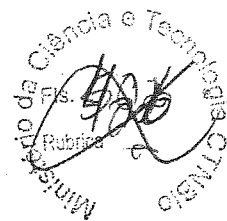


FEIJÃO CONSOLIDADO
HUMANO

CTBRASIL

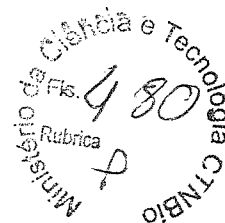
Ministério da Ciência e Tecnologia

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA
COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA – CTNBio
SECRETARIA EXECUTIVA



CTNBio
de biossegurança

PARECER TÉCNICO



Processo n. 01200.005161/2010-86

Data de Protocolo: 15/12/2010

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

CQB: 008/96 (Embrapa Arroz e Feijão) e 004/96 (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)

CNPJ: 00348003/0014-35 (Embrapa Arroz e Feijão); 00348003/0038-02 (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: Josias Correa de Faria (Embrapa Arroz e Feijão) e Eduardo Romano de Campos Pinto (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)

Descrição do OGM: Feijoeiro Geneticamente Modificado Resistente ao Mosaico Dourado- Evento Embrapa 5.1

Uso proposto: Uso Comercial

Extrato Prévio: 2614/2010

Reunião:

Decisão:

Solicitação

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Arroz e Feijão e a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia vêm solicitar a CTNBio o parecer técnico referente à liberação comercial de Feijoeiro Geneticamente Modificado Resistente ao Mosaico Dourado- Evento Embrapa 5.1 (BEM-PVO51-1). O evento de feijoeiro Embrapa 5.1 foi gerado com o uso da estratégia de RNA interferente (RNAi) e é altamente resistente ao vírus do mosaico dourado de feijoeiro (Bean golden mosaic virus-BGMV). Os interessados enviaram Proposta para a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio contendo informações detalhadas quanto a caracterização molecular do evento, desenvolvimento, desempenho agrônômico e ambiental e segurança alimentar do referido feijão. A Proposta encontra-se instruída em um volume de 504 paginas subdividido em oito partes, 2 anexos contendo: Anexo I, Materiais e Métodos e o Anexo 2, a Sequencia completa do lócus de integração do Evento Embrapa 5.1 e Referencias Bibliográficas.

PARECER TÉCNICO

1. O cultivo de feijão no Brasil: Considerações gerais

A introdução do feijão no Brasil, possivelmente, se deu através de três rotas: uma para feijões pequenos teria sua origem no México, seguindo pelo Caribe, Colômbia, Venezuela e Brasil; a outra seria para os feijões grandes, como a cultivar Jalo, provavelmente oriunda dos Andes (Peru); e uma terceira rota vinda da Europa, com os feijões trazidos por imigrantes vindos de lá. O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L) teve origem no Novo Mundo, tendo sido levado ao Velho Mundo após o descobrimento da América. O gênero *Phaseolus* compreende muitas espécies das quais apenas 4 são cultivadas: *P. vulgaris* L., *P. coccineus* L., *P. acutifolius* Gray var. *latifolius* Freem e *P. lunatus* var. *lunatus*. Das quatro, a mais importante é o feijoeiro comum ou *P. vulgaris*, amplamente adaptado e cultivado. Os caracteres morfológicos empregados na identificação de cultivares de feijoeiro (*P. vulgaris*), que envolvem a fase vegetativa e reprodutiva estão apresentados na figura V.1 e tabela V.2. O ciclo da cultura é completado em 70 a 110 dias, a depender da cultivar e das condições climáticas. O feijão comum é a leguminosa mais consumida no Brasil, sendo considerado o ingrediente-símbolo da gastronomia brasileira. O feijão tipo carioca é aceito em praticamente todo país, representando 53% da área cultivada, enquanto o feijão preto é mais popular em alguns estados como Rio Grande do Sul, Santa Catarina, sul e leste do Paraná, Rio de Janeiro, sudeste de Minas Gerais e sul do Espírito Santo. O feijão mulatinho é mais aceito na Região Nordeste e é também denominado de Chita Fina e Bagajó. Feijão roxo e rosinha são mais aceitos nos Estados de Minas Gerais e Goiás.

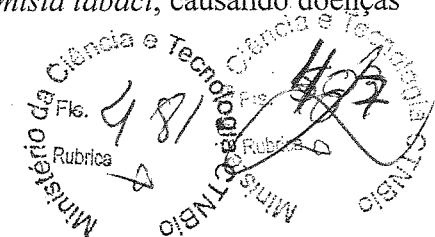
2. Caracterização do problema

Variedades de feijoeiros Embrapa 5.1 GM constituem ferramenta importante para o controle do vírus mosaico dourado no Brasil e possivelmente em outros países das Américas. O mosaico dourado é causado pelo vírus BGMV (Bean golden mosaic vírus) que é transmitido por moscas brancas (*Bemisia tabaci*, Genn.) presentes em todas as regiões do país onde se cultiva o feijoeiro. Quando ocorre a doença as perdas estimadas da produção de grãos podem variar de 40 a 100% dependendo da incidência, da época do plantio e do cultivar. As perdas anuais no país variam entre 90 a 280 mil toneladas de grãos, quantidade suficiente para alimentar entre 6 a 20 milhões de brasileiros adultos.

O vírus do mosaico dourado ou o mosaico dourado (MD) do feijoeiro foi inicialmente encontrado no município de Campinas (SP), próximo ao Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) em 1965 e desde então se disseminou para quase todas as regiões produtoras de feijão do País, principalmente aquelas com clima adequado para o inseto vetor, a mosca branca denominada *Bemisia tabaci*. A doença do feijoeiro

pelo mosaico dourado leva a um amarelecimento foliar, brilhante e intenso. As plantas podem ainda apresentar sintomas de nanismo e/ou superbrotamento. As vagens quando se desenvolvem mostram-se deformadas e de tamanhos reduzidos, com as sementes subdesenvolvidas, afetando a qualidade final dos grãos e o seu valor comercial. O vírus do mosaico dourado pertence ao gênero *Begomovirus* e assim como outros os vírus deste gênero, são transmitidos pela mosca branca *Bemisia tabaci*, causando doenças reconhecidas como fitovirose de grande importância econômica.

3. Transformação genética do feijão - evento Embrapa 5.1



O evento Embrapa 5.1 foi obtido a partir de inserção de transgenes no genoma nuclear com a utilização do método de biobalística. Para obtenção de resistência ao vírus do mosaico dourado foi inserido um gene quimérico para expressão de um RNA contendo um fragmento, posicionado em senso e anti-senso (intercalado por um intron), do gene *rep* (AC1) do BGMV. O RNA foi desenhado de modo a formar um grampo com sequências de RNA de dupla fita (dsRNA) que são reconhecidas pela maquinaria celular para a geração de pequenos fragmentos de RNA (siRNA) que vão interferir na expressão do gene *rep* viral. Sem a expressão deste gene, a replicação viral fica comprometida, tornando as plantas resistentes ao vírus. O cassete de expressão do RNA grampo (hpRNA) é denominado na presente proposta de *ΔAC1hpRNA*. Para selecionar os brotos geneticamente modificados originados de células apicais de embriões zigóticos de feijão foi inserido o gene *csr1.2* (denominado de *AtAhas*) de *Arabidopsis thaliana* com seu promotor e região 3' não traduzida (3' UTR) nativos. O gene *AtAhas* codifica a subunidade maior da enzima aceto-hidroxidácido sintase (AtAHAS), também chamada de acetolactato sintase, que confere tolerância aos herbicidas do grupo químico das imidazolinonas. Observou-se, entretanto, que embora a planta tenha cópias íntegras deste gene *AtAhas*, a tolerância é suficiente apenas para seleção das brotações, sendo as plantas sem tolerância significativa aos herbicidas. A CTNBio já aprovou o evento de soja BPS-CV127- geneticamente modificada tolerante ao herbicida do grupo químico das imidazolinonas, devido a expressão do gene *AtAhas*. A Proposta apresenta na Fig. V.16, fotos do desenvolvimento do Evento Embrapa 5.1, testado em condições de casa de vegetação, mostrando alta resistência ao vírus do mosaico dourado, mesmo após inoculação mediada por grande número de moscas brancas. As fotos comparam o Evento Embrapa 5.1 com a sua variedade parental o feijão Olathe.

4. Caracterização molecular do OGM Evento Embrapa 5.1

- Característica da planta receptora: a variedade de feijoeiro Olathe foi desenvolvida e lançada pela Colorado State University Experiment Station, EUA, em 1979. É uma variedade resistente a

Uromyces phaseoli var. *typica*, resistente a 15 estirpes americanas do vírus *Bean common mosaic* e ao *Curly top* vírus.

- Vetor utilizado e seu espectro de hospedeiro: o vetor pBGMVRNAiAHAS cujo mapa de restrição está apresentado na figura V.25, possui 14 400 bp e é derivado do vetor pBluescript II SK (-) da Stratagene. O gene *atAhas* foi clonado no sítio de *Xba*I; o cassete de expressão $\Delta AC1hpRNA$ foi clonado no sítio de *Not*I; para a transformação genética o vetor pBGMVRNAiAHAS foi digerido com a enzima *Fsp*I que corta o vetor em duas posições removendo parte do fragmento do gene *bla* de *E. coli* que codifica para enzima beta-lactamase.
- O organismo doador do gene *AtAhas* é a espécie *Arabidopsis thaliana*, que não é patogênica a humanos e animais, ou que produza toxinas ou alérgenos. Além disso, o gene *AtAhas* é encontrado em diversas espécies de vegetais, apresentando alta similaridade com o gene *PvAhas*, que codifica a proteína AHAS do feijoeiro.
- As sequências do BGMV presentes no evento Embrapa 5.1 não codificam para nenhuma proteína e o hpRNA resultante da expressão do gene quimérico é processado pela célula em siRNA.
- Elementos reguladores: na construção do gene quimérico $\Delta AC1hpRNA$ foi empregado o promotor do RNA 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) e o sinal de poliadenilação e terminação de transcrição do gene da octopina sintase (*ocs*) de *Agrobacterium tumefaciens*. O CaMV tem baixo espectro de hospedeiros, sendo restrito a plantas da família Cruciferae, representada pela couve, couve-flor, brócolis, repolho e mostarda. O feijoeiro *P. vulgaris* não é hospedeiro do CaMV. A sequência 3' do gene *ocs* vem de *A. tumefaciens*, uma bactéria Gram-negativa de solo e possui uma gama de hospedeiros mais ampla. As sequências do CaMV e de *A. tumefaciens* presente no feijoeiro Embrapa 5.1 não causam danos a planta nos diversos aspectos estudados, além de não serem codificadoras de proteínas. A sequência nucleotídica completa do vetor pBGMVRNAiAHAS está apresentada nas páginas 110 a 114.

A caracterização molecular completa do inserto e da região flanqueadora presente no cromossomo do evento Embrapa 5.1 foi feita empregando diversas técnicas de seqüenciamento, devido a complexidade das estruturas de grampos. As sequências completas estão apresentadas no Anexo II da presente Proposta. A figura V.26 na pag. 120 mostra a estrutura dos transgenes presentes no locus de integração. Análises de Southern blotting empregando sondas para os fragmentos nos 3', *ahas* 5', 35SCaMV e do gene *bla*, mostraram que os fragmentos presentes no genoma do evento 5.1 foram detectadas nas análises de seqüenciamento do locus de integração. Empregando a metodologia de FISH (Hibridização in situ Fluorescente), foi possível confirmar que os transgenes estão em um único locus, como ilustra a figura V.29.

A proteína AtAHAS foi detectada em folhas, raízes e flores. Os níveis entretanto, são muito baixos fazendo com que plantas adultas quando tratadas com herbicidas do grupo químico das imidazolinonas não mostrasse tolerância.

Empregando técnicas de PCR evento-específico para o feijoeiro Embrapa evento 5.1, foram desenhados com um primer ancorado na sequência flanqueadora 5' ou intercaladora e outro primer ancorado no inserto (apresentados na tabela da pag. 137). Com estes primers é possível detectar a presença do OGM no evento Embrapa 5.1, e na variedade BRS pontal após cruzamento com evento 5.1 e 9 gerações de autofecundação com padrão amplificação semelhantes. A linhagem parental Olathe não GM não apresentou produtos de amplificação a partir destes primers. Estes dados estão apresentados na figura V.39. Estes resultados mostram também a estabilidade genotípica do evento Embrapa 5.1.

5. Avaliação da biossegurança alimentar do feijão GM- evento Embrapa 5.1

A segurança a saúde humana e animal foi avaliada e confirmada pelos resultados de uma série de estudos resumidos abaixo:

- A caracterização molecular detalhada do locus de integração dos transgenes no evento Embrapa 5.1 mostrou a presença de cassetes íntegros de expressão de *AtAhas* e do dsRNA correspondente a um fragmento do gene *rep* do BGMV; nenhuma outra sequência com possibilidade de expressão de outra proteína ou RNA foi identificada;
- Caracterização bioquímica mostrou que a proteína AtAHAS expressa em quantidades muito pequenas no feijoeiro Embrapa 5.1 é típica da classe das proteínas AHAS, incluindo a do próprio feijoeiro, com histórico de uso seguro na alimentação humana e animal;
- A composição e a equivalência nutricional do feijoeiro Embrapa 5.1 quando comparada ao seu parental e outras variedades convencionais foram demonstradas por análise de nutrientes importantes e de fatores anti-nutricionais. Foram avaliados os teores dos principais açúcares, vitaminas, aminoácidos, minerais e proteína. A comparação foi feita com feijoeiro GM e não GM cultivados em oito regiões do Brasil por um período de cinco anos. Estes resultados estão compilados nas tabelas VI. 2 a VI. 9 e as variações de nutrientes e anti-nutrientes apresentados nas figuras VI.8 e VI.9. As análises das principais proteínas presentes nos grãos colhidos de campos cultivados com o evento Embrapa 5.1 e a variedade Olathe parental, em Santo Antonio de Goias (GO), Sete Lagoas (MG) e Londrina (PR), foram feitas em gel bidimensional, nos quais as principais proteínas foram identificadas. Estes dados estão apresentados nas figuras VI.10 a VI.13, que mostram o mesmo padrão eletroforético entre as os feijões analisados.
- Estudos de alimentação feito em animais confirmou a equivalência nutricional do evento 5.1 em relação ao seu parental. Os animais, ratos Wistar (machos e fêmeas), foram separados e

distribuídos aleatoriamente em quatro grupos para quatro tratamentos nas duas etapas de estudo: crescimento (30 dias) e exposição prolongada (180 dias). As dietas foram preparadas utilizando como fonte proteica o feijão GM evento Embrapa 5.1 e a variedade parental não-GM. Os resultados destes ensaios estão descritos nas figuras VI.14 e VI.15. Não foram observadas diferenças significativas na evolução de peso inicial e peso final de animais submetidos a 45 dias de tratamento com dieta contendo feijão GM e não-GM. Resultados semelhantes foram observados na evolução de ganho de peso dos animais tratados com dieta contendo feijão GM e não-GM. Em outros estudos, foram realizadas análises morfológicas, com mensuração do peso e tamanho dos órgãos após necropsia, bem como análises histológicas com medições de altura de mucosa e submucosa gástrica e das vilosidades do intestino grosso e delgado. Para o fígado e rins foram feitas análises de imagem para possíveis alterações patológicas. Estes resultados estão apresentados nas figuras VI.16 a VI. 29. Não foram observadas alterações significativas em todos os parâmetros avaliados quando foram comparados animais alimentados com feijão GM e não-GM.

- A capacidade de produção de toxinas ou metabólitos com efeitos adversos em humanos e animais foi descartada pelo fato que: (i) tentativas de isolamento de siRNA ou mesmo RNA total de sementes maduras ou imaturas após o cozimento foram infrutíferas; além disso, animais alimentados por via oral com cerca de 100 vezes o valor que seria possível consumir de RNA total não provocou nenhum efeito negativo em ratos Wistar, machos ou fêmeas; (ii) a toxicidade potencial da proteína AtAHAS foi avaliada em ensaios com ratos, nos quais uma dose de 5000mg/kg do peso do animal foi administrada sem resultar em sinais clínicos de toxicidade, nem perda de peso quando comparado com o grupo controle;
- Análises químicas e bioquímicas foram realizadas no sangue de animais alimentados com grãos do feijão GM Embrapa 5.1 e variedade Olathe parental. Os estudos mostraram que não houve diferenças significativas nos parâmetros avaliados (ureia, creatinina-para disfunção renal; TGO e TGP para injúria hepática; fosfatase alcalina e proteína total sérica para disfunção hepática) entre os animais que se alimentaram de feijão GM em relação aos alimentados com feijão não-GM.
- Avaliação do potencial alergênico de proteínas AtAHAS e SEC61 (esta última sem detecção de transcritos) feita em banco de dados de alérgenos mostrou que a sequência destas proteínas não tem similaridade com alérgenos conhecidos; em adição, já foi demonstrado que a proteína AtAHAS é degradada nos primeiros 30 segundos de análise em fluido gástrico simulado;

Considerando os dados detalhados e cuidadosamente apresentados pelos solicitantes, os resultados obtidos em ensaios de controle e segurança do organismo geneticamente modificado da presente proposta, a inexistência de fatos contrários à segurança nutricional, toxicológica e alergênica, por mais que tenham sido investigados, nosso

parecer é favorável a liberação comercial do feijoeiro geneticamente modificado resistente ao mosaico dourado, evento Embrapa 5.1 para o consumo na cadeia alimentícia de humanos e animais.

Ana Lucia Tabet Oller do Nascimento

Ana Lucia Tabet Oller do Nascimento

Maria Lucia Zaidan Dagli

Membros da CTNBio

14/06/2011

Monitoramento dos Agravos a Saúde Humana e Animal. Este será feito por meio de postos de atendimento de saúde humana ao Sistema de Notificação de Doenças (SND) ou o Sistema Nacional de Notificação de Eventos Adversos Relacionados a Produtos de Saúde (SINEPS), regulamentado pela ANVISA. Anualmente a Embrapa Arroz e Feijão consultará o SND e SINEPS para obter informações de ocorrência de doenças que eventualmente possam ter alguma relação com o consumo do evento de feijoeiro Embrapa 5.1. A Embrapa consultará o setor de Sanidade Animal do MAPA sobre possíveis ocorrências de eventos negativos com animais em campos cultivados com o feijão GM.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

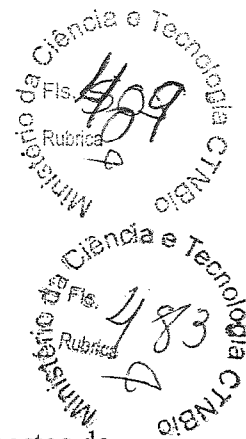
Aragao FJ, de Sa MF, Almeida ER, Gander ES, Rech EL. Particle bombardment-mediated transient expression of a Brazil nut methionine-rich albumin in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Mol Biol.* 1992 Oct;20(2):357-9. PubMed PMID: 1391783.

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.

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.

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.

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 Feb 12;20(3):430-2. Epub 2004 Jan 22. PubMed PMID: 14960474.

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.

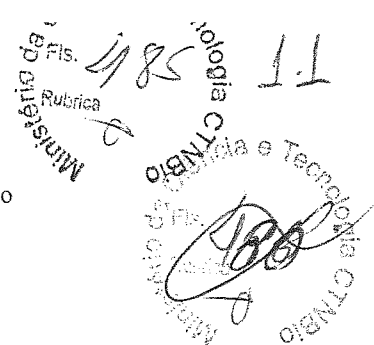
Vanitharani R, Chellappan P, Fauquet CM. Short interfering RNA-mediated interference of gene expression and viral DNA accumulation in cultured plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Aug 5;100(16):9632-6. Epub 2003 Jul 28. PubMed PMID: 12886005; PubMed Central PMCID: PMC170969.

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



PARECER TÉCNICO



Processo n. 01200.005161/2010-86

Data de Protocolo:

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

CQB: 008/96 (Embrapa Arroz e Feijão) e 004/96 (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)

CNPJ:

Endereço:

Presidente da CIBio: Josias Correa de Faria (Embrapa Arroz e Feijão) e Eduardo Romano de Campos Pinto (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)

Descrição do OGM: Feijoeiro Geneticamente Modificado Resistente ao Mosaico Dourado- Evento Embrapa 5.1

Uso proposto:

Extrato Prévio:

Reunião:

Decisão:

Solicitação

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Arroz e Feijão e a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia vêm solicitar a CTNBio o parecer técnico referente à liberação comercial de Feijoeiro Geneticamente Modificado Resistente ao Mosaico Dourado- Evento Embrapa 5.1 (BEM-PVO51-1). O evento de feijoeiro Embrapa 5.1 foi gerado com o uso da estratégia de RNA interferente (RNAi) e é altamente resistente ao vírus do mosaico dourado de feijoeiro (Bean golden mosaic virus-BGMV). Os interessados enviaram Proposta para a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio contendo informações detalhadas quanto a caracterização molecular do evento, desenvolvimento, desempenho agrônômico e ambiental e segurança alimentar do referido feijão. A Proposta encontra-se instruída em um volume de 504 paginas subdividido em oito partes, 2 anexos contendo: Anexo I, Materiais e Métodos e o Anexo 2, a Sequencia completa do locus de integração do Evento Embrapa 5.1 e Referencias Bibliográficas.

PARECER TÉCNICO

1. O cultivo de feijão no Brasil: Considerações gerais

A introdução do feijão no Brasil, possivelmente, se deu através de três rotas: uma para feijões pequenos teria sua origem no México, seguindo pelo Caribe, Colômbia, Venezuela e Brasil; a outra seria para os feijões grandes, como a cultivar Jalo, provavelmente oriunda dos Andes (Peru); e uma terceira rota vinda da Europa, com os feijões trazidos por imigrantes vindos de lá. O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L) teve origem no Novo Mundo, tendo sido levado ao Velho Mundo após o descobrimento da América. O gênero *Phaseolus* compreende muitas espécies das quais apenas 4 são cultivadas: *P. vulgaris* L., *P. coccineus* L., *P. acutifolius* Gray var. *latifolius* Freem e *P. lunatus* var. *lunatus*. Das quatro, a mais importante é o feijoeiro comum ou *P. vulgaris*, amplamente adaptado e cultivado. Os caracteres morfológicos empregados na identificação de cultivares de feijoeiro (*P. vulgaris*), que envolvem a fase vegetativa e reprodutiva estão apresentados na figura V.1 e tabela V.2. O ciclo da cultura é completado em 70 a 110 dias, a depender da cultivar e das condições climáticas. O feijão comum é a leguminosa mais consumida no Brasil, sendo considerado o ingrediente-símbolo da gastronomia brasileira. O feijão tipo carioca é aceito em praticamente todo país, representando 53% da área cultivada, enquanto o feijão preto é mais popular em alguns estados como Rio Grande do Sul, Santa Catarina, sul e leste do Paraná, Rio de Janeiro, sudeste de Minas Gerais e sul do Espírito Santo. O feijão mulatinho é mais aceito na Região Nordeste e é também denominado de Chita Fina e Bagajó. Feijão roxo e rosinha são mais aceitos nos Estados de Minas Gerais e Goiás.

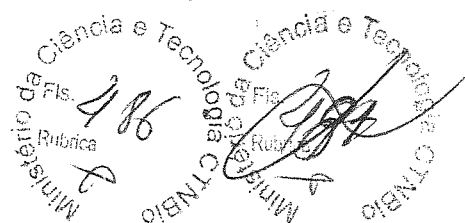
2. Caracterização do problema

Variedades de feijoeiros Embrapa 5.1 GM constituem ferramenta importante para o controle do vírus mosaico dourado no Brasil e possivelmente em outros países das Américas. O mosaico dourado 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. Quando ocorre a doença as perdas estimadas da produção de grãos podem variar de 40 a 100% dependendo da incidência, da época do plantio e do cultivar. As perdas anuais no país variam entre 90 a 280 mil toneladas de grãos, quantidade suficiente para alimentar entre 6 a 20 milhões de brasileiros adultos.

O vírus do mosaico dourado ou o mosaico dourado (MD) do feijoeiro foi inicialmente encontrado no município de Campinas (SP), próximo ao Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) em 1965 e desde então se disseminou para quase todas as regiões produtoras de feijão do País, principalmente aquelas com clima adequado para o inseto vetor, a mosca branca denominada *Bemisia tabaci*. A doença do feijoeiro pelo mosaico dourado leva a um amarelecimento foliar, brilhante e intenso. As plantas podem ainda apresentar sintomas de nanismo e/ou superbrotamento. As vagens quando se desenvolvem mostram-se deformadas e de tamanhos reduzidos, com as sementes subdesenvolvidas, afetando a qualidade final dos grãos e o seu valor comercial. O vírus do mosaico dourado pertence ao gênero Begomovirus e assim

como outros os vírus deste gênero, são transmitidos pela mosca branca *Bemisia tabaci*, causando doenças reconhecidas como fitovirose de grande importância econômica.

3. Transformação genética do feijão - evento Embrapa 5.1



O evento Embrapa 5.1 foi obtido a partir de inserção de transgenes no genoma nuclear com a utilização do método de biobalística. Para obtenção de resistência ao vírus do mosaico dourado foi inserido um gene quimérico para expressão de um RNA contendo um fragmento, posicionado em sentido e anti-senso (intercalado por um intron), do gene *rep* (AC1) do BGMV. O RNA foi desenhado de modo a formar um grampo com sequências de RNA de dupla fita (dsRNA) que são reconhecidas pela maquinaria celular para a geração de pequenos fragmentos de RNA (siRNA) que vão interferir na expressão do gene *rep* viral. Sem a expressão deste gene, a replicação viral fica comprometida, tornando as plantas resistentes ao vírus. O cassete de expressão do RNA grampo (hpRNA) é denominado na presente proposta de $\Delta AC1hpRNA$. Para selecionar os brotos geneticamente modificados originados de células apicais de embriões zigóticos de feijão foi inserido o gene *csr1.2* (denominado de *AtAhas*) de *Arabidopsis thaliana* com seu promotor e região 3' não traduzida (3' UTR) nativos. O gene *AtAhas* codifica a subunidade maior da enzima aceto-hidroxidácido sintase (AtAHAS), também chamada de acetolactato sintase, que confere tolerância aos herbicidas do grupo químico das imidazolinonas. Observou-se, entretanto, que embora a planta tenha cópias íntegras deste gene *AtAhas*, a tolerância é suficiente apenas para seleção das brotações, sendo as plantas sem tolerância significativa aos herbicidas. A CTNBio já aprovou o evento de soja BPS-CV127- geneticamente modificada tolerante ao herbicida do grupo químico das imidazolinonas, devido a expressão do gene *AtAhas*. A Proposta apresenta na Fig. V.16, fotos do desenvolvimento do Evento Embrapa 5.1, testado em condições de casa de vegetação, mostrando alta resistência ao vírus do mosaico dourado, mesmo após inoculação mediada por grande número de moscas brancas. As fotos comparam o Evento Embrapa 5.1 com a sua variedade parental o feijão Olathe.

4. Caracterização molecular do OGM Evento Embrapa 5.1

- Característica da planta receptora: a variedade de feijoeiro Olathe foi desenvolvida e lançada pela Colorado State University Experiment Station, EUA, em 1979. É uma variedade resistente a *Uromyces phaseoli* var. *typica*, resistente a 15 estirpes americanas do vírus *Bean common mosaic* e ao *Curly top* vírus.
- Vetor utilizado e seu espectro de hospedeiro: o vetor pBGMVRNAiAHAS cujo mapa de restrição está apresentado na figura V.25, possui 14 400 bp e é derivado do vetor pBluescript II SK (-) da Stratagene. O gene *atAhas* foi clonado no sítio de *XbaI*; o cassete de expressão $\Delta AC1hpRNA$ foi clonado no sítio de *NotI*; para a transformação genética o vetor pBGMVRNAiAHAS foi digerido

com a enzima *FspI* que corta o vetor em duas posições removendo parte do fragmento do gene *bla* de *E. coli* que codifica para enzima beta-lactamase.

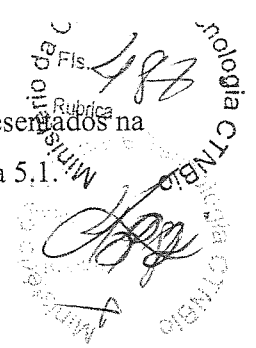
- O organismo doador do gene *AtAhas* é a espécie *Arabidopsis thaliana*, que não é patogênica a humanos e animais, ou que produza toxinas ou alérgenos. Além disso, o gene *AtAhas* é encontrado em diversas espécies de vegetais, apresentando alta similaridade com o gene *PvAhas*, que codifica a proteína AHAS do feijoeiro.
- As sequências do BGMV presentes no evento Embrapa 5.1 não codificam para nenhuma proteína e o hpRNA resultante da expressão do gene quimérico é processado pela célula em siRNA.
- Elementos reguladores: na construção do gene quimérico $\Delta AC1hpRNA$ foi empregado o promotor do RNA 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) e o sinal de poliadenilação e terminação de transcrição do gene da octopina sintase (*ocs*) de *Agrobacterium tumefaciens*. O CaMV tem baixo espectro de hospedeiros, sendo restrito a plantas da família Cruciferae, representada pela couve, couve-flor, brócolis, repolho e mostarda. O feijoeiro *P. vulgaris* não é hospedeiro do CaMV. A sequência 3' do gene *ocs* vem de *A. tumefaciens*, uma bactéria Gram-negativa de solo e possui uma gama de hospedeiros mais ampla. As sequências do CaMV e de *A. tumefaciens* presente no feijoeiro Embrapa 5.1 não causam danos a planta nos diversos aspectos estudados, além de não serem codificadoras de proteínas. A sequência nucleotídica completa do vetor pBGMVRNAiAHAS está apresentada nas páginas 110 a 114.

A caracterização molecular completa do inserto e da região flanqueadora presente no cromossomo do evento Embrapa 5.1 foi feita empregando diversas técnicas de seqüenciamento, devido a complexidade das estruturas de grampos. As sequências completas estão apresentadas no Anexo II da presente Proposta. A figura V.26 na pag. 120 mostra a estrutura dos transgenes presentes no locus de integração. Análises de Southern blotting empregando sondas para os fragmentos nos 3', ahas 5', 35SCaMV e do gene *bla*, mostraram que os fragmentos presentes no genoma do evento 5.1 foram detectadas nas análises de seqüenciamento do locus de integração. Empregando a metodologia de FISH (Hibridização in situ Fluorescente), foi possível confirmar que os transgenes estão em um único locus, como ilustra a figura V.29.

A proteína AtAHAS foi detectada em folhas, raízes e flores. Os níveis entretanto, são muito baixos fazendo com que plantas adultas quando tratadas com herbicidas do grupo químico das imidazolinonas não mostrasse tolerância.

Empregando técnicas de PCR evento-específico para o feijoeiro Embrapa evento 5.1, foram desenhados com um primer ancorado na sequência flanqueadora 5' ou intercaladora e outro primer ancorado no inserto (apresentados na tabela da pag. 137). Com estes primers é possível detectar a presença do OGM no evento Embrapa 5.1, e na variedade BRS pontal após cruzamento com evento 5.1 e 9 gerações de autofecundação com padrão amplificação semelhantes. A linhagem parental Olathe não

GM não apresentou produtos de amplificação a partir destes primers. Estes dados estão apresentados na figura V.39. Estes resultados mostram também a estabilidade genotípica do evento Embrapa 5.1.



5. Avaliação da biossegurança alimentar do feijão GM- evento Embrapa 5.1

A segurança a saúde humana e animal foi avaliada e confirmada pelos resultados de uma série de estudos resumidos abaixo:

- A caracterização molecular detalhada do locus de integração dos transgenes no evento Embrapa 5.1 mostrou a presença de cassetes íntegros de expressão de *AtAhas* e do dsRNA correspondente a um fragmento do gene *rep* do BGMV; nenhuma outra sequência com possibilidade de expressão de outra proteína ou RNA foi identificada;
- Caracterização bioquímica mostrou que a proteína AtAHAS expressa em quantidades muito pequenas no feijoeiro Embrapa 5.1 é típica da classe das proteínas AHAS, incluindo a do próprio feijoeiro, com histórico de uso seguro na alimentação humana e animal;
- A composição e a equivalência nutricional do feijoeiro Embrapa 5.1 quando comparada ao seu parental e outras variedades convencionais foram demonstradas por análise de nutrientes importantes e de fatores anti-nutricionais. Foram avaliados os teores dos principais açúcares, vitaminas, aminoácidos, minerais e proteína. A comparação foi feita com feijoeiro GM e não GM cultivados em oito regiões do Brasil por um período de cinco anos. Estes resultados estão compilados nas tabelas VI. 2 a VI. 9 e as variações de nutrientes e anti-nutrientes apresentados nas figuras VI.8 e VI.9. As análises das principais proteínas presentes nos grãos colhidos de campos cultivados com o evento Embrapa 5.1 e a variedade Olathe parental, em Santo Antonio de Goias (GO), Sete Lagoas (MG) e Londrina (PR), foram feitas em gel bidimensional, nos quais as principais proteínas foram identificadas. Estes dados estão apresentados nas figuras VI.10 a VI.13, que mostram o mesmo padrão eletroforético entre as os feijões analisados.
- Estudos de alimentação feito em animais confirmou a equivalência nutricional do evento 5.1 em relação ao seu parental. Os animais, ratos Wistar (machos e fêmeas), foram separados e distribuídos aleatoriamente em quatro grupos para quatro tratamentos nas duas etapas de estudo: crescimento (30 dias) e exposição prolongada (180 dias). A dietas foram preparadas utilizando como fonte proteica o feijão GM evento Embrapa 5.1 e a variedade parental não—GM. Os resultados destes ensaios estão descritos nas figuras VI.14 e VI.15. Não foram observadas diferenças significativas na evolução de peso inicial e peso final de animais submetidos a 45 dias de tratamento com dieta contendo feijão GM e não-GM. Resultados semelhantes foram observados na evolução de ganho de peso dos animais tratados com dieta contendo feijão GM e não-GM. Em outros estudos, foram realizadas análises morfológicas, com mensuração do peso e tamanho dos órgão após ~~autopsia~~, bem como análises histológicas com medições de altura de

micropia

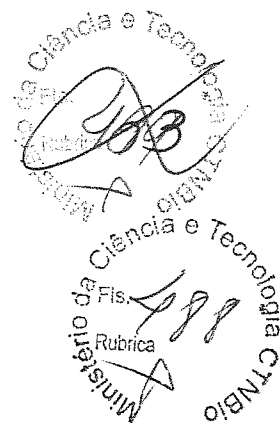
mucosa e submucosa gástrica e das vilosidades do intestino grosso e delgado. Para o fígado e rins foram feitas análises de imagem para possíveis alterações patológicas. Estes resultados estão apresentados nas figuras VI.16 a VI. 29. Não foram observadas alterações significativas em todos os parâmetros avaliados quando foram comparados animais alimentados com feijão GM e não-GM.

- A capacidade de produção de toxinas ou metabólitos com efeitos adversos em humanos e animais foi descartada pelo fato que: (i) tentativas de isolamento de siRNA ou mesmo RNA total de sementes maduras ou imaturas após o cozimento foram infrutíferas; além disso, animais alimentados por via oral com cerca de 100 vezes o valor que seria possível consumir de RNA total não provocou nenhum efeito negativo em ratos Wistar, machos ou fêmeas; (ii) a toxicidade potencial da proteína AtAHAS foi avaliada em ensaios com ratos, nos quais uma dose de 5000mg/kg do peso do animal foi administrada sem resultar em sinais clínicos de toxicidade, nem perda de peso quando comparado com o grupo controle;
- Análises químicas e bioquímicas foram realizadas no sangue de animais alimentados com grãos do feijão GM Embrapa 5.1 e variedade Olathe parental. Os estudos mostraram que não houve diferenças significativas nos parâmetros avaliados (ureia, creatinina-para disfunção renal; TGO e TGP para injúria hepática; fosfatase alcalina e proteína total sérica para disfunção hepática) entre os animais que se alimentaram de feijão GM em relação aos alimentados com feijão não-GM.
- Avaliação do potencial alergênico de proteínas AtAHAS e SEC61 (esta última sem detecção de transcritos) feita em banco de dados de alérgenos mostrou que a sequência destas proteínas não tem similaridade com alérgenos conhecidos; em adição, já foi demonstrado que a proteína AtAHAS é degradada nos primeiros 30 segundos de análise em fluido gástrico simulado;

Considerando os dados detalhados e cuidadosamente apresentados pelos solicitantes, os resultados obtidos em ensaios de controle e segurança do organismo geneticamente modificado da presente proposta, a inexistência de fatos contrários à segurança nutricional, toxicológica e alergênia, por mais que tenham sido investigados, esta assessoria é de parecer favorável a liberação comercial do feijoeiro geneticamente modificado resistente ao mosaico dourado, evento Embrapa 5.1 para o consumo na cadeia alimentícia de humanos e animais.

Ana Lucia Tabet Oller do Nascimento

Membro da CTNBio



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

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.

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.

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 Feb 12;20(3):430-2. Epub 2004 Jan 22. PubMed PMID: 14960474.

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.

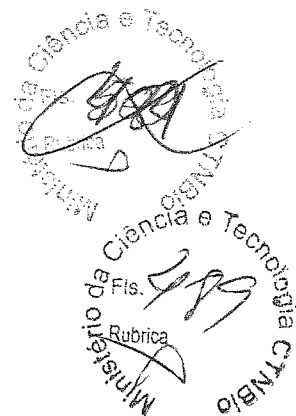
Soares A, Romano E, Neiva S, De Capdeville G, Vianna GR, Rech EL, Aragão FJ. Inheritance of a recessive transgene-associated character controlling albinism in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Biol (Stuttg)*. 2005 Jan;7(1):104-7. PubMed PMID: 15666217.

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



ANA LÚCIA TABET OLER

