



**COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA
PARECER TÉCNICO Nº 1519/2022/SEI-CTNBio - Membros**

Processo: 01245.019073/2022-89

Requerente: Suzano S.A

Data de Protocolo: 25/10/2022

SEI: 10554398

CQB: 325/11

Endereço: Av. Dr. José Lembo, 1010 – s/A – Jardim Bela Vista – Itapetininga/SP

Presidente da CIBio: Eduardo José de Mello

Extrato Prévio:

Assunto: Liberação comercial de Eucalipto geneticamente modificado – Evento 955P082

Descrição do OGM: Eucalipto geneticamente modificado – Evento 955P082

Decisão: DEFERIMENTO

Reunião:

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 955P082, com o respectivo Relatório de Biossegurança com os dados gerados em laboratório e casas de vegetação, e em experimentos de campo conduzidos no Brasil.

O evento 955P082 foi desenvolvido pela Suzano, paralelamente ao eucalipto geneticamente modificado evento 955S019 aprovado pela CTNBio (Extrato de Parecer Técnico nº 8.072/2022). A construção genética utilizada nos eventos 955P082 e 955S019 é a mesma denominada FGN#955, que possui os genes: cp4 epsps e nptII, traduzido nas proteínas CP4 EPSPS e NPTII. Não há diferença nas regiões reguladoras entre os dois eventos, como promotores e terminadores. A diferença entre os dois eventos está no clone convencional utilizado como base para transformação genética e na localização do inserto no genoma.

O eucalipto 955P082 expressa as proteínas CP4 EPSPS e NPTII. As plantas do eucalipto, evento 955P082, 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. O germoplasma de eucalipto que foi utilizado como recipiente inicial dos genes exógenos para obtenção do eucalipto evento 955P082 é um clone híbrido de *Eucalyptus urophylla*, denominado FGN-P. A análise de sequenciamento do DNA (NGS, Sequenciamento de Nova Geração) identificou duas cópias invertidas do T-DNA da construção FGN#955 em um único sítio de inserção no genoma do eucalipto 955P082.

Caracterização Molecular

O eucalipto 955P082 foi produzido pelo método de transformação genética mediada por *Rhizobium radiobacter*1 (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 955P082 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 dois eucaliptos geneticamente modificados 955S019 e 955P082. O eucalipto 955S019, já aprovado pela CTNBio, foi obtido por meio da transformação genética do clone convencional FGN-S, já o eucalipto 955P082, foi obtido por meio da transformação genética do clone convencional FGN-P. O mesmo plasmídeo, denominado FGN#955, foi utilizado para obtenção dos dois eventos geneticamente modificados. A obtenção de eventos geneticamente

modificados utilizando uma mesma construção genética, mas utilizando como recipientes clones convencionais distintos, é fundamental para garantir a introgressão da característica de tolerância ao herbicida glifosato em outras bases genéticas, viabilizando a utilização da característica em regiões com características edafoclimáticas diferentes, além de evitar o estreitamento da base genética da população de melhoramento genético. Além disso, algumas particularidades inerentes ao melhoramento genético do eucalipto exigem que diferentes genótipos sejam transformados geneticamente com uma mesma característica biotecnológica de interesse, como por exemplo, a depressão endogâmica, que inviabiliza a realização de retrocruzamentos e o longo ciclo de melhoramento (~12 anos). No presente caso, os dois eventos tolerantes ao herbicida glifosato foram gerados por processos de transformação independentes. O evento 955S019 obteve a inserção do T-DNA no cromossomo 03, do clone recipiente FGN-S (*E. urophylla*), já no evento 955P082 a inserção do T-DNA foi no braço superior do cromossomo 06 com uma recombinação com o braço inferior do cromossomo 02, do clone recipiente FGN-P (*E. urophylla*).

A caracterização do T-DNA inserido no eucalipto 955S019 foi realizada por meio de análises de Southern blot e sequenciamento de DNA (NGS). Os resultados mostraram que o eucalipto 955S019 contém uma inserção do T-DNA no genoma, com duas cópias funcionais do gene cp4 epsps e uma cópia funcional do gene 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 955S019 e matrizes convencionais não transformadas, confirmaram a segregação mendeliana para o inserto, contendo os genes cp4 epsps e nptII, comprovando a integridade do evento 955S019, por meio da estabilidade da segregação do inserto nas progênies. As proteínas CP4 EPSPS e NPTII foram caracterizadas bioquimicamente e quantificadas através de análise ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) específica. A expressão das proteínas foi avaliada em folha jovem, folha madura, ramo e pólen. Uma abordagem passo a passo de peso de evidência foi usada para avaliar o potencial de efeitos tóxicos ou alergênicos das proteínas NPTII e CP4 EPSPS. Análises de bioinformática da sequência de aminoácidos não revelaram homologias significativas com alérgenos ou toxinas conhecidas. Ambas proteínas foram termo lábeis e hidrolisadas rapidamente em fluidos gástricos e intestinais simulados. As proteínas não causam efeitos adversos em estudos de toxicidade oral aguda em camundongos (Schafer, 2021 relatório 210019). O baixo nível das proteínas NPTII e CP4 EPSPS presentes no eucalipto 955S019 em relação às proteínas vegetais totais representa baixo risco de exposição. Além disso, os resultados da avaliação de segurança geral das proteínas NPTII e CP4 EPSPS não indicam possíveis efeitos alergênicos ou tóxicos.

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-P. As análises de NGS revelaram uma translocação entre o cromossomo 06 (Chr06) e o cromossomo 02 (Chr02) no clone FGN-P (Figura 7). Cerca de 6.361.614 bp do Chr02 foram translocados com 14.376.600 bp do Chr06 resultando em recombinações no evento 955P082 (Figuras 7 e 8B). Neste processo de recombinação, 67 pb do DNA genômico foram deletados do Chr06 e 62 pb foram deletados do Chr02. O ponto de translocação no FGN-P está em torno de Chr06: 41372000 e Chr02: 53848600 no genoma de referência do *Eucalyptus grandis* (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>). No rearrajamento estável do cromossomo do 955P082, a repetição-invertida do T-DNA está localizada no braço superior do Chr06 e a aproximadamente 5 MBb do braço inferior do cromossomo Chr02 (Figura 9). A sequência completa do T-DNA está apresentada na Figura 10.

Aspectos ambientais

A requerente encaminha a avaliação de risco simplificada, baseada no parecer favorável da CTNBio para a Liberação Comercial do Eucalipto Geneticamente Modificado Evento 955S019, que apresenta construção genética idêntica à do evento 955P082. Estudos a campo conduzidos, com autorização da CTNBio, demonstraram a eficácia e praticabilidade econômica do uso do eucalipto 955S019 em condições de cultivo no Brasil. Os resultados desses estudos demonstraram também que o eucalipto 955S019 é similar ao seu clone convencional, não transformado, em características fenotípicas e silviculturais. O eucalipto 955S019, à semelhança do eucalipto convencional, não apresenta comportamento invasivo em ecossistemas naturais. Não há vantagem competitiva para a sobrevivência ou dispersão do eucalipto 955S019, quando comparado ao eucalipto convencional. Foram realizados estudos de composição química de folhas do eucalipto 955S019 comparativamente ao clone convencional. 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 955S019 não difere do eucalipto convencional em sua composição química, exceto pela presença e expressão do gene *cp4 epsps*, que confere tolerância ao herbicida glifosato, e do gene *nptII*, que confere tolerância ao antibiótico Canamicina, atuando como marcador de seleção. As características da planta geneticamente modificada coletadas durante os testes de campo, bem como nas análises laboratoriais apresentadas neste documento, comprovam que o cultivo do eucalipto 955S019 é seguro ao meio ambiente e à saúde humana e animal, não diferindo do clone de eucalipto convencional

original, não transformado. A tecnologia presente no eucalipto 955S019 terá impacto positivo no setor florestal brasileiro, viabilizando a adoção de práticas modernas de controle de plantas daninhas, práticas já consolidadas no setor agrícola. O eucalipto 955S019 é uma alternativa importante para atender às necessidades dos produtores de eucalipto no Brasil, possibilitando redução significativa nos custos operacionais e promovendo maior segurança ambiental e melhoria nas condições de trabalho dos trabalhadores. Por esse motivo, a Suzano S.A. vem, por meio deste documento, requerer a emissão de decisão técnica para liberação comercial do eucalipto e seus derivados com o evento 955S019, nos termos da Resolução Normativa no 32 da CTNBio, do Decreto no 5.591/05 e da Lei n o 11.105/05.

Aspectos da Saúde Humana e Animal

Não existem diferenças nas construções genéticas utilizadas para a obtenção dos dois eucaliptos geneticamente modificados 955S019 e 955P082. O eucalipto 955S019, já aprovado pela CTNBio, foi obtido por meio da transformação genética do clone convencional FGN-S, já o eucalipto 955P082, foi obtido por meio da transformação genética do clone convencional FGN-P. O mesmo plasmídeo, denominado FGN#955, foi utilizado para obtenção dos dois eventos geneticamente modificados. No evento 955S019 o T-DNA está inserido no cromossomo 03 no clone convencional FGN-S, possuindo uma cópia do T-DNA proveniente da construção FGN#955. No processo de transformação do evento 955P082 ocorreu uma recombinação durante a inserção do T-DNA, sendo este inserido entre o braço superior do cromossomo 06 (upstream) e o braço inferior do cromossomo 02 (downstream). Além, dessa diferença, o 955P082 possui duas cópias invertidas do T-DNA, proveniente da construção FGN#955, em um único sítio de inserção no genoma do clone convencional, FGN-P.

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 955P082 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 que foram mapeadas para a sequência de T-DNA, foram usadas para montar o mapa de inserção. As leituras mapeadas para as sequências de T-DNA e para o genoma, foram usadas para identificar a localização do inserto no genoma. Os dados de NGS identificaram uma única inserção do T-DNA no genoma que foi inserido como uma repetição

invertida (duas cópias) com uma cópia completa do T-DNA e a segunda cópia com a sequência parcial do T-DNA contendo o gene cp4 epsps truncado.

PARECER:

A requerente Suzano S.A., por meio deste documento, requerer à CTNBio a emissão de decisão técnica para liberação comercial do Eucalipto Geneticamente Modificado – Evento 955P082, nos termos da Resolução Normativa N°. 32 da CTNBio.

A requerente informa que o evento 955P082 foi desenvolvido pela Suzano, paralelamente ao eucalipto geneticamente modificado evento 955S019 aprovado pela CTNBio (Extrato de Parecer Técnico nº 8.072/2022). A construção genética utilizada nos eventos 955P082 e 955S019 é a mesma denominada FGN#955, que possui os genes: cp4 epsps e nptII, traduzido nas proteínas CP4 EPSPS e NPTII. Não há diferença nas regiões reguladoras entre os dois eventos, como promotores e terminadores. A diferença entre os dois eventos está no clone convencional utilizado como base para transformação genética e na localização do inserto no genoma. O eucalipto 955S019, já aprovado pela CTNBio, foi obtido por meio da transformação genética do clone convencional FGN-S, já o eucalipto 955P082, foi obtido por meio da transformação genética do clone convencional FGN-P.

Em face do 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, a requerente apresentou avaliação de risco simplificada, baseada no parecer favorável da CTNBio para a Liberação Comercial do Eucalipto Geneticamente Modificado Evento 955S019, que apresenta construção genética idêntica à do evento 955P082.

Dessa forma, no âmbito das competências do Art. 14 da Lei 11.105/05, considera-se que a liberação comercial para plantio do presente eucalipto geneticamente modificado **atende** 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 e, portanto, sou **favorável ao deferimento** da solicitação da liberação comercial do Eucalipto Geneticamente Modificado – Evento 955P082 e à isenção do Plano de Monitoramento Pós-Liberação Comercial.

Data: 07/12/2022

Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini

Membro da CTNBio