



**COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA  
PARECER TÉCNICO Nº 85/2023/SEI-CTNBio - Membros**

**PARECER TÉCNICO: 8352/2023**

**Processo:** 01245.020529/2022-53

**Data de Protocolo:** 16/11/2022

**Assunto:** Liberação Comercial de Eucalipto Geneticamente Modificado.

**Requerente:** Suzano SA.

**CQB:** 325/11

**Endereço:** Avenida n Doutor José Lembo n . 1010, Itapetininga/SP.

**Título:** Liberação Comercial do Eucalipto Geneticamente Modificado –  
Evento 955S024.

**Extrato Prévio:** 8583/2022

**Decisão:** Deferido

**Reunião:** 258ª Reunião Ordinária ocorrida em 02/02/2023

**Identificação do OGM**

**Designação do OGM:** Eucalipto 955S024.

**Espécie:** *Eucalyptus urophylla*

**Característica Inserida:** O eucalipto 955S024 expressa as proteínas CP4 EPSPS e NPTII. As plantas do eucalipto, evento 955S024, apresentam tolerância aos herbicidas formulados à base do princípio ativo glifosato, devido à expressão da proteína CP4 EPSPS. A proteína NPTII é utilizada como marcador de seleção no processo de transformação genética, por conferir resistência a antibióticos do grupo dos aminoglicosídeos, como a canamicina, gentamicina e neomicina.

**Método de introdução da característica:** O eucalipto 955S024 foi produzido pelo método de transformação genética mediada por *Rhizobium radiobacter*1 (também reconhecido como *Agrobacterium tumefaciens*) utilizando o plasmídeo pBI121.

**Uso proposto:** liberação no meio ambiente, seu uso comercial e quaisquer outras atividades relacionadas a esse OGM e qualquer progênie dele derivados.

### **Resumo da Fundamentação Técnica:**

A CIBio da Suzano S.A. (FuturaGene – Divisão de Biotecnologia), detentora do Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB) nº 0325/11 encaminha proposta fundamentada na Resolução Normativa nº 32 de 15 de junho de 2021, de liberação comercial do Eucalipto Geneticamente Modificado – Evento 955S024, com o respectivo Relatório de Biossegurança do Eucalipto 955S019, bem como os dados gerados em laboratório e casas de vegetação, no Brasil e em Israel, e em experimentos de campo conduzidos no Brasil.

O evento 955S024 foi desenvolvido pela Suzano, paralelamente ao evento já aprovado 955S019 (Extrato de Parecer Técnico nº 8.072/2022). A construção genética utilizada nos dois eventos é idêntica, denominada #955, que possui os genes: *cp4 epsps* e *nptII*, traduzido nas proteínas CP4 EPSPS e NPTII. Os dois eventos foram obtidos por meio da transformação genética do clone convencional FGN-S, utilizando o mesmo plasmídeo, denominado FGN#955. No evento 955S019, o T-DNA foi inserido no cromossomo 3, já no evento 955S024 o T-DNA foi inserido no cromossomo 11, ambos com sítio único de inserção.

A presente Proposta de Liberação Comercial do Eucalipto 955S024 foi elaborada de acordo com o Art. 12º da Resolução Normativa nº. 32 de 15 de junho de 2021 da CTNBio, que dispõe sobre normas para liberação comercial de Organismos Geneticamente Modificados e seus derivados, no qual foi realizada a avaliação de risco simplificada, baseada no parecer favorável da CTNBio para a Liberação Comercial do Evento 955S019, que apresenta construção genética idêntica ao evento 955S024.

A análise do sequenciamento de DNA (NGS, Sequenciamento de Nova Geração) do eucalipto 955S024, identificou duas cópias do T-DNA (construção gênica FGN#955) invertidas, com sítio único de inserção. Durante o processo de integração do T-DNA na geração do evento 955S024 obteve-se quatro cópias funcionais do gene *cp4 epsps* e duas cópias funcionais do gene *nptII*.

O eucalipto 955S024 foi produzido pelo método de transformação genética mediada por *Rhizobium radiobacter* (também reconhecido como *Agrobacterium tumefaciens*) utilizando o plasmídeo pBI121. O vetor contém os cassetes de expressão do gene *cp4 epsps*, e do gene *nptII*. A construção FGN#955 presente no eucalipto evento 955S024 possui 2 (duas) cópias do gene *cp4 epsps*, sendo uma delas regulada pelo promotor 35S do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) e a outra pelo promotor *sub-genomic transcript*(Sgt) do *Figwort mosaic virus* (FMV), sendo ambas as cópias controladas pelo terminador NOS de *Agrobacterium tumefaciens*. A expressão do gene *nptII* é regulada pelo promotor e pelo terminador 35S do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV). O promotor 35S está fusionado à sequência TEV (5'UTR, região não traduzida) do *Tobacco etch virus* (TEV), que funciona como um intensificador da tradução em plantas.

Não existem diferenças nas construções genéticas utilizadas para a obtenção dos eucaliptos geneticamente modificados 955S019 e 955S024. Os dois eventos foram obtidos por meio da transformação genética do clone convencional FGN-S, utilizando o mesmo plasmídeo, denominado FGN#955. No evento 955S019, o T-DNA foi inserido no cromossomo 3, já no evento 955S024 o T-DNA foi inserido no cromossomo 11, ambos com sítio único de inserção.

O eucalipto 955S024 foi desenvolvido com o objetivo de fornecer ao produtor florestal brasileiro mais uma alternativa simples, eficiente e ambientalmente favorável para o controle de plantas daninhas por meio da aplicação pós emergência de herbicidas a base de glifosato, sem causar dano e/ou injúria ao cultivo.

### **Caracterização Molecular**

A estrutura do T-DNA e o local de inserção no evento foram analisadas por sequenciamento de nova geração (NGS) realizado pelo BGI (<https://www.bgi.com/global/home>).

O DNA genômico do evento 955S024 foi isolado pelo método CTAB e quantificado por espectrofotometria.

O DNA genômico foi sequenciado em 150 bp *paired-end*. Leituras limpas de 90 GB de *paired-end* foram alinhados contra a sequência do plasmídeo FGN#955 usando o software *Geneious Prime* versão 11 (<http://www.geneious.com> (Kearse et al. 2012)). As leituras foram mapeadas para a sequência de T-DNA e foram usadas para montar o mapa de inserção. Leituras mapeadas para as sequências de T-DNA e para o genoma foram usadas para identificar a localização do inserto no genoma.

Duas cópias do cassete estão em posições invertidas cruzadas no primeiro promotor do CaMV 35S resultando em uma deleção das bordas direita dos dois T-DNA. Além disso, as bordas esquerdas de ambos os cassetes estão truncadas. Todos os outros elementos estão presentes e intactos em ambas as repetições.

Os dados de análise de NGS (*New Generation sequencing*) identificaram um único sítio de inserção, com duas cópias do T-DNA (construção gênica FGN#955) invertidas no genoma. Nenhuma leitura foi mapeada da região de *backbone* do vector.

Para identificar a exata localização da integração do T-DNA no genoma, leituras de NGS foram mapeadas contra a sequência do plasmídeo FGN#955. As leituras que continham a sequência do plasmídeo e a sequência do DNA genômico foram mapeadas contra a sequência genômica do clone FGN-S.

Um mínimo de 15 leituras foi mapeado para cada junção genômica e baseado nessas leituras as sequências que flanqueiam o genoma de aproximadamente 1100pb de cada lado foram montadas. De acordo com as análises de NGS, 6 pb do DNA genômico foram deletados e um fragmento de 17 pb foi inserido no sítio de inserção do T-DNA. Foi apresentado a sequência completa dos elementos inseridos com a região flanqueadora do genoma.

A região genômica do clone FGN-S que flanqueia o inserto no eucalipto 955S024 foi alinhada com o banco de dados do genoma de referência do *Eucalyptus grandis* (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>). As regiões flanqueadoras foram mapeadas para o cromossomo 11 no genoma do Eucalipto. De acordo com a referência no banco de dados, nenhum gene foi interrompido pela inserção e o gene mais próximo encontrado está cerca de 3.000 pb *upstream* do sítio de inserção.

A sequência do segundo alelo foi determinada com base na leitura dos dados de sequenciamento (NGS). A sequência final foi alinhada contra o alelo no qual o inserto está localizado (*insert allele*) e no sítio de inserção do 955S024.

### **Comparação das construções genéticas dos eucaliptos 955S019 e 955S024**

O plasmídeo FGN#955 é o mesmo que foi utilizado para a transformação dos eucaliptos 955S019 e 955S024. Essa construção, utilizada para a obtenção do 955S019 (FGN-Ø3S19-5) e 955S024 (FGN-Ø5S24-3) possui os genes, *cp4 epsps* e *nptII* e conseqüentemente expressa as proteínas CP4 EPSPS e NPTII.

Uma vez que o plasmídeo é o mesmo, as regiões reguladoras do gene *nptII* também são as mesmas, sendo compostas pelo promotor do 35S de *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) e pelo terminador do CaMV. Um dos

genes *cp4 epsps* na construção FGN#955 é regulado pelo promotor 35S do CaMV e pelo terminador NOS de *Agrobacterium tumefaciens*, e possui o peptídeo de trânsito CTP2 na região 5' do gene. O segundo cassete de expressão do gene *cp4 epsps* é regulado pelo promotor *sub-genomic transcript* (Sgt) do *Figwort mosaic virus* (Bhattacharyya et al., 2002) e pelo terminador NOS de *Agrobacterium tumefaciens*.

Durante o processo de integração do T-DNA na geração do evento 955S024 obteve-se quatro cópias funcionais do gene *cp4 epsps* e duas cópias funcionais do gene *nptII*.

### **Descrição da construção genética utilizada**

A construção genética utilizada para a obtenção do evento de eucalipto tolerante ao glifosato 955S019, já aprovado pela CTNBio, é a mesma construção utilizada para a obtenção do 955S024.

O T-DNA do vetor pBI121 contém, após as modificações por clonagem, três cassetes de expressão, dois para o gene *cp4 epsps* e outro para o gene *nptII* (ou neo). O primeiro cassete no T-DNA contém a sequência codificadora do gene *cp4 epsps* ligada ao peptídeo de trânsito para cloroplasto (CTP2) de *Arabidopsis thaliana*. Esse cassete é regulado pelo promotor 35S do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), que está ligado ao *enhancer Omega*, e o terminador NOS na extremidade 3'. O segundo cassete no T-DNA, que continha originalmente a sequência codificadora do gene *nptII*, para expressão da enzima neomicina-fosfotransferase tipo II (NPTII), regulada pelo promotor e terminador NOS, foi substituído pela sequência codificadora do gene *nptII* otimizada para eucalipto sob o controle do promotor 35S ligado a sequência *enhancer* do *Tobacco etch virus* (TEV) e o terminador CaMV na extremidade 3'. Posteriormente foi adicionada mais uma sequência do gene *cp4 epsps* sob o controle do promotor Sgt do FMV e pelo terminador NOS.

O cassete de expressão do gene *neomycin phosphotransferase II* (*nptII*), controlado pelo promotor e terminador NOS do plasmídeo pBI121 original, foi substituído pelo gene sintético (Genewiz) contendo a sequência codante (CDS) do gene *nptII* otimizada para expressão em *Eucalyptus*, sob o controle do promotor 35S de *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), fusionado a sequência *enhancer* do *Tobacco etch virus* (TEV) e o terminador CaMV na extremidade 3'. Este cassete foi clonado usando as enzimas de restrição BstZ17I/PmeI -HindII.

O sítio da enzima de restrição MfeI *downstream* à borda esquerda foi eliminado e substituído por um fragmento de DNA de 17 pb.

Um cassete de expressão de DNA sintético (Genewiz) do gene *ctp2-cp4 epsps*, controlado pelo promotor sgt de FMV e pelo terminador NOS, foi clonado *downstream* do cassete de expressão do gene *nptII* no vetor pBI121, modificado usando as enzimas de restrição HindIII-EcoRI.

Um segundo cassete de expressão de DNA sintético (Genewiz) do gene *ctp2-cp4 epsps* controlado pelo promotor 35S do CaMV, fusionado com uma região não traduzida  $\Omega$  (5'UTR) do *Tobacco mosaic virus* (TMV) e o terminador NOS, foi clonada *upstream* ao cassete do gene *nptII* usando o sítio da enzima de restrição FseI. O plasmídeo gerado após as modificações foi nomeado de FGN#955.

### **Aspectos ambientais**

A requerente realizou ensaios de características fenotípicas de plantas do eucalipto 955S024 (após aplicações do herbicida glifosato dirigida sobre as plantas, aos 30 e 60 dias após o plantio), e de plantas do genótipo base, FGN-S (manejo convencional, protegendo as plantas do contato com o herbicida glifosato). Não houve interferência no desenvolvimento de árvores do eucalipto 955S024, mesmo após aplicações dirigidas sobre as plantas, aos 30 e 60 dias após o plantio, com o herbicida glifosato (2,0 Kg equivalente ácido por hectare), por meio da comparação com o clone convencional FGN-S, manejado sem aplicações do herbicida glifosato (controle mecânico das plantas daninhas)

A requerente solicita isenção do plano de monitoramento pois não foram identificados riscos não negligenciáveis na avaliação de risco do eucalipto 955S019, nem na avaliação de risco simplificada do eucalipto 955S024. De acordo com o Artigo 18 da Resolução Normativa nº 32, de 15 de junho de 2021, que dispõe sobre as normas para liberação comercial e monitoramento de animais e vegetais Geneticamente Modificados - OGM e seus derivados de origem vegetal e animal, estarão isentos de monitoramento pós-liberação comercial, OGMs de Classe de Risco 1 que não tiverem identificação de risco não negligenciável.

### **Plano de Monitoramento**

A requerente não apresentou plano de monitoramento, justificando que não foram identificados riscos não negligenciáveis na avaliação de risco simplificada do eucalipto 955S024 realizada de acordo com o Artigo 12o, do Capítulo IV, da Resolução Normativa No 32, de 15 de junho de 2021. Dessa forma, requerente não apresenta plano de monitoramento pós-liberação comercial conforme parágrafo 1º, do artigo 18º da Resolução Normativa No 32.

## 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, exceto nas Áreas de Proteção Ambiental”.

## Parecer Final

A requerente Suzano S.A. solicita neste processo a Liberação comercial do eucalipto 955S024, portador dos genes *cp4 epsps* e *nptII*, os quais conferem tolerância ao herbicida glifosato e resistência a antibióticos do grupo dos aminoglicosídeos. Ante aos dados apresentados pela proponente, que avaliaram a biossegurança do eucalipto transgênico 955S024 em comparação ao seu clone convencional, conclui-se que o cultivo do eucalipto 955S024 não é potencialmente causador de risco não negligenciável ao ambiente, ou a saúde animal ou humana, superior ao cultivo de eucalipto convencional, despidendo, portanto, o plano de monitoramento, conforme preconiza o Art. 3º. Inciso IX da Resolução Normativa 32. As avaliações incluíram quantificação do nível de expressão das proteínas, análise de composição química, avaliação de características agronômicas, estudo de organismos não alvo (NTO), estudo de biodegradabilidade, interação das plantas com patógenos, estudo de análise química, física e microbiota do solo.

Tendo em vista as análises e resultados apresentados, levando em consideração que o evento 955S024 utiliza os mesmos genes e construção do evento 955S019, Processo 01245.002847/2022-32, aprovado comercialmente pela CTNBio, o histórico seguro de utilização dos genes *EPSPS* e *NPTII* em centenas de organismos geneticamente modificados, não foi possível observar riscos não negligenciáveis no processo.

A utilização de OGMs com genes *EPSPS* e *NPTII* tem um histórico seguro de utilização de mais de 20 anos em relação a biossegurança, portanto também aprovo a solicitação de isenção do plano de monitoramento pós-liberação comercial solicitado.

No âmbito das competências do art. 14 da Lei 11.105/05, bem como os critérios internacionalmente aceitos para avaliação de segurança de alimentos e matérias primas geneticamente modificadas, considera-se que os dados de biossegurança do evento **atendem** às normas e à legislação pertinente que visam garantir a biossegurança do meio ambiente,

agricultura, saúde humana e animal. Assim, atendidas as condições descritas no processo e neste parecer técnico, essa atividade **não é** potencialmente causadora de significativa degradação do meio ambiente ou saúde humana/animal.

**Data:** 03/02/2023

**Dr. Paulo Augusto Vianna Barroso**  
**Presidente da CTNBio**