

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, INOVAÇÕES E
COMUNICAÇÕES

PARECER TÉCNICO 6208/2018

Processo: 01250.033737/2018-67

Data de Protocolo: 15/06/2018

Assunto: Consulta relativa a aplicação da Resolução Normativa 16 em milho desenvolvido com técnicas inovadoras de melhoramento de precisão – TIMP

Requerente: Du Pont do Brasil

CQB: 13/97

CNPJ: 61.064.929/0043-28

Endereço: Unidade de Pesquisa e Beneficiamento de Brasília Rodovia DF 250, km 20, Núcleo Rural Santos Dumont, lote 50 CEP: 70.310-970, Caixa Postal 083 — Planaltina/DF.

Presidente da CIBio: Rutnéia Pessanha

Decisão: DEFERIDO – O presente produto se enquadra nos parâmetros da Resolução Normativa 16 da CTNBio;

Reunião: 218ª. Reunião Ordinária ocorrida em 06/12/2018

Fundamentação Técnica:

A requerente encaminha consulta a fim de obter parecer final acerca do enquadramento do Milho Ceroso CRISPR-Cas como não OGM e seus derivados, nos termos do Art. 3º da Lei Nº 11105/05 e à luz da resolução Normativa 16 da CTNBio.

Trata-se de uma variedade de milho ceroso editada pelo sistema CRISPR-Cas9. O fenótipo ceroso do milho é determinado por uma mutação no gene Wx1 localizado no cromossomo 9, que codifica a biossíntese da amilose catalisada pela enzima sintase associada aos grânulos de amido. A mutação no alelo wx1, que torna o gene não funcional, resulta na perda da produção de

enzimas funcionais, interrompendo assim a rota de síntese da amilose, conduzindo a produção de amido com quase 100% de amilopectina. Várias mutações espontâneas e induzidas no gene Wx1 levando ao fenótipo ceroso já foram relatadas em milho.

A tecnologia CRISPR-Cas foi usada para deletar o gene de milho Wx1 de linhagens de milho dentado da DuPont Pioneer, resultando no fenótipo de milho ceroso. Isto foi conseguido pela introdução de dois RNAs guias para gerar duas quebras em locais precisos da dupla fita de DNA do milho. Um RNA guia 5' (CR4) é homólogo à sequência na região do promotor do gene Wx1 à montante do suposto sítio de início da transcrição (transcription start site -TSS), e um RNA guia 3' (CR8) é homólogo à sequência na região 3' não traduzida (3'UTR) do gene Wx1. A DSB gerada foi, subsequentemente, reparada por um mecanismo celular nativo chamado Junção de Extremidades Não Homólogas (Non-Homologous End Joining — NHEJ). O resultado foi a obtenção de uma linhagem de milho com uma deleção da sequência de DNA entre os dois sítios de quebra de dupla fita de DNA, causando a inativação do gene Wx1.

O milho ceroso CRISPR-Cas foi gerado pelo bombardeamento de partículas de embriões imaturos de milho com seis plasmídeos. O plasmídeo 1 é o doador da nuclease Cas9; os plasmídeos 2 e 3 são doadores do RNA guia 5' e RNA guia 3', respectivamente, os plasmídeos 4 e 5 são doadores de dois genes auxiliares (ZM-ODP2 e ZM-WUS2) usados para melhorar a resposta para desenvolvimento de embriões e de frequência de regeneração de plantas; e o plasmídeo 6 é o doador do marcador de seleção NPTII.

A deleção do gene Wx1 diretamente nas linhagens endogâmicas elites foi obtido pela transformação dessas linhagens com os plasmídeos referidos acima. As plantas TO são sequenciadas para caracterizar a deleção do gene Wx1 em nível de nucleotídeos, como descrito pela requerente. Os ensaios de PCR quantitativo (qPCR) foram realizados nesta fase para avaliação inicial da presença/ausência de elementos genéticos chave dos seis plasmídeos de transformação. Várias plantas TO, com a deleção do gene Wx1 confirmada, foram cruzadas com a linhagem convencional. As plantas BCO (F1) resultantes, passam por uma análise molecular abrangente para (a) confirmar a deleção do gene, e (b) análise baseada no Sequenciamento de Próxima Geração (Next Generation Sequencing — NGS) para verificar a ausência de DNA plasmidial não intencional de todos os plasmídeos utilizados no processo de transformação. Esta planta BCO (F1), finalmente confirmada, foi então avançada para BC1 e outras gerações para o desenvolvimento do produto comercial. Após várias etapas de autopolinização, ela se torna uma linhagem endogâmica elite "acabada". Tal desenvolvimento e análise foram conduzidos para cada linhagem pura distinta produzida. Finalmente, duas linhagens parentais endogâmicas elites "acabadas" foram cruzadas para

produzir sementes híbridas de milho ceroso comercial CRISPR-Cas. O desenvolvimento de novas linhagens endogâmicas elites contendo a deleção do gene Wx1, como descrito aqui, é repetido em diferentes linhagens endogâmicas dentadas para o desenvolvimento de novos híbridos cerosos para uso comercial.

A tecnologia de Sequenciamento de Próxima Geração (Next Generation Sequencing — NGS) foi usada para caracterizar a deleção do gene Wx1 comparando a mesma região da sequência no milho convencional, contendo o gene Wx1 intacto, e no milho ceroso CRISPR-Cas. Conforme mencionado, a Junção de Extremidades Não Homólogas (Non Homologous End Joining — NHEJ) é um processo de reparo nativo que pode produzir uma ligeira variação no sítio de reparo da dupla fita de DNA, causando deleções ou adições adicionais (a partir de um pool celular livre) de nucleotídeos no sítio de reparo da dupla fita de DNA. Cada linhagem endogâmica distinta de milho ceroso CRISPR-Cas produzida que é posteriormente avançada foi sequenciada para caracterizar precisamente o sítio de reparo da DSB, isto é, para confirmar a deleção específica com precisão de 3.853 pb do gene Wx1-alvo e ausência de qualquer deleção ou adição de nucleotídeos ao sítio da DSB.

Para comprovar a ausência de sequências nucleotídicas, a requerente desenvolveu uma ferramenta eficiente de caracterização molecular baseada em sequenciamento, Southern-by-Sequencing (SbS). A análise SbS abrange as sequências completas de todos os seis plasmídeos e é concebida para detectar junções únicas que seriam criadas entre o DNA genômico da planta e sequências derivadas dos plasmídeos de transformação se houvesse integração do DNA do plasmídeo. Uma planta na qual não foi detectado DNA derivado de plasmídeo é selecionada e avançada para o desenvolvimento do produto comercial. O conteúdo de amilopectina foi calculado a partir destes resultados. O teor de amilopectina do amido em grãos de milho ceroso CRISPR-Cas foi aumentado em relação ao milho dentado não ceroso. Estes resultados confirmam que a deleção do gene Wx1 usando a tecnologia CRISPR-Cas resulta na alteração pretendida na composição de amido nos grãos.

Parecer final:

No âmbito das competências do art. 14 da Lei 11.105/05, a CTNBio analisou as informações contidas no pedido e considerou que as técnicas empregadas para construção do milho ceroso não resultaram em um organismo geneticamente modificado.

O presente produto se enquadra no Art. 1, parágrafo 3 da Resolução Normativa 16 da CTNBio, por atender em pelo menos, uma das seguintes características:

- I – produto com ausência comprovada de ADN/ARN recombinante, obtido por técnica que emprega OGM como parental;
- II – produto obtido por técnica que usa ADN/ARN que não se multiplicará em célula viva;
- III – produto obtido por técnica que introduz mutações sítio dirigidas, gerando ganho ou perda de função gênica, com a ausência comprovada de ADN/ARN recombinante no produto;
- IV – produto obtido por técnica onde existe a expressão, temporária ou permanente, de moléculas de ADN/ARN recombinante, sem que haja a presença ou introgressão dessas moléculas no produto;
- V – produto onde são utilizadas técnicas que empregam moléculas de ADN/ARN que, absorvidas ou não de forma sistêmica, não causam modificação permanente do genoma.

Data: 07/12/2018

Maria Sueli Soares Felipe

Presidente da CTNBio