

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 viroses.

A requerente produziu uma linhagem de feijoeiro geneticamente modificado denominado Embrapa 5.1. A seguir são reproduzidas algumas informações constantes do processo.

Parecer Relator – Comercialização

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*), que 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, incluindo as seguintes regiões: ahas5' contém o promotor do gene da acetolactato sintase de *A. thaliana*; ahas codificante para a acetolactato sintase de *A. thaliana*; ahas3' da acetolactato sintase *A. thaliana*; 35ScaMV promotor do RNA 35S do vírus mosaico da couve-flor; rep fragmento de 411 pb do gene *rep* (*ACI*) do vírus do mosaico dourado do feijoeiro; 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 β -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 estável por várias gerações de autofecundação. Não foram identificadas seqüências funcionais do gene *bla* (que codifica resistência a β -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 vírus BGMV (*Bean golden mosaic virus*) 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 superbrotamento. 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 processo contém a caracterização molecular do inserto com mapa detalhado do vetor pBGMVRNAiAHAS empregado na transformação do feijão da var. Olathe em evento Embrapa 5.1. Afirma a empresa que este vetor possui 12.429 pb e que foram sequenciados

Ministério da Ciência e Tecnologia
CTNBio
nº Fis. 450
Secretaria Executiva

50.030 pb correspondendo ao locus de integração bem como que nas análises realizadas por Southern blot de várias gerações e após cruzamentos, PCR para amplificação de sequências específicas, e fenótipo de resistência ao vírus BGMV que se mostrou estável por diversas gerações, comprovam a eficiência da transformação, embora a resistência tenha sido comprovada em apenas dois eventos.

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, nº de sementes por vagem, comprimento das sementes e nº 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, sendo que as plantas segregantes apresentaram fenótipo normal em todos os casos analisados, ou seja nos cruzamentos do evento Embrapa 5.1 com 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* (*ACI*) desenhado para formar um grampo com sequencias de RNA de dupla fita (dsRNA) e interferir na expressão do *rep* viral. A segurança do feijão GM foi testada com alimento para animais e humanos através de composição química para estabelecer a Equivalência Substancial em amostras coletadas nos diversos ensaios realizados nos três canteiros experimentais.

Animais alimentados com feijões genitor e GM não apresentaram diferenças nutricionais, imunológicas e histológicas, caracterizado 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 autores dos estudos que culminaram com a presente solicitação de liberação comercial atenderam plenamente, em diversos níveis, as exigências de ensaios de biossegurança padronizados internacionalmente para a correta caracterização de inocuidade do transgene. Vale mencionar que novos testes poderão ser incorporados aos ora apresentados sem, no entanto, invalidar os resultados da presente petição ou alterar o entendimento de segurança do evento Embrapa 5.1.

A requerente apresenta no Anexo I o detalhamento da metodologia empregada em todas as partes referidas no processo evento elite Embrapa 5.1 em relação às amostras controle convencionais da var. Olathe: planejamento e desenvolvimento do feijoeiro

Parecer Relator – Comercialização

geneticamente modificado; caracterização fenotípica e avaliação agrônômica das plantas modificadas; composição química e nutricional dos feijões GM; ensaios nutricionais; infestação programada com moscas brancas (*Bemisia tabaci*, Genn.); e avaliações de impacto ambiental sobre insetos, microrganismos do solo, nutrientes e atividade enzimática, entre outras. No Anexo II está pormenorizado o mapa genético com a sequência de integração do evento Embrapa 5.1, que por si justifica a solicitação de informação confidencial.

2.a) Considerações específicas sobre a avaliação de risco ambiental

Na avaliação de risco ambiental é essencial a clara formulação do problema representado pela liberação do feijoeiro transgênico, seguida de uma mensuração de riscos e terminando na conclusão sobre a segurança do evento para o meio ambiente. Todas estas etapas estão minuciosamente detalhadas em um grande número de considerações apoiadas em farta literatura e em experimentos realizados pela EMBRAPA, descritas com riqueza de detalhes na Seção VII, entre as páginas 227 e 386. Ressaltamos a seguir alguns pontos que são mais importantes porque, na nossa leitura, mais pertinentes à avaliação de risco deste evento.

Inicialmente cumpre ressaltar que o feijoeiro comum não é nativo do Brasil e sim da região andina sul-americana ou ainda da América Central e do Norte (México). As variedades cultivadas no Brasil foram introduzidas após a colonização portuguesa e algumas delas bem recentemente, com a chegada de imigrantes italianos. Não é realista sustentar-se que há um grupo expressivo de agricultores que mantêm suas variedades de feijão de forma tradicional, como ocorre no milho. Assim, a agrobiodiversidade é, do ponto de vista de patrimônio genético brasileiro, inexpressiva.

Por outro lado, o feijoeiro é essencialmente autógamo. Independente da fauna de polinizadores é baixa a frequência de cruzamentos, que atualmente representam um problema na agricultura apenas no caso de produção de sementes.

Quanto ao fluxo gênico para espécies compatíveis, sabe-se que é improvável o cruzamento de *P. vulgaris* com as espécies mais próximas *P. coccineus* e *P. polyanthus* e a maioria dos cruzamentos não produz híbridos férteis. No caso pouco provável da passagem do transgene para um híbrido fértil, o organismo seria hemizigoto e sua resistência ao vírus seria muito inferior ao do feijoeiro GM. Assim, não se esperaria uma vantagem seletiva real.

Com base nestas informações, disponíveis na literatura revista no pedido de liberação comercial, observa-se que os riscos de cruzamento são baixos e, em havendo, os danos esperados são negligenciáveis. De fato, nem se espera que os feijoeiros cultivados nas proximidades de plantios de feijão GM cruzem com estes em taxas significativas (este é um problema de coexistência, que nada tem a ver com a avaliação de risco), nem muito menos que o transgene se propague em populações de outras espécies do gênero.

Em nossa leitura, não há outras questões relevantes ambientais neste caso, já que o feijoeiro em análise não expressa proteínas recombinantes em taxas significativas nem altera de forma alguma a relação desta planta com a biota, quando comparada com seu parental.

A audiência pública trouxe à discussão alguns pontos relevantes à avaliação ambiental, tais sejam a presença de polinizadores diversos e a eventualidade de fluxo gênico para

variedades crioulas de feijão. Estas questões, contudo, foram adequadamente tratadas no processo ou estão documentadas na literatura, como comentado acima, não ensejando dúvidas quanto à biossegurança ambiental deste evento.

Quanto à biossegurança alimentar, seguimos o parecer consolidado das setoriais pertinentes, que foram favoráveis à liberação comercial deste evento.

3) Produto da Expressão:

- Pequenos siRNA
- Baixos níveis de AHAS

4) Área de Restrição Ambiental:

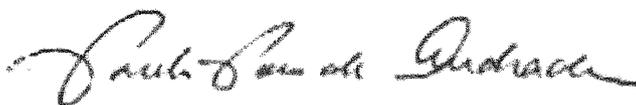
Conforme estabelecido no art. 1º da Lei 11.460, de 21 de março de 2007, “ficam vedados a pesquisa e o cultivo de organismos geneticamente modificados nas terras indígenas e áreas de unidades de conservação.

5) Nível Biossegurança: nível de biossegurança 1.

6) Parecer final do relator:

Atendidas as condições descritas no protocolo e as medidas de biossegurança contidas no processo, essa atividade NÃO É potencialmente causadora de significativa degradação do meio ambiente ou saúde humana. Na avaliação deste relator, o evento Embrapa 5.1 deve ser considerado tão seguro quanto a espécie não transformada sendo, portanto, favorável à liberação comercial deste produto..

09/06/2011



Paulo Paes de Andrade
Relator – Membro da CTNBio

Assessor Técnico da CTNBio: Gutemberg D. Sousa

