvidos na promoção da recombinação e resolvasas, tais como homólogos Mus81, Xpf/Ercc1 e Xrcc3-Rad51C.

No WP 4 será estudado o efeito combinado da remoção de gargalos como encontrados nos primeiros três WPs. A maior parte dos experimentos será executada com a planta modelo *Arabidopsis* e implementada pela indústria em culturas tais como tomate e milho para garantir rápida aplicabilidade para o melhoramento.

Terpenóides de plantas para a saúde humana: uma abordagem química e genômica para identificar e produzir compostos bio-ativos

<i>Acrônimo</i> TERPMED <i>Acrônimo do Programa</i> FP7-KBBE <i>Número do Contrato</i> 227448 <i>Período</i> Junho de 2009 – Maio de 2013 <i>Website do projeto</i> http://www.terpmed.eu/	<i>Coordenador</i> Albert FERRER Universitat de Barcelona Gran Via de les Corts Catalanes 585 ES-08007 Barcelona Spain albertferrer@ub.edu
--	---

<i>Parceiros</i> Harro BOUWMEESTER Wageningen Universiteit (NL) Christof KERSCH Prisna bv, Weesp (NL) Milica DJORDJEVIC Institut Za Bioloska Istrazivanja, Belgrade (RS) Christina BESTA Aristotelio Panepistimio Thessalonikis (EL)	Jeffrey A. JOHNSON University of Wisconsin- Madison (US) Leny VERSTEEG Plant research international b.v., Wageningen (NL)
--	--

BACKGROUND E OBJETIVOS

Metabólitos secundários de plantas são fonte de grande número de compostos biologicamente ativos; de fato, muitos das drogas terapêuticas hoje usadas são derivadas de plantas ou desenvolvidas a partir de um composto originalmente de plantas. O projeto TERPMED é devotado a terpenóides de plantas, que são o maior e quimicamente mais diverso grupo de produtos naturais de plantas, com mais de 25 mil compostos até agora identificados. Essa enorme diversidade química é, entretanto, pouco explorada para o desenvolvimento de novas drogas devido a várias razões, tais como pouca disponibilidade do material vegetal fonte, concentrações baixas demais no material vegetal e dificuldades em isolar compostos puros. Este projeto é dirigido para fornecer soluções para superar essas dificuldades para duas classes de terpenóides de plantas, portanto grupos químicos funcionais específicos, sesquiterpeno lactonas e diterpenos fenólicos. Essas duas classes de terpenóides foram escolhidas por causa de seu alto potencial de novas drogas para humanos para tratamento do câncer e distúrbios do sistema nervoso central, e há evidências que os grupos butirolactona e fenólico são responsáveis em parte pela atividade biológica desses compostos.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

O desenvolvimento de tecnologias genômicas e metabolômicas tornou agora possível trazer o campo dos produtos naturais vegetais para o século XXI e substituir o achado serendípico e ao acaso pelo projeto racional e a descoberta. O projeto TERPMED desenvolverá a tecnologia exigida para atingir esta meta. Usando uma combinação de metabolômica comparativa e genômica, o projeto contribuirá para o entendimento das rotas de biossíntese das classes de terpenos acima citadas. Para essa finalidade, os parceiros desenvolverão métodos de seleção analíticos eficientes e robustos para

detectar e identificar terpenóides, portanto os grupos funcionais – butirolactona e fenólico.

Procedimentos de extração e purificação serão estabelecidos em escala de laboratório para isolar esses compostos para subsequente caracterização estrutural e funcional. Essas seleções baseadas em funções levarão ao estabelecimento de uma compreensiva biblioteca de compostos de um subgrupo de espécies e variedades de plantas selecionadas. Os compostos mais representativos serão testados para atividade biológica e as moléculas mais ativas serão selecionadas. Em paralelo, será executado o sequenciamento em larga escala de cDNAs de tecidos produzindo e não produzindo de um número de planta selecionadas pela sua capacidade de produzir os compostos alvo. Será usado um sequenciamento de cDNA de alta produtividade, em conjunto com análises do perfil metabólico das espécies alvo para elucidação da rota biossintética que leva a esses compostos.

Os genes descobertos serão usados para aumentar a produção de compostos contendo os grupos funcionais -butirolactona e fenólico, mas também para gerar novas moléculas funcionais através de biossíntese combinatória. Plataformas de produção de plantas inovadoras usando órgãos de secreção tais como os tricomas e culturas de órgãos *in vitro* serão testadas para produção eficiente dos compostos mais promissores identificados. Os procedimentos de extração e purificação em escala semi-industrial serão desenvolvidos para isolar os compostos bioativos dessas plataformas de produção. Em resumo, o projeto TERPMED levará à produção melhorada das moléculas ativas conhecidas biologicamente e à descoberta de novas moléculas bioativas. O projeto também irá gerar a tecnologia para produzir e isolar esses compostos de hospedeiros vegetais heterólogos geneticamente modificados.

Melhorando as paredes celulares vegetais para uso como matéria-prima industrial renovável

<i>Acrônimo</i> RENEWAL <i>Acrônimo do Programa</i> FP7-KBBE <i>Número do Contrato</i> 211982 <i>Período</i> Agosto de 2008 – Julho de 2012 <i>Website do projeto</i> http://www.york.ac.uk/org/cnap/Renewall	<i>Coordenador</i> Simon MCQUEEN-MASON University of York Heslington GB-York, YO10 5DD United Kingdom sjmm1@york.ac.uk
--	---

<i>Parceiros</i> James HOUSTON University of Dundee (UK) Anna HALDRUP Kobenhavns Universitet (DK) Ake ERIKSSON Kungliga Tekniska Hoegskolan, Stockholm (SE) Herman HOFTE Institut National de la Recherche Agronomique, Paris (FR) Amanda GREGORY University of Newcastle Upon Tyne (UK) Henrik WREM Aarhus Universitet (DK) Deborah GOFFNER Universite Paul Sabatier Toulouse III (FR) Dawn BARKER The Chancellor, Masters and Scholars of the University of Cambridge (UK)	Kerry CHANTREY The University of Manchester (UK) Ingrid RAGNARSDOTTER Sveriges Lantbruksuniversitet, Uppsala (SE) Win GOEMACIE VIB, Zwijnaarde (BE) Hinrich HARLING KWS SAAT AG, Einbeck (DE) Adam WALKE Bioniqs Limited, York (UK) Magnus HERTZBERG Swetree Technologies Ab, Umea (SE) Thomas DIDION DLF- Trifolium A/S, Roskilde (DK) Martha STEINBOCK United States Department of Agriculture, Washington (US) Kimberly HAYES Cornell University, Ithaca (US)
---	--

BACKGROUND E OBJETIVOS

A necessidade de energia renovável e matérias-primas para a indústria e a sociedade tornou-se um sério problema. A dependência de uma população mundial urbanizando-se e industrializando-se rapidamente em combustíveis fósseis é claramente insustentável, devido à reservas decrescentes e ao impacto dos gases estufa no clima global. As economias industriais também estão crescentemente preocupadas com a estabilidade e segurança do suprimento de combustíveis. Combustíveis para transporte derivados de petróleo respondem por mais de 30% do consumo de energia da UE. Biocombustíveis líquidos, tais como bioetanol (produzido pela fermentação de açúcares derivados de plantas) e biodiesel (produzido por óleos animais ou vegetais) oferecem uma alternativa renovável para combustíveis líquidos para transporte e tem o potencial de diminuir a dependência dos membros da UE em importações de petróleo. A produção de bioetanol está aumentando no mundo todo, mas a expansão

da produção atual a partir da cana de açúcar, beterraba açucareira ou grãos de cereais põe pressão sobre os suprimentos mundiais de alimentos e preços. O desenvolvimento de biocombustíveis de “segunda geração”, que possam ser feitos de biomassa vegetal de baixo insumo e não alimentar, pode aliviar a dependência no petróleo em um modo sustentável e neutro em carbono sem colocar mais pressão no suprimento de alimentos.

Biomassa vegetal (ou ‘*lignocelulose*’) é uma das maiores reservas não aproveitadas do planeta e na maior parte composta de paredes celulares. Polímeros polissacarídeos ricos em energia são cerca de 75% das paredes celulares das plantas e podem ser quebradas para produzir açúcares que podem ser fermentados para produzir bioetanol e outros produtos. Um valor maior ainda pode ser acrescentado usando sistemas de processamento integrado que permitem que múltiplos produtos possam ser obtidos da mesma biomassa – o conceito de biorrefinaria. Entretanto, a completa estrutura das paredes celulares, de uma rede de microfibrilas de celulose e matriz de polissacarídeos incrustados pelo polímero fenólico lignina, torna-as muito resistentes à degradação. Melhorar a facilidade e produtividade da sacarificação da parede celular (conversão a açúcar) representa o maior obstáculo tecnológico a ser superado antes que a visão completa de uma biorrefinaria movida a plantas possa ser concretizada.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

A meta do RENEWALL é fazer avanços em nosso entendimento sobre as paredes das células vegetais e usar esse conhecimento para desenvolver novas estratégias para o melhoramento de plantas com valor agregado com propriedades modificadas da parede celular que são mais adequadas para a biorrefinaria. O projeto fará isso identificando as barreiras moleculares à digestibilidade, e os genes que possam ser manipulados para diminuir essas barreiras: esses podem ser os genes das plantas envolvidos na biossíntese da parede celular ou outros genes (frequentemente microbianos) que podem modificar as propriedades da parede ou degradar polímeros da parede quando expressos em plantas. Esses genes podem ser usados diretamente em abordagens GM para obter matéria-prima vegetal para biorrefinar, ou usá-los como marcadores para melhorar culturas por abordagens convencionais de melhoramento.

O projeto reúne cientistas líderes em parede celulares vegetais, juntamente com especialistas na área de enzimas microbianas para a degradação da parede celular, e melhoradores de culturas e engenheiros genéticos com interesses em biomassas de culturas. Entre eles, os cientistas de parede celular trazem uma experiência profunda e recursos na área da estrutura da parede celular e biossíntese, que não havia antes sido focada na busca de entendimento e melhoramento da degradação da parede celular.

Durante o primeiro ano, o projeto desenvolveu um grupo de novas ferramentas analíticas com as quais medir a digestibilidade da parede das células vegetais. Elas incluem um sistema robótico de alta produtividade para identificar plantas com digestibilidade alterada em grandes populações de plantas e, um sistema reator para análises mais detalhadas de planta com digestibilidade alterada. A parceria produziu uma ampla gama de material vegetal para análise de digestibilidade, e dados preliminares já identificaram plantas com conteúdo de lignina modificado que mostra mais que o dobro da facilidade com que os açúcares podem ser liberados.

Produção e exploração de fontes alternativas de borracha e látex baseadas na UE

<i>Acrônimo</i> EU-PEARLS <i>Acrônimo do Programa</i> FP7-KBE <i>Número do Contrato</i> 212827 <i>Período</i> April 2008 – March 2012 <i>Website do projeto</i> http://www.eu-pearls.eu/	<i>Coordenador</i> Hans MOOIBROEK Agrotechnology and Food Innovation BV Bornsesteeg 59 NL-Wageningen 6708 PD The Netherlands hans.mooibroek@wur.nl/ UK
--	--

<i>Parceiros</i> Andries KOOPS Plant Research International b.v., Wageningen (NL) Peter VAN DIJK KEYGENE NV, Wageningen (NL) Katharina STEINBERG Westfaelische Wilhelms- Universitaet Muenster (DE) Yves POIRIER Universite de Lausanne (CH) Jeffrey MARTIN Yules Corporation, Maricopa (US) Jaroslav NOVOTNY Botanicky Ustav AVCR, Pruhonice (CZ) Enrique RITTER Instituto Vasco de Investigacion y Desarrollo Agrario Neiker SA, Vizcaya (ES)	Kamila MAGZIEVA Uchrezhdenie Centr Ekologicheskaya Rekonstruktsiya, Almaty (KZ) Jacques NOLIN Centre de Cooperation International en Recherche Agronomique pour le Developpement, Paris (FR) Berend BLOKHUIS Vredestein Banden Bv, Enschede (NL) Peter SCHEEPERS Stramproy Contracting BV, Stramproy (NL)
--	---

BACKGROUND E OBJETVOS

A borracha natural é um material amplamente usado, essencial na indústria, medicina, transporte e defesa, cuja principal fonte é a seringueira *Hevea brasiliensis*, sustentável e ambientalmente benéfica. Entretanto, a demanda mundial crescente de borracha natural e látex significa que fontes alternativas sustentável são urgentemente requeridas. Para responder a esse desafio, os parceiros criaram uma rede que liga todos os interessados envolvidos no desenvolvimento e uso sustentável de *Parthenium argentatum* (guayule) e *Taraxacum koksaghyz* (dente de leão Russo) como fontes alternativas de borracha e látex na UE. O desempenho técnico e econômico do látex e da borracha extraídos dessas plantas vai ser avaliado com a produção de protótipos específicos, tais com luvas cirúrgicas e pneus.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

Para garantir o desenvolvimento sustentável e a exploração de ambas as culturas através da cadeia de agregação de valor, o projeto inclui pesquisa na coleta e criação de novo germoplasma, bioquímica e genética, agronomia, processamento e desenvolvimento de produto. A rota biossintética completa da borracha será analisada e gargalos potenciais serão identificados e evitados através de melhoramento convencional direcionado. Os genes envolvidos na biossíntese da borracha serão mapeados, ajudando a acelerar as estratégias de melhoramento para gerar plantas com produtividades de borracha comercialmente viáveis. Tais plantas serão testadas para crescimento eficiente e produção de borracha no campo, sob diferentes condições climáticas e edáficas na Europa.

Uma vez que se prevê que o melhoramentos de características múltiplas será necessário para obter sistemas de produção economicamente viável para ambas as culturas, o projeto inclui estratégias de cruzamentos clássicos e novo melhoramento baseado em genômica e assistido por marcadores e mutagênese direcionada (variante TILLING), em vez da produção de culturas transgênicas cultivadas no campo. Devido à alta desregulamentação de custos e da política da UE, não serão usados transgênicos no melhoramento das culturas para borracha da Europa. Isso contrasta com o programa americano para borracha.

Entretanto, como o dente de leão russo pode ser hibridizado com outras espécies de dente de leão, a transformação de genes da síntese da borracha é uma forma de *cis*gênese. *Cis*gênese é, portanto, uma opção para futuro melhoramento quando as regulamentações da UE para *cis*-gênese se tornarem menos estritas. As características a serem tratadas em algum ponto durante todo o programa de melhoramento e esperado para durar por um período mais longo que os quatro anos da vida do projeto incluem:

- vigor de crescimento para produção aumentada de biomassa total;
- desempenho agrônômico;
- morfologia da raiz (dente de leão russo, borracha somente nas raízes, colheita mais fácil);
- conteúdo de látex e borracha;
- regulação para baixo das rotas bioquímicas competidoras(e.g. esteróis ou terpenos indesejados);
- propriedades poliméricas da borracha e distribuição de tamanho;
- ausência de proteínas alergênicas no látex;
- superar a necessidade de indução pelo frio da síntese da borracha (guayule);
- tolerância a sal (guayule);
- tolerância ao frio (guayule).

Para apoiar e acelerar as estratégias do melhoramento e promover o entendimento da biossíntese da borracha, a planta modelo *Arabidopsis thaliana* e o fermento de pão *Saccharomyces cerevisiae* são parte do programa para identificar e avaliar os papéis de genes chave envolvidos na acumulação de acetil-CoA, em determinar o fluxo através da rota bioquímica do mevalonato e, finalmente, na (iniciação de) polimerização de unidades de IPP e GGPP a (poli) –isoprenos de cadeia longa. Serão usadas sequências de DNA envolvidas para apoiar as estratégias de melhoramento para guayule e dente de leão russo.

Produção de vacinas em plantas

<i>Acrônimo</i> PLAPROVA <i>Acrônimo do Programa</i> FP-KBBE <i>Número do Contrato</i> 227056 <i>Período</i> Janeiro de 2009 – Dezembro de 2011 <i>Webside do projeto</i> http://www.plaprova.eu/	<i>Coordenador</i> Mary ANDERSON John Innes Centre Norwich Research Park Colney GB-Norwich NR4 7UH United Kingdom mary.anderson@bbsrc.ac.uk
--	--

<i>Parceiros</i> Neil HATTERSLEY Scottish Crop Research Institute, Dundee (UK) Ruddie JULLENS Wageningen Universiteit (NL) Carlos Manuel ABAD RUIZ Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid (ES) Concetta MOTTURA Consiglio Nazionale Delle Ricerche, Rome (IT) Ivan MINKOV University of Plovdiv (BG) Sue CUSTERS University of Cape Town (ZA)	Nikolay RAVIN Centre Bioengineering of the Russian academy of sciences, Moscow (RU) Joseph ATABEKOV Moscow Lomonosov State University, Biological Faculty, Moscow (RU) Liudmila TSYBALOVA Research Institute of Influenza of Russian Academy of Medical Science, Saint-Petersbourg (RU) Vladimir BORISOV FGI Federal Centre for Animal Health, Vladimir (RU)
--	--

BACKGROUND E OBJETIVOS

O uso de plantas como biorreatores para a produção de fármacos acha-se numa encruzilhada. Por um lado, nos últimos cinco anos houve consideráveis avanços nas tecnologias para a expressão de proteínas e sua extração em uma forma ativa das plantas. Isso culminou em 2006 com a obtenção pela Dow Agrosience de uma aprovação regulamentar para uma vacina expressa em plantas contra a doença aviária Newcastle. Por outro lado, a maior parte dos sucessos recentes relacionou-se com a produção de antígenos e anticorpos bem caracterizados que já foram produzidos usando métodos previamente estabelecidos, como cultura de células de mamíferos.

Do ponto de vista científico, essa abordagem claramente fez sentido, sendo importante estabelecer o princípio que os fármacos produzidos em plantas são comparáveis em segurança e eficácia aos seus correspondentes produzidos convencionalmente. Mais ainda, dados os intervalos associados com as linhas de produção de plantas transformadas estavelmente, era essencial que as proteínas com propriedades farmacológicas previamente caracterizadas fossem expressas, uma vez que poucas candidatas poderiam ser examinadas. O lado mau, entretanto, é que as proteínas expressas em plantas, que estão mais desenvolvidas e, em alguns casos, sendo submetidas testes clínicos, estarão em competição direta com os produtos existentes.

É claro agora que, para as plantas concretizarem seu potencial como meios de produzir proteínas farmacêuticas, é imperativo que sejam desenvolvidos métodos para a produção rápida e caracterização da proteínas expressas em plantas. Isso é particularmente importante para os casos em que não são atualmente possíveis e/ou prático produzir a proteína por outros modos. Nesses casos, provavelmente existem muito menos informações preexistente disponíveis sobre a eficácia do produto final, e será essencial que as propriedades de um número de variantes possam ser rapidamente avaliadas para determinar quais são as mais adequadas para posterior desenvolvimento. Transformação genética estável (nuclear ou plastídica) é inadequada para esses estudos em vista do tempo gasto para obter a expressão.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

É uma das principais metas deste projeto refinar as tecnologias de expressão provisórias de modo que possam produzir suficiente material em um espaço de tempo suficientemente curto para permitir estudos farmacológicos de um grande número de variantes de candidatos a vacina a serem examinados. Isso permite a otimização de métodos de apresentação de antígenos de uma variedade de diferentes imunogênicos potenciais. Uma particular vantagem da abordagem transitória é que as produtividades podem facilmente alcançar 10-30% de TSP. Mais ainda, esses altos níveis de expressão podem ser atingidos em poucos dias.

Usando sistemas de expressão transitórios, o consórcio pode ir da clonagem de construções à expressão de quantidades em miligramas de imunogênicos dentro de duas a três semanas. Essa velocidade significa que uma ampla gama de candidatos a vacina pode ser selecionada em pouco tempo. Dessa forma, o consórcio PLAPROVA é capaz de avaliar vacinas potenciais contra um número de doenças de grande e crescente importância tanto na UE como na Rússia.

O consórcio está se concentrando na expressão de proteínas que formam polipeptídeos complexos ou partículas semelhantes a vírus. Devido às suas propriedades imunológicas, elas são particularmente adequadas a candidatas a vacinas.

Capítulo 4 – Avaliação e manejo de risco – Política de apoio e comunicação

Prof. Dr. Joachim SCHIEMANN
Julius Kuhn Institute (JKI)
Federal Research Centre for Cultivated Plants
Head of the Institute For Biosafety of Genetically Modified Plants

INTRODUÇÃO

Desde a publicação do primeiro livro “EC-sponsored Research on Safety of Genetically Modified Organisms” (Pesquisa da Segurança de Organismos Geneticamente Modificados patrocinada pela CE) em 2001, a estrutura legal da UE sobre Organismos Geneticamente Modificados (OGM) mudou substancialmente. Atualmente, ela compreende principalmente legislação sobre a liberação intencional de OGM no ambiente, bem como alimentos e rações GM, e sua rastreabilidade e rotulagem, respectivamente. Como parte das iniciativas legais, a Autoridade Europeia em Segurança de Alimentos foi fundada em 2002, e hoje é o órgão responsável pela condução da avaliação de risco à saúde e ao ambiente de cada OGM a ser comercializado na UE. Paralelamente a essas importantes mudanças, esforços consideráveis foram feitos e são continuamente feitos na UE para assegurar que a pesquisa trate as principais questões públicas sobre OGMs. Os projetos dentro desta seção fornecem insight e instrumentos para enfrentar os desafios relacionados com – entre outros – a introdução de OGMs nos mercados europeus, que, em princípio, poderiam servir de base para futuro estabelecimento de políticas.

Os projetos aqui descritos tratam de pesquisa em biossegurança; análise de risco; coexistência e questões regulatórias; escolhas do consumidor assim como comunicação de risco/segurança. Além disso, o 7.º levantamento Eurobarometer de 2010 sobre biotecnologia recebeu suporte financeiro.

Uma vez que plantas GM resistentes a vírus já foram liberadas para comercialização em todo o mundo (e.g. mamão resistente a vírus mancha anelada), é importante fornecer a base necessária para avaliação de risco das características de resistência a vírus antes de sua liberação comercial na Europa. Em relação ao seu impacto ecológico potencial, o projeto VRTP IMPACT estudou duas formas de fluxo gênico, seja de planta ao vírus por recombinação, seja de planta a planta por cruzamento. Baseado em seu trabalho prévio, usando abordagens que incluem laboratório, casa de vegetação e estudos de campo, os participantes no projeto fizeram considerável progresso proporcionando o conhecimento que permitirá a avaliação de riscos potenciais ligados às características resistentes a vírus GM.

Para promover a segurança dos alimentos, uma nova abordagem de análise de risco integrada foi desenvolvida como parte do projeto SAFE FOODS. Combinando os conhecimentos de vários cientistas naturais e sociais, representando uma ampla gama de instituições, países e disciplinas, o projeto visou a contribuir na restauração da confiança do consumidor na cadeia alimentar através do desenvolvimento de uma nova abordagem de análise de risco integrada para alimentos.

O desenvolvimento de uma estrutura de governança alimentos produzidos por diferentes métodos, práticas agrícolas e processamentos mudou o foco da tomada de decisão em segurança alimentar de riscos únicos para cestas de riscos, benefícios e custos que estão associados com sua produção e consumo, levando também em consideração o contexto social no qual a decisão é tomada. O principal resultado do projeto é uma nova abordagem para análise de risco para alimentos que integram as

avaliações dos aspectos de saúde humana, preferências e valores do consumidor, assim como análises de impacto dos aspectos socioeconômicos. As descobertas da abordagem de pesquisa multidisciplinar podem contribuir para avançar o modelo de análise de risco, traduzindo-as como recomendações de melhor prática e usando-as para emendar o modelo clássico de análise de risco.

Enquanto isso, mais de 40 países (incluindo 27 Estados-membros da UE) introduziram regulamentações de rastreabilidade e rotulagem principalmente seguindo ou os padrões da UE ou dos EUA, que podem diferir de acordo com a decisão – se é obrigatória ou voluntária, e se há um limite tolerado para a presença adventícia de OGMs. A coexistência de cadeias de suprimentos incorporando produtos GM é uma das questões que a agricultura e a corrente de processamento da Europa enfrentam dentro de um quadro de diferentes restrições. Em linha com esses desenvolvimentos, vários projetos de pesquisa têm sido financiados sob o quinto e o sexto Programas da Estrutura Europeia para pesquisa, focagem em rastreabilidade QPCRGMOfFood, GMOCHIPS) e coexistência (SIGMEA, TRANSCONTAINER, CO-EXTRA).

Os participantes do projeto CO-EXTRA representam um amplo conhecimento em vários aspectos da coexistência e rastreabilidade de cadeias de suprimento GM e não-GM. O projeto examinou as práticas das cadeias de suprimento da produção da semente até as prateleiras dos varejistas com ferramentas de implementação prática (e.g. documental e analítica), tratando de questões de coexistência por equipes multidisciplinares abrangendo as cadeias como um todo. Os métodos, estratégias, ferramentas e modelos desenvolvidos no CO-EXTRA para coexistência e rastreabilidade das cadeias de suprimento GM e não-GM, podem ser usadas no gerenciamento de outras cadeias de suprimento, valor agregado e mercados de nicho, e para detectar e excluir produtos danosos. Os resultados principais do projeto foram disseminados nas bienais Genetically Modified Crops Coexistence Conferences (GMCC-07/09) (Conferências sobre a Coexistência de Culturas Geneticamente Modificadas) e, Sevilha e Melbourne, o único fórum internacional focado na coexistência entre cadeias de suprimento agrícolas GM e não-GM.

A pesquisa pública na moderna biotecnologia visa a resolver limitações à produção agrícola, em relação a cuidados com a saúde e proteção ambiental. Os acontecimentos na pesquisa do setor público na biotecnologia agrícola estão na estreita dependência do delineamento e na implementação da estrutura de regulamentação para as culturas GM nos níveis nacional, regional e global. A moderna biotecnologia pode contribuir para o bem-estar humano apenas se a estrutura regulamentadora é baseada em ciência, previsível, transparente e equilibrada. Para conseguir isso, é crucial que os determinadores da política, regulamentadores e o público em geral estejam bem informados sobre os objetivos e progressos nas ciências naturais em biotecnologia agrícola. Correspondentemente, a própria pesquisa pública precisa estar informada sobre e envolvida nas regulamentações relacionadas com a moderna biotecnologia e implicações para pesquisa, de modo a estar mais bem alinhada com os desenvolvimentos mais amplos da política para segurança de alimentos, proteção ambiental e desenvolvimento sustentável. Portanto, o projeto SCIENCE 4 BIOREG foi financiado visando a envolver os cientistas do setor público trabalhando com pesquisa em biotecnologia em negociações internacionais e discussões de políticas e estendendo as atividades da Iniciativa Pública de Pesquisa e Regulamentação (PRRI). Como resultado do projeto, pesquisadores públicos tornaram-se uma bem conhecida entidade na arena internacional e o papel da ciência em geral, e o da pesquisa pública em particular, foi claramente estabelecido nas agendas de negociação.

Em seguida à adoção em 2004 pela UE da rotulagem compulsória de todos os produtos contendo GM em qualquer ingrediente, era incerto quão rapidamente tais produtos iriam aparecer nas prateleiras dos supermercados. Portanto, o projeto financiado pela UE CONSUMERCHOICE pergunta: “Os consumidores europeus compram alimentos GM?”. Várias pesquisas de opinião pública e alguns grupos de pesquisa de mercado exploraram as atitudes do público em relação a produtos alimentícios contendo GM, mostrando que a maioria do público europeu era algo antipática à tecnologia sendo aplicada à agricultura. É questionável, entretanto, se as atitudes expressas podem ser tomadas como procurações para comportamento. Os estudos feitos levam à conclusão que apenas um pequeno número de produtos GM rotulados estavam à venda e sendo comprados em vários países europeus. Uma vez que o número de produtos GM disponível após a introdução da rotulagem diminuiu significativamente devido às considerações de grandes fornecedores de alimentos e fabricantes, pode-se concluir que os consumidores europeus estão limitados em sua escolha com respeito às suas compras de alimentos GM. As descobertas também sugerem que a maioria das pessoas não está realmente interessada no tema nem muito alerta à presença de ingredientes ou produtos GM, embora estejam realmente presentes nos alimentos comprados. As observações sublinham o fato de que o que as pessoas dizem difere do que elas fazem. Embora os dados obtidos não sejam suficientemente extensivos, pode ser razoavelmente concluído que (i) a maioria das pessoas não evita ativamente os alimentos GM quando estão comprando, sugerindo uma divergência entre suas opiniões e padrões reais de compras; (ii) ligar dados de compras com respostas a questionários é um modo mais confiável de estabelecer atitudes do que depender apenas das pesquisas de opinião.

No prefácio do relatório da Comissão Europeia sobre pesquisa financiada pela CE sobre segurança de OGMs publicada em 2001, J.E. Beringer citou alguns comentários de oponentes dos OGMs: “OGMs não são seguros e nunca devem ser liberados no ambiente; Não sabemos o suficiente sobre os OGMs para arriscar liberá-los – o que se está fazendo sobre isso?; Por que alguém não faz algo para entender quais os riscos dos OGMs?”.

De acordo com Beringer, eles encorajaram e exploraram a inquietação do público muito efetivamente por que a maioria das pessoas não está ciente da pesquisa de biossegurança que está sendo feita e, com exceção da vacinas GM e outros usos médicos, tem havido poucos benefícios diretos ao público para reagir contra riscos percebidos.

Nesta publicação anterior, Beringer declarou que: “Uma década de pesquisa foi feita e milhões de euros foram gastos, mas a agenda do lobby antiGM mudou muito pouco. Eles dizem ainda estar preocupados porque não temos conhecimento suficiente e nenhum OGM deve ser liberado até podermos prever com certeza do que ele, e os genes clonados dentro dele, vão fazer com o ambiente”. Até onde fomos dez anos depois? Ainda mais: os resultados e mesmo a existência de pesquisa sobre biossegurança são frequentemente ignorados no debate público sobre a biossegurança de OGMs. Como consequência, a forte base já estabelecida para a discussão baseada na ciência sobre a biossegurança de OGMs não é totalmente explorada na Europa e no mundo todo. Alinhada com o complexo debate público sobre o uso de engenharia genética na agricultura e produção de alimentos, a Comissão Europeia tem financiado projetos apoiando decisões políticas baseadas na ciência e melhorando a comunicação sobre a “engenharia genética verde”. Os quatro projetos descritos neste capítulo apóiam a iniciativa europeia de melhorar a comunicação relacionada com a biossegurança de OGMs (GMO RES COM) e estabelecem uma Rede de Comunicação de Pesquisa sobre Biossegurança (BIOSAFENET). Além disso, conduzem um estudo piloto sobre abordagens inovadoras na comunicação pública de

ciências naturais e biotecnologia por estudantes e pesquisadores jovens (BIOPOP) e fornecem uma plataforma de avaliação de segurança e comunicação sobre OGMs (GMO-COMPASS).

Embora a CE e os Estados-membros da UE tenham investido meios consideráveis na pesquisa do impacto potencial de OGMs, é claro que estas atividades de pesquisa precisam ser acompanhadas por maiores esforços para melhorar a comunicação, tanto dentro da comunidade científica envolvida, como entre cientistas e outros interessados. Portanto, o projeto GMO RES COM apoiou a participação de cientistas da UE no bienal simpósio sobre Biossegurança de OGMs (ISBGMOs), lançou uma revista científica internacional revisada por pares inteiramente devotada a projetos de pesquisa de biossegurança de OGMs. Foram feitos esforços para esses três instrumentos de comunicação relacionados com pesquisa de biossegurança de OGMs para assegurar que eles continuem a funcionar no futuro. No caso do ISBGMOs, a série de simposia está claramente estabelecida, e não pode haver dúvidas sobre sua continuação a longo prazo.

Com relação à revista científica revisada por pares sobre Pesquisa sobre Biossegurança Ambiental (EBR), há pouca razão para temer sobre seu futuro, uma vez que o número de manuscritos submetidos aumentou significativamente desde os seus primeiros anos. O futuro do banco de dados de pesquisa sobre biossegurança também está assegurado, uma vez que, sob o nome de “biosafe.res database”, ele agora é parte do conjunto de instrumentos dos recursos de biossegurança de OGM baseado na web do Centro Internacional de Engenharia Genética e Biotecnologia (ICGEB).

A principal meta do projeto BIOSAFENET foi promover o envolvimento científico e sua percepção mais ampla em discussões de, e tomadas de decisões em, biossegurança de OGMs.

Portanto, as atividades cobriram instrumentos de informação, reuniões científicas e apoio logístico para formação de redes, também reforçando a posição dos pesquisadores europeus na arena internacional com a exploração de plataformas fornecidas pela Sociedade Internacional de Pesquisa em Biossegurança (ISBR). Para conseguir isso, a participação ativa de cientistas europeus em dois ISBGMOs, que são os únicos simpósios internacionalmente reconhecidos nesse importante campo da pesquisa, e atividades em rede de cientistas dos novos Estados-membros e países associados foram apoiados. Além do suporte direto das redes, instrumentos adicionais de comunicação melhoraram o fluxo de informação sobre os resultados da pesquisa sobre biossegurança. Os grupos alvo foram cientistas, regulamentadores, tomadores de decisões, a mídia e o público mais amplo. Essas atividades trataram de demandas específicas de cada grupo, da informação sobre projetos científicos, compilação de conhecimento para a avaliação de questões críticas (vindouras) sobre biossegurança e das apresentações de resultados da pesquisa sobre biossegurança ao público em geral.

O projeto BIOPOP foi uma mistura de ideias inovadoras e entusiasmo vindos de cientistas jovens, visando a estabelecer um novo formato em comunicação científica e participação pública, pela criação de um ambiente especial onde a nova geração de cientistas e cidadãos pode realmente se encontrar e efetivamente estabelecer um diálogo e uma comunicação duradoura. Todo o projeto foi desenvolvido em estreito contato com profissionais da mídia. Um complexo sistema de avaliação foi projetado para avaliar e acompanhar a interação estabelecida entre jovens cientistas e o público, e especialmente entender o impacto do novo modelo de comunicação tanto nos cidadãos como nos pesquisadores.

O projeto GMO-COMPASS demonstrou sua capacidade de apoiar os europeus em entender a política de OGM e regulamentações e informá-los sobre novos desenvolvimentos, benefícios e o debate público sobre questões de OGM. O consumidor foi alcançado com o oferecimento de informação baseada em ciência alinhada com as expectativas dos leigos e incrustada em um relato equilibrado, incluindo opiniões contrárias e visões de não cientistas. Portanto, o GMO-COMPASS complementou com sucesso o suprimento de informações existentes de regulamentadores, elaboradores de políticas, grupos de lobby e instituições científicas. O amplo interesse no discurso online mostra que tais instrumentos são altamente adequados para a promoção de um sério debate público sobre questões de OGM na Europa.

Alinhada com a complexidade do debate público sobre biotecnologia, especialmente o uso de engenharia genética na agricultura a produção de alimentos, a Comissão Europeia não apenas financiou projetos dedicados à pesquisa da biossegurança como um pré-requisito para a avaliação e manejo de risco competentes, mas também projetos apoiando a tomada de decisões baseadas em ciência assim como melhorando a comunicação sobre “engenharia genética verde”. O conhecimento desenvolvido na UE durante os últimos dez anos poderia resultar em benefícios substanciais para o ambiente, os consumidores e as sociedades em geral. Além disso, ele reforçou o papel dos cientistas e regulamentadores europeus no debate internacional sobre a segurança das plantas GM, bem como a coexistência de cadeias de suprimento agrícola GM e não-GM e apoiou a construção de pontes entre grupos de interesse diferentes, incluindo aqueles que normalmente não se envolvem no processo científico.

Plantas transgênicas resistentes a vírus: impacto ecológico do fluxo gênico

<p><i>Acrônimo</i> VRTP IMPACT</p> <p><i>Acrônimo do Programa</i> FP5-LIFE QUALITY</p> <p><i>Número do Contrato</i> QLK3-2000-00361</p> <p><i>Período</i> Dezembro de 2001 – Março de 2004</p> <p><i>Website do projeto</i> http://www.inra.fr/vrtpimpact/</p>	<p><i>Coordenador</i> Mark TEPFER Laboratoire de Biologie Cellulaire INRA-Versailles F-78026 Versailles cedex France mark.tepfer@versailles.inra.fr</p>
---	---

<p><i>Parceria</i> Mireille JACQUEMOND INRA, Avignon (FR) Rene DELON Institut du Tabac, Bergerac (FR) Ervin BALAZS Agricultural Biotechnology Center, Godollo (HU) Edgar MAISS University Hannover, Hannover (DE) Detlef BARTSCH Aachen University of Technology RWTH, Aachen (DE)</p>	<p>Fernando Garcia ARENAL ETSI Agronomos Ciudad Universitaria, Madrid (ES) Peter Palukaitis SCRI, Dundee, Scotland (UK) Ian COOPER NERC, Oxford (UK) Erkki TRUVE NICPB, Tallinn (EE)</p>
--	--

BACKGROUND E OBJETIVOS

A resistência a vírus estava entre as primeiras características agronômicas úteis a serem introduzidas em plantas por transformação genética, e várias cultivares transgênicas resistentes a vírus já foram liberadas comercialmente nos EUA. Para fornecer a necessária avaliação de risco baseada em ciência de tais plantas antes de contemplar a liberação comercial na Europa, é útil esclarecer vários pontos relacionados com um potencial impacto ecológico. Os impactos potenciais mais importantes poderiam resultar de duas formas de fluxo gênico, ou da planta para o vírus por recombinação ou de planta a planta por cruzamento sexual.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

O VRTP IMPACT tratou dessas duas destacadas questões relacionadas com o potencial impacto ecológico de plantas transgênicas resistentes a vírus:

- a recombinação com um vírus infectante levará à criação de novos genomas de vírus?
- a transmissão de um gene de resistência a vírus a parentes selvagens da espécie da cultura modificada irá conferir uma vantagem adaptativa às plantas selvagens?

Nos estudos de fluxo gênico recombinacional planta a vírus, os alvos particulares eram dois grupos de importantes vírus de plantas, os cucumovirus e os potivirus. Os estudos de fluxo gênico planta a planta foram conduzidos com duas plantas de culturas principais, que sabidamente são capazes de cruzar com parentes selvagens, a beterraba e a colza oleaginosa. Uma vez que é sabido que o fluxo gênico entre a cultura e os parentes selvagens pode ocorrer com essas espécies, o trabalho focou não na incidência de fluxo gênico, mas em seu resultado. Em todos os casos, o

impacto potencial foi avaliado relativamente a estudos dessas duas formas de fluxo gênico na ausência de plantas transgênicas.

PRINCIPAIS DESCOBERTAS E RESULTADOS

Há considerável evidência evolucionária para a recombinação entre vírus relacionados que têm hospedeiros em comum. Assim, somente se os recombinantes que são observados em plantas transgênicas que são diferentes daqueles em plantas não transgênicas haverá razão para preocupação sobre recombinação em plantas transgênicas serem uma fonte de aparecimento de novos genomas de vírus. Para comparar os vírus recombinantes aparecendo em plantas transgênicas e não transgênicas, ferramentas moleculares extremamente sensíveis foram desenvolvidas para detecção de genomas virais recombinantes, mesmo quando representam partes extremamente pequenas da população de RNAs virais. Elas foram aplicadas tanto em plantas não transgênicas duplamente infectadas como em plantas transgênicas simplesmente infectadas, expressando o gene da proteína da capa viral. Estes estudos tornaram possível caracterizar em detalhe os cucumovírus recombinantes presentes em plantas infectadas com o vírus do mosaico do pepino e estreitamente relacionado *vírus da aspermia do tomate*. Esta análise de sítios de recombinação de RNA3 em plantas infectadas por dois cucumovirus tornou possível identificar uma variedade de lugares comuns de recombinação. Isto forneceu a informação básica essencial com a qual o estudo de recombinação em plantas transgênicas expressando um gene da proteína da capa foi comparado, para determinar se novos vírus recombinantes ocorrem em plantas transgênicas. Estudos das propriedades biológicas dos vírus recombinantes observados mostrou que a maioria deles são deficientes em vários graus, e não se espera que sobrevivam na natureza.

Um dos principais fatores limitantes na recombinação do vírus é que o RNA viral deve estar nas mesmas células no momento em que RNAs virais são duplicados. Para determinar a extensão com a qual dois vírus relacionados coabitam nas mesmas células nas plantas infectadas com ambos os vírus, foram criados novos genomas virais codificando uma proteína fluorescente adicional. Quando esta estratégia foi aplicada a potivirus (*vírus de pústula da ameixa e vírus de venação mosqueada do tabaco*), um novo fenômeno de exclusão celular foi observado; vírus relacionados estavam presentes apenas em uma pequena subfração de células infectadas, na interface entre espaços de células infectadas com apenas um vírus. Como em princípio as sequências transgênicas virais que poderiam recombinar estão presentes em todas as células infectadas nas plantas transgênicas que expressam tais sequências, a probabilidade da coabitação de vírus no nível de célula em plantas não transgênicas é uma peça-chave de informação básica.

Pouco se sabe sobre a prevalência de genomas virais recombinantes na natureza. Isso é por que estudos moleculares de vírus encontrados no campo foram conduzidos. Verificou-se que os vírus que resultaram de recombinação de duas cepas, ou o *vírus do mosaico do pepino* ou o potivirus *vírus do mosaico da melancia*, eram claramente parte das populações naturais de vírus. Isso confirma que a recombinação é uma ocorrência normal, e que os vírus recombinantes são parte da variabilidade natural das populações de vírus.

As plantas encontram numerosos tipos de estresses que podem afetar sua capacidade de crescer e reproduzir. A infecção por vírus pode ser considerada uma importante fonte de estresse biótico. É por isso que entender o impacto da infecção de vírus na aptidão da planta (crescimento e reprodução) é importante na avaliação do impacto potencial de um gene de resistência a vírus sobre parentes selvagens de culturas resistentes a vírus. O trabalho executado sugere que a infecção por vírus pode afetar

a aptidão da beterraba selvagem (a mesma espécie da beterraba açucareira), e certas *Brassica* selvagens (parentes próximos da colza oleaginosa). Embora isso sugira que a transmissão do gene de resistência a vírus de culturas transgênicas e não transgênicas aos seus parentes selvagens pode afetar sua aptidão, os resultados mostraram que o impacto sobre a aptidão é altamente dependente dos genótipos tanto das plantas hospedeiras como dos vírus, assim como do ambiente.

CONCLUSÕES

As duas questões-chave de biossegurança relacionadas com plantas transgênicas resistentes a vírus são o impacto do fluxo gênico planta a planta por recombinação e cruzamento. Baseados em seu trabalho prévio, usando abordagens que incluem laboratório, casa de vegetação e estudos de campo, os participantes no projeto VRTP IMPACT fizeram considerável progresso obtendo o conhecimento que permitirá a avaliação desses dois riscos potenciais. Trabalhos adicionais atualmente em curso nesses laboratórios melhor esclarecerão o impacto dessas duas formas de fluxo gênico.

PRINCIPAIS PUBLICAÇÕES

BONNET, J.; FRAILE, A.; SACRISTAN, S.; MALPICA, JM.; GARCIA-ARENAL, F.; (2005). Role of recombination in the evolution of natural populations of Cucumber mosaic virus, a tripartite plant virus. *Virology* 332:359-368.

DIETRICH, C.; MAISS, E.; (2003). Fluorescent labelling reveals spatial separation of potyvirus populations in mixed infected *Nicotiana benthamiana* plants. *J. Gen. Virol.* 84: 2871–2876.

PIERRUGUES, O.; GUILBAUD, L.; FERNANDEZ-DELMOND, I.; FABRE, F.; TEPFER, M.; JACQUEMOND, M.; (2007). Biological properties and relative fitness of intersubgroup cucumber mosaic virus RNA3 recombinants produced in vitro. *J. Gen. Virol.* 88: 2852-2861.

RAYBOULD, A.; COOPER, R I.; (2005). Tiered tests to assess the environmental risk of fitness changes in hybrids between transgenic crops and wild relatives: the example of virus resistant *Brassica napus*. *Environ. Biosafety Res.* 4: 127-140.

TURTURO, C.; FRISCINA, A.; GAUBERT, S.; JACQUEMOND, M.; THOMPSON, JR.; TEPFER, M.; (2008). Evaluation of the potential risks associated with recombination in transgenic plants expressing viral sequences. *J. Gen. Virol.* 89: 327-335.

Resultados e perspectivas sobre a coexistência e rastreabilidade de cadeias de suprimento GM e não-GM

<p><i>Acrônimo</i> CO-EXTRA <i>Acrônimo do Programa</i> FP6-FOOD <i>Número do Contrato</i> 007158 <i>Período</i> Abril de 2005 – Setembro de 2009 <i>Webside do projeto</i> http://www.coextra.eu/contactus.html</p>	<p><i>Coordenador</i> Yves BERTEAU Institut national de La Recherche Agronomique 147, rue de l'Universite F-75138 Paris France</p>
---	--

<p><i>Parceiros</i> Joachim SCHIEMANN Federal Biological research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig (DE) Morten GYLLING of Food Economics, Frederiksberg (DK) Julian KINDERLERER The University of Sheffield (UK) Stephen LANGRELL Joint Research Center, Ispra (IT) Christina GRUDEN National Institute of Biology, Ljubljana (SI) Arne HOLST-JENSEN National Veterinary Institute, Oslo (NO) Ivan ATANASSOV AgroBioInstitute, Sofia (BG) Esther KOK Rikilt Institute of Food Safety, Rikilt (NL) Kristina SINEMUS Genius Biotechnologie GmbH, Darmstadt (DE) Hermann BROLL Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin (DE) Steven BENTLEY NIAB, Cambridge (UK) William MOENS Scientific Institute of Public health, Brussels (BE) HAnn VAN GYSEL The Danish Research Inst. Flanders Interuniversity, Institute of Biotechnology,</p>	<p>Laurence TISI Lumora Ltd, Cambridge (UK) Askild HOLCK Matforsk AS, Norwegian Food Research Institute Ltd, Aas (NO) David ZHANG Groupement d'interet public, Groupe d'Etudes et de controle des Varietes et des Semences, Guyancourt (FR) Christophe VAN HUFFLE Eppendorf Array Technologies SA, Namur (BE) Giorgos SAKELLARIS National Hellenic Research Foundation, Athens (EL) Jorge ARENAS VIDAL Vitalia Consulting S.L., Madrid (ES) Jan WISSE Schuttelaar &Parceiros The Hague (NL) Xavier PINOCHET Centre Technique Interprofessionnel des oleagineux metropolitains, Paris (FR) Daniel BLOC ARVALIS-Institut du vegetal, Paris (FR) Peter SAMP Swiss Federal Institute of Technology, Zurich (CH) Roger JAQUIERY Delley Samen und Pflanzen AG, Delley (CH) Boy FEIL Agro-Projektmanagement</p>
--	--

Gent (BE)	Dr Feil, Kronprinzenkoog (DE)
Klaus MENRAD	Ralph BOCK
University of Applied Sciences of Weihenstephan, Freising (DE)	Max Planck Society for the Advancement of Science, Munchen (DE)
Matthias STOLZE	Marie Angele HERMITTE
Forschungsinstitut fur biologischen Landbau, Frick (CH)	Centre national de la recherche scientifique, Paris (FR)
Pere PUIGDOMENECH	Neil HARRIS
Consejo Superior de Investigaciones Cientificas NC, Madrid (ES)	LGC Limited, Teddington (UK)
Mia EECKHOUT	Nelson MARMIROLI
Centre for Agricultural Research, Gent (BE)	Universita di Parma (IT)
Jose M. GIL	Marina MIRAGLIA
CREDA, Barcelona (ES)	Istituto superiore di Sanita, Roma (IT)
Peter BRODMAN	Vladimir MEGLIC
Biolytix AG, Witterswill (CH)	Agricultural Institute of Slovenia, Ljubljana (SI)
Andreas WURZ	Bao DIEP
Geescan Analytics GmbH, Freiburg (DE)	INRA Transfert SA, Paris (FR)
Christine HENRY	Andreas WASCHE
Central Science Laboratory, Defra (UK)	Fraunhofer Gesellschaft zur Forderung der angewandten Forschung, Munchen (DE)
Gilbert BERBEN	Paola VECCHIA
Centre Wallon de Recherches agronomiques, Gembloux (BE)	Centro Ricerche Produzioni Animali CRPA SpA, Reggio Emilia (IT)
Patrick PHILIPP	Huguette NICOD
Generale de la Concurrence, de la Consommation et de la Repression des Fraudes de Strasbourg, Illkirch-Graffenstaden (FR)	ADRIANT SAS, Nantes (FR)
Victor PELAEZ ALVARES	Konstantin SKRYAGIN
Instituto Tecnologia do Parana, Curitiba (BR)	Center Bioengineering RAS, Moscow (RU)
	Norma Ana PENSEL
	Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuaria, Buenos Aires (AR)

BACKGROUND E OBJETIVOS

A engenharia de plantas foi desenvolvida em 1983 por três grupos diferentes, um na Bélgica e dois nos EUA. Desde então a biotecnologia de plantas se expandiu enormemente e é agora a base de uma principal indústria multinacional. Plantas geneticamente modificadas para consumo humano ou ração animal são principalmente cultivadas nos EUA e no Canadá, com crescente produção no Brasil, na Argentina e China. A Europa cultiva apenas uma pequena quantidade de culturas GM (principalmente milho GM cultivado na Espanha), embora seja provável aumentar no futuro.

A regulamentação mundial dos OGMs pode ser na maior parte dividida em dois tipos completamente diferentes. O primeiro, tipificado pelos EUA, baseia-se no princípio da equivalência substancial e pergunta se os produtos derivados de OGMs são substancialmente os mesmos que seus correspondentes não-GM geralmente aceitos ou não. Se for julgado que sim, pouca regulamentação adicional, além das exigências

da segurança do alimento, é exigida. O segundo ponto de vista, iniciado na Europa, concentrou-se no método de produção, argumentando que os OGMs são produzidos por tecnologia diferente ou processo de produção, e, portanto, requerem regulamentação especial. Extensiva legislação da UE, incluindo detecção rastreabilidade e rotulagem de OGMs foi introduzida para respaldar esse ponto de vista. Mais de 40 países (incluindo 27 Estados-membros da UE) têm introduzido regulamentação de rastreabilidade e rotulagem. Estas ficam entre os padrões de regulamentação da UE ou dos EUA e podem diferir de acordo com a rotulagem, se é obrigatória ou voluntária e se existe um limite para a presença adventícia de OGMs.

O molde europeu reconhece a liberdade de produzir para os produtores e o direito dos consumidores de escolher os produtos que querem, sejam eles oriundos da agricultura OGM, convencional ou orgânica. Devido a isso, a coexistência de cadeias de suprimento incorporando aqueles produtos é uma das questões enfrentadas pela agricultura europeia e cadeia abaixo, numa série de limitações, tais como as da OMT.

Vários programas foram lançados nas estruturas de pesquisa europeia FP5 e FP6 sobre rastreabilidade (QPCRGMOFodd GMOCHIPS) e coexistência (SIGMEA, TRANSCONTAINER, CO-EXTRA). CO-EXTRA (contrato 007158, www.coextra.eu). Tem sido (2005 - 2009) o maior projeto financiado pela CE em coexistência e rastreabilidade de cadeias de suprimento Gm e não-GM.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

O projeto CO-EXTRA trata pela primeira vez toda a questão da coexistência de cadeias de suprimento GM e não-GM, examinando as práticas das cadeias de suprimento da produção da semente às prateleiras dos varejistas com instrumentos práticos de implementação, tais como sistemas documentais e analíticos que baseiam a coexistência das cadeias de suprimento. Esse modo coordenado e produtivo de trabalho foi possível apenas devido ao tamanho deste tipo de programa (projeto integrado). Desse modo, o lançamento de tais grandes projetos de pesquisa deve ser favorecido; projetos de pesquisa pequenos e fragmentados devem ser evitados onde possível.

Numerosos resultados mostram que a coexistência de cadeias de suprimento GM e não-GM, mesmo no nível da fazenda, não pode ser tratado estudando separadamente os diferentes componentes dessas cadeias. Questões de coexistência têm que ser tratados por equipes multidisciplinares abrangendo as cadeias de suprimento como um todo.

O CO-EXTRA conduziu trabalho experimental com milho, colza oleaginosa, girassol e tomate, bem com estudou modelos de fluxo de pólen em grandes áreas fragmentadas.

PRINCIPAIS DESCOBERTAS E RESULTADOS

Técnicas de biocontenção tais como esterilidade citoplasmática em milho e cleistogamia em colza oleaginosa podem ser usadas para reduzir o fluxo de pólen e com isso facilitar a coexistência no nível do campo. A proporção da mistura depende das condições e das variedades usadas. De acordo com isso, a precisão e a estabilidade a longo prazo (por exemplo, alguns tipos de milho CMS são altamente suscetíveis a doenças de plantas) desses sistemas de biocontenção devem ser reavaliadas ou, em alguns casos, ainda têm de ser desenvolvidas. Na eventualidade de ser necessária uma contenção total das plantas, particularmente quando se consideram plantas GM não destinadas ao cultivo de alimentos ou rações, o acúmulo de medidas de biocontenção será necessário. A transformação de plastídios poderia

ser usada para biocontenção, mas terá impacto sobre os métodos analíticos. Entretanto, a questão da compatibilidade entre a duração necessária para o desenvolvimento de variedades que integram a biocontenção e o cronograma da implementação da coexistência europeia precisa ser levantada. Mais ainda, a disponibilidade comercial de tais métodos de biocontenção, já usados para produção de híbridos, é questionável.

Os parceiros confirmaram observações anteriores de que os interessados estão usando um limite contratual prático de cerca de 0,1%, bastante abaixo do limite de 0,9% da rotulagem europeia. Este limite prático foi explicado pela amostragem (nenhum plano de amostragem consensual disponível) e medição (a variabilidade interlaboratórios é cerca de 200 % em torno de um valor). Usando limites práticos abaixo de um limite de qualidade ou segurança é uma prática muito comum em todos os setores que lidam com um limite. Este limite prático é facilmente alcançado nos terceiros países com campos grandes. Sua sustentabilidade em pequenos a médios campos europeus dependerá da futura pressão dos OGMs na UE. A disseminação observada do pólen por uma grande distância e as incertezas da amostragem e medições implicam que a coexistência de culturas de polinização cruzada é somente possível usando ou uma grande distância de isolamento ou a produção de produtos GM e não-GM em áreas especificadas, como determinado pelos modelos desenvolvidos pelo projeto SIGMEA financiado pela CE. As definições legais de tais áreas de produção especificadas permanecem em aberto.

Na ausência de disseminação de pólen, o conteúdo final de OGM depende das sementes GM iniciais. A pureza da semente é, portanto, um fator crucial básico da coexistência. Qualquer limite para sementes deve ser muito mais baixo do que a rotulagem para deixar bastante folga para tornar a coexistência possível no nível do campo. Entretanto, o acúmulo de genes, uma tendência crescente na produção de OGMs, reduzirá com o conteúdo adicional de DNA GM a capacidade dos fazendeiros de cumprir as exigências das cadeias de suprimento. Finalmente, a coexistência não pode existir sem a disponibilidade sustentável de sementes não-GM de baixo custo que incorporem os últimos melhoramentos genéticos. Fazendeiros usando sementes de colheita própria deveriam beneficiar-se da mesma proteção que produtores de sementes sob contratos com companhias de sementes. Em todos os casos, bons sistemas de informação entre fazendeiros devem ser implementados.

A coexistência de cadeias de suprimentos em fazendas na fase final do processo de produção não é uma questão nova, uma vez que a segregação entre produtos diferentes, tais como milho ceroso e colza erúcica, já é implementado. Entretanto, há pouca experiência na UE de coexistência de produtos GM e não-GM. Estudos empíricos de várias cadeias de suprimentos foram feitos em milho, trigo, soja e colza oleaginosa para determinar os pontos críticos e desenvolver modelos de gerenciamento de cadeias de suprimento. Os cerealistas foram identificados como a fonte de mistura não intencional. Onde GM e não-GM coexistem, as estratégias para lidar com a coexistência são diferentes entre os setores de alimentos e rações, devido à atual ausência de rotulagem para animais alimentados com OGMs.

O CO-EXTRA destacou vários fatos econômicos e legais. Em particular, a coexistência não pode ocorrer sem uma valoração econômica de toda a cadeia de suprimento, o que implica, por exemplo, rotular animais alimentados com e/ou sem OGMs.

Três tipos e estratégias de segregação são possíveis: especialização de plantas, especialização da linha de produção e especialização do tempo. Devido a diferenças em tamanhos e estruturas de companhias, a escolha de uma estratégia específica deveria ser feita caso a caso e provavelmente será motivada pela demanda do

mercado. Uma abordagem de modelagem de relacionamentos verticais ao longo da cadeia de suprimento foi executada (i) para representar as estratégias atuais; (ii) para identificar mudanças no contexto e mitigação de medidas que tornariam mais fácil manejar a segregação GM/não-GM; e (iii) discutir tais modelos ou sistemas de apoio a decisões derivadas com interessados. Tais modelos também podem ser combinados com os de resultados de fazendas como o MAPOD, um modelo de fluxo gênico espacialmente explícito. O modelo genérico considera os riscos de mistura entre produtos GM e não-GM e as consequências resultantes em termos de obediência pelo produto de limites regulatórios de rotulagem. O modelo de simulação, baseado no exemplo da cadeia de suprimento de amido de milho, simula fluxos físicos dos campos ao processamento. Usa três tipos de controle de lotes: rastreabilidade simples, classificação pior automática e teste de PCR.

CONCLUSÕES

Os resultados mostram que há um efeito de limite e que, no ponto de vista econômico, existe equilíbrio entre o nível de cumprimento do produto final e o número de lotes não-GM desclassificados. Esse equilíbrio depende tanto da penalidade incorrida como consequência do não cumprimento e o ágio do não-GM no mercado. Operadores de fazendas na fase final do processo de produção usam administração (stewardship), por exemplo amostrando métodos, envolvendo limites contratuais práticos de conteúdo de OGM, por exemplo através do acordo GAFTA, independente das legislações nacionais. O limite prático de cerca de 0,1% usado nessas administrações impacta drasticamente o resultado do conteúdo no campo e a organização da produção, e também o valor dos futuros limites europeus para sementes para conteúdo de OGMs aprovados fortuitos e tecnicamente inevitáveis.

Os resultados empíricos e de modelagem do projeto CO-EXTRA podem aplicar-se à maioria de cadeias de suprimento com qualidade e/ou exigências de segurança. Os métodos, estratégias, ferramentas, modelos desenvolvidos no projeto para a coexistência e rastreabilidade das cadeias de suprimentos GM e não-GM serão usados no manejo de numerosas outras cadeias de suprimento, valor agregado e mercados de nicho, e para detectar e excluir produtos danosos, tais como alergênicos e organismos produtores de micotoxinas ou patógenos. A rastreabilidade (tanto do ponto de vista analítico como documental) é um importante instrumento de segregação para a coexistência. A rastreabilidade documental é largamente usada por companhias e apenas alguns controles (rastreabilidade analítica) são efetivamente executados.

A rastreabilidade tem sido estudada do ponto de vista regulatório e também por sua função econômica e social: permitir que a confiança se estabeleça entre os atores e sobre atividades que apresentem risco na mistura. O CO-EXTRA mostrou que, na intersecção do conhecimento e o risco, os sistemas legais estão tentando estabelecer a confiança da sociedade que une os dois.

Várias questões gerais da sociedade podem ser levantadas de tais fatos ou de questões básicas lembradas pelo CO-EXTRA, por exemplo, a sustentabilidade de sementes não-GM deveria ser governada pelo mercado, ou o setor público deveria envolver-se na produção de variedades não-GM? O mesmo pode aplicar-se à disponibilidade de métodos de biocontenção, que pode parecer necessários, provavelmente na forma acumulada, para aumentar a segurança da coexistência no campo, mas todos eles são de propriedade de companhias, e provavelmente não estariam facilmente disponíveis aos fazendeiros, exceto em casos de contenção em campos de pequena escala dedicados a produtos não alimentares, tais como fármacos. Outras questões ou propostas gerais da sociedade foram feitas pelo CO-EXTRA tais como entender a responsabilidade sem culpa e esquemas de

compensação já implementados por fazendeiros em alguns Estados-membros, a toda a cadeia de suprimento, portanto abaixo das fazendas no processo produtivo.

Os custos das medidas de coexistência têm que ser quantitativa e precisamente medidos e sua distribuição avaliada para impedir débitos injustos para algumas cadeias de suprimento e conseqüentemente aos consumidores. Os benefícios no custo da coexistência e rastreabilidade das cadeias de suprimento deveriam ser melhor avaliados levando em consideração a aplicação das diretrizes e regulamentações Europeias impactando a coexistência e rastreabilidade. Falando geralmente, os aspectos socioeconômicos, das sementes às prateleiras, precisam ser melhor avaliados.

Os métodos de detecção para rastrear analiticamente OGMs são mais e mais precisos e capazes de fornecer informações confiáveis para usuários finais e consumidores. Devido ao desenvolvimento de numerosas técnicas de detecção múltiplas e o uso importante da rastreabilidade documental por operadores, estima-se que o impacto econômico de controles analíticos não aumente os custos finais. Entretanto, esses melhoramentos não resolvem as questões de reprodutibilidade interlaboratórios, calculada entre 50% e 200% de conteúdo calculado de OGM na amostra, dependendo da moagem da amostra, extração do DNA e dos métodos de detecção por PCR usados, assim como treinamento do pessoal. Essa diferença na reprodutibilidade interlaboratórios explica, em parte, com questões de amostragem, a diferença observada entre os limites contratuais práticos (ca 0,1%) usado pelos operadores e o limite da rotulagem de 0,9%.

Algumas questões – tais como (i) como lidar com “impurezas botânicas” em análises de rotina (em relação a questões LLP) e (ii) como gerenciar técnica, econômica e legalmente a coexistência no campo com grande distância de isolamento ou áreas de produção designadas – ainda estão pendentes e deveriam ser melhor pesquisadas sob os pontos de vista científico, técnico, econômico e legal.

O CO-EXTRA está, portanto, recomendando:

- que este trabalho de pesquisa, tão grande e integrado sobre coexistência das cadeias de suprimento deva ser continuado, uma vez que todas as questões de coexistência são interrelacionados e não podem ser tratados separadamente;
- que este trabalho integrado sobre coexistência e rastreabilidade deva abranger mais questões globais, não apenas aquelas relacionadas com a UE;
- falando mais geralmente, que sejam estudadas a coexistência e a rastreabilidade das cadeias de suprimentos, da semente às prateleiras, com foco menos específico no aspecto GM;
- a coexistência no nível do campo integra a biotecnologia e as estruturas e estratégias da área de sementes e seus impactos sobre a disponibilidade comercial de ferramentas úteis, tais com ferramentas de biocontenção;
- estudos mais profundos sobre a dispersão de pólen viável por grandes distâncias em áreas fragmentadas por várias plantas de culturas, portanto não restritos às atualmente espécies GM aprovadas (milho) e modelos correspondentes;
- busca em um sistema de armazenamento central baseado em GIS (com interface com a web), preferivelmente pela JRC europeia, de todos os dados sobre coexistência, incluindo a sustentabilidade de cultivo orgânico em regiões de produção de OGM de, por exemplo, cultivo na Espanha;
- a preparação de um sistema de armazenamento central baseado em GIS (com interface com a web), preferivelmente operado pela JRC europeia para monitoramento pós-comercialização, tanto para monitoramento de caso específico como para

vigilância geral, e capaz de integrar dados e aumentar a transparência para os cidadãos;

- a capacidade de ter ou grandes distâncias de isolamento entre culturas GM e não-GM, ou desenvolver área designadas para produção;
- a capacidade de manter fontes de sementes não-GM, integrando os últimos melhoramentos genéticos;
- a capacidade de acumular diferentes métodos de biocontenção tanto para OGMs destinados para alimentos e rações como para OGMs destinados para fins não alimentares.

Está claro que é necessário determinar rapidamente a pesquisa futura, mas provavelmente na maior parte estruturas de especialização para a rápida implementação da coexistência da semente às prateleiras. Entretanto, antes de lançar nova pesquisa ou ações de especialistas seria bom que as autoridades competentes tomassem decisões e fizessem a estrutura menos incerta: tal como determinar o(s) nível(is) de presença fortuita de OGMs nas sementes, orientação sobre medidas e harmonização para a coexistência individual *versus* regional, provisões para produção de sementes, etc. Alguns outros fatos também devem ser considerados, tais como a hipótese preferida de produção designada *versus* coexistência usando grandes distâncias de isolamento, instrumentos com financiamento público para possibilitar a provisão de sementes não-GM e talvez métodos de biocontenção publicamente disponíveis antes que trabalhos adicionais sobre coexistência seja feito. Isso significa que é necessário que decisões e harmonização sobre regras de coexistência devam ser tomadas e propostas ao Estados-membros para restringir ao mínimo o conhecimento ou campos de pesquisa a serem iniciados. Várias decisões tomadas antecipadamente pela autoridade europeia competente devem pavimentar o caminho para a coexistência de um modo rápido e eficiente em custo. Manter questões demais em aberto claramente prejudica a capacidade de achar soluções rapidamente para as questões de coexistência.

Uma iniciativa europeia para aumentar a comunicação relacionada com a pesquisa de segurança dos OGM

<i>Acrônimo</i> GMO RES COM <i>Acrônimo do Programa</i> FP5-LIFE QUALITY <i>Número do Contrato</i> QLK3-CT-2001-30037 <i>Período</i> Março de 2002 – Fevereiro de 2005	<i>Coordenador</i> Mark TEPFER ICGEB Biosafety Outstation Via Piovega, 23 31056 Ca' Tron di Roncade (TV) Italy E-mail: Mark.Tepfer@icgeb.org
---	--

<i>Parceiros</i> Ervin BALAZS Agricultural Research Institute, Martonvasar (HU) Decio RIPANDELLI Biosafety Unit, Trieste (IT)	Joachim SCHIEMANN Inst. Plant Virology, Microbiology, Braunschweig (DE)
--	---

BACKGROUND E OBJETIVOS

Embora a Comissão Europeia (CE) e os Estados-membros da UE tenham investido consideravelmente em pesquisa sobre o impacto potencial de organismos geneticamente modificados (OGMs), está claro que essas atividades de pesquisa precisam ser acompanhadas de maiores esforços para melhorar a comunicação, tanto dentro da comunidade científica envolvida como entre cientistas e outros interessados. O objetivo do projeto GMO RES COM foi contribuir para o melhoramento da comunicação nessa área. Isso foi implementado principalmente através de três instrumentos: 1) apoio para a participação de cientistas da UE no bienal Simpósio Internacional de Biossegurança de OGMs (ISBGMOs); 2) lançando uma revista científica internacional revisada por pares devotada à pesquisa de biossegurança de OGMs; e 3) criação de um banco de dados de projetos de pesquisa em biossegurança de OGM.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

A CE, juntamente com o Ministério da Agricultura dos Estados Unidos (USDA), estava na origem da mais importante série de conferências internacionais em andamento sobre pesquisa de biossegurança de OGMs, o Simpósio Internacional de Biossegurança de OGMs (ISBGMOs), que agora é organizado pela Sociedade Internacional para a Pesquisa sobre a Segurança (ISBR: <http://www.isbr.info/>). O GMO RES COM serviu para destacar o papel dos cientistas europeus nos ISBGMOs que houve em 2002 e 2004.

Como ficou evidente nas últimas décadas, um dos aspectos particulares da pesquisa sobre a segurança dos OGM é sua alta natureza interdisciplinar. Também certos tipos de dados de pesquisa importante, tais como os que mostram nenhum efeito dos OGM, eram difíceis de publicar nas revistas científicas existentes. Por essas razões, com o apoio do projeto GMO RES COM, foi criada uma nova revista internacional interdisciplinar nesta área, Environmental Biosafety Research (Pesquisa sobre Bio-Segurança Ambiental) (EBR: <http://www.ebr-journal.org/>).

Também foi reconhecido que era difícil ter uma vista geral do estado atual da pesquisa sobre a biossegurança dos OGM. Além de volumes publicados de resumos de

projetos, era claramente desejável estabelecer um banco de dados de acesso público baseado na web, que apresentaria o estado atual da pesquisa de um modo dinâmico. Isso também foi conseguido pelo projeto GMO RES COM.

PRINCIPAIS DESCOBERTAS E RESULTADOS

O Simpósio Internacional sobre Biossegurança de OGMs (ISBGMO)

Desde o primeiro em 1990, um ISBGMO foi feito bianualmente, para tratar da base científica para as questões de biossegurança dos OGMs. A série de simpósios é destinada a cientistas, que estabelecem políticas, regulamentadores, organizações não-governamentais e representantes da indústria envolvida com desenvolvimento de OGM e estudos relevantes de biossegurança.

Participação no 7.º ISBGMO, 10-16 de outubro de 2002, Beijing, China

O 7.º ISBGMO foi organizado na China, em reconhecimento do crescente importante papel que a China está desempenhando na pesquisa de biossegurança de OGM. Era necessário, portanto, a comunidade europeia de pesquisa estar bem representada. O GMO RES COM forneceu apoio para viagem e estadia para todos os cientistas europeus do setor público que eram membros do comitê organizador e presidiram uma sessão ou apresentaram um trabalho na sessão plenária.

A presença de uma delegação europeia importante também ajudou a assegurar que os cientistas europeus continuem a desempenhar um papel central nas atividades da Sociedade Internacional para a Pesquisa sobre Biossegurança (ISBR). Por exemplo, graças à delegação europeia na ISBGMO de Beijing foi decidido que os 8.º Simpósio será organizado na França em 2004.

Organização do 8.º ISBGMO, 26-30 Setembro de 2004, Montpellier France

O 8.º Simpósio, organizado de 26-30 Setembro de 2004 em Montpellier, França, sob a responsabilidade da ISBR, foi presenciado por aproximadamente 250 participantes. Como durante as prévias edições, os quatro dias do simpósio foram dedicados à apresentação de pesquisa cobrindo temas importantes selecionados, relevantes à segurança dos OGM, com um esforço particular feito no sentido de projetar o atual estado do conhecimento para o futuro. Todo o conteúdo do simpósio pode ser baixado no website da ISBR (<http://www.isbr.info/>). Além dos quatro dias usuais de sessões, o 8.º simpósio incluiu dois elementos novos. Um deles foi um evento especial à noite para melhor contato entre os cientistas e o público, que foi na forma de apresentação pública do trabalho do simpósio, incluindo a oportunidade de fazer perguntas aos cientistas participantes. O segundo foi uma reunião de trabalho especial Norte-Sul. O propósito aqui era mobilizar a comunidade de pesquisa sobre biossegurança de OGM para identificar a pesquisa sobre biossegurança relacionada com OGM que os países do Sul necessitarão para avaliar o desenvolvimento dos OGMs para seus próprios usos e para criar melhores contatos entre pesquisadores do Norte e do Sul.

Pesquisa sobre Biossegurança Ambiental (EBR)

Uma breve história da Pesquisa sobre Biossegurança Ambiental

Pesquisa sobre Biossegurança Ambiental (EBR), a revista oficial da ISBR, nasceu diretamente do ISBGMOs. A ideia de lançar uma nova revista refletindo alta natureza interdisciplinar dos simpósios foi primeiramente discutida no 5.º simpósio (1998). Isso foi seguido por vários anos de discussão e planejamento, antes que a primeira edição da EBR fosse liberada no fim de 2002. O escritório editorial foi estabelecido no INRA-Versailles e a revista foi administrada inicialmente com três editores-chefes, Mark

Tepfer (França), Klaus Ammann (Suíça) e David Andow (EUA), e um corpo editorial composto de seis membros europeus, seis dos EUA e três dos países em desenvolvimento. Para mais informações, ver <http://www.ebrjournal.org/>. Particularmente durante o primeiro ano da EBR, considerável esforço foi feito para destacar sua visibilidade. Isso incluiu criar e distribuir volantes em numerosas reuniões científicas, e um real esforço foi feito para ter a revista indexada nos mais importantes serviços de indexação, tais como o ISI Master Journal List and Medline.

Panorama dos primeiros anos de publicação da EBR

A EBR apareceu trimestral desde o fim de 2002. Como visto abaixo, até o fim de 2004, um total de 49 artigos foi publicado, para um total de páginas de 575. Nos anos desde o final do projeto GMO RES COM, a EBR continuou a publicar um número similar de trabalhos.

	2002 Volume 1 1 Edição	2003 Volume 2 4 Edições	2004 Volume 3 4 Edições	Totais
Artigos regulares	4	9	17	30
Artigos de revisão	1	5	1	7
Editoriais	2	3	* 2	7
Revisão de livros		1	3	4
Outros		1		1
Totais	7	19	23	49

Graças à versão online da EBR, a revista tem um bom nível de percepção pela comunidade científica. Na última contagem, o artigo mais baixado havia recebido mais de mil acessos.

O Banco de Dados GMO RES COM de Pesquisa em Biossegurança Criação do Banco de Dados GMO RES COM de Pesquisa em biossegurança

Este banco de dados foi projetado para tornar-se uma fonte atualizada de informação, preenchendo as necessidade de vários grupos interessados. Ele facilita a criação de consórcios de grupos de pesquisa para conduzir pesquisa em biossegurança e é excelente fonte de conhecimento nos vários campos de pesquisa em biossegurança de OGM, e também fornece acesso público grandemente facilitado à pesquisa em biossegurança de OGM. O banco de dados foi criado durante o projeto GMO RES COM e melhorado graças ao apoio do projeto BiosafeNet (http://www.gmo-safety.eu/en/biosafenet_navigator/562.docu.html). O banco está presentemente alojado em ICGEB (<http://www.icgeb.org/~bsafesrv/>).

CONCLUSÕES

Como descrito acima, a execução do projeto GMO RES COM resultou em pleno desenvolvimento de instrumentos para comunicação relacionada com a pesquisa em biossegurança de OGM. Foram feitos esforços para assegurar que continuarão a funcionar no futuro. No caso do ISBGMOs, a série de simpósios está claramente estabelecida, e não pode haver dúvida sobre sua continuação no longo prazo. Com

relação à EBR, há pouca razão para temer pelo futuro da revista, uma vez que o número de manuscritos submetidos cresceu significativamente desde seus primeiros anos. O futuro do banco de dados GMO RES COM também está assegurado, uma vez que, sob o nome de 'biosafe.res database', ele é agora parte do jogo de ferramentas dos recursos em biossegurança em OGM baseados na web do ICGEB (<http://www.icgeb.org/~bsafesrv/>).

Envolvimento global de cientistas da pesquisa pública na regulamentação da biossegurança e biotecnologia agrícola

<i>Acrônimo</i> SCIENCE 4 BIOREG <i>Acrônimo do Programa</i> FP6-FOOD <i>Número do Contrato</i> 043012 <i>Período</i> Novembro de 2006 – Janeiro de 2010	<i>Coordenador</i> Dr Zuzana KULICHOVA Delft University of Technology Julianalaan 67 NL-2628BC Delft The Netherlands z.kulichova@tudelft.nl
---	---

<i>Parceiros</i> Kim MEULENBROEKS Stichting Publiek Onderzoek en Regelgeving (Foundation for Public Research and Regulation), Delft (NL) Pieter-Jan VAN DER MEER Horizons sprl, Lasne (BE) Sylvia Dina Frida BURSSSENS Ghent University, Ghent (BE) David John BENNETT Cambridge Biomedical Consultants Ltd, Cambridge (UK) Monty P. JONES Forum for Agricultural Research in Africa, London (UK) Atanas ATANASSOV Black Sea Biotechnology Association, Sofia (BG) Yaroslav BLUME Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, Kiev (UA)	Desiree M. HAUTEA University of the Philippines Los Banos, Laguna (PH) Charles MUGOYA Association for strengthening Agricultural research in East and Central Africa, Entebbe (UG) Katharina KUMMER PEIRY Kummer EcoConsult, Villarsur- Glane (CH) George SAKELLARIS National Hellenic Research Foundation, Athens (EL) Oda LEILA Associação Nacional de Biossegurança, Rio de Janeiro (BR) Joachim SCHIEMANN Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig (DE) Lionel GIL Faculty of Medicine, University of Chile, ICBM, Santiago (CL)
---	---

BACKGROUND E OBJETIVOS

O projeto SCIENCE4BIOREG trata da crescente lacuna entre as ciências naturais de um lado e as políticas de regulamentação e as percepções públicas de outro.

A pesquisa pública no campo da moderna biotecnologia visa a resolver limitações à produção agrícola, cuidados com a saúde e proteção ambiental. Os acontecimentos na pesquisa do setor público estão estreitamente dependentes do projeto e da implementação das estruturas de regulamentação para culturas geneticamente modificadas nos níveis nacional, regional e global.

A moderna biotecnologia pode contribuir para o bem-estar humano apenas se a estrutura regulamentadora é baseada em ciência, previsível, transparente e equilibrada. Não apenas os riscos que podem acompanhar qualquer inovação

tecnológica precisam ser verificados, os benefícios também devem ser levados em conta ao assegurar uma boa administração. Para conseguir isso, é crucial que responsáveis pela política, regulamentadores e o público em geral estejam bem informados sobre os objetivos e progressos nas ciências naturais em biotecnologia agrícola. Correspondentemente, a própria pesquisa pública precisa estar informada sobre e envolvida nas regulamentações relacionadas com a moderna biotecnologia e implicações para pesquisa, de modo a estar mais bem alinhada com os desenvolvimentos mais amplos da política para segurança de alimentos, proteção ambiental e desenvolvimento sustentável.

O objetivo deste projeto, focado nos cientistas do setor público trabalhando com pesquisa em biotecnologia, é envolvê-los em negociações internacionais e discussões de políticas que pertencem à biotecnologia. O projeto SCIENCE4BIOREG estende as atividades da iniciativa para a pesquisa pública e a regulamentação com a meta de assegurar que o setor público de pesquisa será pelo menos minimamente representado em todas as reuniões relevantes.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

O envolvimento bem-sucedido dos cientistas naturais em negociações de discussões de regulamentação requer que tenham um entendimento do background regulatório. Para esse fim, a administração de projeto organiza regularmente reuniões regionais preparatórias, em que os cientistas podem aprender sobre os regulamentos existentes e planejados, regionais e internacionais. Além disso, os cientistas são apoiados na participação em discussões internacionais e na expressão de suas opiniões em acontecimentos de regulamentação. As regulamentações alvo do projeto incluem o Protocolo de Cartagena em Biossegurança (CBP), a Convenção sobre Diversidade Biológica (CBD), a Convenção de Aarhus e as Diretrizes e Regulamentações da CE. Além da participação em reuniões internacionais e sua organização, o projeto SCIENCE4BIOREG informa os governos, organizações e outros interessados da pesquisa pública em andamento em tecnologia moderna e as preocupações dos pesquisadores públicos em relação a acontecimentos específicos da regulamentação.

PRINCIPAIS DESCOBERTAS E RESULTADOS

Durante o projeto os seguintes resultados foram alcançados:

- 40 cientistas do setor público de 21 países participaram da Terceira Reunião de Partes (MOP3) do Protocolo de Cartagena em Biossegurança;
- 40 cientistas do setor público de 21 países participaram da Quarta Reunião de Partes (MOP4) do Protocolo de Cartagena em Biossegurança;
- 10 cientistas do setor público participaram da 8.º e 9.º Conferência de Partes (COP8 e COP9) da Convenção de Diversidade Biológica;
- 10 cientistas do setor público participaram da Conferência de Partes da Convenção de Aarhus;
- numerosos cientistas do setor público participaram de muitas reuniões interseccionais de todos MOPs e COPs;
- cientistas do setor público participaram de várias reuniões organizadas pela Comissão Europeia, Estados-membros, EFSA, e outras Organizações Europeias como COST;
- seis reuniões regionais e internacionais foram organizadas para informar os cientistas do setor público sobre regulamentação existente e planejada, internacional e regional pertinente à biotecnologia;
- declarações sobre itens específicos nas agendas de MOPs e COPs, tais como avaliação de risco e considerações socioeconômicas, foram preparadas em consulta com membros do PRRI e submetidas às partes em negociação;

- foi criada a estrutura para um banco de dados online incluindo o setor público de pesquisa em biotecnologia em todo o mundo;
- materiais de orientação para cumprimento das regulamentações sobre biossegurança foram preparados e disponibilizados para os pesquisadores públicos;
- as atividades do projeto foram apresentadas durante reuniões internacionais;
- circulares (newsletters) sobre os resultados de reuniões internacionais e negociações relevantes à biotecnologia e biossegurança fora disseminadas entre os cientistas do setor público em todo o mundo;
- cartas explicando a relevância da pesquisa do setor público na biotecnologia moderna foram enviadas a governos e organizações internacionais.

Detalhes dessas atividades podem ser encontradas em www.pubresreg.org

CONCLUSÕES

Os pesquisadores públicos tornaram-se uma entidade bem conhecida na arena internacional e os papéis da ciência em geral, e da pesquisa pública em particular, foram claramente estabelecidos nas agendas de negociação.

A experiência do projeto indica que o diálogo contínuo entre os cientistas naturais e os que estabelecem as políticas pode contribuir para o estabelecimento de estruturas de regulamentação em biotecnologia. Regulamentações transparentes, baseadas na ciência e previsíveis, são o primeiro pré-requisito para liberar o potencial da biotecnologia moderna dos canais de pesquisa e entregando seus benefícios nos campos dos fazendeiros.

Promovendo a segurança dos alimentos por meio de nova abordagem integrada de análise de risco para alimentos

<i>Acrônimo</i> SAFE FOODS	<i>Coordenador</i> Dr Hans J.P. MARVIN
<i>Acrônimo do Programa</i> FP6-FOOD	RIKILT – Institute of Food Safety
<i>Número do Contrato</i> 506446	Akkermaalsbos 2 NL-6708 WB Wageningen
<i>Período</i> Abril de 2004 – Junho de 2008	The Netherlands hans.marvin@wur.nl
<i>Website do projeto</i> http://www.safefoods.nl/default.aspx	

<i>Parcerias</i> Dr Esther KOK MSC DLO-RIKILT – Institute of Food Safety, Wageningen (NL) Prof. Howard Davies SCOTTISH Crop Research Institute, Dundee (UK) Prof. Karl HEINZ ENGEL Technical University Munich (DE) Prof. Sirpa KARENLAMPI University of Kuopio (FI) Dr. Ewa ZIMNOCH–GUZOWSKA Plant Breeding and Acclimatization Institute, Blonie (PL) Dr. Marina MIRAGLIA National Institute of Health, Rome (IT) Prof. Jane MORRIS Council for Scientific and Industrial Research, Pretoria (ZA) Dr. Jim MCNICOL Biomathematics and Statistics Scotland Research Institution, Edinburgh (UK) Dr. Leif BUSK National Food Administration, Uppsala (SE) Prof. Yongning WU National Institute of Nutrition and Food Safety, Beijing (CN) Dr. Ib KNUDSEN Danish Institute for Food and Veterinary Research, Soeborg (DK) Dr. Jiri RUPRICH	Dr. Declan BOLTON National Food Center, Dublin (IE) Prof. Aldo PRANDINI Catholic University of Piacenza, Milano (IT) Dr. Olga ORLOVA Latvian Food Center, Riga (LT) Prof. Diana BANATI Central Food Research Institute, Budapest (HU) Dr. Peter BOS National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven (NL) Dr. Juliane BRAEUNIG Federal Institute for Risk Assessment, Berlin (DE) Dr. Beat BRUSCHWEILER Swiss Federal Office of Public Health, Bern (CH) Prof. Yu LI Institute of Crop Germplasm Resources, Beijing (CN) Dr. George CHRYSOICHODIS Agricultural University of Athens (EL) Health, Prague (CZ) Dr. Andy STIRLING University of Sussex, Wageningen University (NL) Brighton (UK) Prof. Ellen VOS University of Maastricht (NL) Dr. Asa BOHOLM University of Goteborg (SE) Prof. Ragnar LOFSTEDT King's College London (UK)
---	--

National Institute of Public
Institute of Food Research,
Norwich (UK)
Prof. Peter SANDOE
Royal Veterinary and
Agricultural University,
Frederiksberg (DK)
Prof. Ortwin RENN
DIALOGIK gGmbH,
Stuttgart (DE)
Prof. Wout SLOB
Institute for Risk Assessment
Sciences, Utrecht (NL)

Dr. Anna VARI
Institute of Sociology at the
Hungarian Academy of
Sciences, Budapest (HU)
Prof. Vittorio SANTANIELLO
Centre for International
Studies on Economic Growth
(CEIS), University of Rome (IT)
Mrs. Laura SMILLIE
European Food Information
Council, Brussels (BE)

BACKGROUND E OBJETIVOS

A administração de segurança de alimentos foi sempre vista como o domínio de “peritos” e gerentes de risco profissionais, com uma contribuição mínima de outras partes interessadas, tais como consumidores. Entretanto, um número de incidentes com a segurança de alimentos na Europa (OGMs, BSE, dioxinas...) teve um impacto negativo na confiança do público sobre regulamentação e administração e expôs a necessidade de melhoramentos na atual abordagem da análise de risco de alimentos.

O projeto SAFE FOODS (2004 - 2008) da UE visa a contribuir para a restauração da confiança nas cadeias de suprimento através do desenvolvimento de uma nova abordagem integrada da análise de risco em alimentos. Combinando o conhecimento de mais de cem cientistas naturais e sociais, vindos de 37 instituições em 21 países, o projeto está integrando uma ampla gama de disciplinas para refinar a prática de análise de risco para a segurança de alimentos.

O objetivo principal é desenvolver uma estrutura de administração para os alimentos produzidos por diferentes métodos e práticas de processamento. O objetivo dessa estrutura é mudar o foco da tomada de decisão sobre segurança de alimentos de simples riscos para considerar os alimentos como cestas de riscos, benefícios e custos que estão associados com sua produção e seu consumo, levando em conta o contexto social no qual essas decisões são tomadas.

As questões que foram abordadas são:

- a aplicabilidade de novos métodos de obtenção de perfis para a identificação de riscos emergentes na produção de alimentos;
- como a informação sobre a avaliação de risco deve ser comunicada ao público e como as preocupações do público podem ser incorporadas neste processo;
- como a comunicação efetiva e participação inclusiva do público no manejo do risco e a política de ciência e tecnologia podem ser desenvolvidas; e
- o papel das instituições envolvidas na avaliação e manejo de risco à luz de uma estrutura mais ampla de análise de risco que leva em conta as questões socioeconômicas de risco-benefício e as consequências de introduzir alimentos e novos métodos de produção.

O resultado principal deste projeto é a nova abordagem na análise de risco para alimentos, que integra a avaliação de aspectos de saúde humana, preferências e valores dos consumidores, assim como análise do impacto de aspectos

socioeconômicos. Os pontos fortes do modelo são o novo e transparente método de identificação e avaliação de risco e a abordagem inclusiva de manejo de risco com envolvimento ativo de todos os interessados, levando em conta uma ampla variedade de fatores éticos, sociais e econômicos.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

SAFE FOODS consiste em um número de projetos de pesquisa (blocos de trabalho) com alto grau de coerência, colocando juntos equipes multidisciplinares de especialistas dedicados da área acadêmica de muitos países da UE, incluindo os novos Estados-membros:

1. Avaliação comparativa de segurança de abordagens ao melhoramento e práticas de produção utilizando sistemas de alto e baixo insumo;
2. Detecção precoce de riscos emergentes associados com produção de alimentos e rações;
3. Avaliação quantitativa de risco da exposição combinada de contaminantes alimentares e toxinas naturais;
4. Confiança do consumidor em práticas de análise de risco em relação a alimentos novos e convencionais;
5. Investigação do papel das instituições regulamentadoras no manejo de risco;
6. Projeto de nova abordagem integrada de análise de risco para alimentos.

WP1. O objetivo principal do Bloco de Trabalho 1 foi desenvolver métodos de avaliação comparativa da segurança para alimentos produzidos por diferentes abordagens de melhoramento e práticas de produção. Os métodos selecionados foram designados para facilitar a análise de expressão de genes em larga escala, expressão da proteína e conteúdo de metabólitos usando técnicas de transcriptômica, proteômica e metabolômica ligadas a estruturas relevantes para a análise estatística dos dados. Esses métodos foram usados para avaliar fonte de variação na composição em grãos de milho e tubérculos de batata, como exemplos de culturas europeias. Para fazer isso com eficiência, exigiu que os testes fossem executados e analisados por quatro safras. No total, mais de 3 mil amostras foram analisadas.

WP2. A meta deste Bloco de Trabalho 2 foi explorar e desenvolver métodos e ferramentas para a identificação precoce de riscos emergentes, com foco particular em questões que possam estar associadas a métodos de produção agrícola, como sistemas de produção agrícola com altos ou baixos insumos. As seguintes técnicas foram usadas: revisão dos sistemas e métodos de alerta precoce existentes; revisão da literatura sobre a emergência de riscos microbianos e químicos na segurança de alimentos; estabelecimento de um ponto de transferência, em que especialistas pudessem trocar informações e de um banco de dados especializado com âmbito na UE; revisão da ligação potencial entre a segurança de alimentos e mudança climática em uma escala global europeia, fornecendo capacidade para construir para avaliadores de risco e gerentes de risco europeus na questão de identificação de riscos emergentes.

WP3. Este Bloco de Trabalho 3 tinha três metas principais:

- desenvolvimento de uma plataforma eletrônica para bancos de dados para consumo de alimentos e resíduos, todos ligados a software probabilístico via Internet. Esta plataforma irá facilitar a modelagem pan-europeia de exposição na qual os cálculos da exposição nacional e internacional são executados de modo harmonioso;
- desenvolvimento de um modelo de risco integrado probabilístico no qual a exposição a compostos via alimento está diretamente ligada à informação sobre possíveis efeitos

detrimentais à saúde. Desse modo, avaliações de risco quantitativas mais refinadas e realísticas podem ser feitas, comparadas aos métodos atualmente aplicados;

- o uso deste modelo nas situações em que consumidores são expostos simultaneamente a mais de um produto químico e nos quais o gerente de risco tem que pesar ou o efeito do risco (ou benefício) de um composto contra o outro, ou considerar efeitos cumulativos de compostos com o mesmo modo de ação.

WP4. o principal propósito deste bloco de trabalho foi entender as percepções do manejo de risco de alimentos na Europa. Uma série de estudos foi conduzida em vários Estados-membros da UE que tentaram identificar os determinantes psicológicos do bom manejo de risco institucional. A efetividade percebida das práticas de manejo de riscos de alimentos foi explorada em um estudo qualitativo, usando grupos de pesquisa constituídos por membros do público e especialistas em segurança de alimentos. As fundações para um modelo para os fatores psicológicos subjacentes que afetam a confiança do consumidor nas práticas de manejo de risco de alimentos foram fornecidas pelos resultados destes estudos explanatórios, os quais foram testados quantitativamente usando modelagem de equação estrutural. O estudo quantitativo envolveu um levantamento baseado na Internet conduzido em quatro Estados-membros europeus – Alemanha, Grécia, Dinamarca e Reino Unido – e um levantamento por telefone na Eslovênia. Para validar o modelo de percepções do consumidor, uma série de entrevistas de estudos de caso foi conduzida para dar “prova de princípios” contra incidentes de segurança de alimentos passados.

WP5. O principal objetivo deste bloco de trabalho foi explorar alguns dos maiores desafios para a administração da segurança de alimentos na UE e relacioná-los a respostas procedimentais e institucionais potenciais. A primeira fase do trabalho de pesquisa foi dedicada à investigação de alguns dos maiores rearranjos institucionais e reformas de procedimentos na regulamentação europeia da segurança de alimentos e delinear as bases legais e políticas para essas mudanças e esforços de reforma. A segunda fase envolveu identificar certas questões que emergem como tarefas essenciais na mudança da administração da segurança de alimentos para melhor e sugerir modos de tratar essas questões. Isso foi feito referindo-se aos imperativos identificados nos principais documentos legais e de políticas e como enfatizado pelos interessados no campo com base na experiência desde que as mudanças foram introduzidas.

WP6. Um dos principais objetivos deste bloco de trabalho foi integrar os resultados dos outros blocos de trabalho (1-5) na nova estrutura de análise de risco integrada SAFE FOODS . Além das inovações na avaliação de risco que foram feitas nos Blocos de Trabalho 1,2, e 3, a nova abordagem conscientizou-se das recomendações para melhorar a comunicação de risco e da organização institucional em administração da segurança de alimentos que resultou da pesquisa dos Blocos de Trabalho 4 e 5, respectivamente. A nova estrutura de análise de risco visa a aumentar a transparência do procedimento da análise de risco, assim como assegurar o envolvimento do interessado. Além do risco à saúde humana associado com o consumo de alimento, este bloco de trabalho explorou a possibilidade de avaliar os benefícios associados e incluir fatores socioeconômicos, tais como impactos sociais, econômicos e ambientais, assim com as implicações éticas nessa avaliação. Estudos de caso retrospectivos ajudaram determinar o valor agregado de uma abordagem melhorada da análise de risco. Um documento de discussão descrevendo a nova estrutura foi submetido a uma ampla gama de interessados durante duas reuniões de trabalho, para obter feedback, que foi usado para melhorar ainda mais a abordagem.

PRINCIPAIS DESCOBERTAS E RESULTADOS

Técnica inovadora de obtenção de perfis. Nas décadas recentes, os produtores têm experimentado diferentes métodos (e.g. GM, convencional, orgânico) para assegurar culturas básicas, mas os assessores de risco têm um entendimento limitado sobre como os diferentes métodos de cultivo afetam a composição das culturas. Usando a técnica inovadora “ômica”, SAFE FOODS analisou a composição de batatas e milho de diferentes backgrounds genéticos e diferentes práticas de produção. O projeto descobriu que a tecnologia “ômica” pode permitir que os cientistas façam análises sem precedentes da composição das culturas medindo milhares de parâmetros de uma só vez (incluindo genes, proteínas e metabólitos). Essas possibilidades permitem aos cientistas determinar se, inserindo um novo gene no grão de milho, muda sua composição de um modo indesejado. Embora a abordagem “ômica” não seja atualmente exigida nas avaliações de risco, as evidências mostram que fornece uma visão muito melhor da composição da cultura do que os instrumentos hoje em uso. A nova tecnologia é útil nos casos em que é imperativo para os gerentes de risco entender como o processo de produção da cultura muda o valor nutricional do alimento no prato do consumidor (e.g. nanotecnologia, GM, orgânico).

Abordagem holística ao risco emergente. É uma prática padrão rastrear alertas sobre alimentos e rações e manter um sistema de alerta precoce que focaliza os riscos. Os alertas precoces de hoje são principalmente reativos, pegando o dano após acontecer. SAFE FOODS explorou o potencial de aplicar análise de tendências a relatos do sistema de alerta rápido para alimentos e rações, e de combiná-lo com dados adicionais de fatores que afetam a cadeias de suprimento do alimento e ração (e.g. tamanho das fazendas, clima, importações/exportações, e mudanças nos regulamentos). O projeto identificou indicadores genéricos e casos específicos e fontes de dados para detectar riscos microbianos e químicos, e proporá métodos para utilizar essa informação para identificação precoce de riscos de segurança de alimentos. Esta abordagem holística, olhando para as influências internas e externas que afetam o desenvolvimento do risco na cadeia alimentar, tem o potencial de ajudar os avaliadores de risco a identificar proativamente os riscos emergentes. A importância do crescente número de fatores globais na segurança de alimentos foi reconhecida e a abordagem holística está atualmente sendo explorada na Holanda.

Instrumentos probabilísticos de modelagem. Os países coletam dados sobre o que as pessoas comem e sobre as toxinas às quais as pessoas estão expostas via alimentos. SAFE FOODS explorou o potencial de usar instrumentos probabilísticos de modelagem para combinar bancos de dados de consumo e resíduo de alimentos com a meta de permitir aos avaliadores de risco projetar a exposição de uma população de contaminantes de alimentos por um longo. Os avaliadores de risco podem então prever, por exemplo, se vegetarianos têm uma exposição maior a pesticidas do que não-vegetarianos, e a que ponto sua exposição alcança um nível crítico. Este instrumento tem o potencial de facilitar uma avaliação de exposição mais realista do que as práticas atuais porque permite aos avaliadores de risco identificar grupos vulneráveis dentro da população.

Visões do consumidor europeu de análises de risco. As perspectivas do consumidor sobre a análise de risco foram exploradas previamente no nível nacional, mas as diferenças em questões e métodos usados para coletar as respostas tornaram difícil ver como os valores culturais influenciam as percepções de riscos alimentares. Um entendimento de como essas diferenças culturais podem influenciar a análise de risco é de crucial importância em sociedades multiculturais. SAFE FOODS venceu essa lacuna conduzindo uma série de levantamentos, entrevistas e grupos de pesquisa nos Estados-membros da UE que eram regionalmente representativos. A

pesquisa com consumidores do projeto fornece uma visão de como os consumidores europeus otimizariam o processo de análise de risco de alimentos.

Análise comparativa da administração do risco alimentar na Europa. A administração de risco é estruturada diferentemente nos níveis nacional e europeu. Por exemplo, no Reino Unido, o manejo de risco e a avaliação de risco são tratados por órgãos separados, enquanto na Hungria essas responsabilidades se sobrepõem. No nível europeu, onde essas tarefas são separadas, as autoridades envolvidas em segurança de alimentos reconhecem que podem mandar mensagens mais claras aos consumidores com a otimização da colaboração. SAFE FOODS analisou a divisão de responsabilidade para a administração de risco em cinco Estados-membros e no nível europeu. O projeto extraiu exemplos de melhor prática dessas comparações entre países para contribuir para a otimização da interação entre os gerentes de risco e os avaliadores de risco, identificando quando essa interação é útil.

Uma nova estrutura integrada de análise de risco para a segurança de alimentos. Estendendo ainda mais os modelos de análise de risco previamente desenvolvidos pelo *Codex alimentarius* e a Comissão Europeia, SAFE FOODS desenvolveu uma nova estrutura integrada de análise de risco visualizada como um processo cíclico envolvendo vários estágios, incluindo enquadramento, estimativa, avaliação, gerenciamento (tomada de decisões, implementação, e monitoramento) e revisão. As novidades apresentadas nesta abordagem incluem a distinção explícita da estruturação e estágios de avaliação, maior envolvimento dos interessados, e a inclusão de outros fatores além dos riscos no estágio de avaliação científica.

CONCLUSÕES

O aspecto comum por toda a pesquisa multidisciplinar do SAFE FOODS foi assegurar que as descobertas contribuíssem para fazer avançar o modelo de análise de risco. O projeto traduziu as descobertas acima em recomendações de melhor prática e usou essas recomendações para corrigir o modelo clássico de análise de risco.

A estrutura básica do modelo do SAFE FOODS ergue-se da estrutura de três fases desenvolvida pela FAO/WHO e segue o modelo clássico em um processo de cinco estágios, envolvendo enquadramento, estimativa, avaliação, manejo de risco e revisão.

Os principais objetivos do desenvolvimento desta estrutura de análise de risco de alimentos foram:

1. levar em conta os benefícios sempre que possível e explorar modos de equilibrar riscos e benefícios;
2. ampliar os aspectos do risco, considerando os impactos éticos, sociais, e ambientais; e
3. assegurar o envolvimento formal dos interessados.

PRINCIPAIS PUBLICAÇÕES

SHEPHERD, T.; DOBSON, G.; VERRALL, SR.; CONNER, S.; GRIFFITHS, DW.; MCNICOL, JW.; DAVIES, HV. & STEWART D. (2007). Potato metabolomics by GC-MS: what are the limiting factors? *Metabolomics* 3(4):475-488.

Edição especial de *Food and Chemical Toxicology* Early Awareness of Emerging Risks to Food and Feed Safety, Volume 47, issue 5, May 2009; Guest Editors: Harry A. Kuiper and Gijs A. Kleter.

Edição especial de *Food and Chemical Toxicology* Probabilistic risk assessment of dietary exposure to single and multiple pesticide residue or contaminants, Volume 47, December 2009, guest editors: Hans J.P. Marvin, Polly E. Boon and Andy Hart.

VAN DIJK, H.; HOUGHTON, J.; VAN KLEEF, E.; VAN DER LANS, I.; ROWE, G. & FREWER, L. (2008). Consumer responses to communication about food risk management. *Appetite*, 50(2-3),340-352.

VOS, E. AND WENDLER, F. (eds.), Food Safety Regulation in Europe. A Comparative Institutional Analysis, *Series lus Commune*, Vol. 62, Intersentia, Antwerp, 469 p. (20 06).

Edição especial de Food Control featuring articles on the new integrated SAFE FOODS risk analysis model, of which the publication is foreseen for 2010; Guest Editors: Harry A. Kuiper and Gijs A. Kleter.

Os consumidores europeus compram alimentos OGM?

<i>Acrônimo</i> CONSUMERCHOICE <i>Acrônimo do Programa</i> FP6-FOOD <i>Número do Contrato</i> 518435 <i>Período</i> Maio de 2006 – Outubro de 2008	<i>Coordenador</i> Dr Vivian MOSES Strand GB-London, WC2R 2LS United Kingdom v.moses@qmul.ac.uk
---	--

<i>Parceiros</i> Siglinde FISCHER BioAlliance AG, Frankfurt (DE) Jaroslav DROBNIK Association Biotrin, Prague (CZ) Tomasz TWARDOWSKI Agencya Edytor, Kiekrz (PL) Raivo VOKK Tallinn University of Technology, Department of Food Processing, Tallinn (EE) Giorgos SAKELLARIS National Hellenic Research Foundation, Athens (GR) Peter RASPOR University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Ljubljana (SI) Barbara GALLANI Bureau Europeen des Unions de Consommateurs, Brussels (BE)	Victoria WIBECK Linkoping University, Linkoping (SE) Louis LEMKOW Universitat Autònoma de Barcelona (ES) Patricia OSSEWEIJER Delft University of Technology (NL) George GASKELL London School of Economics and Political Science (UK) Hugo SCHEPENS EuropaBio, Brussels (BE) Steve MARINKER Citigate Dewe Rogerson Ltd, London (UK)
--	---

BACKGROUND E OBJETIVOS

Em seguida à adoção pela UE em 2004 da rotulagem compulsória de todos os produtos contendo GM em qualquer ingrediente, era incerto o quão rapidamente tais produtos apareceriam nas prateleiras de estabelecimentos varejistas de mantimentos. Parece que, nos fins de 2005, alimentos GM rotulados, de um tipo ou de outro, estavam à venda em vários países da Europa.

Durante a década passada, aconteceram diversos debates e campanhas focando as culturas geneticamente modificadas e seus produtos alimentares. Várias pesquisas de opinião pública e grupos de pesquisa explorando as atitudes do público em relação aos produtos alimentícios contendo GM mostraram que a maioria do público europeu era antipática à tecnologia, com opiniões variando de alguns que eram vigorosamente opostos, uma parte entusiasticamente a favor, enquanto a maioria das pessoas era essencialmente desinteressada.

Esses levantamentos eram hipotéticos ao perguntar “O que você faria se você tivesse a oportunidade de comprar produtos GM?”, uma vez que é questionável se as atitudes expressas podem ser tomadas como procuração para a ação. Houve alguns

experimentos em pequena escala nos quais um número limitado de consumidores puderam escolher entre produtos idênticos com e sem o rótulo GM, mas com um diferencial de preço em favor da opção GM. Entretanto, nenhuma exploração foi feita sobre o que os consumidores realmente fariam quando em compras em locais familiares oferecendo alimentos rotulados como contendo ou sendo derivados de ingredientes GM.

Os principais objetivos estratégicos desses estudos foram, portanto:

- determinar a discrepância entre as atitudes medidas dos consumidores europeus em relação aos alimentos GM e suas compras reais quando tendo a oportunidade de escolher entre GM e não-GM;
- registrar produtos GM oferecidos à venda, como os consumidores são informados pela rotulagem, pelos preços e pelas informações suplementares, e aposição do produto e proeminência nas prateleiras;
- suplementar as descobertas com pesquisas de opinião específicas e grupos de pesquisa;
- fornecer evidência confiável das escolhas dos consumidores sobre escolhas de alimento GM a interessados em cadeias de suprimentos para ajudá-los em seu planejamento futuro.

O projeto CONSUMERCHOICE “Os europeus compram alimentos GM?” conduziu a uma série de estudos que incluíram a exploração das escolhas de compra na República Checa, Estônia, Alemanha, Grécia, Holanda, Polônia, Eslovênia, Espanha, Suécia e no Reino Unido.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

Para fazer uma avaliação geral dos produtos GM rotulados no mercado, o primeiro estudo usou uma série de visitas ao acaso às lojas para determinar quais supermercados ofereciam esses produtos por um longo período. Paralelamente a essas visitas, uma análise da mídia sobre questões GM foi feita para assegurar um entendimento geral da situação em cada país, aplicando um método de uso comum de análise de conteúdo para estabelecer a tônica da cobertura da mídia. Isso foi suplementado com a identificação de pontos de vista políticos com o acompanhamento das declarações sobre políticas em questões GM dos partidos políticos.

Dois estudos quantitativos usando questionários também foram conduzidos para identificar:

1. se cidadãos poloneses e britânicos agora morando nos Estados Unidos estavam cientes de que os produtos GM não precisam ser rotulados nos EUA;
2. se eles estavam comprando esses produtos; e
3. como se sentiam sobre essa situação.

Um terceiro estudo quantitativo comparou as compras reais das pessoas com suas percepções e atitudes com relação a produtos GM rotulados. Isso foi alcançado comparando os dados de compra de produtos GM com as respostas dos consumidores a um breve questionário. Estes dados foram coletados de modos idênticos em cada país com questionários traduzidos para a língua nacional, usando os serviços da companhia GfK (Growth for Knowledge). O questionário apresentou questões sobre o nível de conhecimento de quem respondeu sobre a rotulagem dos produtos GM e sua percepção e atitudes sobre alimentos GM. Os dados foram interpretados usando o software Pacote Estatístico para Ciências Sociais (SPSS),

versão 16. Testes de χ^2 foram usados para comparar respostas dadas por compradores e parentes não compradores.

Finalmente, um estudo qualitativo foi conduzido em quatro países europeus: Suécia, Reino Unido, Espanha e a Holanda. Isso foi feito através de discussões com grupos de pesquisa, usando diretrizes padronizadas para tamanho de grupo, configuração, questionamento e interpretação. O estudo explorou ainda mais as visões dos consumidores sobre produtos GM rotulados e sobre sua vontade de comprar esses produtos, juntamente com as pressuposições implícitas de valor e as premissas subjacentes a seus argumentos.

PRINCIPAIS DESCOBERTAS E RESULTADOS

Durante o período do projeto, o debate público sobre questões GM na Europa estava relativamente calmo, embora marcadamente mais ativo em alguns países em ocasiões particulares, tal como no Reino Unido no verão de 2008 e na França no começo do mesmo ano. A tônica da cobertura na mídia mudou durante o período de negativo-neutro para neutro-levemente positivo.

O preparo de gerentes de supermercados para discutir a questão GM variou entre companhias individuais, assim como entre países. A maioria dos supermercados de grandes cadeias não estava querendo fornecer dados de vendas de produtos rotulados GM. Pequenos lojistas geralmente não estavam cientes da origem transgênica de alguns produtos em suas lojas. Entretanto, nenhum deles, grandes ou pequenos, relataram nenhuma reação de consumidores, quaisquer que fossem.

Determinamos que os produtos GM rotulados estavam à venda na Estônia, Polônia, República Checa, Espanha, Holanda e no Reino Unido. Na Eslovênia, Grécia, Alemanha e Suécia, nenhum produto GM rotulado foi encontrado no mercado durante o período do projeto. Nesses países onde os alimentos rotulados GM estavam à venda, a maioria era de óleos de soja GM ou milho GM vendidos ou como óleo de cozinha ou incorporados em outros produtos, tais como margarina e salgadinhos. Verificamos que o número de produtos contendo GM em oferta era consideravelmente menor do que antes da introdução da regulamentação de rotulagem.

Os resultados dos dois questionários a europeus vivendo nos EUA mostraram que a maioria deles (92 %) disse que sabia o que eram alimentos GM e mais da metade estava ciente que produtos GM não rotulados estavam à venda nos EUA. Entretanto, esse conhecimento não conseguiu levar a maioria (73 %) a fazer qualquer esforço para identificar esses produtos e evitá-los.

Para todos os países com produtos GM rotulados à venda, 75 % dos que responderam alegaram saber que esses produtos têm que ser rotulados, por lei. Quase 60% disseram saber como distinguir um produto contendo GM de um convencional. Embora nem todos tenham lido a lista detalhada de ingredientes antes de comprarem um particular alimento, 54.1 % dos que responderam disseram que haviam lido. Não houve diferença significativa entre compradores e não-compradores nas respostas sobre essas três questões. Mais da metade dos que responderam disseram que não eram cuidadosos em evitar alimentos rotulados GM.

A comparação entre o comportamento real dos pesquisados e suas percepções não revelou diferenças significativas entre compradores e não-compradores. Metade dos pesquisados (49.8%) disse que *não comprou* alimentos rotulados GM. De interesse, 48% dos compradores de GM pensavam que *não haviam comprado* GM alimentos

rotulados GM. Inversamente, quase 23% dos não compradores pensavam que *tinham comprado* alimentos rotulados GM. Um elevado número de pesquisados (30%) alegou que não sabia.

Estudos com grupos de pesquisa mostraram que o alimento GM não está em alta nas mentes das pessoas quando se discutem hábitos de compra de alimentos. A rotulagem foi exigida por participantes, mas poucos deles realmente olharam os rótulos quando compraram alimentos. Argumentos céticos foram mais dominantes do que consideração dos benefícios, mas parece provável que, no futuro, o clima e restrições da disponibilidade de alimentos pela população possa levar a maior aceitação dos alimentos GM.

CONCLUSÕES

Em geral, esses estudos levam-nos a concluir que apenas um pequeno número de produtos GM rotulados está à venda e sendo comprado em vários países europeus. Como o número de produtos GM disponíveis desde a introdução da rotulagem declinou significativamente, podemos concluir que os consumidores europeus estão restritos em sua escolha de compras, refletindo a falta de disponibilidade desses produtos nas lojas.

O fato de três em cada quatro pessoas alegarem saber que o alimento tem que ser rotulado, e que dois terços dizem que não podem distinguir produtos GM de não-GM, pode refletir que menos de 50% dos pesquisados se deram ao trabalho de ler rótulos antes de comprar um alimento. Alternativamente, isso pode significar que a informação do rótulo não é entendida ou é mal-interpretada. Outra razão pode ser que as pessoas simplesmente não estão interessadas: isso parece ser confirmado pela descoberta de que apenas 30% dos pesquisados serem cuidadosos em não comprar alimentos com ingredientes GM.

Nossos resultados, incluindo os estudos com poloneses e britânicos residentes nos Estados Unidos, sugerem que a maioria das pessoas não está realmente interessada, nem muito alerta à presença de ingredientes GM ou produtos. Pesquisas de opinião em outros lugares mostraram um nível baixo e em declínio no interesse na questão GM quando os pesquisados são perguntados sem estímulo a uma lista de preocupações sobre alimentos. É apenas quando os OGMs são trazidos especificamente à sua atenção que eles mostram antipatia. Isso também é confirmado pelos resultados das discussões nos grupos de pesquisa.

De maneira geral, os consumidores continuam a mostrar uma atitude negativa em relação a ingredientes GM em produtos alimentícios e à tecnologia gênica em particular. Quando perguntados se comprariam alimentos GM, supondo benefícios, como preços menores, produtos mais saudáveis e produção “ambientalmente amigável”, a maior parte das pessoas permaneceu negativa. Isso não é refletido nos resultados dos grupos de pesquisa, onde as pessoas pareciam mais positivas em relação a alimentos GM com benefícios especiais. Os estudos com os grupos de pesquisa levam à conclusão que os ingredientes geneticamente modificados não são um problema que as pessoas consideram seriamente enquanto fazem compras. Cuidados com o ambiente ou qualidade em relação ao preço são mais importantes. Seria interessante explorar mais as razões para essas diferenças.

O fato de que os produtos GM rotulados estão disponíveis e realmente adquiridos mostra que na verdade há um mercado para tais produtos. Nossos resultados podem sugerir que esse mercado pode ser ainda maior do que se crê, uma vez que 20% dos não-compradores já estão comprando alimentos GM e cerca de 30% nem sequer

sabem se estão ou não comprando. É interessante notar que os dados não mostram diferenças significativas entre compradores e não-compradores.

Nossas observações sublinham o fato de que as pessoas dizem diferem do que elas fazem. Quando perguntados se haviam comprado alimentos GM, metade dos pesquisados disse que não. Mas a análise do código de barras de suas compras mostrou que metade deles estava errada e que tinha de fato comprado tais produtos GM. Talvez eles não soubessem o que haviam comprado. Algumas pessoas também pensavam que haviam comprado alimentos GM quando, de fato, não haviam. Nossos dados não são suficientemente extensos para penetrar mais fundo nas mentes dos compradores, mas podemos razoavelmente concluir que:

- a maioria das pessoas não evita ativamente o alimento GM, sugerindo que não estão muito preocupadas com a questão GM;
- ligar os dados de compra com as respostas a questionários é um modo mais confiável de estabelecer atitudes do que apenas pesquisas de opinião.

Tabela 1. *Número de produtos rotulados GM (códigos de barras) por país encontrado nos supermercados em 2007.*

País	Tipo de rotulagem	N.º de códigos de barras
República Checa	GM	8
Holanda	GM	18
Polônia	GM	1
Espanha	GM	7
Reino Unido	GM	27
Estônia	GM	13
Alemanha	GM	29
Suécia	GM	22
Eslovênia	GM	13
Grécia	GM	0

PRINCIPAIS PUBLICAÇÕES

KNIGHT J.G; , MATHER D.W.;. HOLDSWORTH, D. K. &. ERMEN, D. F; (2007). Acceptance of GM food — an experiment in six countries. *Nature Biotechnology*, 25 5:507-508.

NOUSSAIR, C; ROBIN, S; RUFFIEUX, B; (2004). Do consumers really refuse to buy genetically modified food? *The Economic Journal*, 114 1:102-120.

MARKS, L.; KALAITZANDONAKES, N.G. AND VICKNER, S. (2004). Consumer purchasing towards GM foods in The Netherlands, in *Consumer Acceptance of Genetically Modified Foods* by R E Evenson, Economic Growth Center, Department of Economics, Yale University, Connecticut, USA.

SPENCE, A; TOWNSEND. E; (2006). Examining Consumer Behavior Toward Genetically Modified (GM) Food in Britain. *Risk Analysis*, 26 3: 657-670.

OSSEWEIJER, P; KINDERLERER,J. ; AMMANN, K; (2009). Societal issues in industrial biotechnology. Chapter in Soetaert, Vandamme (eds): *Industrial Biotechnology. Sustainable Growth and Economic Success*. Wiley. No prelo.

Rede de comunicação de pesquisa em biossegurança

<i>Acrônimo</i> BIOSAFENET <i>Acrônimo do Programa</i> FP6-FOOD <i>Número do Contrato</i> 043025 <i>Período</i> September 2006 – February 2009	<i>Coordenador</i> Prof. Dr. Joachim SCHIEMANN Julius Kuhn Institute (JKI) Federal Research Centre for Cultivated Plants Head of the Institute for Biosafety of Genetically Modified Plants Erwin-Baur-Strasse 27 D-06484 Quedlinburg Germany joachim.schiemann@jki.bund.de
---	---

<i>Parceiros</i> Mark TEPFER International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Trieste (IT) Ervin BALAZS Agricultural Research Center of Hungarian Academy of Sciences, Martonvasar (HU)	Kristina SINEMUS Genius GmbH, Darmstadt (DE) Giorgos SAKELLARIS National Hellenic Research Foundation, Athens (GR)
--	--

BACKGROUND E OBJETIVOS

No debate sobre a biossegurança de Organismos Geneticamente Modificados (OGMs), os resultados e mesmo a existência da pesquisa em biossegurança de OGM são frequentemente ignorados. Como consequência, a base já estabelecida e sólida para a discussão científica sobre a biossegurança dos OGM não é completamente explorada na Europa e no mundo todo. A principal meta deste projeto foi promover o envolvimento científico e sua percepção mais ampla nas discussões e tomada de decisões na biossegurança dos OGM. Como tal, o BIOSAFENET não foi um projeto de pesquisa, mas uma iniciativa de formar uma rede para a pesquisa de biossegurança.

As atividades cobriram instrumentos de informação para cientistas, tomadores de decisão, interessados e o público em geral; e reuniões científicas e suporte logístico para a formação de redes. Um objetivo principal foi reforçar a posição dos pesquisadores europeus na arena internacional. Para conseguir isso, a participação ativa dos cientistas europeus no Simpósio Internacional sobre Biossegurança de OGM (ISBGMO), o único internacionalmente reconhecido neste importante campo da pesquisa, assim como foram apoiadas atividades de formação de rede de cientistas nos novos Estados-membros e países associados. As plataformas fornecidas pela Sociedade Internacional para Pesquisa em Biossegurança (ISBR) foram exploradas para realçar o papel dos especialistas europeus no debate internacional sobre biossegurança. Além da formação de redes, outros instrumentos de comunicação aumentaram o fluxo de informações sobre resultados da pesquisa em biossegurança. Os grupos alvo eram cientistas, regulamentadores, tomadores de decisões, a mídia e o público em geral. Essas atividades trataram de demandas específicas para cada grupo, da informação sobre projetos específicos, compilação de conhecimentos para a avaliação de questões críticas sobre biossegurança (futuras) e apresentações de resultados de pesquisa de biossegurança para o público em geral.

As atividades do BIOSAFENET foram coordenadas no projeto “Envolvimento global de cientistas da pesquisa pública na regulamentação da biossegurança e biotecnologia agrícola (Science4BioReg)”. O intercâmbio com outros projetos financiados pela UE conduzindo pesquisa sobre OGM também foi estabelecido via Advisory Board.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

O projeto foi estruturado em quatro blocos de trabalho e a seção de gerenciamento:

- **WP1.** Compreendeu apoio aos cientistas europeus para participar ativamente nos simpósios de 2006 e 2008 ISBGMO sobre biossegurança, assim como a organização de seminários de especialistas sobre questões chave de pesquisa em biossegurança. O BIOSAFENET financiou os seminários e organizou o(s) local (ais) e a logística, com os parceiros do projeto participando ativamente nos seminários e coorganizando-os. Relatórios de recomendações foram/são publicados sobre as questões discutidas nos seminários.
- **WP2.** O projeto estabeleceu um intercâmbio com a Sociedade Internacional para Pesquisa em Biossegurança (ISBR), os organizadores dos simpósios ISBGMO, em dois aspectos. O comitê do programa e a BIOSAFENET coordenaram os convites e as atividades dos cientistas europeus no simpósio. Uma vez que a ISBR também forneceu uma plataforma internacional baseada em ciência para a discussão e promoção de questões de biossegurança, BIOSAFENET estabeleceu, juntamente com a ISBR instrumentos de comunicação geral envolvendo especialistas europeus, i.e. um website e uma circular. Além da ligação com a ISBR, WP 2 apoiou as atividades de formação de rede científica nos Balcãs e na Turquia, incluindo reuniões com representantes de outros projetos financiados pela UE, tais como Science4BioReg, CO-EXTRA, TransContainer e PharmaPlanta. Outra atividade foi a reconstrução de um banco de dados de pesquisa em bios-segurança (anteriormente GMO RES COM), agora sobre a cobertura do ICGB e renomeado *BiosafeRes*. O intercâmbio com outros projetos financiados pela UE foi fomentado via Advisory Board.
- **WP3** tinha a tarefa de estabelecer uma plataforma na Internet para a disseminação de informações relativas à biossegurança a todos os grupos de interessados e ao público.
- **WP4** foi criado para informar a mídia e os jornalistas sobre questões de biossegurança. A informação sobre tópicos da pesquisa em biossegurança foi compilada e editada para distribuição para a mídia.

PRINCIPAIS DESCOBERTAS E RESULTADOS

Em setembro de 2006, o projeto iniciou pela seleção de cientistas para a delegação europeia ao 9.º Simpósio Internacional de Biossegurança de Organismos Geneticamente Modificados (ISBGMO) em Jeju, Coréia. Onze cientistas (de seis países da UE) receberam apoio para participar como palestrantes, presidentes de sessão ou organizando comitês. Em 2008, o 10.º ISBGMO foi organizado em Wellington, Nova Zelândia, e a participação de 16 cientistas (de dez países da UE) foi paga pelo projeto. Resumos e relatórios de ambos os simpósios estão disponíveis no site da ISBR (www.isbr.info) ou serão publicados na *Environmental Biosafety Research*.

Seis seminários para especialistas foram organizados durante o período do projeto BIOSAFENET sobre os seguintes tópicos:

1. vírus vegetais e engenharia genética;
2. adaptação de culturas transgênicas;
3. experiência em monitoramento de milho *Bt* ;
4. estatísticas para experimentos de campo em relação à avaliação de risco;
5. insetos transgênicos; e
6. plantas GM e tolerância a stress abiótico.

O BIOSAFENET convidou cientistas com especialização em seus respectivos campos pra explorar os assuntos em uma atmosfera de mente aberta com um grupo de 20 cientistas, e uma reunião de dois a três dias. As discussões e conclusões de cada seminário foram ou serão publicadas como comentários na *Environmental Biosafety Research*. Vários seminários foram organizados em seguida a reuniões de grupos de trabalho da EFSA, Painel GMO , proporcionando uma ligação direta e em apoio entre a pesquisa de biossegurança e avaliação de risco ambiental. O conceito de seminários de especialistas será adotado pelo ISBR para mais atividades.

BIOSAFENET reconstruiu um banco de dados de projetos de pesquisa de biossegurança. O novo banco de dados, gerenciado pelo ICGEB agora chamado *BiosafeRes* (<http://www.icgeb.org/~gmores/prod/index.php>), fornece acesso público livre no mundo todo para descrições de projetos de pesquisa atuais e anteriores sobre biossegurança de OGMs. Os grupos alvo variam de cientistas a jornalistas e o público em geral. O banco de dados também apóia pesquisadores em países em desenvolvimento ansiosos por estender seus contatos com cientistas europeus e desenvolver projetos colaborativos com eles.

O website www.gmo-safety.org , editado por um parceiro, foi apoiado em parte pelo BIOSAFENET por promover um fórum para disseminar informações sobre pesquisa de biossegurança para um público mais amplo. Seus serviços incluem o *Biosafenet Download Centre* para trabalhos e publicações livremente acessíveis, e o *Biosafenet Navigator* que fornece links a websites relevantes. O número de visitantes entre 2007 e junho de 2009 subiu de 16 mil a aproximadamente 25 mil por mês.

Além disso, material para mídia e notícias sobre questões destacadas como “plantas resistentes a herbicidas e biodiversidade”, “o ecossistema do solo” e “*Bt* e as borboletas” foram preparadas e distribuídas para a mídia e os jornalistas. Durante o período do projeto, foram compilados 21 materiais para a mídia e elaborada uma lista com mais de 800 jornalistas europeus/internacionais para receber mais informações sobre pesquisa de biossegurança.

Várias atividades do BIOSAFENET também estabeleceram contatos diretos com grupos alvos e interessados. Em maio de 2008, Science4Bioreg e BIOSAFENET organizaram uma cabine de informações e vários eventos colaterais na 4.^a Conferência dos Participantes do Protocolo de Cartagena, 12 a 16 de maio de 2008, em Bonn, Alemanha. Cientistas do Science4Bioreg, BIOSAFENET e outros projetos financiados pela UE introduziram seus tópicos de pesquisa de biossegurança e fontes de informações relacionadas a uma audiência internacional.

Cientistas europeus trabalhando no campo da biossegurança foram contatados diretamente em várias conferências e seminários para participarem de discussões científicas sobre biossegurança. Além disso, a participação ativa dos parceiros do BIOSAFENET em conferências regionais, seminários e reuniões de trabalho sobre avaliação de risco e biossegurança focalizou nos novos Estados-membros, a região dos Balcãs e a Turquia (17 países), e uma lista de 90 especialistas dessas regiões foi compilada. Uma troca contínua com a ISBR, a *Pannonian Plant Biotechnology*

Association (PPBA) e a *Black Sea Biotechnology Association* foi mantida durante o projeto.

O projeto BIOSAFENET terminou com uma conferência pública feita em 29 de junho de 2009 em Berlim. Os parceiros do projeto e representantes das instituições cooperadoras, tais como a ISBR e PRRI/Science4Bioreg, relataram projetos, atividades conjuntas e conclusões. A conferência foi concluída com um painel de discussão por cientistas, jornalistas, indústria e representantes de ONG sobre a comunicação da pesquisa em biossegurança, levando em conta as preocupações do público.

CONCLUSÕES

O Conselho Consultivo do BIOSAFENET, reconhecidos especialistas europeus de biossegurança e membros administradores de outros projetos financiados pela UE avaliaram as atividades na metade e no final do projeto. O conselho destacou os instrumentos flexíveis desenvolvidos e o desempenho geral do projeto, classificando o formato e o conteúdo dos seminários de especialistas e relatórios de recomendações como instrumentos convincentes para resolver problemas específicos de biossegurança. O conceito do seminário será adotado pela ISBR para eventos futuros. O conselho também recomendou manter o banco de dados (*BiosafeRes*) e as atividades do website (www.gmo-safety.eu), e mesmo a tradução delas em línguas adicionais da UE. Isso está essencialmente alinhado com o feedback do evento colateral em COP/MOP 4, quando os participantes realçaram a necessidade de ter acesso às informações científicas e gerais de um modo “uma-só-parada”. A ICGEB continuará a gerenciar o *BiosafeRes*. A continuação e extensão do website e atividades relacionadas, tais como editar as informações pinçadas da media, dependerão de financiamento futuro de projeto no nível nacional ou europeu.

O intercâmbio com a comunidade científica foi realizado mais efetivamente através do apoio de redes existentes de organizações como a ISBR, PPBA ou a *Black Sea Biotechnology Association*. Além disso, seminários sobre avaliação de risco de OGM e biossegurança para pesquisadores regionais foram bem aceitos e podem aumentar a conscientização dos tópicos discutidos. Uma estrutura de comunicação regional refletindo as necessidades regionais melhoraria o envolvimento, mas ainda não está bem institucionalizada na maioria dos novos Estados-membros ou países associados.

O BIOSAFENET facilitou os contatos iniciais e as reuniões de pesquisadores e especialistas interessados nessas regiões, mas iniciativas de apoio serão necessárias para estabelecer reuniões rotineiras e fomentar a integração internacional.

PRINCIPAIS PUBLICAÇÕES

TEYCHENEY, PY.; TEPFER, M. (2007). Possible roles of endogenous plant viral sequences and transgenes containing viral sequences in both virus resistance and virus emergence. *Environmental Biosafety Research*, 6 (4):219-222.

WILKINSON, M.J.; TEPFER, M. (2009). Fitness and beyond: Preparing for the arrival of GM crops with ecologically important novel characters. *Environmental Biosafety Research*, 8 (1):1-14.

PERRY, J.N.; TER BRAAK, C.J.F.; DIXON, P.M.; DUAN, J.J.; HAILS, R.S.; HUESKEN, A.; LAVIELLE, M.; et al; (2009). Statistical aspects of environmental risk assessment for GM plants. *Environmental Biosafety Research*, 8 (2):65-78.

WILHELM, R.; SANVIDO, O.; CASTANERA, P.; SCHMIDT, K.; SCHIEMANN, J.; (2009). Experience from monitoring commercial cultivation of *Bt* maize in Europe – conclusions and recommendations for future monitoring practice. *Environmental Biosafety Research*, 8, no prelo.

BIOSAFENET (2007). Strengthening the voice of European biosafety research. *The Parliament Magazine*, 256, 26 November 2007, 32.

BIOSAFENET (2009). Driving biosafety research on GM plants. *eStrategies – Projects*; April 2009, 68-69.

Estudo piloto de abordagens inovadoras à comunicação pública de ciências naturais e biotecnologia por estudantes e jovens pesquisadores

<i>Acrônimo</i> BIOPOP <i>Acrônimo do Programa</i> FP6-FOOD <i>Número do Contrato</i> 007086 <i>Período</i> Janeiro de 2005 – Dezembro de 2006 <i>Website do projeto</i> http://www.biopop-eu.org/	<i>Coordenador</i> Mr Francesco LESCAI Associazione Nazionale dei Biotecnologi Italiani Via della Beverara 123 I-40131 Bologna Italy Francesco.lescai@yebn.org
---	---

<i>Parceiros</i> Gianpaolo PEREGO AETHIA SRL, Colletterto Giacosa (IT) Federico NERESINI Observe, Vicenza (IT) Amelie CHABOUREAU Amicale des Eleves ingenieurs de l'ecole de Biotechnologie de Strasbourg (FR)	Holger NICKEL Biotechnologische Studenteninitiative, Koln (DE) Sylwia GORLACH Politechnika Lodzka, Lodz (PL) Terry VRIJENHOEK Genomics Network for Young Scientists, Wageningen (NL)
---	---

BACKGROUND E OBJETIVOS

Tome duas cidades importantes de partes diferentes da Europa: Itália e Holanda. Imagine, de um lado, jovens cientistas ansiosos por discutir seu trabalho, e, do outro lado, um grupo de homens-e-mulheres-nas-ruas com vontade de compartilhar seus pontos de vista e contribuir para novos papéis em ciência. Isso é o BIOPOP!

Este projeto é uma notável mistura de entusiasmo e ideias inovadoras de cinco organizações de jovens cientistas da Jovem Rede de Biotecnologia Europeia, liderada pela Associação de Biotecnólogos Italianos juntamente com o BtS, Amicale, GeNeYouS, TU, Lodz ASSB, Aethia e Observe Science in Society.

O BIOPOP trata das grandes questões presentes na interface “ciência e sociedade”. Reconhecendo isso, a Comissão Europeia concordou em financiar essa fonte de novas ideias, estabelecendo com isso um novo recorde da mais jovem faixa etária de pesquisadores e estudantes já agraciados com uma doação na estrutura do programa FP5 para a pesquisa e o desenvolvimento tecnológico.

Evocando as palavras “BIOtecnologia” e “POPular”, e associando-as com música pop e o movimento pop, o projeto visa a estabelecer um novo formato para comunicação e participação pública na ciência, criando um ambiente especial em que a próxima geração de cientistas e cidadãos possa realmente se encontrar e efetivamente estabelecer um diálogo e comunicação de longo prazo.

Um dos eventos do BIOPOP foi a colocação de uma barraca especialmente projetada nas principais praças dessas duas importantes cidades, onde os pesquisadores e transeuntes tinham a oportunidade de estabelecer um relacionamento único entre a sociedade e a ciência.

O projeto foi desenvolvido em estreita colaboração com profissionais da mídia, organizada em ambos os países em grupos de contato com a mídia – jornalistas “ativistas” e comunicadores que discutiram, compararam e revisaram as ideias dos jovens cientistas sob vários pontos de vista.

O primeiro evento teve lugar em Bolonha, em outubro de 2005; e o segundo em Delft, em abril de 2006. Quatro mil pessoas em Bolonha, 2 mil em Delft contribuíram para uma extraordinária experiência que tocou em questões “quentes”, tais como terapia anticâncer, células-tronco, OGM e segurança de alimentos, e patentes de coisas vivas.

Estes jovens cientistas discutiram tais questões abertamente com as pessoas que encontraram, compartilharam seus sentimentos e emoções, ouviram e coletaram reações, desafiando a si próprios em seus próprios tópicos de pesquisa. Ao mesmo tempo, pessoas do público puderam expressar seus pontos de vista sobre iniciativas de regulamentação e sobre campos da ciência que mereciam mais financiamento.

Uma complexa avaliação do sistema foi usada para acompanhar o intercâmbio entre os jovens cientistas e o público e medir o impacto desse novo modelo de comunicação tanto sobre os cidadãos como os pesquisadores.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

O projeto produziu um formato de comunicação estruturado para parear com as pessoas participantes e a abordagem na qual foram treinados. Esse foi um treinamento sob medida, baseado em um modelo especificamente projetado e usando um novo sistema de manejo de conteúdo para assegurar que os jovens cientistas aplicassem corretamente o modelo.

As pessoas

As pessoas envolvidas no BIOPOP eram os professores e animadores, mais pesquisadores e estudantes de ciências naturais. O processo foi, portanto, *sui generis*, no sentido de que os participantes vieram de seus laboratórios para encontrar o público e, após seu envolvimento, voltaram ao seu trabalho diário em ciência. Eles passaram por uma experiência especial de interação com o público, enquanto permaneciam ativos em ciência. O objetivo era proporcionar um processo de enriquecimento, com impacto esperado não apenas, ou não principalmente, sobre o público, mas sobre os próprios cientistas.

Abordagem

Comparado com experiências anteriores de interação, o modelo desenvolvido requer que os cientistas se encontrem com o público em um ambiente neutro (i.e. não baseado no cargo), para compartilhar pontos de vista e não apresentar posições. O modelo visa a criar interação entre pares e não se trata de cientistas encontrar o público, mas de uma interação interpessoal em que cada um tem o seu ou a sua própria bagagem de experiência para trocar.

Treinamento

Para assegurar esses aspectos do modelo de comunicação, um conjunto especial de módulos de treinamento foi desenvolvido com o objetivo específico de:

1. desconstruir a visão baseada em função do cargo e categorizada do público;
2. desenvolver uma abordagem ao público baseada no compartilhamento de experiência;
3. treinar em um sistema diferente em conteúdo/administração de conhecimento, desenvolvido especificamente sob o projeto.

Contexto

Os aspectos principais do ambiente no qual a comunicação foi estabelecida eram:

- baseadas na juventude, i.e. inevitavelmente, as interações seriam essencialmente entre jovens;
- informal, i.e. as reuniões, discussões e todas as interações durante o evento foram abertas e moldadas pelas contribuições dos participantes;
- baseada em ciência: apesar da presença de pessoas jovens e da informalidade, era evidente que esta era uma oportunidade para discutir ciência com cientistas. Cada experiência era essencialmente científica.

Gerenciamento do conteúdo

Instrumentos específicos foram desenvolvidos para gerenciar a troca de informações durante o evento e, portanto, estabelecer uma interação frutífera, evitando o chamado “modelo deficitário”.

Os instrumentos desenvolvidos ligaram o conhecimento científico à vida diária, estabelecendo, portanto, um processo de gerenciamento de conhecimento que foi mais complexo do que qualquer um apenas baseado em fatos, e mais próximo do modo comum de ligar diferentes níveis de informação durante a discussão. Mais ainda, alguns dos instrumentos baseados em discussões foram projetados para assegurar que o intercâmbio fosse sempre aberto, em vez de levar a conclusões ou a posições fixas.

PRINCIPAIS DECOBERTAS E RESULTADOS

Uma nova abordagem da mídia foi estabelecida: os jornalistas e organizações não apenas distribuíram informações sobre os eventos, mas foram ativamente envolvidos no desenvolvimento e realização do modelo de comunicação e em todas as atividades de disseminação (press releases, publicidade, website).

O modelo inovador de comunicação funcionou bem e foi prontamente aceito por todos os envolvidos. A resposta positiva do público à participação “de baixo para cima” é um sinal seguro de que esses métodos são apropriados: as raras oportunidades em participar de tais atividades tendem a ser totalmente aproveitadas pelas pessoas mais ativas, independentemente do nível de seu envolvimento diário em tópicos científicos. Juntamente com a organização do evento, houve uma estrutura específica para cientificamente avaliar o impacto do modelo nas pessoas: o projeto foi planejado *ad hoc* para medir parâmetros nunca medidos em experiências prévias baseadas no “modelo deficitário”. O esquema original de avaliação é outro resultado concreto do projeto.

Eventos como estes parecem ser muito bem-sucedidos, especialmente no nível de comunicação interpessoal entre os membros do público e pesquisadores. Um público ativo procurando informações e querendo engajar-se em discussões individuais sobre biotecnologia parece ficar bem atendido com um evento como este. A interação não intermediada e humana fornece a possibilidade de criar um processo autêntico de comunicação de duas vias, o diálogo entre cientistas e membros do público.

Essa “redescoberta” da comunicação aberta interpessoal pode levar a mais confiança e menos cinismo, talvez mais do que outros tipos de interação intermediada com a ciência e tecnologia na mídia de massa ou em museus. Parece vital que os comunicadores sejam os próprios pesquisadores, em particular jovens, e nenhum RP ou encarregado de informações estejam envolvidos.

A reduzida idade dos cientistas envolvidos é um fator importante na facilitação da comunicação, porque faz o diálogo mais informal, em comparação com o relacionamento de cientistas bem conhecidos e o público. As sessões de laboratório aberto nas tendas, a mensagem de comunicação relativamente aberta na “exibição boa cabeça” e a combinação de imagens estereotipadas e fortemente não estereotipadas produziram um ambiente bem-sucedido para a comunicação interpessoal. Juntos, todos esses aspectos forneceram a oportunidade de preservar, ou restaurar, certo grau de complexidade às comunicações como é a realidade na pesquisa científica.

Este tipo de comunicação não reduz a ciência a declarações “preto no branco” ou questões de certo ou errado sobre a realidade. Ele não apenas demonstra os resultados científicos, mas também o processo da pesquisa em biotecnologia (embora isso seja uma pequena parte do todo) e as questões sociais e éticas que cercam esse tipo de pesquisa. A comparação entre as duas experiências deu indicações úteis para a averiguação do sucesso da abordagem da comunicação lançada no projeto BIOPOP.

CONCLUSÕES

Por um lado, se concluímos que este é um modelo de comunicação inovador e bem-sucedido, convidamos instituições e a mídia a explorar o material e os métodos que o BIOPOP tornou agora disponíveis. Por outro lado, entretanto, algumas questões não resolvidas permanecem após a experiência BIOPOP. Sem exceção, cada um dos 150 cientistas de toda a Europa que participaram nessa iniciativa tiveram as mesmas dificuldades em engajar-se no projeto. Uma vez que um dos aspectos-chave era envolver cientistas jovens desejando permanecer ativos em ciência, o maior obstáculo para eles foi dedicar parte de seu tempo à comunicação e ao treinamento.

Não era apenas uma questão do tempo materialmente disponível para essas atividades. *Era também uma questão da aceitação cultural de seu engajamento em seus laboratórios.* Em quase todos os casos, diretores de laboratórios, assim como colegas, consideraram mesmo uma pequena porção de tempo devotada ao engajamento público como um desperdício de tempo! Em vez de ser um valor agregado, foi considerado prejudicial para o trabalho no laboratório, e até mesmo prejudicial às perspectivas de carreira das pessoas.

Este é o principal paradoxo: em todos os níveis, as instituições europeias e nacionais clamam por maior responsabilidade social dos cientistas e realçam a necessidade de um compromisso com o público como parte dos deveres do pesquisador, especialmente quando as atividades são financiadas com doações públicas. Compromissar a comunidade científica com uma diferente visão depende por definição dos cientistas jovens, uma vez que isso implica treinamento, de um lado (treinamento em comunicação e em modelos participativos) e uma evolução cultural por outro, acompanhada de uma mudança nas percepções do público. A imagem emergindo de um lado, portanto, é que:

1. as instituições pedem maior engajamento;
2. cientistas jovens deveriam ser os principais atores envolvidos no processo,

mas por outro lado:

1. a cultura da comunidade científica estabelecida não favorece este engajamento;
2. não há incentivos ou recompensas para aqueles cientistas engajados com o público enquanto permanecem ativos em ciência;

3. ambas as questões-chave impactam especialmente os cientistas jovens, uma vez que eles são menos autônomos e frequentemente têm posições instáveis.

É evidente que há necessidade de achar propostas factíveis para remover esses obstáculos, para oferecer incentivos a pesquisadores e suas instituições, assim como dar maior valor a carreiras, no curto e médio prazo, e produzir uma mudança na dimensão cultural a longo prazo. Enquanto a mudança cultural pode ser parcialmente deixada para a mudança de geração, diferentes métodos e soluções têm que ser experimentados nos outros aspectos-chave.

A segunda questão emergindo do projeto BIOPOP é mais estreitamente ligada às experiências de cientistas quando engajados com o público. Ela relaciona-se com o impacto do público nas atividades do cientista quanto retorna a seu laboratório.

O engajamento público é apenas uma apresentação? Como lidamos com a questão epistemológica dos debates sobre o brilho da biotecnologia, i.e. a necessidade de uma administração da pesquisa e desenvolvimento tecnológico mais complexa e participativa? Essas são as questões para as quais, para fornecer respostas sérias, os jovens cientistas europeus precisarão de incentivos concretos.

Plataforma de comunicação e avaliação da segurança de OGM

<i>Acrônimo</i> GMO-COMPASS <i>Acrônimo do Programa</i> FP6-FOOD <i>Número do Contrato</i> FOOD-CT-2004-06914 <i>Período</i> Janeiro de 2005 – Fevereiro de 2007 <i>Website do projeto</i> www.gmo-compass.org	<i>Coordenador</i> Kristina SINEMUS Genius Biotechnologie GmbH Robert-Bosch-Str.7 DE-Darmstadt, 64293 Germany ksinemus@genius-biotech.de
---	--

<i>Parceiros</i> Gerd SPELSBERG Transgen, Aachen (DE) Matthias POHL TUVNORD EnSys Hannover GmbH & Co. KG (DE)
--

BACKGROUND E OBJETIVOS

Os consumidores europeus esperam alimentos seguros e de alta qualidade. Entretanto, parecem duvidar que os produtos OGM podem preencher essas exigências. Pesquisas deixaram claro que a maioria dos europeus vê a tecnologia gênica na agricultura e produtos alimentícios com algum ceticismo. Em uma pesquisa Eurobarometer em 2005, somente 27% dos europeus expressaram atitude positiva com relação aos alimentos GM.

Também é evidente que informações precisas sobre OGM são a chave para assegurar uma escolha informada do consumidor sobre tópicos relacionados com produtos GM. Pesquisas nacionais e europeias indicam que muitos consumidores europeus ainda não formaram uma opinião definitiva sobre o tópico. De acordo com a pesquisa Eurobarometer em 2007, o “uso de organismos geneticamente modificados no cultivo” é o segundo tópico mais comum que os consumidores europeus citam como um déficit claro de informação (34% dos pesquisados).

A informação baseada em ciência sobre o uso e segurança de produtos OGM, assim como o procedimento de aprovação, frequentemente falha em alcançar o grupo alvo, o consumidor e o público em geral. Da mesma forma, os resultados da pesquisa referentes a OGMs são quase desconhecidos do público. A percepção pública desses fatos é seletiva: sinais de preocupação com segurança evocam uma reação muito maior do que as explicações baseadas na ciência. Isso intensifica a incerteza de muitos consumidores.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

A plataforma da Internet www.gmo-compass.org foi estabelecida na 6ª Estrutura de Programas de Pesquisa Europeia da UE sob Prioridade 5: Qualidade e Segurança de Alimentos 2005 - 2007. Os objetivos principais eram:

- uma presença mais forte e conscientização de fatos baseados em ciência sobre segurança e potencial das culturas GM no debate público;

- transparência na prática regulatória da avaliação da segurança dos OGM, fomentando assim maior confiança do público na segurança dos OGM;
- fonte de informação compreensível para consumidores bem informados;
- uma plataforma de diálogo para a discussão da biotecnologia verde.

A disseminação e facilitação do acesso a informações baseadas em ciência sobre questões de OGM são um dos principais objetivos do portal de informação GMO-COMPASS. As ofertas de informação precisam adaptar-se melhor à demanda – isso significa atingir as expectativas, necessidades, os interesses e o background de conhecimento dos consumidores. Esforços consideráveis são necessários para fornecer informação científica sobre aspectos da segurança de OGM e as fundações do controle estadual para o público para assegurar a percepção apropriada. Isso é onde o GMO-COMPASS contribui fornecendo conceitos apropriados.

O GMO-COMPASS apresenta uma plataforma orientada ao consumidor que oferece informação facilmente compreensível sobre produtos OGM, seu uso e questões relacionadas de avaliação de segurança. Informações sobre OGMs e produtos OGM estão ligadas a informações de background e tópicos gerais de relevância. Aspectos políticos, nacionais, legais e socioeconômicos ao longo da cadeia alimentar são estreitamente ligados e apresentados na forma de blocos de informação condensada.

Informação baseada em ciência. O conceito editorial indica que o website é o trabalho de jornalistas de ciência que exercitam a liberdade jornalística na seleção e apresentação do conteúdo do website. Isso assegura credibilidade, que é um fator essencial no sucesso quando se apresentam tópicos relacionados com OGM. Usando uma abordagem equilibrada, a informação é compilada e transmitida de um modo que é factual e relativamente fácil de entender. Usuários que desejam aprender mais podem achar links para fontes de texto completo relevantes em cada página do website. Todos os textos são escritos jornalisticamente e apresentados em um projeto atrativo e conciso com múltiplos estilos de apresentação incluindo relatórios, entrevistas, animações, fotos e diagramas.

Diálogo público. O website GMO-COMPASS também foi testado como uma ferramenta para processos de diálogos em questões de OGM. Em 2006, GMO-COMPASS iniciou um discurso online sobre ‘The Future of GM Crops in Europe – Coexistence with Conventional and Organic Farming’ (O futuro das culturas gm na europa – coexistência com cultivo convencional e orgânico). Discursos online servem como um meio para coletar informação e preparação para tomada de decisões. Eram para oferecer aos consumidores e interessados uma oportunidade justa de expressar suas necessidades e desejos (demandas de informação). O discurso era limitado a um programa de quatro semanas e terminou em 8 de outubro de 2006. Para incentivar o debate, uma equipe de moderadores criou três cenários fictícios diferentes relativos à implementação e aos resultados de práticas de coexistência no ano de 2016.

PRINCIPAIS DECOBERTAS E RESULTADOS

Estatísticas de usuários do GMO-COMPASS.org cresceram continuamente, tanto que ele se tornou um dos portais de informação independentes mais usados da Europa sobre questões de OGM. Durante o período do projeto, o website foi visitado aproximadamente por 250 mil pessoas que leram cerca de 2,6 milhões de páginas. No final do período do projeto financiado pela UE (fevereiro de 2007), o número de visitantes alcançou uma média de mil por dia (aproximadamente 30 mil visitantes por mês). Os visitantes vieram de uma ampla gama de países (cerca de 130) da Europa e além.

Desde o começo, o GMO-COMPASS visou a melhorar o nível de disseminação pela cooperação com serviços internacionais de notícias na área de biotecnologia agrícola. Este trabalho levou a uma publicidade extensiva para o website, o que também refletiu no alto número de páginas da web referindo-se ao GMO-COMPASS (cerca de 8 mil links externos).

CONCLUSÃO

O rápido aumento do número de usuários é o indicador mais importante da larga aceitação pelo público e utilidade deste website e da informação que oferece. O GMO-COMPASS foi mantido vivo até hoje e o número de seus visitantes continuou a crescer, quase triplicando, de 2007 a 2009, agora alcançando cerca de 80 mil usuários por mês.

O projeto GMO-COMPASS web demonstra que pode ajudar os europeus a entender a política e a regulamentação de OGM e informá-los sobre novos desenvolvimentos e benefícios e o debate público de questões de OGM. O consumidor foi alcançado com o oferecimento de informações baseadas em ciência alinhadas com as expectativas das pessoas leigas e inseridas em relatos equilibrados que inclui opiniões contrárias e o ponto de vista de não-cientistas. Com estes meios, o GMO-Compass complementa com sucesso o suprimento de informações existentes, as medidas de transparência das instituições e dos órgãos do Estado, assim como os websites de grupos de lobby e instituições científicas.

O grande interesse do discurso online mostra que tais instrumentos são muito adequados para fomentar um debate público sério sobre tópicos e questões OGM na Europa. Para futuros discursos online, recomenda-se considerar as questões locais tais como o debate de zonas livres de GM ou experimentos de campo locais. Acredita-se que tais tópicos aumentam o interesse da pessoa leiga. A experiência sugere que os consumidores tendem a ser mais ativos se são diretamente afetados por tópicos locais.

PRINCIPAIS PUBLICAÇÕES

BRAUERHOCH, F; EWEN, C; SINEMUS,K; (2007). Talking biotech with the public. *Biotechnology Journal*, Volume 2 Issue 9, p 1076-1080.

MINOL, K; SPELSBERG, G; SCHULTE, E; MORRIS, N; (2007). Portals, blogs and co.: the role of the Internet as a medium of science communication. *Biotechnology Journal*, Volume 2 Issue 9, p 1129-1140.

SINEMUS, K; EGELHOFER, M; (2007). Transparent communication strategy on GMOs: Will it change public opinion? *Biotechnology Journal*, Volume 2 Issue 9, p 1141-1146.

Europeus & Biotecnologia em 2010 – Resultados do Eurobarometer 73.1

<i>Acrônimo</i> STEPE <i>Acrônimo do Programa</i> SiS <i>Número do Contrato</i> SiS-CT-2008-217815 <i>Período</i> Agosto de 2008 – Abril de 2011	<i>Coordenador</i> George GASKELL London School of Economics & Political Science Houghton Street London, WC2A 2AE United Kingdom g.gaskell@lse.ac.uk
---	--

<i>Parceiros</i> Paul CASTRO Centro de Investigação e Intervenção Social (PT) Wolfgang WAGNER and Nicole KRONBERGER Department of Social and Economic Psychology, Johannes Kepler University, Linz (AT) Jurgen HAMPEL University of Stuttgart (DE) Claude FISCHLER and Jocelyn RAUDE Ecole des Hautes Etudes en Sciences Sociales and Centre National de la Recherche Scientifique, Paris (FR) Helge TORGERSEN Institute of Technology Assessment, Austrian Academy of Sciences, Vienna (AT) Agnes ALLANSDOTTIR The Centre for Law and Biotechnology, University of Siena (IT)	Gemma REVUELTA Universitat Pompeu Fabra, Barcelona (ES) Alexandre QUINTANILHA Instituto de Biologia Molecular e Celular, Porto (PT) Maaris RAUDSEPP and Andu RAMMER The Environmental Psychology Research Unit, Tallinn University (EE) Nick ALLUM Department of Sociology, University of Essex (UK) R Yilmaz ESMER Department of Political Science and International Relations, Bahcesehir University (TK) Niels MEJLGAARD Department of Development and Planning, Aalborg University (DK)
--	---

BACKGROUND E OBJETIVOS

Este foi o sétimo de uma série de levantamentos do Eurobarometer sobre a biotecnologia conduzido em 1991, 1993, 1996, 1999, 2002, 2005 e 2010. Este último levantamento foi baseado em uma amostra representativa de 30.800 pesquisados de 27 Estados-membros, mais a Croácia, Islândia, Noruega, Suíça e Turquia.

Questões como a medicina regenerativa, produção de Organismos Geneticamente Modificados (OGMs), tanto transgênicos como cisgênicos), biobancos, biocombustíveis e outras inovações tais como nanotecnologia e biologia sintética foram investigadas. Também foram consideradas questões mais amplas, tais como a administração da ciência e o engajamento dos cidadãos. O levantamento fica como uma contribuição ao debate público e de políticas. Este sumário enfatiza as descobertas relativas a OGMs.

ABORDAGEM E METODOLOGIA

AO questionário para este levantamento do Eurobarometer incluiu questões de tendências-chave delineadas para avaliar a estabilidade, ou mudança, em aspectos de percepções públicas. Também incluiu novas questões para capturar opiniões e atitudes sobre questões emergentes no campo da biotecnologia. E, como em 2005, houve questões sobre nanotecnologia, em parte por que isso foi alçado como a nova tecnologia estratégica e em parte devido às suas estreitas ligações com a biotecnologia. Também houve novas questões sobre o emergente campo da biologia sintética.

PRINCIPAIS DESCOBERTAS E RESULTADOS

O retrato dos cidadãos europeus pintado no levantamento de 2010, em comparação a levantamentos anteriores, mostra que a crise de confiança na tecnologia e regulamentação que caracterizou os anos 90 (como resultado da BSE, sangue contaminado e outras falhas de regulamentos percebidas) não é mais dominante. Hoje, há um foco muito maior nas próprias tecnologias. São seguras? São úteis? Não há rejeição ao ímpeto em direção a inovações e comercialização, e os europeus estão a favor da regulamentação para equilibrar o mercado, refletindo seu desejo de estarem envolvidos em decisões sobre novas tecnologias em que valores sociais estão em jogo. Em geral, a maioria do público europeu permanece otimista sobre a biotecnologia e a engenharia genética.

O levantamento do Eurobarometer, entretanto, indica que algumas controvérsias persistem, e os alimentos GM permanecem o calcanhar de Aquiles da biotecnologia. Preocupações sobre a segurança permanecem no topo, seguidas da ausência de benefícios percebidos. Os alimentos GM são vistos como não-naturais. Muito interessante, quando a tecnologia é explicada em maiores detalhes no contexto da produção de maçãs e a comparação é feita entre transferir genes de espécies diferentes (transgênicos) e aqueles de variedades que se cruzam naturalmente, o quadro torna-se mais complexo (cisgênicos). A maioria do público europeu considera a tecnologia cisgênica como segura e, dada a vantagem de menor uso de pesticidas, essa abordagem parece aceitável. Mesmo abordagens transgênicas recebem um recepção algo mais positiva do que o próprio alimento GM, possivelmente pelos potenciais benefícios do menor uso de pesticidas. O levantamento indica que as objeções ao alimento GM estão relacionadas com preocupações com a segurança vistas no contexto de falta de benefício percebido, e essas são objeções que podem declinar se novas variedades oferecerem benefícios claros.

O público europeu é ainda menos a favor da clonagem animal para produtos alimentícios, que são vistos como não-benéficos, inseguros, injustos e preocupantes. As similaridades entre as percepções da clonagem animal e os alimentos GM sugerem que a combinação da biotecnologia e alimentos é uma receita não palatável.

Entretanto, há também uma clara disparidade de opinião através da Europa. O levantamento indica que não há maioria em qualquer país a favor de encorajar os alimentos GM: os pesquisados que pensam que deveriam ser encorajados variam de 44% no Reino Unido até apenas 10% na Grécia e em Chipre, e um nível ainda menor na Turquia (7%). Entretanto, dividindo a tecnologia nas abordagens transgênica e cisgênica, os resultados são marcadamente diferentes. Quando perguntados se uma tecnologia cisgênica deve ser encorajada, Chipre agora aparece com mais a favor, com 76% , enquanto Luxemburgo é o mais cético, com apenas 35%.

CONCLUSÃO

O levantamento mostra que a opinião pública europeia não precisa ser vista como uma limitação à inovação tecnológica. Embora os alimentos GM ainda sejam rejeitados em geral, os europeus favorecem a inovação sustentável – por exemplo tecnologias que permitem reduzir o uso de pesticidas, e a abordagem cisgênica em vez das transgênica. Há agora também maior confiança na indústria e nas autoridades regulamentadoras. E enquanto o público europeu espera a regulamentação apropriada, em preferência a deixar as questões por conta das forças do mercado, quer ser levado em conta quando a tecnologia e valores colidem.

PRINCIPAIS PUBLICAÇÕES

GEORGE, G; ALLUM, N; STARES, S; (2003). Europeans and Biotechnology in 2002. (Europa.eu.int/comm/public_opinion/archives/eb/ebs_177_en.pdf)

George, G; et al. (2007). Europeans and Biotechnology in 2005: Patterns and Trends (http://ec.europa.eu/public_opinion/archives/ebs/ebs_244b_en.pdf).

GASKEL, L G.; ALLUM, N.C.; WAGNER, W.; HVIID NIELSEN, T.; JELSOE, E.; KOHRING, M.; BAUER, M.W. In the public eye: representations of biotechnology in Europe in *Biotechnology 1996-2000: the years of controversy* Gaskell G., Bauer M., Eds. (Science Museum Publications, London, 2001).

GEORGE, G; BAUER, M; DURANT, J; ALLUM, N.; (1999). Worlds Apart: the receptions of GM foods in Europe and the United States. *Science*, 264, 5426, 384-387.

Comissão Europeia

EUR 24473 — Uma década e pesquisa em OGM financiada pela UE (2001 - 2010)

Luxembourg: Publications Office of the European Union

2010 — 264 pp. — formato, 14.8 5 x 21 cm

ISBN 978-92-79-16344-9

doi 10.2777/97784

Como obter publicações UE

Publicações grátis:

- via UE Bookshop (<http://bookshop.europa.eu>);
- nas representações ou delegações da Comissão Europeia.
Você pode obter seus detalhes para contato na Internet (<http://ec.europa.eu>) ou mandando um fax para +352 2929-42758.

Publicações pagas:

- via EU Bookshop (<http://bookshop.europa.eu>);

Subscrições pagas (e.g. séries anuais do Official Journal of the European Union e relatórios dos casos perante a Corte de Justiça da União Europeia):

- via um dos agentes de venda do Escritório de Publicações da União Europeia (http://publications.europa.eu/others/agents/index_en.htm).

Esta publicação resume os resultados de 50 projetos de pesquisa selecionados sobre Organismos Geneticamente Modificados (OGM), cofinanciados pela Comissão Europeia sobre a Estrutura de Programas para Pesquisa e Inovação, e conduzidos no período de 2001 - 2010, incluindo um resumo do último levantamento Eurobarometer 2010 sobre ciências naturais e biotecnologia.

Os projetos aqui apresentados tratam de áreas de maior preocupação do público em relação a OGM: o impacto ambiental dos OGMs, aspectos de segurança de alimentos, avaliação de risco dos OGM e manejo de risco e finalmente aspectos de modificação genética de plantas e/ou microrganismos relacionados com biomassa e produção de biocombustíveis. A publicação é complementada por um número de contribuições altamente valiosas de distintos cientistas, especialistas renomados em seus respectivos campos.