

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
AGR99006 - DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Elinston Ambos Alves

00274448

Acompanhamento de projetos de pesquisa na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

PORTO ALEGRE, Fevereiro de 2021.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
AGR99006 - DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO

Elinston Ambos Alves
00274448

Acompanhamento de projetos de pesquisa na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para obtenção do Grau de Engenheiro Agrônomo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Supervisor do Estágio: Bióloga, Dr. Érika Valéria Saliba Albuquerque Freire

Orientador Acadêmico do Estágio: Profa. Eng. Agr. Dr. Carla Andréa Delatorre

COMISSÃO DE AVALIAÇÃO

Prof. Pedro Selbach – Departamento de Solos (Coordenador)

Prof. Alberto Inda Jr. – Departamento de Solos

Prof. Alexandre Kessler – Departamento de Zootecnia

Prof. André Brunes – Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia

Prof. José Antônio Martinelli – Departamento de Fitossanidade

Profa. Renata Pereira da Cruz – Departamento de Plantas de Lavoura

Prof. Sérgio Tomasini – Departamento de Horticultura e Silvicultura

PORTO ALEGRE, Fevereiro de 2021.

RESUMO

O estágio curricular obrigatório do Curso de Agronomia, base para a elaboração do trabalho de conclusão de curso, foi realizado na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), no centro de pesquisa Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), localizado na cidade de Brasília/DF, no período de 13 de janeiro a 06 de março de 2020. As atividades desenvolvidas e acompanhadas durante o estágio abrangem etapas de projetos de pesquisa ligados à biotecnologia, desde os laboratórios até as casas de vegetação. Nos laboratórios, executando ou auxiliando em protocolos necessários, como *polymerase chain reaction* (PCR), extração de ácido desoxirribonucleico (DNA) e coleta de espécimes, assim como em atividades diversas de organização e manutenção dos espaços e seus equipamentos. Já nas casas de vegetação, as atividades realizadas eram as necessárias para a manutenção geral das mesmas e dos espécimes, principalmente regas, plantio e transplântio de plantas, controle e monitoramento de insetos e doenças e organização geral a fim de aperfeiçoar as atividades e o aproveitamento da área. Com o decorrer do estágio, além de aprimorar os conhecimentos acadêmicos obtidos durante a graduação, foi possível compreender os processos desenvolvidos em um departamento de pesquisa voltado à biotecnologia, além de participar de etapas específicas que trouxeram valioso conhecimento prático.

Palavras-chave: Biotecnologia. Agricultura. Pesquisa. Biologia molecular.

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Produção de culturas biotecnológicas nos 10 países mais importantes.....	17

LISTA DE FIGURAS

		Página
1.	Produtos transgênicos aprovados no Brasil pela CTNBio.....	16
2.	Espécies de plantas transgênicas aprovadas pela CTNBio.....	16
3.	Produtos agrícolas geneticamente editados analisados pela CTNBio e USDA.....	18
4.	Capela utilizada para manipulação de reagentes químicos tóxicos.....	19
5.	Pipetas monocanais e balança de precisão.....	20
6.	Visão externa e interna de uma das casas de vegetação.....	24
7.	Mudas de café não transgênico recém-transplantadas para os tubetes e 15 dias após o primeiro registro.....	25
8.	Plantas com meses de crescimento até plantas com décadas de cultivo dentro de casas de vegetação.....	25
9.	Folhas de plantas com sintomas característicos de provável deficiência nutricional.....	27
10.	Folhas afetadas por deriva recentemente, evolução dos sintomas, e presença de fumagina.....	27
11.	Sementes de café sadias completas, sem o pergaminho e sementes com sinais de danos das brocas.....	28
12.	Sementes acomodadas dentro da magenta, na sala de cultivo há alguns dias.....	29
13.	Plântulas cultivadas em uma magenta na sala de cultivo, alguns dias antes do momento ideal para transplantio.....	29
14.	Sintomas causados por deficiência de magnésio em café.....	33
15.	Sintomas causados por deficiência de ferro em café.....	33
16.	Cochonilhas-da-roseta encontradas em folhas jovens de cafeeiro.....	34

SUMÁRIO

	Página
1. Introdução.....	7
2. Caracterização da cidade de Brasília.....	7
2.1 Aspectos socioeconômicos.....	7
2.2 Aspectos edafoclimáticos.....	8
3. Caracterização da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.....	9
4. Referencial teórico: a biotecnologia.....	11
4.1 Definição.....	11
4.2 Impactos da biotecnologia.....	11
4.2.1 <i>Impactos da biotecnologia na agropecuária.....</i>	<i>12</i>
4.2.2 <i>Plantas geneticamente modificadas no Brasil e no mundo.....</i>	<i>14</i>
5. Atividades realizadas.....	18
5.1 Atividades realizadas em laboratório.....	18
5.1.1 <i>Coleta de larvas e adultos da broca-do-café (Hypothenemus hampei F.).....</i>	<i>20</i>
5.1.2 <i>Extração de DNA de eventos transgênicos de plantas de soja.....</i>	<i>21</i>
5.1.3 <i>Reação da polimerase em cadeia (PCR) para avaliação da presença de genes.....</i>	<i>22</i>
5.2 Atividades realizadas em casa de vegetação.....	23
5.3 Atividades realizadas em sala de cultivo.....	28
5.4 Atividades realizadas em outras dependências ou fora do CENARGEN.....	29
6. Discussão.....	30
7. Considerações finais	35
Referências Bibliográficas	36

1. Introdução

A biotecnologia clássica acompanha o ser humano por toda a sua história, até mesmo antes da própria história ser de fato escrita. Com o auxílio da biotecnologia, mesmo que realizada de forma empírica, civilizações puderam se erguer e o desenvolvimento humano foi alavancado, agindo como uma progressão geométrica ao longo das eras e dos últimos séculos.

Ao longo do tempo, a biotecnologia passou por muitas modificações, tendo seu desenvolvimento atrelado ao avanço da ciência, em áreas multidisciplinares. Com o progresso em ciências como a genética, química, fisiologia, microbiologia e a biologia molecular, hoje experienciamos a conceituada biotecnologia moderna (CROPLIFE, 2020a), que possui ferramentas e aplicações importantes em tal grau, que na falta destas a sociedade como conhecemos não teria suporte para existir.

Atualmente a biotecnologia, principalmente como ciência aplicada, é conduzida pela pesquisa experimental em todas as suas áreas de aplicação, trazendo inovações capazes de resolverem problemas e aumentar o bem-estar global do homem, da sociedade e do meio ambiente. Tendo isso em vista, se torna incontestável a importância das instituições de pesquisa para o desenvolvimento humano, no âmbito global. Considerando a esfera nacional, os institutos de pesquisa pública provam sua notoriedade com seu passado, prospectando um futuro que traz benefícios à sociedade brasileira e torna o Brasil um país cada vez mais competitivo e desenvolvido.

Levando em consideração a biotecnologia e as instituições de pesquisa públicas, a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia se evidencia como uma escolha assertiva para a realização do estágio curricular obrigatório, devido a ser uma instituição renomada capaz de propiciar experiências de aprendizagem singulares, trazendo o aprimoramento de conhecimentos teórico-práticos adquiridos ao longo do processo de formação acadêmica. Ademais, se enquadra nas áreas de maior interesse do autor.

O estágio curricular obrigatório foi realizado na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), no centro de pesquisa Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, localizado na cidade de Brasília/DF, com carga horária semanal de 40 horas, no período de 13 de janeiro a 06 de março de 2020.

2. Caracterização da cidade de Brasília

2.1 Aspectos socioeconômicos

Brasília é a capital federal do Brasil, pertencente ao Distrito Federal (DISTRITO FEDERAL, 1993), uma das 27 unidades federativas do Brasil. O Distrito Federal não possui municípios, é composto apenas pela capital Brasília, sendo esta subdividida em 33 regiões administrativas, não havendo então bairros ou prefeituras¹.

A cidade faz parte do Planalto Central, região Centro-Oeste do Brasil, ocupando uma área de 5.779 km². A população estimada para 2020 é de 3.055.149 habitantes, com densidade demográfica de 444,7 hab/km² no censo de 2010, sendo assim a quarta cidade mais populosa do Brasil (IBGE, 2017a). A situação domiciliar da cidade revela sua predominância urbana, com 96,5% da população, em oposição a 3,42% em situação de residência rural (IBGE, 2017b).

O Produto Interno Bruto (PIB) de Brasília é estimado em 254,8 bilhões de reais, ocupando a posição de terceiro maior PIB municipal do país (IBGE, [2019?]). Já o PIB *per capita* é estimado em 85,7 mil reais, estando na nonagésima nona posição entre as cidades brasileiras (*Ibidem*). A composição econômica do Distrito Federal é majoritariamente composta pelo setor de serviços (94,3% do PIB), seguido pelo setor industrial (5,4% do PIB), com mínimo impacto do setor agropecuário (0,3% do PIB) (CRUZ; SCHLABITZ; QUIROZ, 2018). Brasília se destaca pelo seu Índice de Desenvolvimento Humano (IDH), apresentando um índice de 0,824, nono maior valor dentre as cidades brasileiras (PNUD, 2010).

Brasília teve seu planejamento prévio em forma de um plano urbanístico, conhecido como “Plano Piloto” (COSTA, 1957). Este plano concedeu à cidade, em vista aérea, o formato de um avião. Brasília foi inaugurada em 21 de Abril de 1960, e possui 112,2 quilômetros quadrados de área tombada pela Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura (UNESCO) como Patrimônio Cultural da Humanidade, por conta de sua concepção modernista, com grande participação de Lúcio Costa e Oscar Niemeyer³.

2.2 Aspectos edafoclimáticos

Brasília está localizada a 15°47′ de latitude sul e 47°56′ de longitude oeste, com altitude média de 1.000 metros acima do nível do mar, tendo seu ponto mais alto com 1.341

¹ GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL. **História – Brasília: a cidade sonho**. Brasília, 2021. Disponível em: < <http://www.df.gov.br/historia/>>. Acesso em: 25 de jan. 2021.

² *Ibidem*.

³ *Ibidem*.

metros de altitude (BRASÍLIA, 2021). O relevo de Brasília é predominantemente plano, com leves ondulações. O Distrito Federal está inteiramente inserido dentro do bioma cerrado, um bioma que se caracteriza pela presença de invernos secos e verões chuvosos (RIBEIRO; WALTER, 1998). Este bioma tem a mais rica das floras entre as savanas do mundo, com alto nível de endemismo, apresentando também uma fauna de grande riqueza, embora a presença de mamíferos seja pequena (KLINK & MACHADO, 2005).

De acordo com a classificação de Köppen, o Distrito Federal pertence ao grupo A – Tropical, por apresentar em todos os meses do ano temperatura média acima de 18°C, com temperatura média compensada anual de 21,4°C, além de possuir precipitação significativa (média anual de 1.477 mm) (INMET, [2010]). O clima de Brasília é classificado como tropical com estação seca (tipo *Aw*), característico de savanas, com as chuvas concentradas em uma estação chuvosa (outubro a março) (KLINK & MACHADO, 2005). Durante a estação seca, os níveis de umidade relativa do ar (URA) ficam comumente muito baixos em alguns dias, sendo registrados valores entre 20% e 30%. Valores dentro deste intervalo são considerados de atenção pela Organização Mundial Saúde (OMS), que indica o valor ideal de 60% para evitar o ressecamento de mucosas e da pele humana (EBC, 2014).

Quanto à pedologia, o Distrito Federal possui as classes de solo esperadas para o bioma que está inserido, o Cerrado (BOUL & CLINE, 1973, *apud* BOUL, 2009). De acordo com Ribeiro & Walter (1998), o bioma Cerrado possui predominância de latossolos, seja em áreas sedimentares quanto em terrenos cristalinos. Esta afirmação foi confirmada e complementada por Martins *et al.* (2004), em observação dos trabalhos realizados pelo Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solos (EMBRAPA, 1978), onde conclui que as três classes de solos mais importantes no Distrito Federal são Latossolo Vermelho (38,6%), Latossolo Vermelho-Amarelo (15,8%) e Cambissolo (31%).

3. Caracterização da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

A Embrapa foi criada na década de 1970, um momento de muitas mudanças no Brasil. Havia um acelerado crescimento da população e da renda per capita, além da abertura do mercado externo, o que trazia a preocupação quanto à capacidade da agricultura do país suprir a demanda por alimentos mediante o aumento da oferta (EMBRAPA, [2021]a).

No Ministério da Agricultura já havia o debate acerca da importância do conhecimento científico para o desenvolvimento agrícola, principalmente pela falta de conhecimento técnico para ser repassado aos agricultores por meio da extensão rural. Sendo

assim, um grupo de trabalho constituído pelo então ministro da Agricultura, Luiz Fernando Cirne Lima, definiu os objetivos e funções da pesquisa agropecuária, levando à criação da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), instituída como empresa pública em 07 de dezembro de 1972, pela Lei nº 5.851⁴ do mesmo ano (BRASIL, 1972), sancionada pelo então presidente da república Emílio Garrastazu Médici (EMBRAPA, [2021]a).

Em 1973, uma portaria encerrou a existência do Departamento Nacional de Pesquisa e Experimentação (DNPEA), que era o principal órgão de pesquisa em um momento anterior a Embrapa. O DNPEA contava com uma grande infraestrutura: 09 sedes dos institutos regionais, 70 estações experimentais, 11 imóveis e 02 centros nacionais. A Embrapa herdou do DNPEA estas unidades, iniciando sua fase operativa (EMBRAPA, [2021]a).

Já em 1974, os primeiros centros nacionais por produtos foram originados (Trigo, Arroz e Feijão, Gado de Corte, Seringueira) e no dia 22 de novembro do mesmo ano o CENARGEN foi criado, com a denominação inicial de Centro Nacional de Recursos Genéticos, que originou a sigla usada até hoje. Apenas em 1980 a unidade recebeu o nome de Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, momento no qual passou a atuar também em biotecnologia agropecuária e em controle biológico de pragas. Na década de 90 o CENARGEN incorporou novas e importantes atividades à sua atuação na área da genética molecular: sequenciamento de genomas estrutural e funcional, busca por genes de importância agrícola, técnicas de transformação genética de plantas e clonagem na espécie bovina (EMBRAPA, [2021]b).

A criação da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia atende a uma demanda mundial acerca da conscientização da importância dos recursos genéticos, do impacto destes na sustentabilidade econômica e ecológica e nas pesquisas biotecnológicas (EMBRAPA, [2021]b). A missão do CENARGEN é – “*Viabilizar soluções de pesquisa, desenvolvimento e inovação em recursos genéticos para a sustentabilidade da agricultura brasileira*”, e busca atender esta missão com as seguintes estratégias: conservar, enriquecer e estimular o uso dos recursos genéticos; desvendar características e agregar valor aos recursos genéticos; desenvolver tecnologias com foco em recursos genéticos; promover o intercâmbio seguro de germoplasma e gerar tecnologias com foco em fitossanidade (EMBRAPA, [2021]b).

Atualmente, as principais atividades do CENARGEN são atividades relacionadas à conservação e uso de germoplasma vegetal, intercâmbio de germoplasma vegetal, análises

⁴ “Art. 1º Fica o Poder Executivo autorizado a instituir uma empresa pública, sob a denominação de Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), vinculada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, com personalidade jurídica de direito privado, patrimônio próprio e autonomia administrativa e financeira, nos termos do art. 5º, inciso II, do Decreto-Lei nº 200, de 25 de fevereiro de 1967” (Brasil, 1972).

moleculares, bancos genéticos, conservação e uso de recursos genéticos animais, conservação de micro-organismos, controle biológico, biotecnologia, genômica, biotecnologia e ferramentas para acelerar o melhoramento genético animal. Para o presente e futuro próximo, o foco das pesquisas tende a ser pela busca de novas moléculas a fim de resolver problemas agropecuários, investindo em pesquisas de biotecnologia, genômica e nanotecnologia (EMBRAPA, [2021]b).

4. Referencial teórico: a biotecnologia

4.1 Definição

De forma simplória, o conceito de biotecnologia pode ser resumidamente interpretado com base na palavra de origem grega: *bio* significa vida, *tecnos* significa o uso prático da ciência e *logos* significa conhecimento. Com base nisto, BIOTECNOLOGIA (2011) interpretaram o conceito de biotecnologia como um conhecimento que usa organismos, células e moléculas pra obter bens e serviços, ou uma tecnologia que tem seus produtos advindos de processos de origem biológica. Esta definição engloba tanto a biotecnologia clássica como a moderna.

De acordo com Malajovich (2012), a primeira definição de biotecnologia se deve a Ereky (1919) – “a ciência e os métodos que permitem a obtenção de produtos a partir de matéria-prima, mediante a intervenção de organismos vivos”. Contudo, devido ao grande impacto da biotecnologia, principalmente na economia e na ciência, numerosas tentativas de definição podem ser encontradas na literatura, variando entre países e organizações (DAHMS, 2004), entre ramos e consoantes com o acréscimo de um sufixo (como biotecnologia vegetal – (CANHOTO, 2010), ou ainda entre épocas e para diferenciar a biotecnologia clássica da moderna. A biotecnologia utiliza conhecimentos multidisciplinares, englobando atividades e profissionais de áreas muito variadas (energia, indústria, meio ambiente, agricultura, pecuária, alimentação, saúde), para utilizar processos cada vez mais complexos e tecnológicos, em constante evolução, na geração de seus produtos (MALAJOVICH, 2012), o que pode trazer ao termo biotecnologia um caráter transitório e amorfo (DAHMS, 2004).

4.2 Impactos da biotecnologia

4.2.1 Impactos da biotecnologia na agropecuária

A atividade agropecuária acompanha a história da humanidade desde seu início e foi um dos motores que proporcionou o nascimento de civilizações e os avanços tecnológicos em todas as áreas do conhecimento. O crescimento populacional e a demanda por quantidade e qualidade dos alimentos é um assunto muito debatido em todo o mundo.

Segundo a FAO (2015), mais de 800 milhões de pessoas não tem acesso à comida de forma suficiente para ter uma vida saudável. As projeções são de que em 2050 o planeta Terra terá 9,8 bilhões de habitantes (UN, 2012), o que exigirá uma maior oferta de alimentos. De acordo com Saath & Fachinello (2018), com base nos estudos de Embrapa (2014), os limites da fronteira agrícola para a expansão da produção agropecuária no Brasil estão próximos de serem exauridos, levando ao ponto de que as demandas por alimentos não poderão mais ser supridas por meio do aumento de área plantada, mas sim por aumento da produtividade ou substituição de culturas. Este exemplo no Brasil pode ser considerado uma verdade em todo o globo, a importância do aumento da produtividade, ao mesmo passo da conservação do meio ambiente devem ser questões resolvidas de forma inteligente, com a tecnologia disponível.

Diante disto, a biotecnologia já é utilizada como forma de aumentar a produção de alimentos e elevar a eficiência dos recursos naturais utilizados. O aumento da produção pode se dar por mais de uma maneira, excluído o aumento da área cultivada. Uma destas formas é a redução de perdas na lavoura, fornecendo às plantas ou aos animais formas de resistir ou tolerar estresses bióticos ou abióticos, assim como reduzir perdas durante o armazenamento. Isto pode se dar por meio de defensivos agrícolas (inseticidas, fungicidas e herbicidas) aliados às práticas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) e controle biológico (CB) (FUTINO & SALLES FILHO, 1991). Também, com o uso da engenharia genética é possível introduzir genes de interesse em cultivos para que se tornem tolerantes a herbicidas e resistentes a insetos (SILVEIRA; BORGES; BUAINAIN, 2005), ou ainda a estresses abióticos, como a seca (SALINET, 2009).

Outra forma para elevar a produtividade é aumentar a quantidade produzida em si e, para isto, o ser humano utiliza o melhoramento genético de forma empírica desde o início da agricultura. Mesmo havendo um curto período da história dos vegetais que estes foram domesticados, muitas destas plantas guardam pouca semelhança com seus ancestrais selvagens (MALAJOVICH, 2012). Na idade contemporânea, a redescoberta das leis de Mendel tornou o melhoramento genético mais eficiente e preciso, tanto animal quanto vegetal. Com o conhecimento e as ferramentas da biotecnologia moderna, um novo patamar pode ser alcançado pelo melhoramento genético, principalmente com o uso de marcadores

moleculares e a engenharia genética, tornando mais rápido e preciso o processo de melhoramento genético (BIOTECNOLOGIA, 2011).

A engenharia genética permite a criação de variedades transgênicas, que é uma poderosa ferramenta para o melhoramento genético, pois quanto maior a distância entre duas espécies, o cruzamento se torna mais difícil ou impossível, fazendo com que genes de interesse não possam ser introduzidos (MALAJOVICH, 2012). Com a transformação genética de plantas é realizada a validação funcional de genes individuais selecionados. Da mesma forma, se podem incorporar estes genes diretamente em uma cultivar, visando características agrônomicas desejáveis, como a produtividade (CARRER; BARBOSA; RAMIRO, 2010). Em conclusão, segundo Malajovich (2012), a biotecnologia moderna permite a transferência de genes entre espécies, facilita a identificação dos indivíduos transformados e acelera o processo de melhoramento e obtenção de novas variedades, alcançando mais rapidamente os objetivos de um programa de melhoramento. Além da transgenia, para a criação de cultivares com características específicas ainda existem outras possibilidades, como a mutação gênica orientada (como CRISPr) seguida de seleção ou a alteração do número cromossômico, sendo que esta última opção geralmente causa simultaneamente características deletérias.

Ainda a utilização da cultura de tecidos produz um grande número de material clonado em curto espaço de tempo e em ambientes reduzidos. O que permite também realizar a limpeza clonal de cultivares, visando à eliminação de doenças, como vírus (VILLEN, 2002).

Alguns microrganismos quando associados à agricultura também trazem imensos benefícios. Bactérias fixadoras de nitrogênio, além de reduzir os custos e riscos de contaminação pela adubação nitrogenada, podem elevar a produtividade. Da mesma forma, fungos micorrízicos também podem se tornar uma ferramenta bastante utilizada no futuro, beneficiando as plantas por aumentar sua superfície de absorção de água e minerais do solo (BIOTECNOLOGIA, 2011). Segundo estes autores, a inoculação de bactérias diazotróficas em leguminosas pode reduzir a necessidade de adubação mineral nitrogenada, ou até mesmo substituí-la.

Além de indiretamente possibilitar o aumento da produtividade das espécies cultivadas, pela inserção genética de características desejáveis às culturas abrangidas, a biotecnologia traz a possibilidade de obtenção de plantas com características melhoradas, como a redução de alérgenos, elevar o tempo de conservação, melhorar características organolépticas e nutricionais, assim como adequação ao processamento industrial (MALAJOVICH, 2012). Exemplos para isso é o aumento de vitamina A (YE *et al.*, 2000) e E (SHINTANI & DELLAPENNA, 1998) em grãos de arroz, assim como a composição de

amido nos grãos (JOBILING *et al.*, 2002).

A biotecnologia moderna é uma ferramenta muito importante por desenvolver organismos vivos modificados úteis em processos ou na geração de produtos, ou utilizar produtos de origem biológica já disponíveis naturalmente.

4.2.2 Plantas geneticamente modificadas no Brasil e no mundo.

O uso de plantas transgênicas no Brasil começou em 1998, e atualmente esta tecnologia é amplamente utilizada no país. Em 2019, o PIB brasileiro teve 21,4% de sua composição advinda do agronegócio, o que confirma a importância deste setor (CNA, 2020). Hoje o Brasil é o segundo maior país em área plantada de transgênicos, atrás somente dos Estados Unidos da América (AGROANALYSIS, 2018). A soja é muito importante para o agronegócio brasileiro, e na safra 2019/2020 o Brasil produziu 124,8 milhões de toneladas, assumindo a posição de maior produtor mundial (EMBRAPA, 2020a). De toda esta produção, é estimado que 96% seja oriunda de cultivares transgênicas. Os transgênicos também têm grande participação em culturas como o milho (88%) e algodão (78%), que possuem participação fundamental no PIB e nas exportações brasileiras (AGROANALYSIS, 2018).

Alguns organismos geneticamente modificados (OGMs) possuem manejo facilitado, devido às características que os genes exógenos concedem às cultivares. Segundo Ferreira & Faleiro (2008), o uso de transgenes oferece grande vantagem competitiva em relação a outras cultivares. Como citado pelo mesmo autor, as cultivares atualmente utilizadas com sucesso geralmente possuem características fenotípicas controladas por um ou poucos genes, e estes genes são principalmente de dois tipos: resistência a herbicidas e resistência a insetos.

Acerca dos cultivos tolerantes a herbicidas, a soja “Round Up Ready” RR foi o primeiro produto geneticamente modificado (GM) tolerante. A introdução do gene *CP4 EPSPS* torna a planta resistente ao herbicida glifosato, um herbicida de amplo espectro largamente utilizado. O uso desta tecnologia traz imensas vantagens econômicas pela redução de custos e perdas na lavoura, além de facilitar o manejo de ervas daninhas, por simplificar o uso de herbicidas e o risco no controle sobre estas pragas (SILVEIRA; BORGES; BUAINAIN, 2005). Do ponto de vista ambiental, a adoção de cultivares resistente a herbicidas é capaz de reduzir a quantidade utilizada destes pesticidas, pelo abandono sistemático das aplicações pré-emergentes, tornando viável realizar aplicações apenas quando necessário (KRIMSKY & WRUBEL, 1996). Além de reduzir o número de aplicações e a quantidade aplicada, possibilita a utilização de herbicidas menos tóxicos, como é o caso do

herbicida glifosato, que possui relativa baixa toxicidade em mamíferos e pássaros (AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2002).

Nos cultivos resistentes a insetos, o principal produto utilizado é a tecnologia BT, em diversas culturas. Nesta tecnologia, as plantas recebem genes de *Bacillus thuringiensis*, que lhe concedem resistência a insetos, principalmente lepidopteros e coleopteros, dependendo do gene adicionado (SILVEIRA; BORGES; BUAINAIN, 2005), que sucubem ao se alimentar de tecidos produtores da proteína entomopatogênica, originada do gene exógeno. Economicamente, a tecnologia BT traz benefícios muito significativos, ao reduzir os custos de produção, por diminuir a quantidade e o número de aplicações de inseticidas químicos pulverizados nas culturas (SOUZA, 2016). Em termos ambientais e sociais, a tecnologia BT também traz como vantagem a redução no uso de pesticidas, não expondo o homem ou o meio ambiente a estes produtos. Também é uma tecnologia muito seletiva a seus alvos, não eliminando inimigos naturais ou prejudicando gravemente a biodiversidade, além de poder ser utilizado em conjunto com o manejo integrado de pragas (SOUZA, 2016). Estes fatores levam o produtor, no contexto geral, a utilizar produtos menos tóxicos e uma quantidade menor de pesticidas.

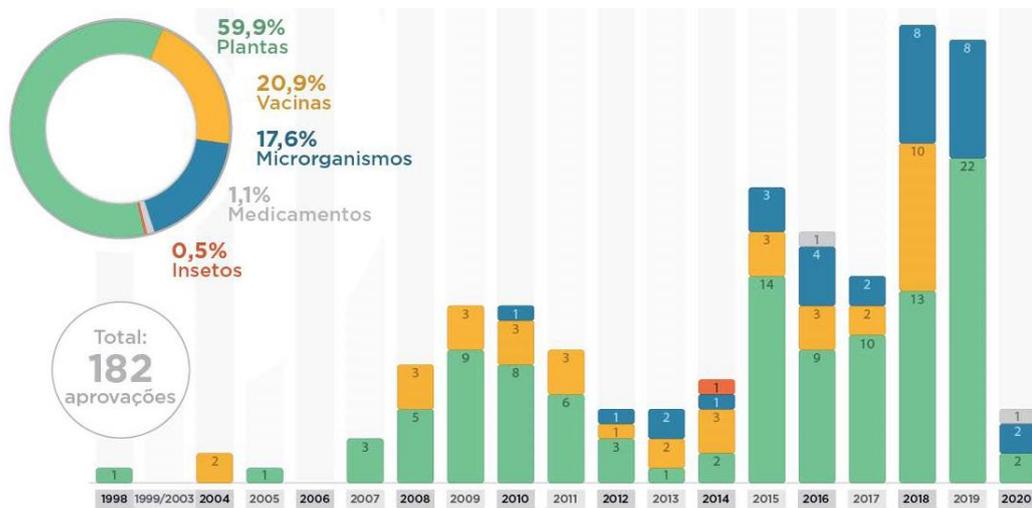
As tecnologias citadas anteriormente não têm origem em pesquisas brasileiras. Porém, mesmo enfrentando grandes dificuldades, a pesquisa brasileira também desenvolveu e continua gerando produtos inovadores para culturas com importância no país. A Embrapa recebeu autorização da CTNBio para comercialização do feijão transgênico resistente ao vírus do mosaico dourado, uma doença muito importante para a cultura (AGROANALYSIS, 2018). A empresa também avançou até etapas finais no desenvolvimento de cultivares de soja e cana-de-açúcar tolerantes à seca, o que futuramente pode auxiliar muitos produtores no enfrentamento da pouca disponibilidade de água para as culturas (AGROANALYSIS, 2018).

De acordo com a Lei de Biossegurança⁵, todos os organismos transgênicos precisam ser analisadas e aprovados pela CTNBio para a liberação de seu uso no Brasil (CROPLIFE, 2020b). Mesmo antes da comercialização de um produto, quando este está em fase de desenvolvimento dentro do território nacional, também é necessária uma autorização prévia, concedida por meio do Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB) e pela autorização de Liberações Planejadas no Meio Ambiente, emitidos também pela CTNBio (*Ibidem*).

⁵ “Art. 1º Esta Lei estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização sobre a construção, o cultivo, a produção, a manipulação, o transporte, a transferência, a importação, a exportação, o armazenamento, a pesquisa, a comercialização, o consumo, a liberação no meio ambiente e o descarte de organismos geneticamente modificados – OGM e seus derivados, tendo como diretrizes o estímulo ao avanço científico na área de biossegurança e biotecnologia, a proteção à vida e à saúde humana, animal e vegetal, e a observância do princípio da precaução para a proteção do meio ambiente.” (BRASIL, 2005).

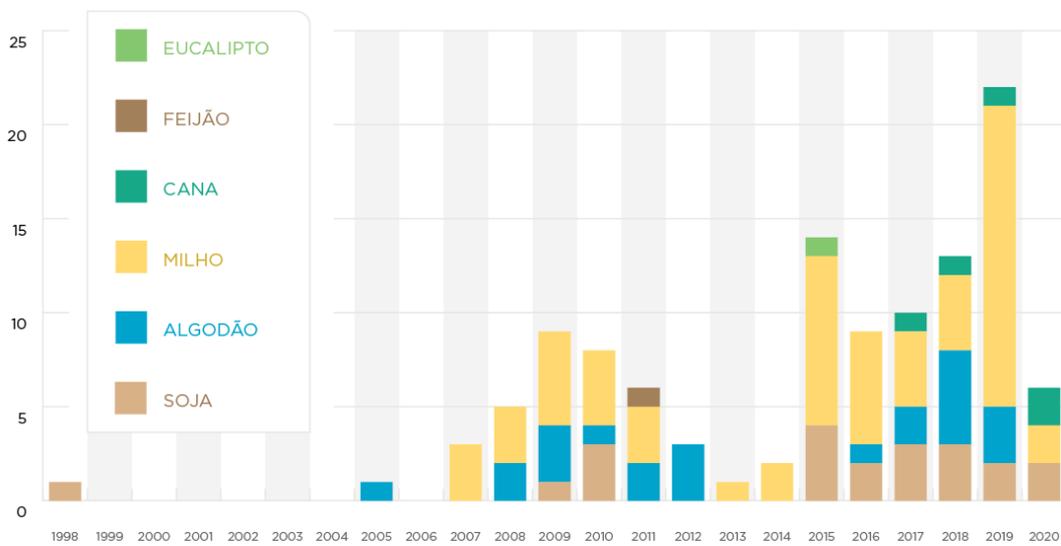
A primeira autorização concedida foi a um evento de soja transgênica, em 1998, desde então, mais de cento e dez plantas geneticamente modificadas foram liberadas para a produção em escala comercial (*Ibidem*). As espécies que incluem estes produtos são soja, milho, algodão, eucalipto, cana-de-açúcar e feijão. Como exemplos mais importantes de características incorporadas a estas plantas, têm-se: resistência a vírus; tolerância a herbicidas; resistência a insetos; tolerância à seca; restauração de fertilidade; aumento na produção de celulose e qualidade de óleo melhorada. (*Ibidem*). As Figuras 1 e 2 demonstram as aprovações realizadas pela CTNBio ao longo dos anos.

Figura 1 – Produtos transgênicos aprovados no Brasil pela CTNBio.



Fonte: Croplife, 2020b, adaptado de CTNBio, 2020.

Figura 2 – Espécies de plantas transgênicas aprovadas pela CTNBio.



TOTAL: 113 APROVAÇÕES

Fonte: Croplife, 2020b, adaptado de CTNBio, 2020.

A adoção da biotecnologia agrícola com o uso de transgênicos ou produtos agrícolas geneticamente editados vem crescendo em todo o mundo devido aos seus benefícios. É relatado globalmente que o uso correto destas tecnologias está reduzindo a emissão de gases de efeito estufa e o uso de defensivos agrícolas, aumentando a renda dos produtores e propiciando maior soberania alimentar às nações, aumentando a produtividade ao reduzir perdas por estresses abióticos e bióticos, reduzindo a necessidade de expansão de áreas agrícolas e aumentando a segurança alimentar mundial (BROOKES, 2020). A tabela 1 mostra os países com maior área plantada com cultivares transgênicas no mundo, além das culturas em que são utilizadas.

Tabela 1 – Produção de culturas biotecnológicas nos 10 países mais importantes.

Posição	País	Área cultivada (Milhões de hectares)	Culturas biotecnológicas
1	Estados Unidos da América	71,5	Milho, soja, algodão, alfafa, canola, beterraba, batata, mamão, melão, maçã
2	Brasil	52,8	Soja, milho, algodão, cana-de-açúcar
3	Argentina	24,0	Soja, milho, algodão, alfafa
4	Canadá	12,5	Canola, soja, milho, beterraba, alfafa, batata
5	Índia	11,9	Algodão
6	Paraguai	4,1	Soja, milho, algodão
7	China	3,2	Algodão, mamão
8	África do Sul	2,7	Milho, soja, algodão
9	Paquistão	2,5	Algodão
10	Bolívia	1,4	Soja

Fonte: Adaptado de ISAAA, 2018.

Muitas técnicas de edição e modificação do DNA estão sendo desenvolvidas desde 1980. No entanto, algumas técnicas e ferramentas se sobressaem a outras trazendo benefícios para o avanço da biotecnologia e para a geração de novos produtos, gradativamente com mais tecnologia imbutida. Uma destas técnicas é o sistema CRISPR, considerado revolucionário por permitir a manipulação de genes com grande precisão. O primeiro produto analisado ocorreu em 2016 pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), um cogumelo que não escurece após o corte (CROPLIFE, 2020c). No Brasil, o primeiro produto fruto da técnica CRISPR avaliado pela CTNBio foi uma cultivar de milho com genes que levam a maior concentração de amilopectinas, em 2018. Após estes acontecimentos, muitos produtos oriundos da técnica CRISPR vêm sendo avaliados em ambos os países (CROPLIFE, 2020c). A figura 3 apresenta os produtos agrícolas geneticamente editados pela técnica CRISPR até o início de 2020.

Figura 3 – Produtos agrícolas geneticamente editados analisados pela CTNBio e USDA.

	Produto	Característica
🇧🇷	Milho	Maior teor de amilopectina
	Cogumelo Paris	Não escurece após corte
	Milho	Maior teor de amilopectina
	Batata	Não escurece após corte
	Batata	Não escurece após corte
	Falso Linho	Maior teor de Ômega 3
	Soja	Tolerância à seca e salinidade
	Alfafa	Maior digestibilidade
	Milho	Resistência a fungo
	Milho	Ganho de produtividade
🇺🇸	Trigo	Maior teor de fibras
	Tomate	Maior facilidade de colheita
	<i>Pennycress</i>	Melhora a qualidade do óleo
	Falso linho	Maior teor de Ômega 3
	Alface	Não escurece
	Tabaco	Maior teor de enzima antioxidante
	<i>Pennycress</i>	Melhora a qualidade do óleo
	Soja	Alteração no tamanho do peciolo
	Tomate	Resistência a vírus (RNAi)
	Laranja	resistência a bactéria
	Soja	resistência a nematoide
	Cana	resistência a herbicida

Fonte: Croplife, 2020c adaptado de CTNBio e USDA, 2020.

O cumulativo de conhecimento técnico existente na área da genética e de regulação nunca foi tão grande, e as técnicas existentes abrem uma grande avenida para o desenvolvimento de novos produtos. Novas tecnologias como CRISPr e RNAi podem ser consideradas, em muitos casos, não transgênicos, portanto os seus produtos ficam desregulamentados, abrindo a possibilidade de *start ups* e empresas nacionais serem economicamente capazes de entrar neste mercado tecnológico.

5. Atividades realizadas

As atividades desenvolvidas ou acompanhadas serão divididas entre setores e locais de trabalho, não estando obrigatoriamente em ordem cronológica ou de importância. Será feita uma descrição geral das atividades, e quando for conveniente, haverá um exemplo de atividade descrita de forma mais detalhada, junto com os objetivos do trabalho executado.

5.1 Atividades realizadas em laboratório

Os laboratórios mais utilizados durante o estágio foram o Laboratório de Regulação Gênica II e Laboratório de Bioquímica e Biofísica, ambos localizados no Prédio da Biotecnologia. A descrição seguirá a ordem de complexidade das atividades.

Para que os trabalhos dentro de um laboratório possam ocorrer de forma correta e eficiente, é indispensável a organização e limpeza. Tendo isto em vista, rotineiramente atividades com este objetivo eram realizadas. Um novo inventário foi realizado nos

laboratórios e em seus estoques. O inventário eletrônico era registrado em planilhas de Excel, contabilizando unidades de insumos (principalmente reagentes), equipamentos descartáveis e permanentes.

Com o inventário realizado, um item de cada insumo laboratorial deveria estar em local de fácil identificação e alcance, sendo esta reposição uma das responsabilidades incumbidas. Não somente materiais deveriam estar sempre disponíveis, mas também as soluções-estoque mais utilizadas. Algumas soluções como cloreto de sódio 5M e EDTA ou tampões como Tris-HCl são necessárias para a realização de vários protocolos, sendo que algumas necessitam de mais de um dia para serem preparadas e autoclavadas. Sendo assim, estas soluções, assim como água miliQ e água destilada deveriam estar em estoque dentro do laboratório.

Como no laboratório são utilizados reagentes tóxicos e perigosos ao ser humano, cuidados adicionais precisam ser tomados. A bancada utilizada para manipular brometo de etídio, principalmente para os processos de observação em gel de agarose, precisa ser coberta com papel pardo que deverá ser descartado corretamente quando estiver danificado ou contaminado em demasia. Também as bancadas precisam estar organizadas defensivamente quanto a possíveis acidentes, com o espaço necessário disponível sem expor à contaminação equipamentos desnecessariamente. Seguindo as recomendações de segurança, a manipulação de certos reagentes deve ser realizada em capela (Figura 4), a qual deve ser utilizada de forma correta e mantida o mais limpa e organizada possível.

Figura 4 – Capela utilizada para manipulação de reagentes químicos tóxicos.



Fonte: Leonardo de Amorim Vidal, 2021 (arquivo pessoal).

Como já citado, algumas soluções-estoque deveriam ter sua quantidade monitorada e novas preparações efetuadas diante da possibilidade de falta. O preparo das soluções e tampões seguia rigorosamente o Manual de Transformação Genética de Plantas (Embrapa, 2015), sendo que a etapa de autoclavagem (quando necessária) era somente acompanhada, de acordo com as normas internas do departamento.

A manutenção e zelo pelos equipamentos dos laboratórios são indispensáveis, já que são peças essenciais para a execução dos protocolos, geralmente de difícil substituição e de alto custo. Durante o estágio, foi acompanhada a manutenção de pipetas monocanais e realizada a aferição da sua precisão por meio da pesagem do volume de água pipetada em balança de precisão (precisão de 0,00001 g) (Figura 5). As pipetas que estivessem fora da precisão esperada, deveriam ser enviadas para calibração externa.

Figura 5 – Pipetas monocanais (esquerda) e balança utilizada para aferição.



Fonte: Leonardo de Amorim Vidal, 2021 (arquivo pessoal).

Os próximos subtópicos exemplificam três atividades realizadas no decorrer do estágio.

5.1.1 Coleta de larvas e adultos da broca-do-café (*Hypothenemus hampei* F.)

O objetivo da coleta de espécimes era o seu uso futuro em projeto que visa identificar enzimas digestivas destes insetos, especificamente na fase inicial de desenvolvimento. Quanto mais jovens fossem os insetos coletados, maior seria a sua qualidade quanto à presença de enzimas digestivas de interesse e mais facilmente realizado o posterior isolamento das mesmas.

As sementes disponibilizadas para o trabalho de coleta geralmente tinham sintomas eminentes da presença da broca-do-café, mas os insetos não eram encontrados em todas as sementes. As larvas tem comprimento de 0,72 a 0,84 mm (LAURENTINO E COSTA, 2004), o que trazia a necessidade da utilização de uma lupa para sua identificação. As maiorias das sementes estavam completamente destruídas em seu interior, comprovando a presença de um grande número de insetos. Porém, somente adultos foram encontrados e uma grande quantidade de ácaros predadores foi observada.

5.1.2 Extração de DNA de eventos transgênicos de plantas de soja.

O objetivo do experimento foi analisar e validar molecularmente plantas transgênicas de soja transformadas com gene que deve conferir tolerância a um determinado estresse abiótico (confidencial), e futuramente determinar o número de cópias inseridas do transgene por meio da técnica de *Southern blot*. O gene advém de plantas de café, o processo está patenteado e agora se espera obter diferenças fenotípicas ligadas à característica em outras espécies, como por exemplo, a soja.

O desenvolvimento e a avaliação fenotípica das plantas de soja foram conduzidos em um local externo à Embrapa, por meio de uma parceria. Para que o experimento que será descrito pudesse ser realizado, algumas folhas de cada planta a ser testada foram cedidas à Embrapa para a avaliação molecular dos eventos transgênicos. As amostras de plantas enviadas para esta análise são de indivíduos de diferentes linhagens advindas de eventos transgênicos únicos, na segunda geração (T2). A escolha dos indivíduos a serem enviados para a análise foi feita com base em avaliação fenotípica em laboratório (ou casa de vegetação), comparando plantas controle e transgênicas quanto à tolerância ao estresse abiótico.

Cinco plantas foram recebidas, entre estas uma sendo controle (não transgênico), e o processo descrito fez uso de quatro destas plantas, entre elas o controle. As amostras eram compostas por folhas de plantas de soja, onde preferencialmente, as folhas deveriam ser jovens e saudáveis, no entanto, as folhas recebidas nas amostras eram mais velhas que o ideal, já tendo seu desenvolvimento totalmente concluído, o que pode ter prejudicado o produto obtido destas amostras brutas.

O método utilizado para extração e quantificação de DNA de tecidos vegetais está descrito no Manual de Transformação Genética de Plantas, no capítulo 9, sendo este uma modificação do método proposto por Doyle & Doyle (1987). O processo inicia com a maceração do material vegetal congelado por nitrogênio líquido, onde deveria-se obter três gramas de material fresco macerado, no entanto, em nenhuma amostra este montante pôde ser obtido. O processo segue com a incubação em banho-maria após a adição do tampão CTAB, que continha beta-mercaptoetanol. Procedeu-se os passos descritos, adicionando o volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), agitando e centrifugando por 10 minutos a 12.000 rpm em centrífuga *eppendorf* 5810R. Depois de centrifugado, o material teve a fase orgânica separada da líquida, sendo que a parte líquida foi separada para utilização, descartando-se a fração orgânica. Foi adicionado RNase A e incubado por 30 minutos, adicionado 0,6 volumes de isopropanol gelado, seguindo para centrifugação de 20 minutos a 12.000 rpm, o

precipitado foi lavado com etanol 70%, centrifugado por 3 minutos e depois seco deixando o tubo invertido em papel-toalha.

Após a precipitação do DNA, observou-se que sua qualidade era duvidosa, devido à coloração do produto precipitado da última reação (verde escuro, com nuances marrom quando deveria ser branco), então, para a quantificação e análise da qualidade do DNA total extraído, foi realizado um teste em espectrofotômetro, que confirmou a baixa qualidade das amostras, estando fora dos padrões ideais, indicando algum problema que será discutido mais tarde.

5.1.3 Reação da polimerase em cadeia (PCR) para avaliação da presença de genes

A técnica de PCR tem inúmeras aplicações em diversas áreas das ciências biológicas, principalmente na área da biologia molecular, onde é uma das ferramentas mais utilizadas na pesquisa. Como exemplos de usos mais importantes têm-se a clonagem de DNA para sequenciamento e manipulação, comprovação molecular da existência de um gene exógeno ou endógeno ou testes para a validação funcional de genes, dentre outras muitas aplicações, podendo gerar resultados precisos, relativamente rápidos e a baixo custo (RODRIGUES; DOS SANTOS GAMA; ARAGÃO, 1998).

A técnica foi aplicada dentro do projeto de edição do genoma de arroz, onde pesquisadores japoneses descobriram e validaram genes em cultivares do seu país, que podem ser de interesse para a pesquisa e melhoramento genético também no Brasil. Devido à grande conservação genética dentro do gênero *Oryza*, levantou-se a hipótese destes genes também serem encontrados nas variedades majoritariamente cultivadas no Brasil. Havendo a confirmação, é possível proceder a novos trabalhos estudando estes genes nas cultivares brasileiras. Para esta confirmação, o material genético foi recebido pela Embrapa, e os *primers* desenhados. Por meio de observação em gel de agarose, a existência destas sequências (fragmentos) de DNA pode ser confirmada, após sua replicação no processo de PCR.

Para cada amostra, serão necessárias três unidades, já que três genes seriam avaliados (cada um com primers iniciadores específicos), contudo, considerou-se fazer o “mix” para quatro repetições, trazendo segurança que não falte para a última amostra, além de minimizar erros no cálculo de proporções dos reagentes. Soluções e produtos adicionados para cada reação: H₂O destilada (37,3 µL); Tampão para PCR (5 µL); MgCl₂ (1,5 µL); dNTPs 10 mM (1 µL); *primer 1* – 10 pmol (1,25 µL); *primer 2* – 10 pmol (1,25 µL); *Taq pol* (0,2 µL); DNA

(2,5 μL). Todos estes itens foram adicionados aos três *ependorfs* que conteriam o “mix”, na ordem: H_2O ; Tampão para PCR; MgCl_2 ; dNTPs 10mM; *Taq pol*; *Primers* 1 e 2; DNA. Dois destes itens precisam ser reajustados à concentração ideal antes de serem adicionados, sendo eles o DNA e os primers. Ao final da diluição e adequação da concentração, foram adicionados 2,5 μL por tubo de “mix”, na concentração de 200 ng/ μL , sendo necessário cálculo para chegar ao fator de diluição do DNA. A concentração de DNA em cada amostra deve ser ajustada antes de ser adicionada ao último tubo, que será destinado ao termociclador. Após a diluição dos primers, do DNA e da preparação final do “mix”, os tubos passaram por spin em equipamento centrifugador *Centrifuge* 5415C, a fim de homogeneizar a solução e decantar o líquido contido nas paredes para o meio aquoso.

Tendo a mistura final em mãos, o equipamento termociclador *MJ Mini* foi programado para 30 ciclos, nos quais há um período de desnaturação (95°C), seguido pelo pareamento (temperatura específica para o par de primers iniciadores) e finalmente o período de extensão (72°C), após os ciclos o programa contém uma extensão final a 72°C. Após o fim do PCR, o conteúdo de cada tubo é adicionado a um poço em um gel de agarose, e por eletroforese os segmentos amplificados são separados por tamanho e podem ser visualizados devido à presença de um intercalante de DNA (brometo de etídio) que torna-se visível quando exposto à luz ultravioleta.

Com a realização desta última etapa, não foi possível visualizar os segmentos de DNA que deveriam ter sido amplificados. Sendo assim, a execução do protocolo neste momento, não foi capaz de confirmar a existência de genes presentes nas cultivares japonesas de arroz também nas variedades brasileiras.

5.2 Atividades realizadas em casas de vegetação

A infraestrutura do CENARGEN conta com dezenas de casas de vegetação, com algumas diferenças quanto as suas construções, equipamentos e nível tecnológico, de acordo com a finalidade de cada estrutura e os projetos em que estão inseridas. As atividades realizadas ocorriam em duas casas de vegetação diferentes, ambas muito similares internamente. Os projetos acompanhados requeriam o cultivo de plantas de café (*Coffea arabica* L.) nas casas de vegetação. Uma parte das plantas, já adultas em sua maioria, compõe parte de uma coleção de café geneticamente modificado, utilizada em pesquisas já concluídas há vários anos ou mesmo décadas. Mesmo com os projetos já estando encerrados, é conveniente manter a coleção viva para possíveis novos trabalhos. A figura 6 traz uma

perspectiva geral de uma das casas de vegetação interna e externamente. Cabe salientar que este espaço necessita e possui permissão da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) para o cultivo de Organismos Geneticamente Modificados (OGM).

Figura 6 – Visão externa de uma das casas de vegetação (esquerda), com a ante-sala destacada; Visão interna da casa de vegetação (direita).



Fonte: EA Alves, 2020.

As casas de vegetação são divididas em dois espaços, o primeiro destes é uma antessala, onde o acesso de saída e entrada está localizado, e o segundo, é o local onde as plantas se localizam. Na ante-sala, há uma porta que divide este espaço do seguinte, e sempre que alguém necessitar adentrar no local onde as plantas são mantidas, deverá colocar seu nome em um livro de registro, juntamente com o horário de entrada e saída, assim como as atividades realizadas. O espaço interno das casas de vegetação é dividido para mais de um projeto, ou seja, os espécimes vegetais ali cultivados pertencem a equipes de pesquisa diferentes. Em nenhuma hipótese, salvo com autorização prévia, deve-se mover ou manipular as espécies vegetais que não pertencem estritamente às responsabilidades incumbidas a cada membro das equipes de pesquisa.

A entrada de novas mudas na casa de vegetação ocorria quando as plântulas cultivadas na sala de cultivo alcançavam o desenvolvimento necessário. Anteriormente à chegada das mudas, o substrato era preparado nos tubetes, geralmente sendo composto pela mistura de *Carolina soil* com solo característico da região (latossolo), na proporção 1:1. Com posse das mudas, estas eram retiradas de suas magentas e transplantadas uma a uma para os tubetes contendo o substrato, sendo importante observar a altura de enterrio das plântulas, para evitar o “afogamento” das mesmas ou danos ao seu caule pela adubação em momentos futuros. Mudas recém-transplantadas para os tubetes e mudas com 15 dias de crescimento, identificadas de forma provisória, são apresentadas na figura 7.

Durante o estágio, foi observado que algumas plantas estavam demasiadamente

enterradas, sofrendo os sintomas do “afogamento”. Também havia plantas com suas raízes muito expostas, provavelmente ocasionadas pelos repetidos eventos de irrigação com a mangueira. No caso de enterrio acima do ideal, as plantas jovens tiveram o substrato cavado na volta de seus caules, com o cuidado para não prejudicar as raízes. Já quando as raízes estavam expostas, principalmente em plantas mais desenvolvidas, os recipientes eram completados com o substrato adequado, até regularizar a situação para o ideal.

Figura 7 – Muda de café não transgênico recém-transplantadas para os tubetes (esquerda) e 15 dias após o primeiro registro.



Fonte: EA Alves, 2020.

Quando as mudas alcançavam um tamanho em que suas raízes já não estivessem com espaço adequado, o transplântio para recipientes plásticos maleáveis era realizado, utilizando o mesmo substrato composto ou apenas solo, a depender da disponibilidade do material. Quando as plantas atingiam novamente um tamanho inadequado para o seu recipiente, haveria um novo transplântio para, desta vez, um vaso plástico. A figura 8 mostra plantas com diferentes idades.

Figura 8 – Plantas com meses de crescimento (esquerda) até plantas com décadas de cultivo dentro de casas de vegetação (direita).



Fonte: EA Alves, 2020.

Uma das atividades realizadas geralmente em dias alternados era a rega das plantas. O

critério de rega obedece a seguinte regra: o substrato nunca deveria ficar seco, mas também nunca encharcado. No caso de recipientes apenas com solo, este deveria estar, na maior parte do tempo, aproximadamente em sua capacidade de campo. A rega era realizada com o auxílio de uma mangueira, que deveria ter a pressão da água controlada de acordo com a idade das plantas que seriam regadas. Quanto mais jovem a planta, menor deveria ser a pressão da água, para não causar danos às mudas ou ao substrato. É indicado não molhar as partes aéreas das plantas, exceto mudas muito jovens ou quando não houvesse alternativa, a fim de não favorecer injúrias causadas por agentes bióticos.

Em dias alternados ou diariamente as plantas eram monitoradas em seu desenvolvimento, sempre zelando pela organização do espaço e sanidade vegetal. Ao decorrer do tempo, o substrato naturalmente sofria compactação, deixando algumas raízes expostas, neste caso, o recipiente era completado até a altura correta. Também é muito importante o monitoramento visual de pragas, doenças ou problemas nutricionais. Os insetos-praga mais facilmente visualizados eram lagartas e cochonilhas e, quando verificados, era realizado o controle mecânico dos mesmos. O controle mecânico pode ser menos eficiente em relação ao tempo utilizado, mas devido ao fato de apenas pequenos focos de insetos serem encontrados, a tarefa é realizada rapidamente, além de não causar danos às plantas. A aplicação de inseticidas era realizada de forma semanal ou por demanda, por equipe terceirizada, preferencialmente nas sextas feiras após o meio dia para que apenas houvesse a entrada de pessoas na próxima segunda feira.

Em grande parte das plantas, principalmente nas que já tinham vários meses na casa de vegetação, surgiam muitas manchas nas folhas que seguiam um padrão idêntico em quase todos os indivíduos. Este material foi levado a um colaborador com experiência para avaliar se o problema seria advindo de uma doença ou um problema nutricional. Foi informado que provavelmente o problema estivesse relacionado à adubação, havendo necessidade de testes específicos. Neste caso, o plano de adubação das plantas foi revisto e será ajustado nas próximas adubações. A figura 9 exemplifica os sintomas característicos observados nas plantas.

Figura 9 – Folhas de plantas com sintomas característicos de provável deficiência nutricional.



Fonte: EA Alves, 2020.

O aparecimento de fumagina nas folhas também ocorria esporadicamente, os indivíduos afetados eram separados das demais plantas e recebiam tratamento químico e limpeza pelos colaboradores terceirizados, a fim de serem recuperados. Outro sintoma foliar observado algumas vezes, se refere à deriva de algum defensivo utilizado em plantas vizinhas de outros experimentos, que acabavam afetando acidentalmente espécimes próximos. A figura 10 apresenta os sintomas de deriva e fumagina.

Figura 10 – Folhas afetadas por deriva (esquerda), evolução dos sintomas (centro), e presença de fumagina (direita).



Fonte: EA Alves, 2020.

Também era realizada a organização das mudas quando necessário, de forma a aperfeiçoar o uso do espaço e a exposição à luz. Em caso de descarte de material vegetal ou de substrato, este era realizado de acordo com os critérios estabelecidos pela CTNBio do CENARGEN que determina a forma como materiais oriundos do cultivo de OGMs devem ser descartados, ou no caso de plantas não modificadas geneticamente, o descarte era realizado no local indicado, localizado no exterior da casa de vegetação.

5.3 Atividades realizadas em sala de cultivo

A sala de cultivo era uma dependência fechada, junto dos laboratórios. Esta sala

possui ambiente controlado, com temperatura estável e fotoperíodo manipulado de acordo com as necessidades dos cultivos em andamento. Neste local, várias culturas seguindo diversos métodos eram mantidas, contudo, as atividades desenvolvidas no estágio envolveram plantas de café, cultivadas dentro de magentas plásticas transparentes com substrato vermiculita expandida.

As atividades desempenhadas abrangiam desde a seleção e desinfestação das sementes até a retirada das plântulas para o transplantio em casa de vegetação. A primeira etapa se constituía na seleção de sementes adequadas, sãs e sadias, para a sementeira. As sementes selecionadas não deveriam conter danos de insetos ou qualquer outro sintoma ou sinal de origem biótica ou abiótica, assim como deveriam ter tamanho e peso adequados. A seleção era feita unicamente por método visual e tátil (Figura 11).

Figura 11 – Sementes de café sadias completas (esquerda), sem o pergaminho (centro) e sementes com sinais de danos das brocas (direita).



Fonte: Leonardo de Amorim Vidal, 2021 (arquivo pessoal).

Após a seleção, as sementes tinham seus capítulos retirados e ficavam de molho sob agitação por algumas horas. Na próxima etapa, eram desinfestadas utilizando solução de hipoclorito de sódio, e após serem lavadas com água estariam prontas para a sementeira nos recipientes. Os recipientes para a colocação do substrato para deveriam estar o mais limpo possível, para evitar a proliferação de insetos e doenças. Como já citado, o substrato era composto unicamente por vermiculita expandida, que era colocada dentro das magentas até que o fundo fosse coberto. As magentas então seguiam para a autoclavagem, levando à esterilização tanto do recipiente como do substrato. Após este processo, as sementes eram adicionadas, sendo indicadas 09 sementes por unidade (figura 12). A seguir os recipientes eram acomodados em local adequado nas prateleiras da sala de cultivo, onde ficavam até o momento do transplantio.

Figura 12 – Sementes acomodadas dentro da magenta, estando na sala de cultivo há poucos dias, já é possível

observar o crescimento de fungos em algumas sementes.



Fonte: EA Alves, 2020.

O monitoramento do desenvolver do cultivo era realizado diariamente com o objetivo de identificar problemas como contaminações, ou verificar o momento de transplântio das plântulas. No caso de contaminação nos recipientes de cultivo, a supervisora deveria ser informada, que decidiria pelo descarte ou não do material. Enfatiza-se a necessidade de manter um ambiente destes completamente limpo e organizado, livre de possíveis fontes de contaminação. O momento de transplântio era alcançado quando a maioria das plantas dentro da magenta atingia a tampa do recipiente com seu meristema apical. Neste caso, as plantas eram removidas da sala de cultivo e levadas até a casa de vegetação adequada, para transplântio em tubetes. A figura 13 exemplifica plântulas que estarão prontas para o transplântio em poucos dias.

Figura 13 – Plântulas cultivadas em uma magenta na sala de cultivo, algumas dias antes do momento ideal para transplântio.



Fonte: Leonardo de Amorim Vidal, 2021 (arquivo pessoal).

5.4 Atividades realizadas em outras dependências ou fora do CENARGEN

Além das atividades inerentes ao estágio, houve oportunidades adicionais de aprendizado com eventos únicos que aconteceram ao longo do período no CENARGEN, sendo citados abaixo:

“Curso de análise funcional *in silico*: dados biológicos de animais e vegetais”, com quinze horas de duração (ao longo de três dias), e recebimento de certificado.

No dia 21 de janeiro de 2020 ocorreu um evento singular no Auditório Assis Roberto de Bem, localizado no CENARGEN, uma palestra com a Prêmio Nobel de Química em 2018, Frances Hamilton Arnold. O tema abordado foi “Inovação sustentável na agricultura”, abrangendo, principalmente, métodos de evolução dirigida para criar sistemas biológicos úteis, incluindo enzimas, vias metabólicas, circuitos reguladores genéticos e organismos (EMBRAPA, 2020b).

No dia 09 de março de 2020 ocorreu a defesa da tese de mestrado da colega de trabalho estagiária Isabela de Oliveira Motta (colega de laboratório), em um dos auditórios da Universidade de Brasília (UnB), com o título: “Redescrição de *Glyphidops (Glyphidops) filusus* e *Nerius pilifer* (Diptera, Neriidae) com especial atenção ao estudo da morfologia comparada das genitálias de machos e fêmeas”.

Em 30 de janeiro de 2020 aconteceu a defesa da tese de doutorado de Pedro Souza Berbert, orientado pelo Dr. Francisco José Lima Aragão (Pesquisador do CENARGEN), ocorrida em um dos auditórios da UnB, tendo por título: “Expressão de uma esfingomielinase de *Trichoderma harzianum* com potencial para controle de bacterioses em plantas”.

Em 05 de fevereiro de 2020 houve a participação, como ouvinte, da Reunião das Setoriais Vegetal e Ambiental da CTNBio, por convite da orientadora Professora Carla Andréa Delatorre.

Ocasionalmente ocorriam reuniões com a equipe, com a supervisora ou com algum pesquisador do CENARGEN que estivesse disposto a explicar sua linha de trabalho e o futuro de sua pesquisa, geralmente apresentando os fundamentos básicos e o estado da arte. No caso das reuniões de equipe, estas eram nas sextas-feiras, para avaliação das atividades da última semana e repasse de informações acerca dos próximos passos, dos projetos de pesquisa e das atividades a serem desenvolvidas.

6. Discussão

Apesar do glamour tecnológico embutido na biotecnologia, o desenvolvimento científico nesta área envolve o desenvolvimento de práticas rotineiras que precisam ser executadas com cuidado e exatidão. O estágio permitiu vivenciar algumas destas práticas e os problemas nelas encontrados serão discutidos abaixo.

Diversos processos, incluindo a análise da presença de genes endógenos, sua

localização, clonagem de genes, sequenciamento, identificação de alelos diversos, mapeamento, entre outros, dependem da obtenção de DNA em quantidade e qualidade adequadas. Apesar do protocolo habitual ser seguido durante o estágio, no experimento que buscava analisar a presença de gene exógeno não foi possível obter DNA de qualidade. É preciso levantar hipóteses para a ocorrência do problema encontrado e possibilidades para resolvê-lo. Primeiramente, a questão da dependência de terceiros para o envio do material vegetal é um fato problemático, já que o material recebido no laboratório pode não estar dentro dos padrões de qualidade necessários para o processo de extração de DNA. A escolha do material vegetal deve buscar, prioritariamente, folhas jovens, sanitariamente sãs e sem defeitos físicos. Tendo escolhido o material assertivamente, este precisa ser acondicionado de forma adequada. O material recebido continha folhas com poucos defeitos aparentes, mas completamente desenvolvidas, não jovens, e em pequena quantidade.

A coloração do material precipitado na última etapa do método utilizado indica possível contaminação por outros componentes que não DNA, como polissacarídeos, peptídeos, fenóis ou outras proteínas, ou oxidação. Tendo isto em vista, durante a execução do método CTAB modificado, poderia ter-se realizado uma nova purificação na última etapa do processo, na tentativa de reduzir a quantidade de contaminantes. Também, o uso de polivinilpirrolidona solúvel (PVP) pode inibir a ação de compostos fenólicos por antioxição (ROMANO & LEAL-BERTIOLI, 2015), como realizado com sucesso por Faleiro *et al.*, (2003) para a extração de DNA de espécies nativas do Cerrado com características foliares que dificultam o processo de extração. Por fim, simplesmente a falta de experiência prévia na realização deste método pode influenciar na exatidão da condução de diferentes etapas, especialmente na separação da fase aquosa da orgânica, e conseqüentemente no produto final.

Em outra fase do projeto, havia a necessidade de obter, a partir de grãos de café, larvas em seus primeiros instares para extração de proteínas. Neste caso, o problema encontrado, possivelmente relaciona-se à logística. Na coleta de insetos não houve sucesso, apenas adultos sem vida foram encontrados. As sementes aparentavam ser velhas, colhidas há um bom período de tempo, já que o interior da imensa maioria estava completamente destruído. Neste caso, a chance de encontrar adultos torna-se maior, já que os insetos jovens podem ter encontrado a situação de não haver mais alimentos para continuar o seu desenvolvimento, e o exoesqueleto dos adultos é mais preservável. Durante as coletas um grande número de ácaros predadores também foi encontrado, o que levanta a hipótese destes ácaros terem se alimentado de toda a prole de larvas, como ocorre com outras espécies, ao exemplo do controle biológico exercido por *Stratiolaelaps scimitus* (Womersley) sobre larvas de fungus

gnats (*Bradysia matogrossensis* Lane) (SUJII *et al.*, 2020). A avaliação dos grãos logo que coletados poderia ter evitado este problema.

Uma fase muito importante é o desenvolvimento e manutenção das plantas, tanto matrizes como transgênicas. Foi observada deriva em alguns cafeeiros na casa de vegetação, que provavelmente ocorreu pela proximidade das plantas de experimentos diferentes, se excluída a hipótese de erro durante a aplicação. Infelizmente não foi possível obter informações precisas acerca dos princípios ativos causadores dos sintomas. Isto poderia ser evitado com a colocação temporária de barreiras físicas entre as plantas em diferentes bancadas. Poucas folhas foram observadas com os sintomas, não se tornando algo preocupante ou danoso às matrizes, ademais, não se tratavam de herbicidas, mas se fosse o caso, o cuidado precisaria ser maior, para evitar danos às plantas. No entanto, caso fossem necessárias avaliações fenotípicas das plantas, pequenas ocorrências de deriva poderiam ser problemáticas, afetando os resultados.

Acerca do transplântio das mudas na casa de vegetação, este deveria ocorrer antes que as plantas estivessem demasiadamente grandes para o recipiente em que estivessem plantadas. Foi observado que boa parte das plantas estava com crescimento excessivo para o seu recipiente, o que causa limitação ao desenvolvimento radicular, trazendo prejuízo imediato e futuro no desenvolvimento e saúde das plantas. Pela falta de espaço para o crescimento radicular, as plantas podem apresentar redução geral em seu desenvolvimento, assim como sintomas de deficiência nutricional pelo pouco volume de substrato que pode ser explorado. O transplântio das plantas poderia ser realizado de forma mais controlada, favorecendo o desenvolvimento da planta.

Os sintomas observados nas plantas de café (Figura 10) dentro das casas de vegetação podem dever-se a mais de um fator, podendo estes interagir e somar-se, resultando no observado. No caso em questão, os sintomas mais provavelmente têm origem em problemas nutricionais: deficiência(s) nutricional (is); excesso de algum nutriente causando toxicidade ou inibindo a absorção de outro; alguma substância causadora de fitotoxicidade. Os sintomas se manifestavam em plantas adultas e mais antigas, podendo o problema ser causado, inclusive, pela falta de espaço para o crescimento radicular, como já discutido. Tratando-se de uma deficiência nutricional, os sintomas observados se assemelham mais a déficit de ferro ou magnésio, já considerando a variação entre plantas. As figuras 14 e 15 ilustram estes sintomas em plantas com a deficiência comprovada.

Figura 14 – Sintomas causados por deficiência de magnésio.



Fonte: Yara, 2020.

Figura 15 – Sintomas causados por deficiência de ferro em café.



Fonte: Yara, 2020.

O solo utilizado para compor o substrato dos recipientes tem origem da região, sendo caracterizado como um Latossolo. Não foi possível obter informações se este solo passou por correção de pH prévia, ou se alguma análise foi feita a fim de identificar deficiências ou problemas de fertilidade. Este tipo de solo geralmente apresenta pH ácido, com risco de toxicidade por alumínio disponível e naturalmente possui baixa fertilidade (SOUZA & ALVES, 2003). As plantas mais jovens tinham seu substrato composto por metade de solo local e metade *Carolina Soil*, enquanto as mais velhas tinham o solo local por totalidade em seus recipientes. Na falta de irrigação, o solo aumentava a impedância rapidamente, o que juntamente com outros fatores, como o limitado espaço para o desenvolvimento radicular, tornava a irrigação um cuidado essencial. Estes fatores somados podem influir negativamente sobre o desenvolvimento das plantas.

Algumas plantas, principalmente as adultas e mais velhas apresentavam sintomas referentes à fumagina em suas folhas. A fumagina trata-se de um fungo, particularmente *Capnodium* sp., que se desenvolve devido à excreções açucaradas de insetos que se alimentam das plantas por sucção. Este substrato causa o alastramento do fungo podendo cobrir órgãos vegetais, prejudicando processos de fotossíntese e respiração, principalmente nas folhas, o que pode levar ao definhamento da planta (SUPLICY FILHO *et al.*, 1983, GALLO *et al.*, 2002 *apud* COSTA *et al.*, 2009).

Na casa de vegetação foi possível observar cochonilhas-da-roseta (*Planococcus citri* R) (Figura 16), em momentos muito esporádicos, contudo, este é um agente causador da fumagina (COSTA *et al.*, 2009). A quantidade de insetos observados não era capaz de explicar a ocorrência de fumagina, que era muito abrangente em algumas plantas. As plantas apresentavam recuperação após o tratamento, no entanto, para explicar o agravamento encontrado dos sintomas, levanta-se a hipótese que em um período anterior ao início do estágio, estes insetos estavam presentes em infestações maiores, que aumentaram a quantidade de inóculo do fungo. Enfatiza-se que as cochonilhas não causavam problemas diretos, pois ocasionalmente eram encontradas. Foi observado que os locais mais próximos às paredes tinham maior propensão para o aparecimento da doença, talvez por haver maior acúmulo de umidade. Devido à fumagina, o molhamento foliar durante as regas era evitado ao máximo, para não favorecer a dispersão da doença.

Figura 16 – Cochonilhas-da-roseta encontradas em folhas jovens de cafeeiro.



Fonte: EA Alves, 2020 (esquerda); Leonardo de Amorim Vidal, 2021 (arquivo pessoal).

Durante todo o estágio, nas sextas-feiras ocorriam reuniões da equipe, coordenadas pela supervisora Erika Valéria Saliba Albuquerque Freire e a pesquisadora Juliana Dantas de Almeida. Estas reuniões, conceituadas “*Progress report*” serviam para a discussão de artigos previamente escolhidos, para avaliação das atividades da última semana e para repassar informações acerca dos próximos passos, dos projetos de pesquisa e das atividades que deveriam ser desempenhadas. Estas reuniões eram ótimas oportunidades para entender a forma como os projetos do CENARGEN eram desenvolvidos e conduzidos, além de obter conhecimento específico acerca de temas relacionados. Este contato próximo com os pesquisadores mostrou-se essencial para associar as práticas executadas e acompanhadas com os projetos em andamento. Ficou clara a necessidade de atividades simples, repetitivas, mas que precisam ser executadas com precisão para que a pesquisa se desenvolva adequadamente e se possa chegar ao desenvolvimento de novos produtos biotecnológicos.

7. Considerações finais

O CENARGEN é uma instituição pública de pesquisa muito renomada, um mérito principalmente dos pesquisadores que conduzem os projetos de pesquisa atualmente ou tiveram seus trabalhos realizados no passado. No geral, a infraestrutura das instalações é robusta e conta com alta tecnologia, com uma boa divisão de setores e departamentos, que se completam para propiciar o correto andamento dos trabalhos.

Foi possível refletir por meio dos projetos em que houve envolvimento, ou em discussões com os pesquisadores, que atualmente o CENARGEN assume uma posição com âmbito muito grande no desenvolvimento de produtos inovadores que possam futuramente chegar à mão de quem produz alimentos. Jamais se poderá negar a importância da pesquisa básica, já que sem esta, não se pode desenvolver a pesquisa aplicada de forma satisfatória. No entanto, a vocação agropecuária do Brasil necessita de respostas cada vez mais rápidas e que tornem nosso agronegócio progressivamente competitivo. Tendo isso em vista, no departamento trabalhado foi percebido um foco significativo na pesquisa aplicada em detrimento da pesquisa básica.

A pesquisa biotecnológica é capaz de gerar respostas, resultados e produtos fascinantes. Contudo, ao contemplar os resultados que a biotecnologia torna possíveis, pode parecer obscuro, o oneroso caminho até que cada objetivo seja alcançado. A rotina em um centro de pesquisa, mais especificamente em laboratórios ou casas de vegetação, na maioria das vezes é repetitiva e pode se tornar massante, necessitando de processos muito longos para se alcançar quaisquer resultados. Cada atividade, partindo da mais simples a mais complexa possível, deve ser valorizada e tratada com zelo.

Com o decorrer do estágio, houve a oportunidade de conhecer e verificar a forma com que os projetos são feitos, pensados e estruturados. Do mesmo modo, foi possível vivenciar o dia-a-dia de trabalho, executando protocolos e tarefas gerais, geralmente diferentes a cada semana e ao lado de pessoas com muita experiência e formação, o que propiciou aprendizados singulares, muito valorizados por todo o conhecimento obtido.

REFERÊNCIAS

- AGROANALYSIS *et al.* Vinte anos de transgênicos no Brasil. **Agronalyis**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 2, p. 29-38, 2018. Disponível em: <http://bibliotecadigital.fgv.br/ojs/index.php/agroanalysis/article/viewFile/77454/74224>. Acesso em: 26 fev. 2021.
- AMARANTE JUNIOR, O. P. de et al. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422002000400014> Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422002000400014&script=sci_arttext&tlng=pt. Acesso em: 26 fev. 2021.
- BIOTECNOLOGIA: estado da arte e aplicações na agropecuária. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/916213/1/LivroFaleiro01.pdf>. Acesso em 25: fev. 2021.
- BUOL, S. W.** Solos e agricultura no centro oeste e norte do Brasil. **Scientia Agricola**, [S.l.],v. 66, n. 5, p. 697-707, 2009. DOI:<https://doi.org/10.1590/S0103-90162009000500016> Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/sa/article/view/22509>. Acesso em: 12 abr. 2021
- BUOL, S. W; CLINE, M. G. Soils of the Central Plateau of Brazil ... **Agronomy Mimeo**. Ithaca: Cornell University, 1973. p. 73-13
- BRASIL. Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005. Regulamenta os incisos II, IV e V do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados – OGM e seus derivados, cria o Conselho Nacional de Biossegurança – CNBS, reestrutura a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio, dispõe sobre a Política Nacional de Biossegurança – PNB, revoga a Lei nº 8.974, de 5 de janeiro de 1995, e a Medida Provisória nº 2.191-9, de 23 de agosto de 2001, e os arts. 5º, 6º, 7º, 8º, 9º, 10 e 16 da Lei nº 10.814, de 15 de dezembro de 2003, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 28/03/2005. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/lei/111105.htm. Acesso em: 27 fev. 2021.
- BRASIL. Lei nº 5.851, de 7 de dezembro de 1972. Autoriza o Poder Executivo a instituir empresa pública, sob a denominação de Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 07/12/1973. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/1970-1979/15851.htm#:~:text=LEI%20No%205.851%2C%20DE,EMBRAPA\)%20e%20d%C3%A1%20outras%20provid%C3%Aancias](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/1970-1979/15851.htm#:~:text=LEI%20No%205.851%2C%20DE,EMBRAPA)%20e%20d%C3%A1%20outras%20provid%C3%Aancias). Acesso em: 27 fev. 2021.
- BRASÍLIA. DISTRITO FEDERAL. Lei orgânica do Distrito Federal. **Diário Oficial do Distrito Federal**, Brasília, nº 116, Suplemento, seção Suplemento de 09/06/1993. Disponível em: http://www.sinj.df.gov.br/sinj/Norma/66634/Lei_Org_nica__08_06_1993.html. Acesso em: 20 de fev. 2021.
- BRASÍLIA. DISTRITO FEDERAL. **História – Brasília: a cidade sonho**. Brasília, [2021]. Disponível em: <http://www.df.gov.br/historia/>. Acesso em: 25 de jan. 2021.

BROOKES, G. Crop biotechnology continues to provide higher farmer income and significant environmental benefits. **PG Economics – Press Release**, Dorchester, July 2020. Disponível em: <https://pgeconomics.co.uk/pdf/pressreleaseljuly2020.pdf>>. Acesso em: 26 fev. 2021.

CANHOTO, J. M. **Biotecnologia vegetal da clonagem de plantas à transformação genética**. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra/Coimbra University Press, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.14195/978-989-26-0404-6> Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=WRnwnvqkiu8C&oi=fnd&pg=PA13&dq=biotecnologia+vegetal+&ots=OUAYJ56pQu&sig=aGlmwb0t60tapCQWlpQ_0Y4PIOA#v=onepage&q=dahms&f=false>. Acesso em: 25 fev. 2021.

CARRER, H.; BARBOSA, A. L.; RAMIRO, D. A. Biotecnologia na agricultura. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 24, n. 70, p. 149-164, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-40142010000300010>. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-40142010000300010&script=sci_arttext. Acesso em: 26 fev. 2021.

CNA – CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL. **Panorama do Agro**. Brasília, 2020. Disponível em: <https://www.cnabrazil.org.br/cna/panorama-do-agro#:~:text=O%20agroneg%C3%B3cio%20tem%20sido%20reconhecido,do%20PIB%20brasileiro%5B1%5D>. Acesso em: 26 fev. 2021.

COSTA, J. N. M. *et al.* **Cochonilhas ocorrentes em cafezais de Rondônia**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2009. (Circular Técnica, 110) Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/710941/1/ct110cochonilhas.pdf>. Acesso em 26 fev. 2021.

COSTA, L. **Plano piloto de Brasília**: relatório Lucio Costa. [1957]. Disponível em: <http://doc.brazilia.jor.br/plano-piloto-Brasilia/relatorio-Lucio-Costa.shtml>. Acesso em: 25 fev. 2021.

CROPLIFE Brasil. **A biotecnologia e o desenvolvimento da humanidade**. São Paulo, SP, 2020a. Disponível em: <http://croplifebrasil.org/conceitos/a-biotecnologia-e-o-desenvolvimento-da-humanidade/>. Acesso em: 27 fev. 2021.

CROPLIFE Brasil. **O cultivo de plantas transgênicas no Brasil**. São Paulo (SP), 2020b. Disponível em: <https://croplifebrasil.org/noticias/plantas-transgenicas-no-brasil/>. Acesso em: 27 fev. 2021.

CROPLIFE Brasil. **Produtos agrícolas geneticamente editados: sistema CRISPR**. São Paulo (SP), 2020c. Disponível em: <https://croplifebrasil.org/publicacoes/produtos-agricolas-geneticamente-editados-sistema-crispr/>. Acesso em: 27 fev. 2021.

CRUZ, B.O.; SCHLABITZ, C.J.; QUIROZ, I.Z. **Aspectos Econômicos do Distrito Federal**. Brasília, Codeplan, 2018. (Texto para discussão, n.27). Disponível em: http://www.codeplan.df.gov.br/wp-content/uploads/2018/02/TD_37-Aspectos-Econ%C3%B4micos-do-Distrito-Federal.pdf. Acesso em: 25 fev. 2021.

CTNBIO – COMISSÃO TÉCNICA DE BIOSSEGURANÇA. **Relatórios anuais**. Brasília, 2020. Disponível em: <http://ctnbio.mctic.gov.br/relatorios-anuais>. Acesso em: 26 fev. 2021.

DAHMS, A. S. Biotechnology: What it is, what it is not, and the challenges in reaching a national or global consensus. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, New York, v. 32, n. 4, p. 271-278, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1002/bmb.2004.494032040375>.

Disponível em:

<https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/bmb.2004.494032040375>. Acesso em: 25 fev. 2021.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, [S.l.], v.19, n.1, p.11-15, 1987.

EBC – EMPRESA BRASIL DE COMUNICAÇÃO. Agência Brasil. **DF entra em estado de atenção por causa da baixa umidade do ar**. Brasília: Agência Brasil, 2014. Disponível em: <https://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2014-08/df-entra-em-estado-de-atencao-por-causa-da-baixa-umidade-do-ar>. Acesso em: 25 fev. 2021.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Levantamento de reconhecimento dos solos do Distrito Federal**. Brasília: Embrapa, 1978.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA. **Soja em números (safra 2019/20)**. Brasília: Embrapa, 2020a. Disponível em: <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>>. Acesso em 26 fev. 2021.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA. **Notícias**. Nobel de Química faz palestra em Brasília. Brasília: Embrapa, 2020b. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/49549043/nobel-de-quimica-faz-palestra-em-brasilia>>. Acesso em 26 fev. 2021.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA. **História da Embrapa**. Brasília: Embrapa, [2021]a. Disponível em: <https://www.embrapa.br/memoria-embrapa/a-embrapa#:~:text=Em%207%20de%20dezembro%20de,vinculada%20ao%20Minist%C3%A9rio%20da%20Agricultura.>>. Acesso em 26 fev. 2021.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**. Brasília: Embrapa, [2021]b. Disponível em: <https://www.embrapa.br/recursos-geneticos-e-biotecnologia/apresentacao>>. Acesso em 25 fev. 2021.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA. **Embrapa monitoramento por satélite: resumo**. Brasília: Embrapa, 2014.

EREKY, K. **Biotechnologie der Fleisch-, Fett-, und Milcherzeugung im landwirtschaftlichen Grossbetriebe**: für naturwissenschaftlich gebildete Landwirte verfasst. P. Parey, 1919.

FALEIRO, F. G. *et al.* **Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do cerrado visando a análises moleculares**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados,

2003. (Comunicado Técnico, 92). Disponível em:
<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/559088/1/comtec92.pdf>. Acesso em:
 27 fev. 2021.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.
The State of Food Insecurity in the World 2015. Rome: FAO, 2015. Disponível em:
<http://www.fao.org/publications/sofi/2015/en/>. Acesso em: 26 fev. 2021.

FERREIRA, M. E.; FALEIRO, F. G. Biotecnologia: avanços e aplicações no melhoramento genético vegetal. In: FALEIRO, F.G.; FARIAS NETO, A.L. (ed.). **Savanas: desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. Cap. 23, p. 765-792. Disponível em:
http://simposio.cpac.embrapa.br/simposio/projeto/palestras/capitulo_23.pdf. Acesso em 26 fev. 2021.

FUTINO, A. M.; SALLES FILHO, S. A biotecnologia na agricultura brasileira: a indústria de defensivos agrícolas e o controle biológico. **Agricultura em São Paulo**, São Paulo, v. 38, p. 45-88, 1991. Disponível em: <http://www.iea.agricultura.sp.gov.br/ftp/iea/publicacoes/asp2-91-te.pdf>. Acesso em: 26 fev. 2021.

GALLO, D. *et al.* **Entomologia Agrícola**. São Paulo: Ceres, 2002.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Brasília: panorama**. Rio de Janeiro, 2017a. Disponível em:
<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/df/brasilia/panorama>. Acesso em: 25 de fev. 2021.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Brasília: pesquisa e ranking**. Rio de Janeiro, 2017b. Disponível em:
<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/df/brasilia/pesquisa/23/25207?tipo=ranking>. Acesso em: 25 de fev. 2021.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produto Interno Bruto dos municípios**. Rio de Janeiro, [2019?]. Disponível em:
<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/df/brasilia/pesquisa/23/25207?tipo=ranking>. Acesso em: 25 de fev. 2021.

INMET – INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. **Normais climatológicas do Brasil**. Brasília: INMET, [2010]. Disponível em: <https://portal.inmet.gov.br/normais>. Acesso em: 25 fev. 2021.

ISAAA – INTERNATIONAL SERVICE FOR THE ACQUISITION OF AGRI-BIOTECH APPLICATIONS. **Biotech Crop Highlights in 2018**. Philippines, 2018. (Pocket K, n. 16) Disponível em:
[https://www.isaaa.org/resources/publications/pocketk/foldable/Pocket%20K16%20\(English\)%202019.pdf](https://www.isaaa.org/resources/publications/pocketk/foldable/Pocket%20K16%20(English)%202019.pdf). Acesso em: 26 fev. 2021.

JOBLING, S. A. *et al.* Production of a freeze–thaw-stable potato starch by antisense inhibition of three starch synthase genes. **Nature Biotechnology**, [S.l.], v.20, n.3, p.295-299, 2002. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nbt0302-295>. Acesso em: 26 fev. 2021.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, [S.l.], v. 1, n. 1, p. 147-155, 2005. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Ricardo-Machado/4/publication/228342037_A_conservacao_do_Cerrado_brasileiro/links/553a78670cf29b5ee4b64c2f/A-conservacao-do-Cerrado-brasileiro.pdf. Acesso em: 25 fev. 2021.

KRIMSKY, S.; WRUBEL, R. P. **Agricultural biotechnology and the environment: science, policy, and social issues**. Illinois: University of Illinois Press, 1996. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=2GHgacCUMFEC&oi=fnd&pg=PP13&dq=agricultural+biotechnology+and+the+environment+-+science,+policy&ots=5Dyt2PIP7d&sig=EtB45b6ENvJSCjYYMn1I5LKLhOo#v=onepage&q=TRH&f=false>. Acesso em: 26 fev. 2021.

LAURENTINO, E.; COSTA, J. N. M. **Descrição e caracterização biológica da broca-do-café (*Hypothenemus hampei*, Ferrari 1867) no Estado de Rondônia**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2004. (Documentos, 90). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/54341/1/doc90-brocadocafe.pdf>. Acesso em: 25 fev. 2021.

MALAJOVICH, M. A. **Biotecnologia 2011**. Rio de Janeiro: Edições da Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT, 2012. p. 39-50. Disponível em: https://www.academia.edu/download/60961128/Biotecnologia_201220191020-120575-1tx3ez4.pdf. Acesso em: 25 fev. 2021.

MARTINS, E. de S. *et al.* **Evolução geomorfológica do Distrito Federal**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2004. (Documentos, 122) Disponível em: https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/16150/1/ARTIGO_EvolucaoGeomorfologicaDistritoFederal.pdf Acesso em: 25 fev. 2021.

PNUD – PROGRAMA DAS NAÇÕES UNIDAS PARA O DESENVOLVIMENTO. **Ranking IDHM Municípios 2010**. [Nova Iorque]: PNUD, 2010. Disponível em: <https://www.br.undp.org/content/brazil/pt/home/idh0/rankings/idhm-municipios-2010.html>. Acesso em: 26 fev. 2021.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. Fitofisionomias do bioma Cerrado. *In*: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. de (Ed.). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. Cap.3, p.89-166. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/554094>. Acesso em: 23 fev. 2021.

RODRIGUES, J. C. M.; SANTOS GAMA, M. I. C.; ARAGÃO, F. J. L. Análise de plantas transgênicas por reação em cadeia da polimerase (PCR). *In*: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, VT de C. (ed.) **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, 1998. Cap. 10, p.181-198.

ROMANO, E.; LEAL-BERTIOLI, S. C. De M. Extração e quantificação de DNA de tecidos vegetais. *In*: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, VT de C. (ed.) **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, 2015. Cap. 9, p.165-180.

SAATH, K. C. de O.; FACHINELLO, A. L. Crescimento da demanda mundial de alimentos e restrições do fator terra no Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, Brasília, v. 56, n. 2, p. 195-212, 2018. Disponível em:

[https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-20032018000200195#:~:text=Segundo%20a%20FAO%20(2015)%2C,exigindo%20maior%20oferta%20de%20alimentos)

[20032018000200195#:~:text=Segundo%20a%20FAO%20\(2015\)%2C,exigindo%20maior%20oferta%20de%20alimentos](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-20032018000200195#:~:text=Segundo%20a%20FAO%20(2015)%2C,exigindo%20maior%20oferta%20de%20alimentos). Acesso em: 26 fev. 2021.

SALINET, L. H. **Avaliação fisiológica e agrônômica de soja geneticamente modificada para maior tolerância à seca**. 2009. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009. Disponível em:

http://www.esalq.usp.br/lepse/imgs/conteudo_thumb/mini/Avalia--o-fisiol-gica-e-agron-mica-de-soja-geneticamente-modificada-para-maior-toler-ncia---seca---Luana-Held-Salinet-.pdf.

Acesso em: 26 fev.2021.

SHINTANI, D.; DELLAPENNA, D. Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering. **Science**, Washington, v. 282, n. 5396, p. 2098-2100, 1998. Disponível em: <https://science.sciencemag.org/content/282/5396/2098.abstract>. Acesso em: 26 fev. 2021.

SILVEIRA, J. M. F. J.; BORGES, I. C.; BUAINAIN, A. M. Biotecnologia e agricultura: da ciência e tecnologia aos impactos da inovação. *São Paulo em Perspectiva*, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 101-114, 2005. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-88392005000200009&script=sci_arttext. Acesso em 26 fev. 2021.

SOUZA, Z.M.; ALVES, M. C. Propriedades químicas de um latossolo vermelho distrófico de cerrado sob diferentes usos e manejos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 27, n. 1, p. 133-139, 2003. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-06832003000100014&script=sci_arttext. Acesso em: 26 fev. 2021.

SOUZA, R. F. **Tecnologia BT: um avanço para o agronegócio**. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnólogo) – Curso Superior de Tecnologia em produção de Grãos, Unidade Universitária Campus Posse, Universidade Estadual de Goiás, Posse, 2016. Disponível em: <http://aprender.posse.ueg.br:8081/jspui/bitstream/123456789/105/1/TECNOLOGIA%20BT.pdf>. Acesso em 26 fev. 2021.

SUJII, E. R. *et al.* Controle de artrópodes-praga com insetos predadores. *In*: FONTES, E. M. G.; VALADARES-INGLIS, M. C. **Controle biológico de pragas da agricultura**. Brasília: Embrapa, 2020. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/212490/1/CBdocument.pdf>. Acesso em: 26 fev. 2021.

SUPLICY FILHO, N.; SAMPAIO, A. S.; MYAZAKI, I. [Comments on coccid *Orthezia praelonga* Douglas, 1891, important pest in Brazilian citriculture [silver cochineal]]. [Portuguese]. **Biologico**, 1983.

UN – UNITED NATIONS. Department of economic and social affairs. **World Population Prospects, the 2012 Revision**. Disponível em:

<https://www.un.org/en/development/desa/publications/world-population-prospects-the-2012-revision.html#:~:text=The%20report%2C%20World%20Population%20Prospects,to%201.8%20billion%20in%202050>. Acesso em: 26 fev. 2021.

USDA – UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **USDA Data Strategy**. Washington, D.C., 2020. Disponível em: <https://www.usda.gov/topics/data>. Acesso em: 27 fev. 2021.

VILLEN, R. A. Biotecnologia: histórico e tendências. **Revista de Graduação da Engenharia Química**, São Caetano do Sul, ano 5, n.10, 2002. Disponível em: <http://www.hottopos.com/regeq10/rafael.htm>. Acesso em: 26 fev. 2021.

YARA Brasil. **Deficiências nutricionais do café**. Porto Alegre, [2020]. Disponível em: <https://www.yarabrasil.com.br/nutricao-de-plantas/cafe/deficiencias-cafe/>. Acesso em: 25 fev. 2021.

YE, X. *et al.* Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. **Science**, Washington, v. 287, n. 5451, p. 303-305, 2000. Disponível em: <https://science.sciencemag.org/content/287/5451/303.abstract>. Acesso em: 26 fev. 2021.