

PARECER TÉCNICO Nº /2011

Processo nº: 01200.005161/2010-86

Requerente: Embrapa Arroz e Feijão

CNPJ: 00.348.003/0014-35

Endereço: Rodovia Goiânia - Nova Veneza, Km 12 - Zona Rural. Caixa Postal 179 – Santo Antonio de Goiás – GO

Requerente: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

CNPJ: 00.348.003/0038-02

Endereço: Parque Estação Biológica - Final da W5 Norte - Caixa Postal 02372 – Brasília - DF

Assunto: Liberação Comercial de feijão geneticamente modificado

A CTNBio, após apreciação do pedido de parecer para liberação comercial de feijão geneticamente modificado, concluiu pelo seu DEFERIMENTO, nos termos deste parecer técnico.

A Embrapa Arroz e Feijão detentora do Certificado de Qualidade em Biossegurança – 08/96, e a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, detentora do Certificado de Qualidade em Biossegurança CQB 04/96, solicitaram a CTNBio parecer sobre a biossegurança de feijoeiro geneticamente modificado resistente ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro (*Bean golden mosaic virus* - BGMV), evento de transformação Embrapa 5.1 para efeito de sua liberação no meio ambiente, comercialização, consumo e quaisquer outras atividades relacionadas a esse OGM e progênes dele derivadas. 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. O evento Embrapa 5.1 foi obtido a partir da inserção de transgenes no genoma nuclear com a utilização do método de biobalística. As requerentes solicitaram confidencialidade apenas para a sequência genética inserida, que foi concedida pela CTNBio. Para obtenção de resistência ao vírus foi inserido um gene quimérico para expressão de um RNA contendo 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 sequências 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. Como marcador de seleção para os brotos foi utilizado o gene *AtAhas*. Embora a expressão do gene *AtAhas* tenha sido muito baixa, julgando-se pela dificuldade de se detectar a proteína AtAHAS em tecidos de folhas e sementes do feijoeiro Embrapa 5.1, análises conduzidas *in silico* e *in vitro* mostram que essa proteína não tem qualquer potencial de alergenicidade. Além do mais, esta proteína está presente em evento comercial de outra leguminosa. Análises *in silico* foram realizadas para a predição de potencial alergênico de proteínas AtAHAS e SEC61 (mesmo com a não detecção de transcritos para essa seqüência) e resultaram nenhuma identidade com alérgenos conhecidos. Além disso, a comparação das proteínas AHAS de *A. thaliana* e de *Phaseolus vulgaris* mostra uma similaridade na seqüência de aminoácidos de 83% e de 98-100% nas regiões catalíticas, encontradas na superfamília das enzimas dependentes de tiamina difosfato (ThDP).

A segurança alimentar humana e animal do evento Embrapa 5.1 foi demonstrada por vários estudos que confirmaram que sua composição é substancialmente equivalente ao de seu parental e comparada à de outros feijoeiros cultivados no Brasil. Uma vez que não estavam disponíveis dados de composição de fatores nutricionais e anti-nutricionais presentes em grãos de feijão cultivados no Brasil, um banco de dados foi gerado com o cultivo de feijoeiro (variedades BRS Valente, Diamante Negro, Pérola, Timbó e Olathe (parental do evento Embrapa 5.1)) nos anos de 2003, 2004, 2005, 2006 e 2007 nos municípios de Santo Antônio de Goiás (GO), Simão Dias (SE), Lavras (MG), Ponta Grossa (PR), Anápolis (GO), Passo Fundo (RS) em distintas épocas do ano. Os dados comparativos de composição de elementos nutricionais e anti-nutricionais encontrados no evento de feijoeiro Embrapa 5.1 são comparáveis aos níveis encontrados em seu parental (Olathe) e as outras quatro variedades convencionais cultivadas no Brasil. Adicionalmente, foram realizadas análises do perfil protéico em grãos colhidos de campos cultivados com o Evento Embrapa 5.1 e Olathe nestas localidades. Foram identificadas as principais proteínas presentes em grãos maduros de feijão. Os resultados mostram que os grãos analisados tiveram o mesmo padrão nos distintos campos e que não foi observada diferença entre o evento Embrapa 5.1 e genótipo receptor do gene e Olathe.

A segurança ambiental do feijoeiro Embrapa 5.1 foi demonstrada em estudos visando identificar possíveis efeitos sobre organismos que interagem com a planta em condições de campo. Não foram observadas diferenças significativas entre os solos cultivados com feijoeiro convencional e transgênico Embrapa 5.1 tanto para macrofauna quanto para mesofauna do solo em nenhuma das três localidades estudadas.

Também foi analisada a comunidade de Artrópodes associada a cultura do feijoeiro e não foram identificadas diferenças entre o feijoeiro Embrapa 5.1 e Parental não modificado.

Estudos para a determinação da produção de matéria seca e acumulação de nitrogênio foram realizados. Concluiu-se que a produção de matéria seca pelas plantas de feijoeiro variou entre os experimentos com solos das diferentes localidades analisadas. Entretanto, a comparação entre os dois genótipos (evento Embrapa 5.1 e seu parental Olathe) mostram comportamento similar frente às condições de estresse. A Comunidade de fungos micorrízicos arbusculares e sua associação com as raízes das plantas de feijoeiro foram estudadas. De uma maneira geral não se observou diferenças significativas entre o feijoeiro Embrapa 5.1 e seu parental não-GM Olathe, sugerindo ausência de alteração da capacidade de micorrização.

Estudos foram realizados para avaliar o fluxo gênico com feijoeiro geneticamente modificado transformado com o gene *bar*, sendo compatível com a literatura. O fluxo, quando raramente observado, ocorreu apenas até uma distância de 6,5 m da fonte de pólen, sem prevalência na direção para os eventos de fecundação cruzada (Faria, et al, 2010).

A CTNBio analisou os relatórios apresentados pelas requerentes bem como literatura científica independente.

PARECER TÉCNICO

I. Identificação do OGM

Designação do OGM: Feijão Embrapa 5.1

Requerente: Embrapa Arroz e Feijão e Embrapa Recursos Genéticos

Espécie: *Phaseolus vulgaris* L,

Característica Inserida: resistente ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro *Bean golden mosaic virus* (BGMV).

4

Método de introdução da característica: Biobalística

Estratégia de RNA interferente com inserção de um gene quimérico para expressão de um RNA contendo 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. Durante a fase de transformação, para seleção das plântulas geneticamente modificadas, foi inserido o gene *AtAhas* 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.

Uso proposto: Livre registro, uso, ensaios, testes, semeadura, transporte, armazenamento, comercialização, consumo, liberação e descarte e quaisquer outras atividades relacionadas a este OGM.

II. Informações Gerais

As requerentes desenvolveram um feijão geneticamente modificado resistente ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro - *Bean golden mosaic virus* (BGMV).

O evento de feijão Embrapa 5.1 foi transformado com o vetor pBGMVRNAiAHAS que contém o cassete de expressão $\Delta ACIhpRNA$ e *AtAhas* (com seu promotor e região não

traduzida 3' (3'UTR) nativos). O vetor pBGMVRNAiAHAS foi digerido com a enzima *FspI* para interromper o gene *bla* (de *Escherichia coli*) que confere tolerância aos antibióticos beta-lactâmicos em organismos procarióticos. Desta forma, esse gene não está funcional no vetor utilizado para transformação do feijoeiro.

O gene $\Delta AC1hpRNA$ consiste em um constructo com a finalidade de expressar um RNA-grampo (hpRNA), formando estrutura de dupla fita, composto de um fragmento de 411 pb do gene *rep* do BGMV. Em posição senso e antisenso intercalados pelo intron do gene *pdk* (gene da enzima da piruvato ortofosfato diquinase) de *Flaveria trinervia*, sob o controle do promotor do RNA 35 do vírus do mosaico da couve-flor (35SCaMV). O sinal de poliadenilação e terminação da transcrição está na sequência 3' do gene da octopina sintase de *Agrobacterium tumefaciens* (*ocs3'*). Trata-se de um cassete do tipo *intron-hairpin* (hpRNA) que tem como objetivo expressar um RNA com uma estrutura de grampo, com regiões de dupla fita (dsRNA). O RNA fita dupla (dsRNA) promove uma sequência de degradação de RNA mensageiro (mRNA) onde o dsRNA é processado por enzimas DICER-like em pequenos RNA interferentes (siRNA) de 21 a 26 nt (Hamilton & Baulcombe, 1999).

Uma fita do siRNA é relaxada e incorporada a um complexo ribonucleoprotéico (RISC), que contém um membro da família das proteínas Argonaute (AGO) (Brodersen & Voinnet, 2006), guiando esse complexo para um mRNA com uma sequência complementar, que sofrem clivagem, levando ao silenciamento gênico. O objetivo da construção $\Delta AC1hpRNA$ é levar ao silenciamento específico do gene *rep* (AC1) do BGMV. Como a expressão gene é essencial para a replicação viral, seu silenciamento leva ao comprometimento da geração de novas partículas virais e conseqüentemente à resistência. Análises de Northern blot permitiram detectar os siRNA nos tecidos foliares do evento Embrapa 5.1., porém, nas sementes identificou-se sinal muito fraco.

O gene *AtAHas*, oriundo de *Arabidopsis thaliana*, codifica a subunidade maior da enzima acetohidroxiácido sintase (AtAHAS), que confere o fenótipo de tolerância aos herbicidas do grupo químico das imidazolinonas devido a uma mutação pontual que resulta na substituição de uma serina na posição 653 por uma asparagina (S653N) (Sathasivan et al., 1990) e que foi

utilizado nesse constructo como marcador de seleção. A regulação da transcrição do gene *AtAhas* no feijoeiro está sob o controle do seu promotor nativo de *A.thaliana*, localizado entre a região 5' da seqüência codificante de *AtAhas*. A terminação é controlada por seqüências para este fim no próprio gene dentro da região 3' não-traduzida (UTR) localizada a jusante da região codificante.

III. Aspectos relacionados à Saúde Humana e dos Animais

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 seqüências completas foram apresentadas na solicitação e a CTNBio atendeu o pedido de confidencialidade para as mesmas. A requerente também demonstrou a estrutura dos transgenes presentes no locus de integração. Análises de Southern blotting empregando sondas para os fragmentos nos mostraram que evidenciaram o locus de integração. Empregando a metodologia de FISH (Hibridização in situ Fluorescente), foi possível confirmar que os transgenes estão em um único locus.

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 mostrem tolerância.

Empregando técnicas de PCR evento-específico para o feijoeiro Embrapa evento 5.1, foi desenhados um primer ancorado na sequencia flanqueadora 5' ou intercaladora e outro primer ancorado no inserto. Com estes primers, foi possível detectar a presença do OGM no evento Embrapa 5.1, e na variedade BRS pontal após cruzamento com evento 5.1 e em 9 gerações de autofecundação com padrão amplificação semelhantes.

A segurança da saúde humana e animal foi avaliada e confirmada pelos resultados de uma série de estudos.

Conforme relatado, 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.

A 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. 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 Goiás (GO), Sete Lagoas (MG) e Londrina (PR), foram feitas em gel bidimensional, nos quais as principais proteínas foram identificadas e 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 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. 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. 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 (uréia, 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.

O Monitoramento dos Agravos a Saúde Humana e Animal 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),

proteínas utilizando-se os extratos das folhas de feijão GM (Embrapa 5.1) e o seu parental não-GM (Olathe). Os resultados não mostraram diferenças entre os genótipos. A nodulação e dependência pela fixação biológica de N₂ pelas plantas de feijoeiro foi também avaliada e os resultados não mostraram alterações significativas entre o evento de feijoeiro Embrapa 5.1 e seu parental. A Comunidade de fungos micorrízicos arbusculares e sua associação com as raízes das plantas de feijoeiro foram estudadas pela análise da densidade de esporos de FMAs (fungos micorrízicos arbusculares) na rizosfera das plantas, colonização das raízes por FMAs indígenas, número de espécies de FMAs identificadas na rizosfera, composição de espécies na comunidade de FMAs. De uma maneira geral, não se observou diferença significativa entre o feijoeiro Embrapa 5.1 e seu parental não-GM Olathe, sugerindo ausência de alteração da capacidade de micorrização devido a alteração genética inserida no feijoeiro.

Estudos foram realizados para avaliar o fluxo gênico com feijoeiro geneticamente modificado transformado com o gene *bar*. Os dados de três anos de avaliação em duas localidades mostraram que o fluxo gênico ocorreu em uma frequência muito baixa, não chegando a ser observado em situações de 1 a 10 metros da fonte de pólen. Quando raramente observada, ocorreu apenas até uma distância de 6,5 m da fonte de pólen. Além disso, não foi observada uma prevalência na direção para os eventos de fecundação cruzada.

V. Restrições ao uso do OGM e seus derivados

As requerentes apresentaram a caracterização molecular do inserto com mapa detalhado do vetor pBGMVRNAiAHAS empregado na transformação do feijão da var. Olathe em evento Embrapa 5.1. Este vetor possui 12.429 pb e que foram sequenciados 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, num total de 22 eventos de transformação, fato perfeitamente normal no processo de transformação de plantas, uma vez que a incorporação do inserto no organismo receptor ocorre de forma aleatória. O genoma do feijoeiro é representador predominantemente

por regiões heterocromáticas (aproximadamente 95%). Desta forma, é esperado que vários eventos de transformação não sejam eficientes por terem sido incorporados nessas regiões. Sendo assim, em todos os casos de transformação de plantas, a maioria das linhagens produzidas não expressam o inserto, o que é absolutamente rotineiro na metodologia de transformação. A requerente realizou seqüenciamento do *locus* de integração.

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 Empresa atendeu plenamente, em diversos níveis, as exigências de ensaios de biossegurança nacionais e padronizados internacionalmente para a correta caracterização de inocuidade do transgene.

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. Sendo assim, o Brasil não é centro de origem nem de diversidade de feijão

12

Ressalta-se que o feijoeiro é essencialmente autógamo. Independente da fauna de polinizadores, é baixa a frequência de cruzamentos, que atualmente representam um problema na agricultura 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, apresentada 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 nem muito menos que o transgene se propague em populações de outras espécies do gênero. Além disso, os ensaios realizados pela empresa revelaram que o evento introduzido não 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, não ensejando dúvidas quanto à biossegurança ambiental deste evento. Todos estes pontos foram considerados na consolidação dos pareceres. Também foi anexado, em fase posterior, documento enviado por dois pesquisadores da Universidade Federal de Santa Catarina. Os relatores do processo analisaram o documento recebido e concluíram que não havia nenhum fato científico novo a ser considerado e mantiveram os seus pareceres originais.

13

VI. Considerações sobre particularidades das diferentes regiões do País (subsídios aos órgãos de fiscalização)

Conforme estabelecido no art. 1º da Lei nº 11.460, de 21 de março de 2007, “ficam vedadas as pesquisa e o cultivo de OGM nas terras indígenas e áreas de unidades de conservação, exceto nas Áreas de Proteção Ambiental ”

A modificação genética introduzida não altera as características botânicas da planta, de forma que o Feijoeiro Embrapa 5.1 se comporta como qualquer *Phaseolus* em condições de cultivo, exceto pela característica inserida.

VII. Conclusão

Considerando que a espécie feijão é uma planta bem caracterizada e com sólido histórico de segurança para consumo humano e que os genes introduzidos nessa variedade não evidenciaram efeitos adversos, segundo os testes realizados.

Considerando que dados de composição centesimal não apontaram diferenças significativas entre as variedades geneticamente modificadas e as convencionais, sugerindo a equivalência nutricional entre elas.

Considerando ainda que:

1. A proteína AHAS está presente em plantas e microrganismos e vários mutantes naturais que apresentam tolerância a herbicidas do grupo das imidazolinonas, embora esta característica não se apresente no feijão. Portanto, homens e animais, há muito tempo, possuem histórico de uso na alimentação.

2. a análise molecular do Feijão Embrapa 5.1 evidenciou que a integridade e estabilidade do inserto foi mantida.
3. a análise de segregação e padrão de herança genética são estáveis ao longo de sucessivas gerações;
4. as avaliações agrônomicas indicaram que a inserção não levou a expressão de qualquer outra características que não aquela esperada, ou seja, a resistência ao ataque do vírus do mosaico dourado.
5. Os estudos com o feijão genitor e GM em animais 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. 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 e demais testes de digestibilidade.

Diante do exposto e considerando os critérios internacionalmente aceitos no processo de análise de risco de matérias-primas geneticamente modificadas é possível concluir que a feijão Embrapa 5.1 é tão seguro quanto seus equivalentes convencionais. No âmbito das competências que lhe são atribuídas pelo art. 14 da Lei 11.105/05, a CTNBio considerou que o pedido atende às normas e as legislações vigentes que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal, e concluiu que o feijão Embrapa 5.1 é substancialmente equivalente ao feijão convencional, sendo seu consumo seguro para a saúde humana e animal. No tocante ao meio ambiente, concluiu a CTNBio que o Feijão Embrapa 5.1 não é potencialmente causador de significativa degradação do meio ambiente, guardando com a biota relação idêntica ao feijão convencional.

A CTNBio considera que essa atividade não é potencialmente causadora de significativa degradação do meio ambiente ou de agravos à saúde humana e animal. As restrições ao uso do OGM em análise e seus derivados estão condicionadas ao disposto na Lei 11.460, de 21 de março de 2007.

A análise da CTNBio considerou os pareceres emitidos pelos membros da Comissão; documentos aportados na Secretaria Executiva da CTNBio pela requerente; resultados de liberações planejadas no meio ambiente; palestras, Audiência Pública, textos etc. Foram também considerados e consultados estudos e publicações científicas independentes da requerente e realizados por terceiros.

15

VIII. Bibliografia consultada

Abid G, Muhovski Y, Jacquemin JM, Mingeot D, Sassi K, Toussaint A, Baudoin JP. Characterization and expression profile analysis of a sucrose synthase gene from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during seed development. *Mol Biol Rep.* 2011 May 15. PubMed PMID: 21573790.

Blair MW, Hurtado N, Chavarro CM, Muñoz-Torres MC, Giraldo MC, Pedraza F, Tomkins J, Wing R. Gene-based SSR markers for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) derived from root and leaf tissue ESTs: an integration of the BMC series. *BMC Plant Biol.* 2011 Mar 22;11:50. PubMed PMID: 21426554; PubMed Central PMCID: PMC3068092

Brodersen P, Voinnet O (2006) The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends in Genetics* 22:268-280

Cenkci S, Yildiz M, Ciğerci IH, Bozdağ A, Terzi H, Terzi ES. Evaluation of 2,4-D and Dicamba genotoxicity in bean seedlings using comet and RAPD assays. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2010 Oct;73(7):1558-64. Epub 2010 Aug 25. PubMed PMID: 20797789.

Cortés AJ, Chavarro MC, Blair MW. SNP marker diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor Appl Genet.* 2011 Sep;123(5):827-45. Epub 2011 Jul 23. PubMed PMID: 21785951.

De La Fuente M, Borrajo A, Bermúdez J, Lores M, Alonso J, López M, Santalla M, De Ron AM, Zapata C, Alvarez G. 2-DE-based proteomic analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. *J Proteomics.* 2011 Feb 1;74(2):262-7. Epub 2010 Nov 6. PubMed PMID: 20971221.

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.

Hamilton AJ, Baulcombe DC (1999) A species of small antisense RNA in post transcriptional gene silencing in plants. *Science* 286:950-952.

Hanley-Bowdoin L, Settlage SB, Orozco BM, Nagar S, Robertson D (1999) Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell regulation. *CRC Critical Reviews in Plant Science* 18:71-106.

Hensche A, Buchholz F, Habermann B (2004) DEQOR: a web-based tool for the design and quality control of siRNAs. *Nucleic Acids Research* 32 :W113-W120.

Hileman RE, Silvanovich A, Goodman RE, Rice EA, Holleschak G, Astwood JD, Hefle SL (2002) Bioinformatic methods for allergenicity assessment using a comprehensive allergen database. *International Archives of Allergy and Immunology* 128:280–291.

Ishii K, Meng-Zhu L (2008) Testing the possibility of horizontal transfer of introduced neomycin phosphotransferase (nptII) gene of transgenic *Eucalyptus camaludulensis* into soil bacteria. *Forestry Studies in China* 10:134-136.

Jackson AL, Burchard J, Schelter J, Chau BN, Cleary M, Lim L, Linsley PS (2006) Widespread siRNA "off-target" transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. *RNA* 12:1179–1187.

Kaldorf M, Fladung M, Muhs HJ, Buscot F (2000) Interactions between mycorrhizal fungi and transgenic trees. In: *Proceedings of the Workshop Release of Transgenic Trees -present achievements, problems, future prospects, 1999, Humboldt University, Berlin*, pp 81-86.

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

Knupp AM, Martins CM, Faria JC, Rumjanek NG, Xavier GR (2009) Comunidade bacteriana como indicadora do efeito de feijoeiro geneticamente modificado sobre organismos não alvo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 44:1692-1699

Küpper Cardoso Perseguini JM, Chioratto AF, Zucchi MI, Colombo CA, Carbonell SA, Costa Mondego JM, Gazaffi R, Franco Garcia AA, de Campos T, de Souza AP, Rubiano LB. Genetic diversity in cultivated carioca common beans based on molecular marker analysis. *Genet Mol Biol.* 2011 Jan;34(1):88-102. Epub 2011 Mar 1. PubMed PMID: 21637550; PubMed Central PMCID: PMC3085381.

Kwak M, Kami J, Gepts P (2009) The putative Mesoamerican domestication center of *Phaseolus vulgaris* is located in the Lerma-Santiago Basin of Mexico. *Crop Science* 49:554-563.

Lara FM (1997) Resistance of wild and near isogenic bean lines with arcelin variants to *Zabrotes subfasciatus* (Boheman). I- Winter Crop. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 26:551-560

Larsen RC, Kurowski CJ, Miklas PN. Two independent quantitative trait loci are responsible for novel resistance to beet curly top virus in common bean landrace G122. *Phytopathology.* 2010 Oct;100(10):972-8. PubMed PMID: 20839932.

Larsen RC, Druffel KL, Wyatt SD. The complete nucleotide sequences of bean common mosaic necrosis virus strains NL-5, NL-8 and TN-1. Arch Virol. 2011 Apr;156(4):729-32. Epub 2011 Feb 23. PubMed PMID: 21344267.

Leister D (2005) Origin, evolution and genetic effects of nuclear insertions of organelle DNA. Trends in Genetics 21:655–663.

Leterme P (2002) Recommendations by health organizations for pulse consumption. British Journal of Nutrition 88:239-242.

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

Lewin A, Jacob D, Freytag B, Appel B (1998) Gene expression in bacteria directed by plant-specific regulatory sequences. Transgenic Research 7:403-412.

Lin X, Ruan X, Anderson MG, McDowell JA, Kroeger PE, Fesik SW, Shen Y (2005) siRNA-mediated off-target gene silencing triggered by a 7 nt complementation. Nucleic Acids Research 33:4527–4535.

Llave C, Kasschau KD, Rector MA, Carrington JC (2002) Endogenous and silencing associated small RNAs in plants. Plant Cell 14:1605-1619.

Marsh JT, Tryfona T, Powers SJ, Stephens E, Dupree P, Shewry PR, Lovegrove A. Determination of the N-Glycosylation Patterns of Seed Proteins: Applications To Determine the Authenticity and Substantial Equivalence of Genetically Modified (GM) Crops. J Agric Food Chem. 2011 Aug 3. PubMed PMID: 21780837.

Melo LC, Faria JC, Rosaria L, Yokoyama M, Brondani RVP, Del Peloso MJ, Brondani C, Faria LC (2005) Controle genético da reação do feijoeiro comum ao vírus do mosaico dourado In: VIII Congresso Nacional Pesquisa de Feijão. Anais. Embrapa Arroz e Feijão, Goiânia, pp 393-396.

Mensack MM, Fitzgerald VK, Ryan EP, Lewis MR, Thompson HJ, Brick MA. Evaluation of diversity among common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) from two centers of domestication using 'omics' technologies. BMC Genomics. 2010 Dec2;11:686. PubMed PMID: 21126341; PubMed Central PMCID: PMC3014982.

Mesquita FR, Corrêa AD, Abreu CMP, Lima RAZ, Abreu AFB (2007) Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): composição química e digestibilidade protéica. Ciência e Agrotecnologia 31:1114-1121.

Naito Y, Yoshimura J, Morishita S, Ui-Tei K (2009) siDirect 2.0: updated software for designing functional siRNA with reduced seed-dependent off-target effect. BMC Bioinformatics 10:392.

Nanni L, Bitocchi E, Bellucci E, Rossi M, Rau D, Attene G, Gepts P, Papa R. Nucleotide diversity of a genomic sequence similar to SHATTERPROOF (PvSHP1) in domesticated and wild common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Theor Appl Genet. 2011 Aug 10

Nicolè S, Erickson DL, Ambrosi D, Bellucci E, Lucchin M, Papa R, Kress WJ, Barcaccia G. Biodiversity studies in Phaseolus species by DNA barcoding. Genome. 2011 Jul;54(7):529-45. Epub 2011 Jul 21. PubMed PMID: 21777058.

Nielsen KM, Townsend JP (2004) Monitoring and modeling horizontal gene transfer. Nature Biotechnology 22:1110-1114.

Pauli S, Rothnie HM, Chen G, He X, Hohn T (2004) The cauliflower mosaic virus 35S promoter extends into the transcribed region. Journal of Virology 78:12120-12128.

Petry N, Egli I, Zeder C, Walczyk T, Hurrell R. Polyphenols and phytic acid contribute to the low iron bioavailability from common beans in young women. J Nutr. 2010 Nov;140(11):1977-82. Epub 2010 Sep 22. PubMed PMID: 20861 210.

Santana MP, Carvalho CF, Souza B, Morgado LN (2002) Abelhas (Hymenoptera: Apoidea) visitantes das flores do feijoeiro, *Phaseolus vulgaris* L., em Lavras e Ijaci, MG. Ciência e Agrotecnologia 26:1119-1127.

Santos JB, Jakelaitis A, Silva AA, Costa MD, Manabe A, Silva MCS (2006) Action of two herbicides on the microbial activity of soil cultivated with common bean (*Phaseolus vulgaris*) in conventional-till and no-till systems. Weed Research 46:284–289.

Sathasivan K, Haughn G, Murai N (1990) Nucleotide sequence of a mutant acetolactate synthase gene from an imidazolinone-resistant *Arabidopsis thaliana* var. Columbia. Nucleic Acids Research 18:2188.

Scacheri PC, Rozenblatt-Rosen O, Caplen NJ, Wolfsberg TG, Umayam L, Lee JC, Hughes CM, Shanmugam KS, Bhattacharjee A, Meyerson M, Collins FS (2004) Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101:1892–1897.

Schmidt MA, Souza EM, Baura V, Wassem R, Yates MG, Pedrosa FO, Monteiro RA. Evidence for the endophytic colonization of Phaseolus vulgaris (common bean) roots by the diazotroph Herbaspirillum seropedicae. Braz J Med Biol Res. 2011 Mar;44(3):182-5. Epub 2011 Jan 14. PubMed PMID: 21243317.

Singh SP (1988) Gene pools in cultivated dry bean. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative 31:180-182.

Takeya M, Yamasaki F, Uzuhashi S, Aoki T, Sawada H, Nagai T, Tomioka K, Tomooka N, Sato T, Kawase M. NIASGBdb: NIAS Genebank databases for genetic resources and plant disease information. Nucleic Acids Res. 2011 Jan;39(Database issue):D1108-13. Epub 2010 Oct 14. PubMed PMID: 20952407; PubMed Central PMCID: PMC3013781.

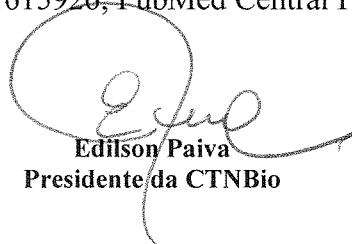
Vergara-Castañeda HA, Guevara-González RG, Ramos-Gómez M, Reynoso-Camacho R, Guzmán-Maldonado H, Feregrino-Pérez AA, Oomah BD, Loarca-Piña G. Non-digestible fraction

of cooked bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Bayo Madero suppresses colonic aberrant crypt foci in azoxymethane-induced rats. *Food Funct.* 2010 Dec 30;1(3):294-300. Epub 2010 Nov 8. PubMed PMID: 21776479.

Vijayan P, Parkin IA, Karcz SR, McGowan K, Vijayan K, Vandenberg A, Bett KE. Capturing cold-stress-related sequence diversity from a wild relative of common bean (*Phaseolus angustissimus*). *Genome.* 2011 Jul 28. PubMed PMID: 21797793.

Yang Y, Gong J, Li H, Li C, Wang D, Li K, Zhi H. Identification of a novel Soybean mosaic virus isolate in China that contains a unique 5' terminus sharing high sequence homology with Bean common mosaic virus. *Virus Res.* 2011 Apr;157(1):13-8. Epub 2011 Jan 22. PubMed PMID: 21262287.

Yin F, Pajak A, Chapman R, Sharpe A, Huang S, Marsolais F. Analysis of common bean expressed sequence tags identifies sulfur metabolic pathways active in seed and sulfur-rich proteins highly expressed in the absence of phaseolin and majorlectins. *BMC Genomics.* 2011 May 26;12:268. PubMed PMID: 21615926; PubMed Central PMCID: PMC3115882.



Edilson Paiva
Presidente da CTNBio

IX - Voto divergente

O Dr. José Maria Ferraz, encaminhou Parecer de Vistas solicitando diligência para o Processo, por considerar:

- Precários os estudos no que se refere aos seguintes aspectos: “os possíveis efeitos da expressão da característica modificada sobre o comportamento, a fisiologia e a reprodução do animal, especificando com dados obtidos a partir de animais modelos. (página 05 do parecer)
- Não apresentar dados consistentes, seja pelo baixo número de animais avaliados, seja pelo tempo de exposição e pela não realização de testes sobre reprodução e estudos com animais em gestação (página 05 do parecer).
- “As avaliações deveriam pautar por um rigor ainda maior” (página 05 do parecer).
- Carência de estudos para justificar a diferença estatisticamente significativa que ocorreu entre o feijão Embrapa 5.1 e seu parental na análise nutricional (página 07 do parecer).

- “não foram avaliados, ao menos não foram apresentados, os efeitos sobre animais em período de gestação e tampouco estudos de efeitos sobre mais de uma geração” (página 08 do parecer).
- Para análises morfológicas e histológicas, o número de animais é pequeno para se afirmar estatisticamente que não houve alterações (página 08 do parecer).
- Houve diminuição do tamanho do rim, aumento do peso do fígado (página 09 do parecer).
- Necessidade de mais estudos para garantir a segurança alimentar (página 09 do parecer).

Acompanharam o pedido de diligência os Drs. Leonardo Melgarejo, Pedro Canísio Binsfeld, Graziela Almeida da Silva, Rodrigo Roubach.

X – Abstenções

Abstiveram-se da votação, os Drs. Francisco Aragão e Carlos Afonso Nobre.

