



COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA
PARECER TÉCNICO Nº 180/2023/SEI-CTNBio - Membros
PARECER TÉCNICO 8393/2023

Processo: 01245.022752/2022-35

Requerente: SUZANO S.A

Assunto: Liberação Comercial do Eucalipto geneticamente modificado 1521K059 e seus derivados

CQB: 325/11

Presidente da CIBio: Ana Cristina Pinheiro

Classe de Risco: 1

Reunião: 259a. Reunião Ordinária ocorrida em 02/03/2023

Decisão: DEFERIDO

Fundamentação Técnica

A requerente, solicita à CTNBio a emissão de decisão técnica para liberação comercial do eucalipto FGN-Ø6K59-4, denominado 1521K059, nos termos da Resolução Normativa no 32 de 15 de junho de 2021 da CTNBio, do Decreto no 5.591, de 22 de novembro de 2005 e da Lei no 11.105, de 24 de março de 2005.

O eucalipto 1521K059 é portador dos genes cry2Aa, cry1Ab e cry1Bb, que codificam proteínas derivadas da bactéria *Bacillus thuringiensis*, conferindo resistência a inseto-pragas da ordem Lepidoptera, especificamente da família Geometridae, como a *Thyrinteina arnobia*, considerada uma das principais pragas do eucalipto no Brasil. Os dados apresentados pela requerente são oriundos de 9 ensaios, cada um em diferentes localidades do território nacional, que forneceram os elementos probatórios para a presente solicitação.

A requerente informa que o eucalipto 1521K059 será cultivado e processado da mesma forma que seu clone convencional FGN-K, uma vez que ambos são

equivalentes em características silviculturais e na composição química, diferindo apenas quanto a sua característica inseticida sobre determinadas ordens ou espécies de insetos praga, Método de Transformação Genética

O eucalipto 1521K059 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 dos genes *cry2Aa*, *cry1Ab* e *cry1Bb*, que codificam proteínas provenientes de *B. thuringiensis*, além da expressão do gene *nptII*, que codifica a neomicina fosfotransferase tipo II (NPTII), oriundo de *Escherichia coli*. A construção presente no eucalipto evento 1521K059 possui uma cópia do gene *cry2Aa* regulada pelo promotor 35S do Cauliflower mosaic virus (CaMV) e pelo terminador NOS de *A. tumefaciens*; uma cópia do gene *cry1Ab* regulado pelo promotor 35S e pelo terminador NOS de *A. tumefaciens*; uma cópia do gene *cry1Bb*, regulado pelo promotor e terminador da Rubisco (pRBS) e uma cópia do gene *nptII* que é controlado pelo promotor 35S e pelo terminador poliA do CaMV.

Os genes *cry* inseridos no eucalipto 1521K059 codificam as proteínas Cry2Aa, Cry1Ab e Cry1Bb, de aproximadamente 70.86 kDa (633 aminoácidos), 69.76kDa (622 aminoácidos) e 74.06 KDa (655 aminoácidos), respectivamente, que conferem resistência a *T. arnobia*.

A caracterização do T-DNA inserido no eucalipto 1521K059 foi realizada por meio de análises de sequenciamento de DNA (New Generation Sequencing - NGS). Os resultados mostraram que o eucalipto 1521K059 contém uma inserção do T-DNA no genoma, com uma cópia funcional dos genes *cry2Aa*, *cry1Ab*, *cry1Bb* e *nptII*. As análises de sequenciamento confirmaram a ausência de sequências indesejadas de DNA no genoma do eucalipto, como por exemplo fragmentos do plasmídeo bacteriano. Os estudos de segregação do inserto em progênies obtidas por meio de cruzamentos controlados envolvendo o eucalipto 1521K059 e matrizes convencionais não transformadas, confirmaram a segregação mendeliana para o T-DNA.

As proteínas Cry2Aa, Cry1Ab, Cry1Bb e NPTII foram caracterizadas bioquimicamente e quantificadas por meio de análise ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). A expressão das proteínas foi avaliada em folhas jovens, folhas maduras, ramos, raízes e em grãos de pólen.

O vetor binário pBI121 foi utilizado na transformação de células de eucalipto para a obtenção do evento 1521K059. Este vetor foi originalmente desenvolvido com o propósito de ser um vetor de uso geral para transformação de vegetais com variações de construções usando a região codificadora do gene β -glucuronidase (GUS) de *E. coli*, para uso em análises de expressão .

Sua região externa ao T-DNA (de 8565 pb) foi construída com base no vetor Bin 19. O plasmídeo recebeu o inserto dos genes cry2Aa, cry1Ab, cry1Bb e nptII juntamente com seus elementos reguladores, construído pela Suzano S.A. (FuturaGene – Divisão de Biotecnologia). O plasmídeo pBI121 é um vetor plasmidial T-DNA, que contém em seu espectro de hospedeiros as bactérias *E. coli* e *A. tumefaciens*. Seu tamanho original total, com o cassete de expressão dos genes nptII e gus, é de 14.758 pb, sendo seu tamanho final, após a substituição desses cassetes pelos cassetes de expressão dos genes cry2Aa, cry1Ab, cry1Bb e nptII é de 21.501 pb

Avaliação de risco à saúde Humana

Potenciais efeitos tóxicos ou alergênicos das proteínas Cry2Aa, Cry1Ab, Cry1Bb e NPTII, foram analisados por meio de análises de bioinformática, não indicando homologias significativas com alérgenos ou toxinas conhecidas. Todas as 4 (quatro) proteínas foram termolábeis e hidrolisadas rapidamente em fluidos gástricos e intestinais simulados. Os resultados da avaliação de segurança geral das proteínas Cry2Aa, Cry1Ab, Cry1Bb e NPTII não indicam possíveis efeitos alergênicos ou tóxicos.

Foram realizados estudos de composição química de folhas comparando o evento geneticamente modificado 1521K059 com o respectivo clone convencional, além de compará-lo a outros clones convencionais utilizados como referências comerciais. Foram quantificados os teores de proteínas totais, extrato etéreo, carboidratos, resíduo mineral fixo, valor energético, minerais, fibras e umidade. Os resultados comprovaram que o eucalipto 1521K059 não difere do eucalipto convencional em sua composição química, exceto pela presença e expressão dos genes cry2Aa, cry1Ab e cry1Bb, que conferem resistência a insetos-praga da família Geometridae, como a *T. arnobia*, e do gene nptII, que confere tolerância ao antibiótico Canamicina, atuando como marcador de seleção.

O T-DNA do vetor pBI121 contém, após as modificações por clonagem, 4 (quatro) cassetes de expressão, para os genes cry2Aa, cry1Ab, cry1Bb e nptII. O primeiro cassete no T-DNA contém a sequência codificadora do gene cry2Aa regulado promotor CaMV 35S fusionado ao intron do Fator de Elongação de *Eucalyptus* spp. (EF1) (Eucgr.J01112) e terminador NOS. O segundo cassete no T-DNA contém a 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 a sequência do gene cry1Bb sob o controle do promotor e terminador da Rubisco de *Eucalyptus* spp. (RbcS; Eucgr.J01502.2). Por último está o cassete de expressão do gene cry1Ab

regulado pelo promotor 35S, fusionado pelo enhancer Omega, e pelo terminador NOS.

O cassette 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* spp., 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 cassette foi clonado usando as enzimas de restrição BstZ17I/PmeI -HindII.

O cassette da beta-glucuronidase (GUS) foi retirado usando a enzima de restrição EcoRI.

O cassette de expressão de DNA sintético (GENEWIZ) de cry2Aa controlado pelo promotor CaMV 35S fusionado ao intron do Fator de Elongação de *Eucalyptus* (EF1) (Eucgr.J01112) e terminador NOS, foi clonado antes do cassette do nptII no pBI121 modificado usando o sítio da enzima de restrição FseI.

Um segundo cassette de expressão de DNA sintético (Genewiz) do gene cry1Ab controlado pelo promotor CaMV 35S, fusionado pela região 5' não traduzida (5'UTR) Ω do Tobacco mosaic virus (TMV) e terminador NOS, foi clonado posterior ao cassette de expressão do nptII usando o sítio da enzima de restrição EcoRI.

Um terceiro cassette de expressão de DNA sintético (Genewiz) do gene cry1Bb, controlado pelo promotor da subunidade pequena da RuBisCO de *Eucalyptus* (RbcS; Eucgr.J01502.2), fusionado a região 5' não traduzida (5'UTR) do RbcS e terminada com a região 3' UTR e o terminador da RbcS. Esta sequência foi clonada posterior a sequência do cassette de expressão do gene cry1Ab usando o sítio da enzima de restrição AsiSI.

Todas as sequências codantes dos genes cry foram otimizadas para *Eucalyptus* spp. O plasmídeo geral foi nomeado como FGN#1521

A sequência nucleotídica do vetor binário FGN#1521 foi verificada por análise de enzima de restrição e sequenciamento de nova geração (Next Generation Sequencing - NGS).

O vetor binário, plasmídeo FGN#1521, foi extraído de *E. coli* de uma cultura líquida crescida overnight (37 °C, 200 RPM, LB + Km 50 µg/mL) usando o Plasmid PlusMidi Kit da QIAGEN (cat#A12943).

Cerca de 1.5 µg de DNA plasmidial foi digerido pelas seguintes enzimas de restrição: FseI (NEB R0588S) 4 unidades, AscI (NEB R0558S) 20 unidades, NsiI (Thermo ER0731) 20 unidades, MfeI (NEB R0589S) 20 unidades, XmaI (NEB R0180S) 20 unidades e SphI (NEB R0182S) 20 unidades. Cada reação foi suplementada com 3 µL do tampão de reação x10 e água foi usada para completar o volume final para 30 µL. A reação foi incubada a 37 °C por 2 horas com metade da quantidade de unidade das enzimas. Então, uma segunda quantidade de unidade de enzimas foi adicionada na reação e incubada a 37 °C por 2 horas adicionais. Posteriormente, a reação foi inativada por aquecimento a 65 °C por 20 minutos. O volume total foi carregado no gel de agarose 1,2% em TBE, separado por 2,5 horas em 150 V e incubado em EtBr por 3 horas.

A análise de NGS foi realizada e o DNA genômico foi isolado e quantificado por espectrofotômetro. Para construir a biblioteca, aproximadamente 100 ng de DNA genômico foi quebrado em fragmentos de aproximadamente 250 pb de comprimento, isolado com a Nextflex Rapid XP DNA-Seq kit da Plataforma da Illumina (Perkin Elmer), como descrito pelo fabricante. A concentração da biblioteca foi mensurada por Qubit e o tamanho foi verificado pelo TapeStation. A biblioteca foi então carregada no equipamento Miseq da Illumina e sequenciado usando o kit Miseq V2 (500 ciclos) para gerar leituras de 2x250 paired-end e concluiu-se que Leituras limpas foram alinhadas contra a sequência do vetor FGN#1521 usando o programa Geneious versão 11.

O produto da expressão dos genes cry2Aa, cry1Ab, cry1Bb e nptII foi avaliado por teste imunoenzimático ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), para detectar e quantificar a concentração das proteínas Cry2Aa, Cry1Ab, Cry1Bb e NPTII nos diferentes tecidos do eucalipto 1521K059 e em diferentes estágios de desenvolvimento da cultura.

Avaliação de Risco ao ambiente

A significância do padrão de segregação foi avaliada pela análise de Qui-quadrado (χ^2) em progênies F1 do eucalipto 1521K059 (utilizado como genitor feminino), produzida por meio de polinizações controladas, utilizando pólen dos genitores masculinos convencionais (FGN-L, FGN-P e FGN-AL). As sementes oriundas dos cruzamentos foram utilizadas para a produção de mudas, por meio do semeio em tubetes plásticos contendo substrato orgânico. Amostras de tecido foliar foram colhidas nas mudas produzidas a partir de sementes dos três cruzamentos (1521K059 x FGN-L, 1521K059 x FGN-P e 1521K059 x FGN-AL) e enviadas para análise no laboratório de biologia molecular. O resultado das análises dos dados das progênies obtidas

emcruzamentos como o eucalipto 1521K059, indicam que as frequências observadas de plantas com os genes cry2Aa, cry1Ab, cry1Bb e nptII seguem a proporção de 1:1, indicando segregação mendeliana do T-DNA nas 3 (três) progênies avaliadas

Nenhum efeito pleiotrópico ou epistático foi observado em plantas do eucalipto 1521K059 decorrentes da presença dos genes cry2Aa, cry1Ab, cry1Bb e nptII, quer em características fenotípicas, agronômicas, morfológicas, reprodutivas e composicional em experimentos em contenção, realizados desde sua obtenção em casa de vegetação, e a campo, realizados sob Liberações Planejadas no Meio Ambiente (LPMAs),

Não foram observadas diferenças significativas nas características fenotípicas estudadas entre plantas GM do eucalipto 1521K059 quando comparadas às plantas do eucalipto convencional, em várias fases de desenvolvimento das árvores, exceto pela sua capacidade de apresentar resistência à lagartas da ordem Lepidoptera, pela introdução dos genes cry2Aa, cry1Ab, cry1Bb e nptII na planta, através de transformação mediada por *Agrobacterium*.

A requerente realizou ensaios para avaliar a emergência de plântulas de eucalipto em condições de campo em duas localidades onde o eucalipto é cultivado pode-se concluir que: Mesmo em condições favoráveis dificilmente o eucalipto se estabelece via sementes em condições de campo; O eucalipto 1521K059 não diferiu estatisticamente de seu controle convencional correspondente FGN-K, na porcentagem de germinação; Após 60 dias do semeio em campo, nenhuma nova germinação ocorreu até o final do teste aos 90 DAI (dias após a instalação).

Os resultados das avaliações fenotípicas indicam que o eucalipto 1521K059 não possui características que possam conferir um risco de impacto significativo ao ambiente ou de se tornar invasor (com aumento da sua adaptabilidade ou invasibilidade), quando comparada ao eucalipto clone convencional FGN-K. Dados de interações ecológicas também indicam que o eucalipto 1521K059 não confere nenhuma suscetibilidade ou tolerância maior à doenças. Os dados de composição também suportam a conclusão sobre a equivalência química do eucalipto 1521K059 e do eucalipto convencional FGN-K.

Testes de toxicidade da proteína Cry2Aa foram realizados em organismos não- alvo associadas à silvicultura do eucalipto GM, incluindo polinizadores como as abelhas (*Apis mellifera*), organismos do solo como a minhoca (*Eisenia fetida*) e colêmbolos (*Folsomia candida*), e microcrustáceos como a *Daphnia magna*. As NOECs desses estudos foram comparadas com as estimativas de exposição ambiental EECs da proteína Cry2Aa de eucalipto,

visando determinar uma margem de exposição ambiental segura da proteína a organismos não-alvo.

Os dados de características químicas e físicas de solos analisados de parcelas experimentais do eucalipto geneticamente modificado 1521K059, de seu clone convencional FGN-K, e de duas referências comerciais FGN-T e FGN-P, em 4 localidades, no pré-plantio (baseline) e 24 meses após o plantio, permitem concluir:

Pela uniformidade das características químicas e físicas do solo antes do plantio, demonstrou-se que as condições de solo da área experimental foram adequadas para permitir uma análise comparativa do efeito dos diferentes clones de eucalipto nas propriedades químicas e físicas dos solos onde foram cultivados.

O eucalipto 1521K059 não alterou as características químicas e físicas do solo que pudessem diferenciá-lo de seu controle convencional FGN-K.

O eucalipto geneticamente modificado 1521K059 (tratamento 2) e seu controle não geneticamente modificado, Isolinha FGN-K (tratamento 3), foram similares no período de degradação da matéria nas variáveis avaliadas, e apresentaram, na maioria dos casos, semelhança com a perda de matéria das referências comerciais convencionais.

A maior decomposição da biomassa dos materiais dos 4 clones ocorreu entre 120 e 180 dias de deposição das amostras no solo.

Ocorreu diferença na decomposição da biomassa em função do local avaliado. Essas diferenças da decomposição da biomassa entre os locais é esperada pois condições edafoclimáticas específicas estão presentes entre os agroecossistemas avaliados.

Parecer Final

A requerente apresentou as informações solicitadas pela RN nº 32/2021. Não houve identificação de riscos não-negligenciáveis na avaliação de risco conduzida. Portanto, e de acordo com as disposições da RN 32/2021 não apresentou plano de monitoramento pós-liberação comercial (pág. 461).

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 1521K059 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.

Data: 02/03/2023

Paulo Augusto V. Barroso
Presidente da CTNBio