



Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

Processo nº: 01200.702462/2016-47

Data de Protocolo: 23/08/2016

Protocolo SEI: 160819/2016

Requerente: Syngenta Seeds Ltda.

CQB: 001/96

Endereço: Rod. BR 452, km 142, Zona Rural, 38407-049, Uberlândia, MG

Título da proposta: Liberação comercial de milho 3272 e de seus derivados para a finalidade de manipulação, transporte, transferência, comercialização, importação, armazenamento, consumo, liberação e descarte.

Resolução Normativa: RN 5

PARECER TÉCNICO

Descrição do OGM: O Milho 3272 foi desenvolvido com o objetivo de facilitar a hidrólise do amido de milho para a produção de etanol. O milho 3272 foi transformado com o gene sintético amy797E, cuja expressão produz a proteína alfa-amilase termoestável AMY797E. O gene amy797E é um gene quimérico derivado de sequências de três genes de alfa-amilase originários de três microrganismos hipertermófilos da ordem archaea Thermococcales. Este gene quimérico de alfa-amilase foi montado a partir de sequências parentais usando a tecnologia GeneReassembly™ (Diversa Corporation, San Diego, CA) e foi selecionado pelas propriedades de termoestabilidade da proteína de amilase codificada, necessárias durante a fase de hidrólise do amido no processamento do milho para a produção de etanol. Grãos de milho produzidos por plantas transformadas com o gene amy797E contêm a proteína termoestável alfa-amilase AMY797E e são eficazes na hidrólise do amido em açúcares solúveis, sob altas temperaturas e pressão, condições alcançadas durante o processamento do milho para a produção de etanol. A amilase é utilizada na indústria de etanol nos EUA (e em pequena escala mais recentemente no Brasil) para hidrolisar o amido em subunidades menores de açúcar, que é o primeiro passo na produção de etanol a partir de plantas. As amilases utilizadas para a produção de etanol precisam ser capazes de trabalhar a altas temperaturas e pressão e baixas concentrações de cálcio. Plantas como o milho contêm naturalmente amilases, porém estas são destruídas quando o milho é sujeito a altas temperaturas de processamento necessárias para a produção de etanol, tornando-se necessário adicionar estas enzimas produzidas a partir de microrganismos. O uso do evento 3272, expressando uma amilase altamente termoestável, ignora esta etapa.

Classificação: Classe de Risco I

Resolução Normativa: RN 05/2008

- ✓ Designação do OGM: Milho 3272
- ✓ Espécie: Zea mays L.



Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

- ✓ Característica Inserida: gene quimérico sintético amy797E que codifica para uma alfa-amilase termoestável durante o processamento do milho para produção de etanol.
- ✓ Método de introdução da característica: O milho 3272 foi desenvolvido através de transformação mediada por Agrobacterium de embriões imaturos de milho com o plasmídeo pNOV7013.
- ✓ Uso proposto: efeito de seu uso comercial e seus derivados e quaisquer outras atividades relacionadas a esse produto para fins de alimentação humana ou animal.

1. Proteínas Expressas:

AMY797E: A proteína AMY797E é uma alfa-amilase codificada pelo gene quimérico e sintético amy797E de 1383 pb. O Gene é derivado de genes alfa-amilases de três microrganismos hipertermófilos da ordem archaea Thermococcales. O gene amy797E inclui a fusão da amilase 797GL3 com uma sequência sinal de 19 aminoácidos N-terminal gama-zeína do milho (GZein ss) e um sinal de retenção do retículo endoplasmático SEKDEL C-terminal (ER rs) (LANAHAN et al., 2003). A sequência sinal gama-zeína do milho e o sinal de retenção do ER fornecem sinais para o direcionamento às proteínas e a retenção no retículo endoplasmático da célula, respectivamente. O sinal gama-zeína N-terminal do milho é clivado da proteína precursora para produzir a proteína alfa-amilase madura. A região codificadora da alfa-amilase do gene amy797E foi sintetizada para acomodar o emprego de códons preferido para o milho (MURRAY et al., 1989). A enzima alfa-amilase catalisa a hidrólise do amido pela clivagem das ligações internas α -1,4-glucosídicas, em dextrinas, maltose e glucose.

PMI: A proteína PMI é codificada pelo gene pmi (manA; E. coli) de 1176 pb e expressa a enzima fosfomanose isomerase (Número de Acesso GenBank M15380). Esta enzima catalisa a isomerização da manose-6-fosfato a frutose-6-fosfato. O gene pmi é utilizado como marcador de seleção na seleção em cultura de tecidos durante o processo de transformação do milho (NEGROTTO et al., 2000).

2. 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”. Também fica proibido o plantio comercial do milho 3272 no Brasil, sendo seu uso restrito na alimentação animal e humana.

3. Observações da Secretaria Executiva:

O pedido de Liberação comercial de milho 3272 e seus derivados é para uso exclusivo na alimentação Humana e Animal incluindo as finalidades de manipulação, transporte,



Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

transferência, comercialização, importação, exportação, armazenamento, consumo, liberação e descarte deste Milho GM e de seus derivados.

4. Fundamentação Técnica:

O milho (*Zea mays* L.) 3272 foi geneticamente modificado através da transformação de embriões imaturos de milho mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Foi introduzido o gene sintético amy797E, cuja expressão produz a proteína alfa-amilase termoestável AMY797E. Segundo a empresa proponente, o gene amy797E é um gene quimérico derivado de sequências de três genes de alfa-amilase originários de três microrganismos hipertermófilos da ordem Archaea Thermococcales. As três alfa-amilases parentais, utilizadas para desenvolver a AMY797E, pertencem naturalmente a três diferentes fontes. Duas das sequências dos genes alfa-amilases parentais foram isolados de bibliotecas de DNA construídas a partir de culturas puras de microrganismos da espécie *Thermococcus*, isolados de amostras coletadas de sistemas hidrotermais marinhos a 95°C, pH7 e 85°C, pH6, respectivamente. A terceira sequência gênica de alfa-amilase tem origem na biblioteca de DNA de uma cultura primária e enriquecida, contendo um número indeterminado de microrganismos, coletados em águas a altas temperaturas (90°C) e pH 6,5 do Oceano Pacífico. Baseado nas comparações das sequências, a origem mais provável para a terceira sequência é um microrganismo da espécie *Pyrococcus* ou outro da espécie *Thermococcus*. As três sequências foram utilizadas para aperfeiçoar a sequência de uma enzima alfa-amilase com características ideais para o processo de produção de etanol a partir do milho. Este gene quimérico de alfa-amilase foi montado a partir de sequências parentais usando a tecnologia GeneReassembly™ (Diversa Corporation, San Diego, CA) (U.S. Patent No. 6,537,776) e foi selecionado pelas propriedades de termoestabilidade da proteína de amilase codificada, necessárias durante a fase de liquefação do amido no processamento do milho para a produção de etanol. Grãos de milho com o gene amy797E expressam a proteína termoestável AMY797E e são mais eficientes na degradação do amido em moléculas menores, sob altas temperaturas e pressão. O milho 3272 também expressa o gene pmi (manA) de *E. coli* que codifica uma Fosfomanose Isomerase e está sob regulação do promotor do gene da ubiquitina de *Zea mays* e do terminador NOS de *A. tumefaciens*. A fosfomanose isomerase atua como marcador de seleção na cultura de tecidos durante o processo de transformação. A construção que deu origem ao evento 3272 é composta por dois cassetes de expressão contidos no plasmídeo vetor pNOV7013 (Figura 1 do Processo de liberação comercial). Um cassete contém o gene de interesse amy797E e seus elementos reguladores GZein e 35S. O outro cassete contém o gene marcador de seleção pmi (manA), que está sob o controle do promotor ZmUbiInt, e é finalizado pelo terminador NOS. A descrição completa dos componentes do vetor está apresentada no item 6 da Parte III do processo de liberação comercial. Mas em resumo as sequências introduzidas no milho 3272 são as sequências entre a Borda Direita/Esquerda do vetor pNOV7013 descritas abaixo:

Cassete do gene de interesse (amy797E):



Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

Promotor GZein (677 pb): Região do promotor do gene da proteína (zeína) de 27-kDa de armazenamento em *Zea mays* (Número de Acesso GenBank® X56117; NCBI, 2005). Proporciona a expressão específica no endosperma em *Zea mays* (DAS et al., 1991).

amy797E (1383 pb): Gene quimérico da alfa-amilase, termoestável, derivado de genes alfa-amilases de três microrganismos hipertermófilos da ordem archaea Thermococcales. O gene amy797E inclui a fusão da amilase 797GL3 com uma sequência sinal de 19 aminoácidos N-terminal gama-zeína do milho (GZein ss) e um sinal de retenção do retículo endoplasmático SEKDEL C-terminal (ER) (LANAHAN et al., 2003). A sequência sinal gama-zeína do milho e o sinal de retenção do ER fornecem sinais para o direcionamento da proteína e a retenção no retículo endoplasmático da célula, respectivamente. O sinal gama-zeína Nterminal do milho é clivado da proteína precursora para produzir a proteína alfa-amilase madura. A região codificadora da alfa-amilase do gene amy797E foi sintetizada para acomodar o emprego do códon preferido para o milho (MURRAY et al., 1989). A enzima alfa-amilase catalisa a hidrólise do amido pela clivagem das ligações internas α -1,4- glucosídicas, em dextrinas, maltose e glucose.

PEPC9 (108 pb): Intron nº 9 do gene da fosfoenolpiruvato carboxilase (Número de acesso GenBank X15239) de *Zea mays* (MATSUOKA & MINAMI, 1989).

Terminador35S (70 pb): Sequência terminadora do RNA 35S do genoma do vírus do mosaico da couveflor (Número de Acesso GenBank AF140604). Sua função é fornecer uma sequência de poliadenilação (FRANCK et al., 1980).

Cassete do marcador para seleção (gene pmi):

ZmUbiInt (1993 pb): Região do promotor do gene da ubiquitina de *Zea mays* (Número de Acesso GenBank S94464). Fornece a expressão constitutiva em monocotiledôneas (CHRISTENSEN et al., 1992).

pmi (1176 pb): Gene man^A de *E. coli* que codifica a fosfomanose isomerase (Número de Acesso GenBank M15380). Catalisa a isomerização da manose 6-fosfato a frutose 6 fosfato (NEGROTTA et al., 2000).

NOS (253 pb): Sequência terminadora do gene da nopalina sintase de *Agrobacterium tumefaciens* (Número de Acesso GenBank V00087). Sua função é fornecer um sítio de poliadenilação (DEPICKER et al., 1982).

Os dados apresentados pela empresa proponente mostram que somente uma única cópia do gene amy797E, do gene pmi, da sequência do promotor GZein e da sequência do promotor ZmUbiInt, do terminador 35S e da sequência do terminador NOS, foram inseridos no genoma do milho 3272. Os resultados apresentados no processo também indicaram que não havia fragmentos de DNA estranho dos elementos funcionais em qualquer outro lugar do genoma do milho 3272, e que o milho 3272 não possui sequências estruturais do plasmídeo pNOV7013. O sequenciamento de DNA de toda a inserção T-DNA no genoma



Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

Coordenação Geral

do milho 3272 determinou a integridade da inserção, a contiguidade dos elementos funcionais, e não detectou mudanças em pares de bases individuais das construções gênicas utilizadas. Estudos de segregação em três gerações foram realizados demonstrando que os genes estão ligados em um único locus de inserção no genoma nuclear e que segregam de acordo com a herança mendeliana. O padrão de hibridização de sondas moleculares foi idêntico em todas as gerações do milho 3272 analisados. Estes estudos indicam que o inserto é herdado de forma estável de uma geração para a seguinte. A empresa também apresenta dados onde todas as gerações analisadas estavam livres de sequências estruturais do plasmídeo pNOV7013.

As concentrações das proteínas AMY797E e PMI no milho 3272 foram determinadas por ELISA em vários tecidos vegetais e na planta inteira (no milho GM e no híbrido não GM, com mesmo background genético) em cinco estágios de crescimento (cartucho, antese, enchimento do grão, maturidade da semente e senescência). A expressão da proteína AMY797E é dirigida pelo promotor de milho gama-zeína para expressão específica no endosperma do grão. Em base seca os níveis de AMY797E no milho 3272 foram maiores na fase de enchimento do grão. Os níveis médios de AMY797E em grãos do híbrido avaliado em todas as fases variou de 838 ± 225 ~g /g (peso úmido) (1004 ± 322 ~g /g em peso seco) para 1627 ± 338 ~g /g (peso úmido) (3365 ± 780 ~g /g em peso seco). Além de grãos, os níveis da proteína AMY797E foram medidos em raízes, folhas, pólen e em plantas inteiras em cinco estágios de desenvolvimento. Níveis quantificáveis de proteína AMY797E foram detectados em algumas amostras de plantas inteiras e algumas amostras de raízes em diferentes estágios de desenvolvimento do milho 3271. A proteína AMY797E não foi detectada no pólen e foi detectado em apenas uma amostra de folhas a partir da senescência. Apesar do promotor sendo utilizado, ser um promotor tecido específico para endosperma, é conhecido da literatura de que em várias situações ocorre indução de expressão basal em outros tecidos tendo-se em vista o local onde ocorreu o inserto no genoma. A identificação da presença da proteína AMY797E em outros tecidos em concentrações próximas ao limite de detecção é aceitável pelas baixas concentrações encontradas que não afetariam o desenvolvimento da planta, e até porque nesta solicitação o uso fica restrito ao consumo humano/animal ficando vedado o plantio comercial.

A expressão da proteína PMI é proporcionada por um promotor constitutivo e foi detectada na maior parte da planta e tecidos analisados, com exceção de algumas amostras de plantas na senescência. Níveis de PMI foram geralmente semelhantes para o milho avaliado em cada ponto de tempo, para cada tipo de tecido, com os mais altos níveis sendo detectados no pólen: 8,0 - 8,5 (~g /g de peso fresco) e 17,0 - 18,2 (~g /g em peso seco).

Segundo a empresa proponente o método de detecção para o evento 3272 em amostras de DNA extraídos de grãos e sementes é por PCR em tempo real e é validado internacionalmente, estando disponível no site: (http://gmocrl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/docs/jrc48922_event3272_validation_report_and_protocol.pdf). (DELOBEL et al., 2008),

A empresa proponente atesta que a avaliação da segurança humana foi conduzida no milho 3272, para determinar que: 1) o milho 3272 é tão seguro quanto o milho convencional



Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

Coordenação Geral

e que 2) as novas proteínas introduzidas não apresentam toxicidade e são improváveis de serem alergênicas. Buscas de bioinformática foram feitas pela proponente não identificando sequências de aminoácidos de AMY797E e PMI compartilhando similaridade significativa com sequências proteicas identificadas como toxinas.

A toxidez potencial a mamíferos de ambas as proteínas foi avaliada pela execução de estudos de toxidez oral em ratos. Nenhuma toxidez foi observada em doses muito altas (1511 mg de proteína/kg de peso corporal para AMY797E e 2000 mg de proteína/kg de peso corporal para PMI). Ambas as proteínas AMY797E e PMI, portanto, foram consideradas atóxicas pela proponente. Nos estudos de consumo das proteínas por seres humanos, considerando a expressão das proteínas AMY797E e PMI no grão, a parte mais provável de entrar na cadeia alimentar humana e animal, a exposição dietética potencial aos humanos da proteína AMY797E e para PMI considerando a dieta média de uma pessoa de 70 kg, seria mínima, portanto a exposição dietética potencial destas proteínas pode ser considerada mínima.

Avaliação do potencial de alergenicidade de AMY797E e PMI foi conduzido usando uma abordagem de peso-da-evidência. As proteínas AMY797E e PMI não são derivadas de organismo fonte conhecido como produtor de proteínas alergênicas. Nenhuma similaridade significativa de sequência de aminoácidos de AMY797E ou PMI com sequências de proteínas alergênicas putativas ou conhecidas foi identificada nos dados apresentados pela empresa proponente.

Tanto AMY797E como PMI foram rapidamente degradadas em fluido gástrico simulado de mamíferos e foram inativadas. Baseando-se nessa evidência, tanto AMY797E como PMI foram consideradas improváveis de serem alimentos alergênicos. Mais ainda, o potencial de exposição de mamíferos a essas proteínas é mínimo baseado nos seus níveis de expressão serem baixos nos tecidos do milho.

Estudo de alimentação com aves demonstrou que não houve efeitos adversos em frangos de corte que consumiram dietas preparadas com grãos de milho 3272 quando comparados com frangos de corte que consumiram dietas preparadas com grãos de milho controle. Espera-se, portanto, que o milho 3272 forneça nutrição adequada aos animais em crescimento. O mesmo ocorreu no estudo de alimentação de mamíferos (roedores) com duração de 90 dias, onde os ratos consumiram dietas preparadas com grãos de milho controle e de dietas preparadas com grãos de milho 3272, mais uma vez não houve efeitos adversos nos animais. As informações apresentadas pela empresa proponente suportam que nenhum dano potencial é evidente do consumo por mamíferos (incluindo humanos) pelo milho 3272 e da exposição às proteínas AMY797E e PMI.

5. Parecer:

Segundo informações prestadas pela proponente toda a produção agrícola do milho 3272 é exclusivamente feita nos EUA em um sistema fechado de *stewardship*, onde desde a produção das sementes híbridas até a entrega nas fábricas de etanol, as atividades são controladas e rastreadas através de um sistema, que é regulado através de contratos entre todas as partes (Syngenta, distribuidores, agricultores e indústria de etanol). Assim a

6



Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

Coordenação Geral

probabilidade de comercialização destes grãos para outros fins é baixa. Segundo ainda a proponente, nos EUA apenas a comercialização do subproduto do processo de produção de etanol, denominado DDG, destinado para a alimentação animal, é aberta e não se encontra dentro do referido sistema de *stewardship*. Assim, podemos assumir que a probabilidade do milho 3272 estar presente em exportações de milho dos EUA para o Brasil é baixa. O milho 3272 encontra-se aprovado nos EUA para Alimentação Humana/Animal (2007) e para o meio ambiente (2011), na Austrália somente para alimentação Humana/Animal (2008), no Canadá para Alimentação Humana/Animal e para o meio ambiente (2011), nas Filipinas para Alimentação Humana/Animal (2008), no México para Alimentação Humana/Animal (2008), no Japão para Alimentação Humana/Animal e para o meio ambiente (2010), na Rússia e Taiwan somente para alimentação Humana (2010), na Coreia do Sul para alimentação Humana/Animal (2011). Mais recentemente o evento foi aprovado na China (2013), Colômbia e Malásia (2016). Com base no seu histórico de uso no mundo desde 2007, no conjunto de evidências obtidas e com base nos dados e informações apresentadas pela empresa proponente, pode-se afirmar que o milho 3272 não apresenta riscos significativos sobre a saúde humana e animal. Possíveis impactos a saúde humana/animal, caso ocorressem seriam de ocorrência desprezível e com risco negligenciável, mesmo que quantidades significativas do milho 3272 estejam presentes nas importações de milho vindas dos EUA. Sendo assim, somos pelo **DEFERIMENTO** do pedido da empresa Syngenta Seeds Ltda que solicita a Liberação comercial de milho 3272 e seus derivados para uso exclusivo na alimentação Humana e Animal incluindo as finalidades de manipulação, transporte, transferência, comercialização, importação, armazenamento, consumo, liberação e descarte deste Milho GM e de seus derivados. Este DEFERIMENTO NÃO INCLUI autorização para plantios comerciais do Milho 3271, ficando a cargo dos órgãos de Fiscalização e Registro observar se as determinações deste parecer se fazem cumprir, principalmente a rastreabilidade e proteção durante o transporte dos pontos de chegada no Brasil até os pontos de uso para consumo animal e humano.

Mais especificamente com o objetivo de se evitar o fluxo gênico dos grãos, considerando que o uso proposto é apenas para alimentação humana e animal, deverão ser adotadas as seguintes medidas de biossegurança:

- (i) Notificar previamente o MAPA (os órgãos de registro e fiscalização) sobre o local de internalização dos grãos de milho, data, quantidade e local de destino;
- (ii) Durante as operações de carga e descarga, todo o material derramado, se houver, deverá ser coletado e depositados nos veículos de transporte ou destruídos, sob a responsabilidade do importador;
- (iii) O transporte do ponto de ingresso para o estabelecimento de destino deverá ser feito em "transportadores" que assegurem a cuidadosa contenção do produto, de maneira a evitar dispersão dos grãos de milho geneticamente modificado no meio ambiente;
- (iv) Apenas produtos derivados de milho não contendo formas viáveis e obtidos após o processamento poderão ser utilizados para a alimentação;



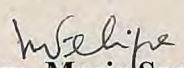
Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

- (v) Nas unidades de processamento, toda a movimentação do milho importado deverá ser registrada e executada com acompanhamento de responsável técnico, de forma a evitar a dispersão no meio ambiente;
- (vi) Os grãos de milho derramados inadvertidamente nas áreas próximas às unidades de armazenamento e/ou moega deverão ser coletados e ajuntados ao montante original ou destruídos, sob a responsabilidade do responsável técnico do estabelecimento;
- (vii) Os resíduos provenientes da limpeza de equipamentos, silos ou armazéns de estocagem deverão ser obrigatoriamente destruídos;
- (viii) Todas as fases de movimentação dos grãos deverão ser registradas de forma a se ter a rastreabilidade do produto. Toda a documentação deverá ser mantida à disposição da fiscalização;
- (ix) Liberações acidentais no meio ambiente do grão de milho geneticamente modificado deverão ser imediatamente comunicados à CTNBio e aos órgãos e entidades de registro e fiscalização.

Os procedimentos e demais medidas complementares deverão ser estabelecidos pelos órgãos de fiscalização e controle.

Data: 01/09/2016


Dr. Alexandre Lima Nepomuceno
Membro da CTNBio


Dra. Maria Sueli Felipe
Membro da CTNBio

Bibliografia Consultada

AGBIOS, 2016. <http://www.agbios.com/dbase.php>.

CHRISTENSEN, A. H.; SHARROCK R. A.; QUAIL, P. H. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Molecular Biology*, Dordrecht, v. 18, p. 675-689, 1992.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2003. Guideline for the conduct of food safety assessment of foods derived from recombinant-DNA plants. Annex 1: Assessment of possible allergenicity. CAC/GL 45-2003. Annex 1: Assessment of Possible Allergenicity, pp. 9-11.

DAS, O. WARD, K., RAY, S. AND MESSING, J. (1991). Sequence variation between alleles reveals two types of copy correction at the 27-kDa zein locus of maize. *Genomics*, 11, 849-856.



Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

- DEPICKER, A.; STACHEL, S.; DHAESE, P.; ZAMBRYSKI, P.; GOODMAN, H. M. Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *Journal of Molecular Applied Genetics*, [s.l.], v. 1, p. 561-573, 1982.
- DELOBEL, C.; MAZZARA, M.; VAN DEN EEDE, G. Event-specific Method for the Quantification of Maize Event 3272 Using Real Time PCR-Validation report and protocol. Luxemburgo: Comissão Europeia, Joint Research Center, 2008. Disponível em: < http://gmocrl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/docs/jrc48922_event3272_validation_report_and_protocol.pdf >. Acesso em: 18 ago. 2016.
- FRANCK, A., GUILLEY, H., JONARD, G., RICHARDS, K. & HIRTH, L. (1980). Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA. *Cell*, 21, 285-294.
- LANAHAN, M. B., BASU, S. S., BATIE, C. J., CHEN, W., JOYCE, C. AND KINKEMA, M. (2003). Self-processing plants and plant parts. US Patent Application Publication Number US2003/0135885 A1.
- MATSUOKA, M. & MINAMI, E. (1989). Complete structure for the gene phosphoenolpyruvate carboxylase from maize. *European Journal of Biochemistry*, 181, 593- 598.
- MURRAY, E. E., LOTZER, J., & EBERLE, M. (1989). Codon usage in plant genes. *Nucleic Acids Research*, 17, 477-498.
- NAS - National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. (2016). *Genetically Engineered Crops: Experiences and Prospects*. Washington, DC: The National Academies Press. doi: 10.17226/23395.
- NCBI (2005). National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- NCBI. 2010. Entrez® Protein database. Bethesda, MD: National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Protein>(accessed March 01, 2011). Ponting C. 2001. Issues in predicting protein function from sequence. *Brief Bioinform* 2:19-29.
- NCBI. 2011. Entrez® Protein database. Bethesda, MD: National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Protein>(accessed March 01, 2011). Ponting C. 2001. Issues in predicting protein function from sequence. *Brief Bioinform* 2:19-29.
- NEGROTTO, D.; JOLLEY, M.; BEER, S.; WENCK, A. R.; HANSEN, G. The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation. *Plant Cell Reports*, Berlin, v. 19, p. 798-803, 2000.

Marcos Roberto Bertozo
Assessor CTNBio

