

Parecer Consolidado

Processo: 01200.005161/2010-86

Data de Protocolo: 15/12/2010

Requerente: Embrapa Arroz e Feijão e Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

CQB: Embrapa Arroz e Feijão (CQB 08/96) e Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CQB 04/96)

Total de Páginas: 504

CNPJ: 00.348.003/0014-35 (Embrapa Arroz e Feijão) e 00.348.003/0038-02 (Embrapa Rec. Genéticos)

Endereço:

Embrapa Arroz e Feijão
Rodovia Goiânia - Nova Veneza, Km 12 - Zona Rural. Caixa Postal 179
Santo Antonio de Goiás/GO – 75375-000

Embrapa Recursos Genéticos
Parque Estação Biológica - Final da W5 Norte - Caixa Postal 02372
Brasília/DF – 70770-900

Presidente da CIBio:

Embrapa Arroz e Feijão: Josias Correia de Faria

Embrapa Recursos Genéticos: Eduardo Romano de Campos Pinto

Descrição do OGM: Feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) geneticamente modificado resistente ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro (*Bean golden mosaic virus*), evento de transformação Embrapa 5.1.

Extrato Prévio: 2614/2010

Classificação: Classe de Risco 01

I - Considerações gerais

O processo em análise refere-se à solicitação de liberação comercial de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) geneticamente modificado resistente à viroses conhecida como “mosaico dourado”, causada pelo *Bean golden mosaic virus* (BGMV), um vírus pertencente ao gênero *Begomovirus* da família *Geminiviridae*. Essa planta geneticamente modificada (PGM) foi gerada por transformação genética com um fragmento do genoma viral correspondente ao gene Rep, na forma de uma repetição invertida, de forma que sua expressão na planta ativa o mecanismo de silenciamento de RNA, degradando de forma altamente sequência-específica quaisquer RNAs que possuam sequência de bases idêntica ao RNA transgênico. Uma vez que a planta não possui nenhum RNA com tal sequência, o mecanismo atua apenas quando o



Parecer Relator – Comercialização

próprio vírus infecta a planta, produzindo RNAs mensageiros com a mesma sequência do transgene. Esses RNAs são prontamente degradados, impedindo o estabelecimento da infecção viral e tornando a planta resistente (na verdade **imune**) ao vírus. As plantas foram extensivamente testadas para a resistência ao BGMV em condições de casa-de-vegetação e de campo, sem que fosse detectada quebra de resistência.

O mosaico dourado do feijoeiro é uma das doenças mais importantes dessa cultura tão simbólica para o nosso país. A doença foi descrita em 1965 por Álvaro Santos Costa (IAC, Campinas), na época como de importância secundária. Ao longo da década de 1970, com a expansão da cultura da soja observada inicialmente nos estados do Paraná e São Paulo, a doença adquiriu grande importância e tornou-se um fator limitante para a produtividade da cultura. O aumento da incidência do mosaico dourado foi atribuído ao fato de que a soja é um excelente hospedeiro para o vetor do vírus, a mosca-branca *Bemisia tabaci*, sem entretanto sofrer danos com a sua colonização. Assim, os produtores de soja não adotam medidas para impedir o aumento populacional de *B. tabaci*. Após a colheita da soja as populações do inseto migram para o feijoeiro, no qual se estabelecem e para o qual transmitem o BGMV. O feijão “da seca” sempre foi o mais afetado pelo BGMV, pois o seu plantio coincide com a colheita da soja. Além disso, o clima menos chuvoso favorece o inseto, ao passo que a ocorrência de chuvas frequentes desfavorece seu desenvolvimento. O resultado final desse cenário foi a virtual eliminação de plantios de feijoeiro “da seca” no norte do Paraná, no estado de São Paulo e no Triângulo Mineiro, ou o plantio apenas sob irrigação por aspersão ou pivô central. No estado de São Paulo foram realizadas tentativas de zoneamento geográfico, a fim de isolar os plantios de feijoeiro de plantios de soja. Entretanto, essas tentativas tiveram sucesso limitado pois o inseto é capaz de migrar a distâncias superiores a 50 km, inviabilizando o zoneamento.

A busca de fontes naturais de resistência ao BGMV em germoplasma de *Phaseolus* foi realizada não apenas no Brasil mas também em diversos países da América Latina. Em particular, o banco de germoplasma de *Phaseolus* do Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), em Cali, Colômbia, foi objeto de estudos exaustivos com o objetivo de se identificarem tais fontes de resistência. Todas as tentativas nesse sentido fracassaram, e até o presente ainda não existem cultivares de feijoeiro efetivamente resistentes ao mosaico dourado.

Simultaneamente aos relatos de mosaico dourado que ocorreram no Brasil ao longo da década de 1970, uma doença de sintomas idênticos e transmitida pelo mesmo vetor (a mosca-branca *Bemisia tabaci*) foi relatada em diversos países da América Central e do Caribe. A caracterização dos agentes etiológicos demonstrou que dois vírus relacionados, porém claramente distintos, o BGMV e o *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV), eram os agentes causais do mosaico dourado no Brasil e na América Central/Caribe, respectivamente. Uma diferença importante entre esses dois vírus é que o BGMV é restrito ao floema em plantas de feijoeiro, enquanto o BGYMV invade os tecidos do mesófilo foliar. Como consequência, o BGYMV é transmitido por contato mecânico, enquanto o BGMV não é transmitido dessa forma. É altamente relevante mencionar que, 40 anos após os primeiros relatos de mosaico dourado no continente americano, o BGMV permanece restrito ao Brasil e Argentina, enquanto o BGYMV permanece restrito à América Central e Caribe. Assim, é

Parecer Relator – Comercialização

evidente que barreiras físicas de grande magnitude (neste caso, a Cordilheira dos Andes e a Floresta Amazônica) efetivamente impedem a migração de *B. tabaci*, mantendo assim a segregação desses dois vírus.

Atualmente, o manejo do mosaico dourado no Brasil envolve o plantio em épocas e, ou locais desfavoráveis para o inseto vetor (regiões de clima frio e, ou chuvoso), o manejo da irrigação e o controle químico de *B. tabaci* por meio da aplicação de inseticidas. Uma vez que nenhuma dessas medidas oferece um controle satisfatório da doença, a produtividade do feijoeiro no Brasil segue muito aquém de seu potencial. De fato, o feijoeiro é o único componente da dieta básica de nossa população que ainda necessita de importações para satisfazer a demanda do mercado interno.

Torna-se evidente, portanto, o impacto extremamente positivo que o plantio de um feijoeiro imune ao mosaico dourado trará a toda a cadeia produtiva do feijoeiro. A cultura poderá retornar a áreas nas quais atualmente não pode ser plantada, e enormes quantidades de inseticidas deixarão de ser aplicadas, uma vez que *B. tabaci*, na ausência do BGMV, não causa danos significativos ao feijoeiro. **Da mesma forma, é evidente que o plantio de tal PGM beneficiará não apenas o produtor, mas também o consumidor final,** uma vez que maior produtividade resultará em menores preços, e uma menor aplicação de inseticidas resultará em um produto de melhor qualidade e mais saudável. Ressalte-se que o feijoeiro resistente ao mosaico dourado foi produzido pela Embrapa, uma empresa do governo federal brasileiro. Assim, não têm fundamento quaisquer preocupações relacionadas à disponibilidade de sementes e outras questões normalmente associadas a PGM produzidas e comercializadas pelas grandes multinacionais do setor de sementes.

II - Características do feijoeiro GM resistente ao mosaico dourado (“Embrapa 5.1”)

O transgene foi gerado utilizando-se a estratégia de RNA interferente (RNAi, também conhecido como silenciamento de RNA ou silenciamento gênico pós-transcricional). A modificação genética foi realizada com a inserção do transgene via biobalística. A construção contém um fragmento do gene *Rep (AC1)* do BGMV posicionado nas direções senso e anti-senso e intercalado por um intron. Consequentemente, a expressão do transgene gera um RNA com uma sequência em repetição invertida, cuja estrutura secundária em forma de grampo gera um RNA de fita dupla (dsRNA). O dsRNA é reconhecido pela maquinaria celular para geração de pequenos fragmentos de RNA (siRNAs). Esses siRNAs são incorporados a um complexo ribonucleoproteico denominado RISC, e vão guiar esse complexo na busca por RNAs que possuem identidade de sequência com o siRNA. Encontrando-se esses RNAs, estes são degradados por uma RNase tipo III (a proteína AGO1), que também faz parte do complexo RISC. Uma vez que a construção gênica gera um dsRNA cujas sequências são derivadas do genoma do BGMV (gene *Rep*), os siRNAs gerados terão identidade com esse gene. Assim, uma vez iniciada a infecção viral, os mRNAs virais correspondentes ao gene *Rep* serão alvo do mecanismo de silenciamento, sendo degradados. Essa degradação impede a expressão da proteína viral Rep, essencial para a replicação do vírus, impedindo assim que o vírus estabeleça a infecção.

O cassete de expressão do RNA foi denominado *ΔAC1hpRNA*. Para seleção dos brotos geneticamente modificados originados de células apicais de embriões zigóticos de feijão foi inserido o gene *AtAhas* (também chamado de *csr1.2*), que é oriundo de *Arabidopsis thaliana* com seu promotor e região 3'-não traduzida (3'NTR) nativos. O gene *Atahas* codifica a subunidade maior da enzima aceto-hidroxiácido sintase (AtAHAS), também chamada de acetolactato sintase, que confere tolerância aos herbicidas do grupo químico das imidazolinonas. Embora o evento Embrapa 5.1 tenha cópias íntegras do gene *AtAhas*, verificou-se que as plantas não apresentam tolerância significativa aos herbicidas. A tolerância é suficiente apenas para a seleção *in vitro* de brotações geradas a partir de células transformadas, originadas a partir do meristema apical de embriões de feijoeiro.

O vetor foi denominado pBGMVRNAiAHAS, incluindo as seguintes regiões: ahas5', correspondente ao promotor do gene acetolactato sintase de *Arabidopsis thaliana* (*AtAhas*); ahas, correspondente à região codificadora do gene *AtAhas*; ahas3', correspondente à região terminadora da transcrição do gene *AtAhas*; 35SCaMV, correspondente ao promotor do RNA 35S do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV); rep, correspondente a um fragmento de 411 pares de bases do gene *Rep* (*ACI*) do *Bean golden mosaic virus* (BGMV); pdk, correspondente ao intron do gene piruvato ortofosfato diquinase de *Flaveria trinervia*; ocs3', correspondente à região terminadora da transcrição do gene octopina sintase (*Ocs*) de *Agrobacterium tumefaciens*; bla, correspondente ao gene β-lactamase (*Bla*) de *Escherichia coli*. Para transformação genética pelo processo de biobalística, esse vetor foi previamente clivado com a enzima *Fsp* I.

Os dados moleculares e genéticos indicam que a construção gênica foi inserida em um único locus e apresentou-se estável por várias gerações de autofecundação. Não foram identificadas sequências funcionais do gene *Bla* (que codifica resistência a β-lactâmicos como a ampicilina). Tal fato decorre da digestão com a enzima de restrição *Fsp*I, já que o gene *Bla* possui dois sítios de restrição para essa enzima, o que levou à inativação do gene.

III - Aspectos relacionados à durabilidade da resistência

Em relação à durabilidade da resistência, a estratégia é interessante uma vez que é baseada no silenciamento de um gene viral, e não na expressão de alguma proteína que ative um mecanismo de resistência ou interfira negativamente com a replicação viral. A produção de siRNAs, que possuem 22-24 nucleotídeos, assegura a especificidade do mecanismo, uma vez que não existem na planta sequências com identidade aos siRNAs. Assim, em uma planta sadia (não infectada), nenhuma alteração metabólica é observada. Além disso, a resistência será durável, pois para que ocorra a quebra devem ocorrer diversas mutações em um gene essencial para o vírus de forma que não ocorra mais o reconhecimento entre o siRNA e o mRNA viral. A probabilidade dessas mutações ocorrerem é tão pequena que pode ser considerada impossível. Isso tem sido comprovado na prática com o cultivo de mamoeiro GM resistente ao PRSV no Havaí desde 1998 (ou seja, há 13 anos), sem a menor evidência de quebra de resistência. No caso específico deste pedido de liberação comercial, o feijoeiro Embrapa 5.1 foi cultivado em três regiões brasileiras (Santo Antônio de Goiás, GO; Londrina, PR; e Sete Lagoas, MG) durante os anos de 2008 e 2009, também sem a menor evidência de quebra de resistência. De fato, a estratégia de RNAi é tão eficiente e específica que todas as

demais estratégias de obtenção de plantas GM resistentes a vírus foram abandonadas, e todos os casos relatados na literatura nos últimos 10 anos utilizam o RNAi.

IV - Aspectos relacionados à biossegurança

Do ponto de vista de biossegurança, o feijoeiro Embrapa 5.1 não expressa nenhuma proteína viral, e nem mesmo um RNA viral. O dsRNA contido na construção gênica corresponde apenas a um pequeno fragmento de um RNA viral, e esse dsRNA nem mesmo acumula na célula, pois é imediatamente reconhecido pela maquinaria de silenciamento e processado, gerando os siRNAs. Assim, a única molécula que acumula na planta é o siRNA, além é claro da proteína utilizada como marcador para seleção durante o processo de regeneração (no caso do feijoeiro Embrapa 5.1, a proteína AtAHAS). Nesse sentido, todos os testes realizados indicam que não há problemas relacionados a segurança alimentar, pois não existem sequências com identidade ao siRNA em humanos, e a proteína AtAHAS, além de expressa em baixa quantidade, não possui alergenicidade e é 83% idêntica à proteína homóloga do feijoeiro. Da mesma forma, não há problemas relacionados ao fluxo gênico, especialmente quando se considera que o vírus infecta naturalmente o feijoeiro, e portanto não se cria nenhuma situação nova com a expressão do dsRNA de origem viral na planta GM. Por fim, não há efeito em organismos não-alvo, o que foi comprovado por testes realizados extensamente com o feijoeiro Embrapa 5.1.

Os ensaios agrônômicos foram realizados em Santo Antonio de Goiás (GO), Londrina (PR) e Sete Lagoas (MG), nos quais foram avaliados: produção em g/parcela de 25m²; porcentagem de germinação; altura inicial das plântulas; largura máxima das folhas primárias; comprimento máximo das folhas primárias; número de sementes por vagem; massa de 100 sementes; comprimento das vagens; comprimento das sementes; e largura e espessura das sementes. Não houve diferenças estatísticas significativas ao nível de 5% de probabilidade entre a variedade genitora Olathe e o evento Embrapa 5.1, e quando houve não se mostraram consistentes. Algumas diferenças ocorreram entre o evento GM e a variedade genitora no ano de 2008 no comprimento máx. das folhas primárias, n° de sementes por vagem, comprimento das sementes e n° de grãos por vagem, porém não se mantiveram no ano seguinte em todos os locais. A empresa ressalta que mesmo que fossem consistentes, tais diferenças seriam diluídas pois o evento Embrapa 5.1 será utilizado apenas como doador do transgene para cultivares comerciais de feijoeiro, visto que no país feijões da classe pinto não são comercializados.

A avaliação da herança genética dos genes inseridos mostrou uma segregação 3:1 para a resistência ao BGMV. As plantas segregantes apresentaram fenótipo normal em todos os casos analisados, ou seja, nos cruzamentos do evento Embrapa 5.1 com as cultivares BRS Pontal e Pérola. Efeitos pleiotrópicos e epistáticos não foram constatados nos ensaios com o evento modificado resultante da inserção dos genes *AtAhas* e *ΔAC1hpRNA*.

A segurança da transformação foi avaliada pela escolha de doadores conhecidos, como *Arabidopsis thaliana* e próprio BGMV, que teve seu gene *rep* (*AC1*) desenhado para formar um grampo com sequências de RNA de dupla fita (dsRNA) e interferir na expressão do gene *Rep* viral.

Animais alimentados com feijões genitor e GM não apresentaram diferenças nutricionais, imunológicas e histológicas, caracterizando-se dessa forma a inocuidade da transformação realizada e a segurança do emprego do feijão Embrapa 5.1 como alimento destinado a humanos. Foram descartados também possíveis efeitos alergênicos pela introdução dos genes escolhidos, seja pelo histórico de uso deles em diversas transformações já aprovadas em diversos países, seja pela análise *in silico* dos peptídeos expressos (os já mencionados 83% de identidade entre a proteína AtAHAS e a proteína homóloga do feijoeiro).

Os autores dos estudos que culminaram com a presente solicitação de liberação comercial atenderam plenamente, em diversos níveis, às exigências de ensaios de biossegurança padronizados internacionalmente para a correta caracterização de inocuidade do transgene.

V - Considerações sobre algumas das manifestações ocorridas na audiência pública

Aqui serão tecidas considerações apenas sobre as manifestações desfavoráveis ao pedido de liberação comercial, uma vez que as manifestações favoráveis abordaram questões que já foram discutidas neste parecer consolidado.

Sra. Ana Carolina Brolo. A representante da Terra de Direitos apresentou uma série de argumentações que carecem de qualquer respaldo científico. Trata-se obviamente de um posicionamento político, mas que de qualquer forma deve ser respeitado como tal. Nesse sentido, o direito dos produtores de não plantarem o feijoeiro GM deve ser respeitado, assegurando-se a disponibilidade de sementes de cultivares não-GM e adotando-se as medidas necessárias para que se evitem a mistura de sementes GM e não GM.

Sr. Werner Fuchs (Conselheiro Suplente do Conselho Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional, CONSEA). Também apresentou um posicionamento político, caracterizado pela afirmação de que “alimentação saudável é aquela resultante do cultivo agroecológico ou orgânico”. Este parecer não tem o objetivo de contra-argumentar um posicionamento de natureza tão reducionista. Cita-se apenas a frase do autor norte-americano Michael Polland, no livro “In Defense of Food”: “Não se deve considerar os nutrientes fora do contexto dos alimentos; os alimentos, fora do contexto da dieta; e a dieta, fora do contexto do estilo de vida.”

Dr. Paulo Kageyama (ex-membro da CTNBio). A manifestação do Dr. Kageyama concentrou-se em questões relacionadas ao fluxo gênico. Nesse sentido, deve ser considerado que o feijoeiro é uma planta autógama ou seja, de polinização fechada. Entretanto, a polinização aberta pode, teoricamente, ocorrer a uma taxa extremamente baixa. O fluxo gênico para cultivos comerciais, não-GM de feijoeiro deve ser evitado com a adoção de medidas de isolamento (facilitadas pela natureza autógama do feijoeiro, já mencionada). O fluxo gênico para populações selvagens não deve resultar na fixação do transgene, pois essas populações não se encontram sob uma pressão de seleção para adquirirem resistência ao mosaico dourado.

Sr. Gabriel Fernandes (AS-PTA). A manifestação do representante da AS-PTA demonstra desconhecimento do processo de transformação genética. A alegada “baixa eficiência na

transformação do feijão” não tem o menor fundamento. Em primeiro lugar, é fato totalmente estabelecido que a incorporação do transgene ao genoma da planta ocorre de forma aleatória (nesse sentido, é importante ressaltar que os autores do pedido de liberação comercial sequenciaram mais de 50.000 nucleotídeos flanqueando o local de inserção). Somado ao fato de que mais de 95% do genoma do feijoeiro corresponde a regiões de heterocromatina, ou seja, regiões não transcritas, é totalmente esperado que a maioria das linhagens transgênicas regeneradas sejam suscetíveis: o transgene, muito provavelmente, foi incorporado a uma região de heterocromatina. Quando os autores do pedido de liberação comercial solicitam sigilo sobre esse fato alegando possibilidade de patenteamento, estão apenas se prevenindo da possibilidade remota de que algumas das linhagens tenham tido o transgene incorporado em regiões efetivamente expressas, e por algum mecanismo desconhecido (que, caso caracterizado, pode vir a ser objeto de patente), tenham tido a expressão inibida. Por fim, ressalte-se que em todos (**absolutamente todos**) os casos de regeneração de plantas transgênicas, a maioria das linhagens obtidas não expressa o transgene. A manifestação também menciona variação de equivalência substancial. Entretanto as variações observadas estão totalmente dentro do esperado em termos estatísticos. Novamente fica evidente o desconhecimento do autor da manifestação, dessa vez relacionado à estatística experimental básica.

Dr. José Maria Ferraz (Membro da CTNBio, representando a Associação Brasileira de Agroecologia, ABA). A manifestação do Dr. Ferraz não se relaciona ao mérito do processo.

VI - Considerações finais

O pedido de liberação comercial do feijoeiro GM resistente ao mosaico dourado representa, sob vários aspectos, um marco na biotecnologia agrícola brasileira e mundial.

Em primeiro lugar, este é o primeiro pedido de liberação comercial no Brasil de uma planta GM distinta da soja, do milho e do algodão. A soja e o milho são utilizados basicamente para alimentação animal, e o milho para a produção de fibra não alimentar (obviamente uma pequena parcela da produção dessas três culturas destina-se à produção de óleo para consumo humano, o qual entretanto não possui DNA em sua composição química). O feijoeiro, por outro lado, é uma cultura totalmente destinada ao consumo humano, constituindo um dos itens básicos da dieta da maioria da população brasileira. Portanto, estamos diante do primeiro pedido de liberação comercial de um alimento básico consumido em grande quantidade por uma parcela significativa da população brasileira.

Em segundo lugar, trata-se do primeiro pedido de liberação comercial no Brasil de uma planta resistente a uma virose. Todas as plantas GM atualmente em cultivo comercial no Brasil apresentam resistência a herbicidas ou a insetos. Nesse sentido, é imperativo que se reconheça que, no caso do feijoeiro GM, seu plantio irá, sem a menor sombra de dúvida, acarretar em um menor uso de agroquímicos, uma vez que estes são usados em grande quantidade na cultura do feijoeiro para o controle da mosca-branca *Bemisia tabaci*, o inseto vetor do mosaico dourado. O plantio de cultivares GM resistentes eliminará a necessidade de controle químico desse inseto, acarretando na redução ou mesmo eliminação total da aplicação desses inseticidas.

Em terceiro lugar, trata-se do primeiro pedido de liberação comercial realizado por uma empresa não apenas brasileira, mas do governo federal. Assim, todas as questões de mercado frequentemente levantadas contra as multinacionais produtoras de sementes não se aplicam.

Por fim, trata-se do primeiro pedido de liberação comercial no mundo de uma planta resistente a um begomovírus/geminivírus. Diversos grupos de pesquisa baseados em países desenvolvidos (EUA, Espanha, Itália, Israel, dentro outros) tentaram, sem sucesso, desenvolver plantas GM resistentes a esses importantes patógenos. Assim, o plantio comercial do feijoeiro GM resistentes ao mosaico dourado representará um avanço científico de alto impacto.

A estratégia de geração de plantas GM resistentes a vírus aqui empregada (o RNAi) é perfeitamente segura do ponto de vista de biossegurança. Além disso, gera plantas com elevados níveis de resistência, e essa resistência é durável, com baixíssima probabilidade de quebra.

Em conclusão, **todos os aspectos desse processo apontam para a segurança do feijoeiro “Embrapa 5.1”, e para os grandes benefícios econômicos, sociais, ambientais e científicos que seu cultivo deverá trazer ao país.** O parecer, portanto, é favorável à liberação comercial do feijoeiro “Embrapa 5.1” resistente ao mosaico dourado causado pelo BGMV.

Este parecer foi preparado com base não apenas nos pareceres do três relatores (todos favoráveis ao pedido de liberação comercial), mas também informações científicas disponíveis na literatura e manifestações por ocasião da audiência pública realizada em 17 de maio de 2011, no auditório da Embrapa Sede, em Brasília DF (essas manifestações estão disponíveis na página da CTNBio na internet, <http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/4581.html>).

Relatores:

Francisco Murilo Zerbini: parecer favorável à solicitação (*)

Fávio Finardi: parecer favorável à solicitação

Paulo Paes Andrade: parecer favorável à solicitação

Brasília, 09 de agosto de 2011

Francisco Murilo Zerbine
Membro da CTNBio
Relator ()*

(*) Relator do Parecer Consolidado

VII – Literatura Consultada

Alan JJ, Moh CC (1966) Determinación del porcentaje de cruzamiento natural en el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en Alajuela, Costa Rica. Turrialba 16:156-158.

Alves BJR, Baêta AM, Alves JV (1999) Protocolo da Embrapa Agrobiologia para análise de nitrogênio em adubos orgânicos, solo e tecidos. Embrapa Agrobiologia, Seropédica.

Aragao FJ, de Sa MF, Almeida ER, Gander ES, Rech EL. Particle bombardment-mediated transient expression of a Brazil nut methionine-rich albumin in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant Mol Biol. 1992 Oct;20(2):357-9. PubMed PMID: 1391783.

Abud S, de Souza PI, Vianna GR, Leonardecz E, Moreira CT, Faleiro FG, Júnior JN, Monteiro PM, Rech EL, Aragão FJ. Gene flow from transgenic to nontransgenic soybean plants in the Cerrado region of Brazil. Genet Mol Res. 2007 Jun 30;6(2):445-52. PubMed PMID: 17952868.

Andrade-Aguilar JA, Jackson MT (1988) Attempts at interspecific hybridization between *Phaseolus vulgaris* L. and *P. acutifolius* A. Gray using embryo rescue. Plant Breeding 101:173-180.

Antunes IF, Costa JGC, Oliveira EA (1973) Determinação da porcentagem de cruzamentos naturais em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) no município de Pelotas, RS, Brasil. IPEAS, Pelotas.

Barampama Z, Simard RE. Effects of soaking, cooking and fermentation on composition, in-vitro starch digestibility and nutritive value of common beans. Plant Foods Hum Nutr. 1995 Dec;48(4):349-65. PubMed PMID: 8882373.

Birmingham A, Anderson EM, Reynolds A, Ilsley-Tyree D, Leake D, Fedorov Y, Baskerville S, Maksimova E, Robinson K, Karpilow J, Marshall WS, Khvorova A. 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. Nat Methods. 2006 Mar;3(3):199-204. Erratum in: Nat Methods. 2007 Jun;4(6):533. PubMed PMID: 16489337.

Bonfim K, Faria JC, Nogueira EO, Mendes EA, Aragão FJ. RNAi-mediated resistance to Bean golden mosaic virus in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). Mol Plant Microbe Interact. 2007 Jun;20(6):717-26. PubMed PMID: 17555279.

Brodersen P, Voinnet O. The diversity of RNA silencing pathways in plants. Trends Genet. 2006 May;22(5):268-80. Epub 2006 Mar 29. Review. PubMed PMID: 16567016.

Capalbo DMF, Simon MF, Nodari RO, Valle S, Santos RF, Coradin L, Duarte JO, Miranda JE, Dias EPF, Le Quang Quyen, Underwood E, Nelson KC (2006) Consideration of problem formulation and option assessment for Bt cotton in Brazil. In: Hilbeck A, Andow DA, Fontes EMG (ed) Environmental risk assessment of genetically modified organisms: methodologies for assessing Bt cotton in Brazil. CABI Publications, Wallingford, pp 67-92.

Ministério da Ciência e Tecnologia
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
CTNBio
Rubrica
478

Chellappan P, Vanitharani R, Pita J, Fauquet CM. Short interfering RNA accumulation correlates with host recovery in DNA virus-infected hosts, and gene silencing targets specific viral sequences. *J Virol.* 2004 Jul;78(14):7465-77.

Erratum in: *J Virol.* 2006 Jan;80(2):1064. Pita, Justin [added]. PubMed PMID: 15220420; PubMed Central PMCID: PMC434130.

Faria JC, Carneiro GES, Aragão FJL (2010) Gene flow from transgenic common beans expressing the *bar* gene. *GM Crops* 2:1-5.

Faria JC, Gilbertson RL, Hanson SF, Morales FJ, Ahlquist P, Loniello AO, Maxwell DP (1994) Bean golden mosaic geminivirus type II isolates from the Dominican Republic and Guatemala: nucleotide sequences, infectious pseudorecombinants, and phylogenetic relationships. *Phytopathology* 84:321-329.

Ding SW. RNA silencing. *Curr Opin Biotechnol.* 2000 Apr;11(2):152-6. Review. PubMed PMID: 10753772

Faria JC, Maxwell DP. Variability in Geminivirus Isolates Associated with *Phaseolus* spp. in Brazil. *Phytopathology.* 1999 Mar;89(3):262-8. PubMed PMID: 18944768.

Fütterer J, Gordon K, Sanfaçon H, Bonneville JM, Hohn T. Positive and negative control of translation by the leader sequence of cauliflower mosaic virus pregenomic 35S RNA. *EMBO J.* 1990 Jun;9(6):1697-707. PubMed PMID: 2347303; PubMed Central PMCID: PMC551872.

Gong W, Ren Y, Zhou H, Wang Y, Kang S, Li T. siDRM: an effective and generally applicable online siRNA design tool. *Bioinformatics.* 2008 Oct 15;24(20):2405-6. Epub 2008 Aug 20. PubMed PMID: 18718944.

Hileman RE, Silvanovich A, Goodman RE, Rice EA, Holleschak G, Astwood JD, Hefle SL. Bioinformatic methods for allergenicity assessment using a comprehensive allergen database. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002 Aug;128(4):280-91. PubMed PMID: 12218366.

Ivanciuc O, Schein CH, Braun W. SDAP: database and computational tools for allergenic proteins. *Nucleic Acids Res.* 2003 Jan 1;31(1):359-62. PubMed PMID: 12520022; PubMed Central PMCID: PMC165457.

Ivanciuc O, Schein CH, Braun W. Data mining of sequences and 3D structures of allergenic proteins. *Bioinformatics.* 2002 Oct;18(10):1358-64. PubMed PMID: 12376380.

Ivo NL, Nascimento CP, Vieira LS, Campos FA, Aragão FJ. Biolistic-mediated genetic transformation of cowpea (*Vigna unguiculata*) and stable Mendelian inheritance of transgenes. *Plant Cell Rep.* 2008 Sep;27(9):1475-83. Epub 2008 Jun 28. PubMed PMID: 18587583.

Levenkova N, Gu Q, Rux JJ. Gene specific siRNA selector. *Bioinformatics*. 2004 12;20(3):430-2. Epub 2004 Jan 22. PubMed PMID: 14960474.

Kaldorf M, Fladung M, Muhs HJ, Buscot F (2002) Mycorrhizal colonization of transgenic aspen in a field trial. *Planta* 214:653-660.

Kay E, Chabrilat G, Vogel TM, Simoneti P (2003) Intergeneric transfer of chromosomal and conjugative plasmid genes between *Ralstonia solanacearum* and *Acinetobacter* sp. BD413. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16:74–82.

Kay E, Vogel TM, Bertolla F, Nalin R, Simoneti P (2002) In situ transfer of antibiotic resistance genes from transgenic (transplastomic) tobacco plants to bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 68:3345–3351.

Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD (2003) Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115:209-216.

Koske RE, Gemma JN (1989) A modified procedure for staining roots to detect V-A mycorrhizas. *Mycological Research* 92:486-488.

Levenkova N, Gu G, Rux JJ (2004) Gene specific siRNA selector. *Bioinformatics* 20:430-432

Malik PS, Kumar V, Bagewadi B, Mukherjee SK. Interaction between coat protein and replication initiation protein of Mung bean yellow mosaic India virus might lead to control of viral DNA replication. *Virology*. 2005 Jul 5;337(2):273-83. PubMed PMID: 15913696.

Nunes AC, Vianna GR, Cuneo F, Amaya-Farfán J, de Capdeville G, Rech EL, Aragão FJ. RNAi-mediated silencing of the myo-inositol-1-phosphate synthase gene (GmMIPS1) in transgenic soybean inhibited seed development and reduced phytate content. *Planta*. 2006 Jun;224(1):125-32. Epub 2006 Jan 4. PubMed PMID: 16395584.

Pariza MW, Cook M. Determining the safety of enzymes used in animal feed. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2010 Apr;56(3):332-42. Epub 2009 Oct 30. PubMed PMID: 19879914.

Rech EL, Vianna GR, Aragão FJ. High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. *Nat Protoc*. 2008;3(3):410-8. PubMed PMID: 18323812.

Romano E, Soares A, Proite K, Neiva S, Grossi M, Faria JC, Rech EL, Aragão FJ. Transgene elimination in genetically modified dry bean and soybean lines. *Genet Mol Res*. 2005 Jun 30;4(2):177-84. PubMed PMID: 16110439.

Soares A, Romano E, Neiva S, De Capdeville G, Vianna GR, Rech EL, Aragão FJ. Inheritance of a recessive transgene-associated character controlling albinism in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Biol (Stuttg)*. 2005 Jan;7(1):104-7. PubMed PMID: 15666217.

Vanitharani R, Chellappan P, Fauquet CM. Short interfering RNA-mediated interference of gene expression and viral DNA accumulation in cultured plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Aug 5;100(16):9632-6. Epub 2003 Jul 28. PubMed PMID: 12886005; PubMed Central PMCID: PMC170969.

Vanitharani R, Chellappan P, Fauquet CM. Geminiviruses and RNA silencing. *Trends Plant Sci*. 2005 Mar;10(3):144-51. Review. PubMed PMID: 15749473.

Vianna GR, Aragão FJ, Rech EL. A minimal DNA cassette as a vector for genetic transformation of soybean (*Glycine max*). *Genet Mol Res*. 2011 Mar 1;10(1):382-90. PubMed PMID: 21365554