



Ministério da Ciência e Tecnologia - MCT
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio
Secretaria Executiva
Parecer Relator – Comercialização



Parecer Técnico

ESSE PROCESSO POSSUI INFORMAÇÕES CONFIDENCIAIS

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

1) Resumo do Processo:

A requerente solicita confidencialidade para detalhes da estrutura dos transgenes no evento Embrapa 5.1. O pedido fundamenta-se no fato de que foram gerados 22 eventos e apenas dois apresentaram o fenótipo desejado (resistência ao geminivírus). Os fatos moleculares para tal

ocorrido ainda não foram desvendados. A requerente acredita que esses mecanismos poderão ser objeto de proteção intelectual, sobretudo em tecnologia para resistências a víruses.

A requerente produziu uma linhagem de feijoeiro geneticamente modificado denominado Embrapa 5.1.

O transgene foi gerado através da estratégia de RNA interferente (RNAi) que conferiu alta resistência ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro (*Bean golden mosaic virus* - BGMV). O OGM foi obtido pela inserção do transgene com a utilização de biobalística. O constructo contém um fragmento do gene *rep* (*ACI*) do BGMV, posicionado em senso e antisenso (intercalados por um intron). Esse RNA foi desenhado para formar um grampo com seqüências de RNA de dupla fita (dsRNA) que são reconhecidas pela maquinaria celular para geração de pequenos fragmentos de RNA (siRNA) que interferem na expressão do gene *rep* viral. Como consequência da falta de expressão do gene *rep*, a replicação viral é comprometida e as plantas se tornam resistentes ao vírus. O Cassete de expressão do RNA foi denominado de $\Delta ACIhpRNA$. Para seleção dos brotos geneticamente modificados originados de células apicais de embriões zigóticos de feijão foi inserido o gene *AtAhas* (também chamado de *csr1.2*). *AtAhas* é oriundo de *Arabidopsis thaliana* com seu promotor e região não traduzida 3'(3'UTR) nativos. O gene *Atahas* codifica a subunidade maior da enzima aceto-hidroxiácido sintase (AtAHAS), também chamada de acetolactato sintase, que confere tolerância aos herbicidas do grupo químico das imidazolinonas. Embora o evento Embrapa 5.1 tenha cópias íntegras do gene *AtAhas*, verificou-se que as plantas não têm significativa tolerância aos herbicidas. A tolerância é suficiente apenas para que permita a seleção *in vitro* de brotações geradas a partir de células transformadas, originadas a partir do meristema apical de embriões de feijoeiro.

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

Os dados moleculares e genéticos indicaram que o constructo foi inserido em um único locus e apresentou-se estáveis por várias gerações de autofecundação. Não foram identificadas seqüências funcionais do gene *bla* (que cofifica resistência a beta-lactâmicos como a ampicilina – marcador). Tal fato decorre da digestão com a enzima de restrição *FspI*, já que o gene *bla* possui dois sítios de restrição para essa enzima o que levou a inativação do gene.

A presente tecnologia destina-se a conferir resistência ao mosaico dourado do feijoeiro é causado pelo BGMV que é transmitido por moscas brancas (*Bemisia tabaci*, Genn.) presentes em todas as regiões do país onde se cultiva o feijoeiro. Os sintomas da doença são mosaico nas folhas, nanismo e/ou superbrotação. Além disso, as plantas infectadas precocemente tendem a alongar o ciclo vegetativo, fato relacionado ao excessivo abortamento de flores. As vagens, quando se desenvolvem, mostram-se deformadas e de tamanho reduzidos, com as sementes subdesenvolvidas, afetando a qualidade final dos grãos e o seu valor comercial.

2) Fundamentação técnica da Decisão do Relator

O feijoeiro GM evento 5.1 foi obtido por meio de transformação via biobalística utilizando uma construção gênica que gera um RNA de fita dupla (dsRNA), o qual é alvo do mecanismo de silenciamento de RNA gerando pequenos RNAs interferentes (siRNAs). Esses siRNAs são incorporados em 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 AC1), os siRNAs gerados terão identidade com esse gene. Assim, uma vez iniciada a infecção viral, os mRNAs virais correspondentes ao gene AC1 serão alvo do mecanismo de silenciamento, sendo degradados. Essa degradação impedirá a expressão da proteína viral Rep, essencial para a replicação do vírus. A planta, portanto, torna-se resistente (ou mesmo imune) ao vírus.

Essa estratégia possui diversas características que a tornam extremamente interessante do ponto de vista da obtenção de plantas resistentes, e também extremamente segura do ponto de vista de biossegurança.

Em relação à obtenção de plantas resistentes, 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 Haváí 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.

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

Parecer Relator – Comercialização

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.

3) Produto da Expressão:

- Pequenos siRNA
- Baixos níveis de AHAS

4) Área de Restrição Ambiental:

Conforme estabelecido no art. 1º da Lei 11.460, de 21 de março de 2007, “ficam vedados a pesquisa e o cultivo de organismos geneticamente modificados nas terras indígenas e áreas de unidades de conservação.

5) Nível Biossegurança: nível de biossegurança 1.

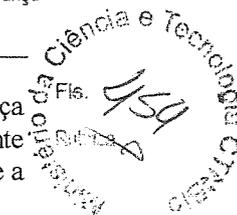
6) Parecer final do relator:

13/05/2011

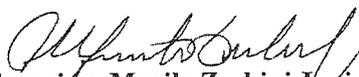
O processo 01200005161/2010-86 trata de pedido de liberação comercial de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) resistente ao mosaico dourado do feijoeiro por meio de RNAi ou silenciamento de RNA. A estratégia, amplamente conhecida, de geração de plantas GM resistentes a vírus, é perfeitamente segura 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. Ressalte-se que o mosaico dourado do feijoeiro é uma doença extremamente importante na cultura, responsável por toda uma mudança na cadeia produtiva do feijoeiro ao longo das décadas de 1970 e 1980. Até hoje não existem cultivares de feijoeiro com resistência natural a essa doença, e depois de mais de 30 anos de pesquisas nesse sentido, é muito provável que de fato não exista essa resistência em germoplasma de *Phaseolus*. Assim, o controle do mosaico dourado é baseado em escape (plantio em épocas/locais pouco favoráveis à doença) e no uso de quantidades maciças de inseticida para o controle do inseto vetor, a mosca-branca *Bemisia tabaci*. Devido em grande parte às perdas e limitações à cultura impostas pelo mosaico dourado, o feijoeiro é o único componente da dieta alimentar básica do brasileiro que ainda é produzido em quantidade insuficiente para atender a demanda. A disponibilidade de plantas resistentes a essa doença representa portanto um avanço científico (outros grupos de pesquisa nos EUA e Europa não tem obtido sucesso na geração de plantas GM resistentes a geminivírus) e tecnológico, que deverá aumentar significativamente a produção brasileira de feijão, eliminando as importações, além de diminuir drasticamente a quantidade de inseticidas utilizados na cultura, com amplos benefícios ambientais e sociais.



Ministério da Ciência e Tecnologia - MCT
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio
Secretaria Executiva
Parecer Relator – Comercialização



Conclui-se que, atendidas as condições descritas no protocolo e as medidas de biossegurança contidas no processo, o plantio comercial do feijoeiro Embrapa 5.1 não é potencialmente causador de significativa degradação do meio ambiente ou saúde humana, recomendando-se a aprovação do pedido de liberação comercial.


Francisco Murilo Zerbini Junior
Relator - Membro da CTNBio

Assessor Técnico da CTNBio: Gutemberg D. Sousa

