

**COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA  
PARECER TÉCNICO Nº 1728/2021/SEI-CTNBio - Membros**

**PARECER TÉCNICO: 7831/2021**

**Processo:** 01245.009609/2020-96

**Requerente:** BASF S.A.

**Assunto:** Carta Consulta

**Data de Protocolo:** 20/10/2020

**Presidente da CIBio:** Reinaldo Barata

**CNPJ:** 48.539.407/0001-18

**Endereço:** Avenida das Nações Unidas 14.171 (Cond. Rochaverá/Torre Cristal), São Paulo – SP.

**CQB:** 031/97

**OGM:** Plantas

**Classe de Risco:** 01

**Decisão:** Deferido

**Reunião:** 245ª Reunião Ordinária ocorrida em 07/10/2021

**Descrição:**

A BASF submete à CTNBio Consulta para a confirmação de que o formulado para tratamento de sementes com base em *B. thuringiensis* serovar israelensis cepa 4Q7 que apresenta uma deleção completa do gene *glyA* (auxotrofia) e contém um cassete circularizado (vetor de expressão) que expressa a enzima  $\beta$  1,4 endoglucanase apenas quando a esporulação é induzida (processo industrial) não se enquadram no escopo da Lei Nº 11.105, de 24 de março de 2005.

**Fundamentação Técnica:**

A requerente Basf solicita Consulta sobre o status regulatório do condicionador de solo produzido com Técnicas Inovadoras de Melhoramento

de Precisão (TIMP), em observação à Resolução Normativa no. 16 da CTNBio.

Trata-se de um produto biológico constituído de esporos de *Bacillus thuringiensis israelenses* que apresenta deleção completa do gene *glyA* (que codifica a produção de glicina a partir de serina) e vetor de expressão do gene da celulase  $\beta$ -1,4 endoglucanase de *Bacillus subtilis*. As sementes revestidas com os esporos dessas bactérias, quando embebidas, liberam as celulases ancoradas na camada externa do esporo e livres no formulado, degradando a matéria orgânica ao redor das raízes, resultando em maior disponibilidade e absorção de nutrientes.

A espécie *B. thuringiensis israelenses* (Bti) não produz as proteínas cry. Usando ferramenta de recombinação homóloga, o gene *glyA* foi deletado, produzindo auxotrofia, uma vez que a bactéria modificada não é mais capaz de crescer em meio na ausência de glicina ou treonina, o qual é fonte alternativa de glicina. Essa foi a única modificação genética realizada no genoma da bactéria, sem efeitos *off-target*. Dessa forma, a única diferença dessa bactéria modificada em relação ao tipo selvagem é a ausência do *locus* de expressão do gene *glyA*.

Em seguida, foi construído um vetor de expressão com genes clonados no plasmídeo pBC16 de *Bacillus cereus*, apresentando o gene *glyA* removido da bactéria Bti; o promotor *bclA* dessa bactéria que regula a transcrição da ORF que fusiona com o gene da celulase; a tag *bclA* 20-35 aa dessa bactéria que codifica o peptídeo da sequência BclA que ancora a proteína de fusão na camada externa do esporo; um linker sintético que associa BclA, tag e celulase; o gene *egl5* de *Bacillus subtilis* que codifica a celulase; e *repU* e *oriU* de *Bacillus cereus* que iniciam a replicação. No final, foi feita a circularização da sequência selecionada para formar o vetor de expressão somente com sequências do gênero *Bacillus*.

O vetor leva à expressão do gene da  $\beta$ -1,4 endoglucanase e permanece dentro da célula pela pressão de seleção resultante da ausência de glicina no meio de fermentação. Durante a produção industrial, a bactéria Bti é induzida ao processo de esporulação e durante a formação do esporo, a celulase é levada à parede externa do esporo, pois o gene da celulase está fusionado ao gene da glicoproteína (BclA) específica da camada externa do esporo. O caldo fermentado contendo esporos com as celulases ancoradas ou não à camada externa (pode haver celulases livres) vai ser adicionado de outros ingredientes e usado para revestir as sementes. Desta forma, as celulases ficam imobilizadas dentro da camada de revestimento da semente. Destaca-se que a expressão do gene da celulase só ocorrerá durante o processo de formação do esporo.

Análises de sequenciamento mostraram que o plasmídeo não se integrou ao genoma da bactéria Bti, não ocorrendo evento de recombinação entre o vetor de expressão e o cromossomo. O vetor foi modificado para a retirada de elementos conjugativos e de mobilidade.

A requerente pondera que, caso os esporos germinem no solo (em condições favoráveis), pelo fato de a concentração de glicina e treonina no solo ser elevada, o vetor de expressão seria perdido com o tempo, pois a presença dele (contendo o gene *glyA*) confere vantagem seletiva somente em meios sem a presença de glicina e treonina. A requerente mostra os resultados de um ensaio onde o vetor de expressão é perdido após sucessivos cultivos da bactéria modificada em meios com alta concentração de glicina e treonina.

Além disso, para haver a expressão do gene heterólogo da celulase, as células resultantes da germinação dos esporos precisariam passar por novo ciclo de esporulação, uma vez que a expressão da celulase está ligada à deposição de glicoproteína na camada externa do esporo.

A requerente considera que o produto biológico pode ser considerado no âmbito da RN16 por utilizar ferramentas de biologia molecular para obter genes heterólogos (item 8 nas considerações iniciais da RN16) e atender à característica V do artigo 1º, inciso 3º: “*produto onde são utilizadas técnicas que empregam moléculas de ADN/ARN que, absorvidas ou não de forma sistêmica, não causam modificação permanente do genoma*”.

#### **PARECER:**

Face às informações e dados aportados originalmente pela requerente e complementados após diligência do processo, a CTNBio considerou os seguintes fatos para concluir sobre o *status* regulatório do microrganismo em questão: a) o vetor de expressão não se integra ao genoma, não causando, portanto, modificação permanente do genoma; b) o vetor de expressão contendo o gene heterólogo contém sequências unicamente do gênero *Bacillus*; c) o vetor de expressão não seria mantido dentro da célula devido às concentrações de aminoácidos glicina e treonina normalmente presentes no solo que causariam perda do vetor de expressão; d) a cepa sem o vetor de expressão somente difere da cepa original pela deleção do gene *glyA*, removido por recombinação homóloga e sem resíduos de plasmídeo ou DNA exógeno; e) não há possibilidade de transferência do vetor de expressão por conjugação ou transdução para outros organismos porque os elementos conjugativos e de mobilidade foram removidos; f) a possibilidade de ocorrer transformação é muito remota devido a uma série de obstáculos que precisariam ser transpostos para a absorção do vetor de expressão por outros organismos.

As considerações acima atendem ao disposto na Resolução Normativa 16, no item 1 das considerações iniciais, que trata da utilização de ferramentas de biologia molecular que resultem na edição precisa do genoma através de indução de mutações específicas (caso da deleção completa do gene *glyA* por ferramenta de recombinação homóloga), no item 8 das considerações iniciais para utilização de ferramentas de biologia molecular para obter genes heterólogos (caso do gene da celulase), e à característica V do artigo 1º, inciso 3º: “*produto onde são utilizadas técnicas que empregam moléculas de ADN/ARN que, absorvidas ou não de forma sistêmica, não causam modificação permanente do genoma*”.

A CTNBio recomenda que a requerente monitore a tecnologia em situação de campo quando for possível, uma vez que dispõe de dois biomarcadores que permitirão detectar a indução de novo ciclo vegetativo no solo. Esses resultados podem ser importantes para consolidação da tecnologia em diferentes situações de campo.

Após analisar a Carta Consulta da BASF S.A sobre o enquadramento de *Bacillus thuringiensis* serovar israelensis cepa 4Q7 que incorpora uma proteína de interesse ( $\beta$  1,4 endoglucanase de *Bacillus subtilis*) estabilizada na camada mais externa do esporo, produzido com Técnicas Inovadoras de Melhoramento de Precisão (TIMP), a CTNBio concluiu, de acordo com a Resolução Normativa 16, não se tratar de um organismo geneticamente modificado, não se enquadrando nas definições do artigo 3º da Lei N° 11.105, de 24 de março de 2005 e não estando sujeito ao processo regulatório de organismos geneticamente modificados.

**Data:** 06/12/2021

(assinado eletronicamente)  
**Dr. Paulo Augusto Vianna Barroso**  
**Presidente da CTNBio**