

PARECER TÉCNICO Nº 4465/2015

Processo nº: 01200.005952/2013-59

Data de Protocolo: 11/12/2013

Requerente: Du Pont do Brasil S.A. - Divisão Pioneer Sementes

CQB: 013/97

Total de Páginas: 381

CNPJ: 49.156.326/0001-00

Endereço: Av. das Nações Unidas, 18001, 4º Andar, 04795-900, São Paulo, SP

Presidente da CIBio: Goran Kuhar Jezovsek

Extrato Prévio: 3923/2014 publicado em 02/01/2014

Reunião: 181ª Reunião ordinária, ocorrida em 9 de abril de 2015.

Decisão: Deferido

Título da proposta: “Liberação comercial de híbridos de milho contendo a combinação de eventos que já obtiveram Parecer Técnico favorável da CTNBio, obtidos por cruzamento convencional: TC1507 x MON810 x MIR162”.

Descrição do OGM: Evento combinado DAS- Ø15Ø7-1 (TC1507) x MON-ØØ810-6 (MON810) x SYN-IR162-4 (MIR162), expressando característica de resistência a insetos e tolerância ao herbicida glufosinato de amônio, obtido através de cruzamento convencional entre os eventos individuais.

Uso Proposto: Uso comercial do milho evento combinado DAS- Ø15Ø7-1 (TC1507) x MON-ØØ810-6 (MON810) x SYN-IR162-4 (MIR162), bem como suas progênies, nas modalidades de cultivo, consumo animal e humano, manipulação, transporte, descarte, importação e exportação, bem como quaisquer outras atividades relacionadas. A requerente também solicita, na proposta apresentada, a autorização para as subcombinações: DAS- Ø15Ø7-1 (TC1507) x SYN-IR162-4 (MIR162) e MON-ØØ810-6 (MON810) x SYN-IR162-4 (MIR162).

PARECER TÉCNICO

A requerente, empresa Du Pont do Brasil S.A., solicita através do processo nº 01200.005952/2013-59 a liberação comercial do milho geneticamente modificado evento DAS-Ø15Ø7-1 (TC1507) x MON-ØØ810-6 (MON810) x SYN-IR162-4 (MIR162), também denominado VYH, contendo genes que conferem resistência a insetos e tolerância ao herbicida glufosinato de amônio.

Descrição dos organismos geneticamente modificados

O evento combinado de modificação genética do milho expressando resistência a insetos e tolerância ao herbicida glufosinato de amônio foi obtido através de cruzamento convencional entre os eventos TC1507 (DAS- Ø15Ø7-1), MON810 (MON- ØØ810-6) e MIR162 (SYN-IR162-4). O milho evento TC1507 expressa as proteínas Cry1F e PAT, o milho evento MON810 expressa a proteína Cry1Ab e o milho MIR162 expressa as proteínas Vip3Aa20 e PMI. A proteína PAT torna a planta tolerante a herbicidas formulados com glufosinato de amônio e as proteínas Cry1F, Cry1Ab e Vip3Aa20 são responsáveis por conferir a característica de

resistência a lepidópteros pragas da cultura do milho. A proteína PMI (enzima fosfomanose isomerase) é utilizada como marcador de seleção.

Os eventos individuais que compõe o evento combinado objeto da presente análise já tiveram sua avaliação de risco pela CTNBio, que concluiu pela segurança desses eventos, conforme os seguintes pareceres favoráveis à liberação comercial:

- Parecer Técnico N° 1.100/2007 (DOU n° 171 de 04/09/2007): Evento MON-ØØ810-6 (milho Yield Gard™);
- Parecer N° 1.679/2008 (DOU n° 243 de 15/12/2008): Evento DAS-Ø15Ø7-1 (milho Herculex™);
- Parecer N° 2.042/2009 (DOU n° 185 de 28/09/2009): Evento SYN-IR162-4 (milho Viptera-MIR162™).

A combinação dupla dos eventos citados também já foi submetida à análise da avaliação de risco pela CTNBio:

- Parecer Técnico N° 3.021/2011 (DOU n° 164 de 25/08/2011): Evento DAS-Ø15Ø7-1 x MON-ØØ810-6 (milho Optimum Intrasect™).

Nos mencionados Pareceres a CTNBio conclui que “os eventos de modificação genética são substancialmente equivalentes ao milho convencional” e “que estes eventos não são potencialmente causadores de significativa degradação do meio ambiente”.

Experimentos realizados e análise dos resultados

Mesmo os eventos individuais e um piramidado terem sido aprovados previamente, a empresa realizou outros experimentos para demonstrar se no milho VHY houve interação entre os transgenes, alteração dos níveis de expressão das proteínas recombinantes, alteração da composição dos grãos e seus efeitos sobre o controle dos insetos alvo.

Nota-se que todos os experimentos foram muito bem delineados experimentalmente, seguindo os preceitos de boas práticas de pesquisa incluindo análise estatística adequada. Os grãos foram plantados em três localidades diferentes representativas (Passo Fundo-RS, Itumbiara-GO e Palmas-TO) e foram utilizados critérios de casualidade para escolha das plantas para a caracterização descrita acima.

Com a finalidade de verificar se os transgenes são estáveis no milho VHY e não tiveram interação alélica entre eles, foram realizados ensaios de *Southern Blot* que demonstraram que no milho VHY há presença inequívoca dos transgenes oriundos dos 3 eventos originais e que estes apresentam estabilidade genômica. Além disso, é possível interpretar destes resultados que os transgenes não se localizam nos mesmos loci genômicos, já que todos segregam de forma independente como mostrados nas figuras de 1 a 5 no documento original.

Outra análise realizada pela empresa no milho VHY foi a quantificação dos níveis de proteínas recombinantes nos híbridos individuais e no milho VHY pela técnica de ELISA. A análise de cada uma das proteínas recombinantes comparando-se a presença no milho VHY e nos híbridos individuais mostrou que os níveis no milho VHY são similares estatisticamente para as proteínas Cry1F, PAT, Cry1Ab, Vip3Aa20 e PMI ($p > 0,05$). Isto em todas as amostras analisadas como folhas, pólen, planta inteira, forragem e grãos.

Deve-se ressaltar que para todas as proteínas recombinantes presentes no milho VHY, o nível de expressão destas é na maioria das vezes 10x maior nas folhas que nos grãos analisados.

Para a análise da composição nutricional dos grãos do milho VHY, foi utilizado como controle negativo um cultivar convencional não-GM. O experimento foi realizado após a

2

aprovação pela CTNBio (processo 01200.001156/2011-8, Parecer Técnico 3.439/2012 de 29/10/2012) nas mesmas três localidades já mencionadas nos experimentos acima. Após a análise bromatológica, de minerais, ácidos graxos, aminoácidos, vitaminas, metabólitos secundários e antinutrientes entre o milho VHY e o controle, não foi notada nenhuma diferença estatisticamente significativa quando da análise da forragem quanto da análise dos grãos (Tabelas 7 a 13 no documento original).

No processo ainda são apresentados análises comparativas entre o milho VHY e o controle quanto a características agrônomicas. Mais uma vez, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre ambos milhos.

Por fim, são apresentados resultados referentes ao controle de lepidópteros alvo, tanto em laboratório quanto em condições de contenção e à campo.

Nas condições laboratoriais, verificou-se o consumo foliar das plantas de milho híbridas individuais, milho VHY e milho controle não GM pelas larvas de *Ostrinia nubilalis* e *Spodoptera frugiperda*. Foi possível determinar que a eficácia de controle da combinação TC1507xMON810xMIR162 presente no milho VHY é similar à melhor encontrada nos eventos individualizados no controle destas espécies alvo.

No ensaio de contenção, expondo as plantas oriundas dos cultivares individuais ou piramidados, verificou-se que o milho VHY apresentou menos ataque às folhas pelas lagartas de *S. frugiperda* que os milhos controle com infestação e os milhos TC1507 e TC1507xMON810, o que atesta a maior eficácia do milho VHY sobre a infestação por *S. frugiperda*.

Já no ensaio a campo, foi realizada avaliação visual do dano causado pela infestação natural das pragas Lagarta do Cartucho do Milho (*S. frugiperda*) e Broca da Cana-de-Açúcar (*Diatraea saccharalis*). Notou-se diferença estatística entre as plantas controle e TC1507 em relação ao milho VHY, o que também atesta a maior eficácia deste híbrido sobre as lagartas nas condições de campo onde foram realizados o experimento.

Avaliação de risco em animais e seres humanos

Tendo em vista o exposto acima, onde foi demonstrado que os insertos não interagem entre si, que as proteínas recombinantes são produzidas em condições similares aos cultivares com as características individuais e que não há diferença na composição nutricional é evidente, à luz do conhecimento desta assessoria, que o milho VHY não deve apresentar riscos maiores que os cultivares individuais já conhecidos, analisados e aprovados para comercialização pela CTNBio.

Além da análise e aprovação da CTNBio que concluiu pela segurança dos citados eventos individuais e de suas subcombinações, o milho evento MON810, evento TC1507 e o milho evento MIR162 já foram avaliados e são aprovados em diferentes países, de acordo com o banco de dados do “Center for Environmental Risk Assessment” – CERA (http://cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_database&mode=Submit, acessado em 23/01/2015). O evento MON 810 foi aprovado no ano de 1995 nos EUA e é atualmente aprovado em 17 países. O evento TC1507 foi aprovado no ano de 2000 nos EUA e é atualmente aprovado em 15 países. O evento MIR 162 foi aprovado no ano de 2008 nos EUA e é atualmente aprovado em 10 países.

Além disso o milho geneticamente modificado contendo quatro eventos combinados, TC1507 x MON810 x MIR162 x NK603, incluindo os três eventos da presente solicitação, já foi analisado pelas Setoriais Humana/Animal e Vegetal/Ambiental da CTNBio que,

respectivamente, em Setembro de 2013 e Março de 2015 concluíram pela segurança desse evento quádruplo.

Restrições ao uso do OGM e seus derivados

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”.

Conclusão

Considerando que a variedade de milho (*Zea mays*) evento TC1507 x MON810 x MIR162 pertence à espécie bem caracterizada e com sólido histórico de segurança para consumo humano;

Considerando que as proteínas Cry1F, Cry1Ab, Vip3Aa e PAT que conferem resistência a insetos e tolerância aos herbicidas glufosinato de amônio e ao glifosato, são expressas em vários eventos de diferentes culturas agrícolas já submetidos à avaliação de risco e aprovados para uso comercial em diversos países;

Considerando que os parentais, evento TC1507, evento MON810 e evento MIR162, já foram submetidos à análise da avaliação de risco pela CTNBio e obtiveram parecer favorável para sua liberação comercial;

Considerando que o milho geneticamente modificado contendo quatro eventos combinados, TC1507 x MON810 x MIR162 x NK603, incluindo os três eventos da presente solicitação, já foi analisado pelas Setoriais Humana/Animal e Vegetal/Ambiental da CTNBio e obtiveram decisão favorável;

Considerando que a requerente apresentou solicitação para adequação aos preceitos do Artigo 4º-A da Resolução Normativa nº 5/2008 e que o citado artigo determina que “*A decisão favorável à liberação comercial de Organismo Geneticamente Modificado - OGM que contenha mais de um evento, combinados através de melhoramento genético clássico, cujos eventos individuais tenham sido previamente aprovados para liberação comercial pela CTNBio, aplicar-se-á às combinações possíveis dos eventos individuais, conforme solicitado pela requerente*”;

Para o plantio de milho geneticamente modificado deverá ser observada ainda a Resolução Normativa CTNBio Nº 4/2007 que dispõe sobre as distâncias mínimas entre cultivos comerciais de milho geneticamente modificado e não geneticamente modificado.

Referências Bibliográficas

ARONSON, A.I.; SHAI, Y. 2001. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. FEMS Microbiol. Letters 195:1-8.

BETZ F.S.; HAMMOND B.G., FUCHS R.L. 2000. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. Regul Toxicol Pharmacol. 32(2):156-73.

BERGAMASCO, V.B. 2012. Interações das proteínas cry1a10 e vip3aa de *Bacillus thuringiensis* e toxicidade para larvas de *Spodoptera* spp. (Lepidoptera: noctuidae). Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp. 111 p.

BINNING R.; HIGGINS L.; NELSON M.; PASCUAL M.A.; NOWATZKI T.; HONG B.; SMITH M.J.; FLEXNER J.L. 2012. Trait Durability Plan for 1507xMON810xMIR162 Maize in the US. Pioneer Hi-Bred International, Inc, Study No. PHI-2012-087.

BURKNESS E.C.; DIVELY G.; PATTON T.; MOREY A.C.; HUTCHISON W.D. 2010. Novel Vip3A *Bacillus thuringiensis* (Bt) maize approaches high-dose efficacy against *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) under field conditions: Implications for resistance management. GM Crops 1: 337-343.

CERA. (2010). GM Crop Database. Center for Environmental Risk Assessment (CERA), ILSI Research Foundation, Washington D.C. http://cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_database

CHAKROUN, M.A., BEL, Y.A., CACCIA,S., ABDELKEFI-MESRATI, L., ESCRICHE B.A.; FERRÉ,J . 2012. Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* and *S. exigua* to *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa insecticidal protein. Journal of Invertebrate Pathology. 110:334–339.

CHEN, J. et al. 2003. Comparison of the expression o *Bacillus thuringiensis* full-length and N-terminal truncated vip3A gene in Escherichia coli. Journal of Applied Microbiology. 95: 310-316.

DE MAAGD, R.A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize insect world. Trends Genet. 17: 193-199.

DE SCHRIVER, A.; DEVOS, Y.; Van de BULCKE, M.; CADOT, P.; De LOOSE, M.; REHEUL, D.; SNEYERS, M. 2007. Risk assessment of GM stacked events obtained from crosses between GM events. Trends in Food Science & Technology, 18: 101-109.

DOU (2007). Extrato de Parecer Técnico no 1.100/2007 (Evento: MON-ØØ81Ø-6). Diário Oficial da União – Seção 1, Edição N°.171 de 04/09/2007, pag.9.

DOU (2008). Extrato de Parecer Técnico nº 1.679/2008 (Evento DAS-Ø15Ø7). Diário Oficial da União - Seção 1 - Edição N°. 243 de 15/12/2008 Pag. 121.

DOU (2009). Extrato de Parecer Técnico nº 2.042/2009 (Evento: SYN-IR162). Diário Oficial da União - Seção 1 - Edição N°.185 de 28/09/2009 Pag. 22.

DOU (2011). Extrato de Parecer Técnico nº 3021/2011(TC1507 x MON810). Diário Oficial da União - Seção 1 - Edição N°.164 de 25/08/2011 Pag. 48.

EFSA. European Food Safety Authority. 2007. Guidance document of the scientific panel on genetically modified organisms for the risk assessment of genetically modified plants containing stacked transformation events. The EFSA Journal, 512: 1-5.

ESTRUCH J.J.; WARREN, G.W., MULLINS, M.A.; NYE, G.J.; CRAIG,J.A.; KOZIEL,M.G.. 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. PNAS 93:5389-5394.

HECKEL D.G.; GAHAN L.J.; BAXTER S.W.; ZHAO J-Z.; SHELTON A.M.; GOULD F.; TABASHNIK BE. 2007. The diversity of Bt resistance genes in species of Lepidoptera. *Journal of Invertebrate Pathology* 95: 192-197.

HOFTE, H.; WHITELEY, H.R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53: 242-255.

HUA G., MASSON L., JURAT-FUENTES JL., SCHWAB G., ADANG MJ. 2001. Binding Analyses of *Bacillus thuringiensis* Cry δ -Endotoxins Using Brush Border Membrane Vesicles of *Ostrinia nubilalis*. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 872-879.

ILSI. International Life Sciences Institute. ILSI Crop Composition Database Version 3.0; 2006. <http://www.cropcomposition.org/>.

JACKSON R.E.; MARCUS M.A.; GOULD F.; BRADLEY JR.; VAN DUYN JW. 2007. Cross-Resistance Responses of Cry1Ac-Selected *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) to the *Bacillus thuringiensis* Protein Vip3A. *Journal of Economic Entomology* 100: 180-186.

KRISHNA JAKKA, S.R. 2013. Characterization of field evolved resistance to transgenic Cry1Fa maize in *Spodoptera frugiperda*. Doctoral Dissertations Graduate School. University of Tennessee, Knoxville.

LEE M.K.; MILES P.; CHEN J.S. 2006. Brush border membrane binding properties of *Bacillus thuringiensis* Vip3A toxin to *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* midguts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 339: 1043-1047.

LEE M.K.; WALTERS F.S.; HART H.; PALEKAR N.; CHEN J-S. 2003. The Mode of Action of the *Bacillus thuringiensis* Vegetative Insecticidal Protein Vip3A Differs from That of Cry1Ab δ -Endotoxin. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 4648-4657.

LIU, J. 2007. Identification of vip3-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a novel vip3A-type gene. *Letters in Applied Microbiology* 45: 432-438.

MENDELSON M.; KOUGH J.; VAITUZIS Z.; MATTHEWS K. 2003. Are Bt crops safe? *Nat Biotechnol*, 21:1003-9.

NELSON M.E. 2010. Mode of Action and Cross-Resistance of Cry1F and Cry1Ab in *Ostrinia nubilalis* (Hübner), *Diatrea grandiosella* (Dyar), and *Helicoverpa zea* (Boddie). Pioneer Hi-Bred International, Inc., Study No. PHI-2009-010, MRID 48005601.

OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development. Consensus document on compositional considerations for new varieties of maize (*Zea mays*): key food and feed nutrients, anti-nutrients and secondary plant metabolites. ENV/JM/MONO/(2002)25.

OECD. (Organization for Economic Co-operation and Development). Consensus document on the biology of maize (*Zea mays* subsp. *mays*) ENV/JM/(2003)11.

OECD. (Organization for Economic Co-operation and Development). Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to phosphinothricin herbicide. ENV/JM/MONO(99)13. France. 26p.1999.

RAYBOULD, A.; QUEMADA, H. 2010. Bt crops and food security in developing countries: realized benefits, sustainable use and lowering barriers to adoption. Food Sec. 2:247-259.

RAYBOULD A.; VLACHOS D. 2011. Non-target organism effects tests on Vip3A and their application to the ecological risk assessment for cultivation of MIR162 maize [J]. Transgenic Res. 20: 599-611.

SENA JAD, HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ CS, FERRÉ J. 2009. Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A Proteins with *Spodoptera frugiperda* Midgut Binding Sites. Applied and Environmental Microbiology 75: 2236-2237.

STORER N.P.; BABCOCK J.M.; SCHLENZ M.; MEADE T.; THOMPSON G.D.; BING J.W.; HUCKABA R.M. 2010. Discovery and Characterization of Field Resistance to Bt Maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. Journal of Economic Entomology. 103: 1031-1038.

STORER,N.P.; KUBISZAK, M.E.; KING, J.E.; THOMPSON, G.D.; SANTOS,A.C. 2012. Status of resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: Lessons from Puerto Rico. Journal of Invertebrate Pathology. 110: 294–300.

TAN, S.; EVANS, R.; SINGH, B. 2006. Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops. Amino Acids 30: 195-204.

WEBER N, FALLER M. 2009. Molecular Characterization of DAS-Ø15Ø7-1xMONØØ81Ø-6xMONØØ6Ø3-6 Maize using Southern Blot Analysis and Event-Specific Polymerase Chain Reaction. Pioneer Hi-Bred International, Inc, Study No. PHI-

Brasília, 09 de abril de 2015.

Edivaldo Domingues Velini
Presidente da CTNBio

Deliberação

A CTNBio decidiu por dezenove votos favoráveis pela aprovação, dois votos contrários do Dr. Paulo Yoshio Kageyama e da Dra. Suzi Barletto Cavalli.