

**EVALUACIÓN DE RIESGOS EN BIOSEGURIDAD (ERB)
COMITÉ DE ARTICULACIÓN INSTITUCIONAL (CAI)**

**GRUPO AD HOC SOBRE ORGANISMOS NO BLANCO
Talleres de Trabajo 2023-2025**

El grupo *Ad hoc* de Organismos no Blanco está integrado por evaluadores de las siguientes instituciones: MGAP, INASE, INIA y MA cuyos CV se encuentran disponibles en la oficina de Bioseguridad del MGAP.

Se estudian los riesgos asociados a la autorización para investigación del evento de maíz **DP910521-2**.

Característica/s que presenta el OVGM:

El maíz DP-9105212 contiene tres cassettes de genes:

- Gen *Cry1B.34*, un gen quimérico compuesto por secuencias de un gen de clase *cry1B*, el gen *cry1Ca1* y el gen *Cry9Db1*, todos derivados de *Bacillus thuringiensis*. La proteína *Cry1B.34* expresada confiere el control de ciertas plagas de lepidópteros susceptibles al provocar la alteración del epitelio del intestino medio.
- Gen *mo-pat* contiene una versión optimizada para maíz del gen de la fosfotricina acetiltransferasa (*mo-pat*) de *Streptomyces viridochromogenes* que codifica la proteína PAT. La proteína PAT expresada confiere tolerancia a la fosfotricina.
- Gen *pmi* de la fosfomanosa isomerasa (*pmi*) de *Escherichia coli* codifica la proteína PMI. La proteína PMI expresada en el tejido vegetal sirve como marcador de selección durante la transformación ya que permite el crecimiento vegetal en medios con manosa como única fuente de carbono.

Modo de acción de las proteínas introducidas:

Todas las proteínas *Cry* de tres dominios conocidas tienen un mecanismo de acción de formación de poros. En general, cuando un insecto susceptible ingiere una proteína *Cry*, las proteasas en el ambiente alcalino del intestino del insecto degradan parcialmente la protoxina a una proteína núcleo resistente a la proteasa, con actividad insecticida. La proteína núcleo se une a receptores específicos ubicados en el intestino medio (mesenteron) del insecto, lo que provoca la formación de poros en la membrana celular y conduce a la citólisis, la septicemia y, en última instancia, a la muerte (OCDE, 2007). Al igual que otras proteínas *Cry*, la proteína *Cry1B.34* expresada se une a los receptores en la membrana con microvellosidades del intestino de las plagas de lepidópteros susceptibles y provoca la muerte celular a través de la formación de poros conductores de iones no específicos en la membrana apical de las células epiteliales del intestino medio.

La proteína PAT confiere tolerancia al ingrediente activo del herbicida glufosinato de amonio, el ingrediente activo en los herbicidas de fosfotricina. El glufosinato se asemeja químicamente al aminoácido glutamato y actúa inhibiendo la glutamina sintetasa, que participa en la síntesis de glutamina. Asimismo, la glutamina sintetasa también está involucrada en la desintoxicación de amoníaco. Debido a su similitud con el glutamato, el glufosinato bloquea la actividad de la glutamina sintetasa, lo que da como resultado una reducción de los niveles de glutamina y un aumento correspondiente en las concentraciones de amoníaco en los tejidos de las plantas, lo que provoca la alteración de la membrana celular, el cese de la fotosíntesis, y la muerte de la planta. La proteína PAT confiere tolerancia a los herbicidas a base de glufosinato de amonio al acetilar la fosfotricina, un isómero del glufosinato de amonio, detoxificando así el herbicida (CERA-ILSI Research Foundation, 2011; Hérouet et al., 2005).

La proteína PMI está en la naturaleza y se expresa en hongos, insectos, plantas y mamíferos. PMI cataliza la interconversión reversible entre manosa-6-fosfato y fructosa-6-fosfato. En presencia de PMI, las células vegetales pueden sobrevivir en medios que contienen manosa como fuente de carbono, lo que permite utilizar PMI como marcador de selección.

Análisis de riesgo sobre organismos no blanco:

Identificación de peligros sobre Organismos No Blanco

El evento DP910521-2 expresa la proteína Cry1B.34, la cual confiere resistencia frente a determinadas especies de lepidópteros plaga. La empresa presentó información de eficacia contra *Spodoptera frugiperda* (Noctuidae) y *Diatraea saccharalis* (Crambidae). Se realizaron estudios de laboratorio de Nivel 1 (Tier 1) para evaluar el efecto de la proteína Cry 1 B.34 sobre larvas y adultos de abejas melíferas (*Apis mellifera*). No se observaron efectos adversos sobre la supervivencia de las larvas, pupas y adultos, la emergencia ni el peso corporal de adultos. Por otro lado, con respecto a otros organismos no blanco, se llevaron a cabo bioensayos de laboratorio con *Folsomia candida* (Collembola, detritívoro), *Chrysoperla rufilabris* (Neuroptera, depredador), *Coleomegilla maculata* (Coleoptera, depredador), *Pediobius foveolatus* (Hymenoptera, parasitoide) y dos vertebrados (codorniz y ratón). No se observaron efectos adversos sobre la reproducción ni sobre la supervivencia.

Dado que en el dossier original no se incluyeron ensayos con especies de Lepidoptera no blanco, se solicitó información adicional. En respuesta, la empresa aportó bioensayos con dos especies de la familia Nymphalidae: *Vanessa cardui* (Nymphalinae) y *Danaus plexippus* (Danainae). Los resultados mostraron concentraciones letales medias (LC₅₀) de 0,065 ng proteína/mg de dieta para *V. cardui* y 0,091 ng proteína/mg de dieta para *D. plexippus*. Ambas especies evidenciaron alta susceptibilidad en condiciones controladas. Esto implica que, en caso de deposición de polen con Cry1B.34 sobre hospederos larvales, puede esperarse una mortalidad significativa a nivel individual, lo cual a su vez se refuerza por los niveles de expresión de la toxina en polen, como se describe más adelante.

La proteína PAT (mo-pat) no posee modo de acción insecticida ni actividad biológica relevante sobre organismos no blanco y ha sido ampliamente evaluada sin evidencia de toxicidad o alergenicidad de preocupación. En consecuencia, la exposición ambiental a PAT a través de tejidos vegetales (incluido polen) no se considera de preocupación en el contexto de ensayos a campo controlados (CERA-ILSI Research Foundation, 2011; Hérouet et al., 2005).

Posibles rutas de exposición

El polen del maíz es transportado por el viento, generalmente a una distancia corta, en condiciones normales. La supervivencia del polen depende en gran medida de la temperatura y la humedad relativa, permaneciendo viable por aproximadamente 30 minutos. Por lo tanto, la exposición más significativa de las larvas será en aquellas especies cuyas plantas hospederas se distribuyen en la cercanía al borde del cultivo. De esta manera una posible ruta de exposición para herbívoros no blanco incluye la vegetación que puede encontrarse en zonas circundantes a los cultivos de maíz. Si el polen que libera el cultivo con el evento DP910521-2 llega a esa vegetación, las larvas de especies no blanco podrían ingerirlo. Estudios internacionales han demostrado que el polen de maíz puede desplazarse y depositarse en plantas hospederas de mariposas cercanas a los cultivos y se ha señalado que los promedios de deposición pueden enmascarar riesgos relevantes en condiciones particulares de borde de cultivo (Baudrot et al., 2021).

Las dos especies de lepidópteros no objetivo que de acuerdo a información brindada por la empresa presentaron alta sensibilidad a la proteína Cry1B.34 pertenecen a la familia Nymphalidae. Estudios de biodiversidad en Uruguay han confirmado la presencia de mariposas de los géneros *Danaus* y *Vanessa*, tanto en áreas de bosques nativos como en ambientes dominados por herbáceas (Bentancur-Viglione & Morelli, 2018). Los Nymphalidae cumplen un rol en las redes tróficas como alimento para otros animales y como agentes de regulación de las poblaciones de sus plantas hospedadoras, pero también se destaca su relevancia como especies bioindicadoras (Ghazanfar et al., 2016; Leston & Koper, 2017). Debido a su alta sensibilidad a los cambios ambientales se han utilizado como indicadores del estado de las comunidades biológicas en regiones amenazadas o con disturbios, composición de especies en paisajes fragmentados y para el monitoreo de conservación de áreas (Fallas Madrigal, 2020; Gonzalez-Valdivia, 2016; Orta et al, 2022; Pereira et al, 2017; Teles y Aranda, 2020). Asimismo, debido a su respuesta diferenciada y dependiente de cada especie a los efectos de los distintos niveles de alteración ambiental, se han incluido en estudios de evaluación de contaminación ambiental por metales pesados (Pallottini et al, 2023). Entre los géneros que han sido utilizados en todos estos estudios se encuentran los ya mencionados *Danaus* y *Vanessa*, pero se incluyen también otros con representantes nacionales tales como *Heliconius*, *Siproeta*, *Dryas*, *Ypthimoides*, *Eunica* y *Dione*.

Dentro de la subfamilia Nymphalinae a la que pertenece el género *Vanessa* se identifican especies que se alimentan de familias botánicas muy comunes en las zonas adyacentes a los cultivos. Por ejemplo, *Vanessa carye*, utiliza plantas de la familia de las Malváceas (como las malvas) y Asteráceas (como la ortiga o el cardo de castilla) como plantas hospederas, sobre cuyas hojas sus larvas ponen sus huevos y se alimentan (Biezanko et al 1957). Géneros como *Pavonia*, *Urtica* o *Cynara* se encuentran generalmente presentes

en asociación con cultivos de maíz. Por su parte, las especies de *Danaus* nativas se alimentan, al igual que lo que sucede con la monarca, de especies de *Asclepias* (Apocynaceae), algunas de las cuales también se encuentran presentes en nuestro territorio. Por lo tanto, en el contexto local, debe considerarse que la presencia de géneros sensibles como *Danaus* y *Vanessa*, sumada a la posibilidad de deposición de polen en hospederos silvestres ubicados en zonas linderas, configura un escenario plausible de riesgo ecológico en lepidópteros no blanco, especialmente bajo condiciones de coincidencia fenológica entre la antesis del maíz y la presencia de larvas tempranas.

Por lo tanto, la exposición de los insectos al polen de maíz podría ser sumamente importante y no se limita solo a los márgenes del maíz cultivado.

Probabilidad de ocurrencia del daño

A partir de la información disponible de los bioensayos de laboratorio, se considera no solo el efecto observado en condiciones controladas, sino también otros factores que inciden en la exposición, tales como la biología de la especie y del cultivo, así como las características del producto que determinan la magnitud, duración y probabilidad de contacto.

La antesis del maíz tiene una duración limitada, normalmente 1-2 semanas en un campo, aproximadamente 60 días después de la emergencia de la planta. Sin embargo, la ventana de emisión de polen va a depender principalmente de la fecha de siembra y eso puede ser muy variable e incluir en su máxima expresión un período entre fines de setiembre (fechas tempranas entre el 20/9 y el 10/10) y fines de diciembre (entre el 1 y 20/12) según datos productivos relevados por INIA. Las larvas de estadio temprano presentes durante este período podrían estar expuestas al polen del maíz.

Cuando se aprueba un evento OGM comercial en el Uruguay, se considera que todos los cultivos de maíz puedan contener esta proteína, en este caso: maíz grano, maíz silo, maíz dulce, maíz pisingallo, etc, lo que concluye en que la dispersión de polen y la emisión de panoja puede estar presente durante todo el año y en todas las localidades, lo cual aumentaría la probabilidad de ocurrencia.

Consecuencias del daño

La consecuencia esperada del daño se traduce en la mortalidad de cohortes de especies de Lepidoptera no blanco expuestas a las proteínas mencionadas en hospederos ubicados en los bordes adyacentes del cultivo. De acuerdo a los datos presentados por la empresa, los valores de expresión de la proteína *Cry1B.34* en el polen son los siguientes: 0.21 ± 0.27 ng *Cry1B.34*/mg de peso seco de tejido. Estos niveles de expresión, confrontados a la dosis letal media reportada para las dos especies no blanco, sugieren una alta probabilidad de mortalidad por consumo no intencional de polen depositado.

Conclusión

Para el caso de la proteína PAT, en base a la evidencia científica actual no se espera un efecto negativo sobre insectos ni sobre los organismos del suelo.

El peso de la evidencia indica que, aunque la proteína Cry1B.34 muestra actividad frente a especies de lepidópteros en bioensayos de laboratorio, a nivel experimental a campo, en condiciones controladas y en microparcels se espera que la exposición a lepidópteros no objetivo derivada del cultivo de maíz con el evento DP910521 sea aceptable. Dado que el riesgo de exposición es proporcional al área de borde del cultivo, en dichas condiciones experimentales se puede considerar bajo. Se deja constancia empero que a medida que aumenta la superficie, dicha exposición cambia y modifica la conclusión de riesgo sobre organismos no blanco.

En resumen, si bien la probabilidad de consecuencias adversas ante la exposición de los individuos citados a la proteína Cry1B.34 se considera alta, dicho riesgo se vería reducido a niveles aceptables en las condiciones de manejo específicas de un escenario de experimentación, incluyendo las distancias de resguardo y el carácter controlado del cultivo destinado a investigación, por lo que se concluye un **NIVEL DE RIESGO MEDIO**.

Bibliografía

Bentancur-Viglione, G., & Morelli, E. (2018). Nuevos registros y ampliación de la distribución de especies de mariposas (Lepidoptera: Papilionoidea) de Uruguay. VI Encuentro de Lepidoptera Neotropicales, Concepción, Chile. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.35035.87843>

Biezanko, C. M., Ruffinelli, A., & Carbonell, C. S. (1957). Lepidoptera del Uruguay. Lista anotada de especies. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 46(apartado), 1-152.

Center for Environmental Risk Assessment (CERA), ILSI Research Foundation. (2011). A review of the environmental safety of the PAT protein. *Environmental Biosafety Research*, 10(4), 73–101. <https://doi.org/10.1051/ebr/2012004>

Fallas-Madrigal, D. (2020). Diversidad de mariposas (Nymphalidae) como indicadores de la calidad de hábitat en el Cerro la Roca, Santa Cruz de León Cortés. *Ecología y Desarrollo Sostenible*, 2(2020). 16 pp.

Ghazanfar, M., Malik, M. F., Hussain, M., Iqbal, R., & Younas, M. (2016). Butterflies and their contribution in ecosystem: A review. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 4(2), 115-118.

Gonzalez-Valdivia, N. A., Pozo, C., Ochoa-Gaona S., Gordon Ferguson B., Cambranis E., Orlando L., Pérez-Hernández I., Ponce-Mendoza A., & Kampichler C. (2016). Nymphalidae frugívoras (Lepidoptera: Papilionoidea) asociadas a un ecomosaico agropecuario y de bosque tropical lluvioso en un paisaje del sureste de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 87 (2016) 451–464.

Hérouet, C., Esdaile, D. J., Mallyon, B. A., Debruyne, E., Schulz, A., Currier, T., Hendrickx, K., Van Der Klis, R.-J., & Rouan, D. (2005). Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the pat and bar sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 41(2), 134-149. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2004.11.002>

Leston, L., & Koper, N. (2017). Urban rights-of-way as extensive butterfly habitats: A case study from Winnipeg, Canada. *Landscape and Urban Planning*, 157, 56-62. <https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2016.05.026>

OECD. (2007). Consensus Document on Safety Information on Transgenic Plants Expressing *Bacillus thuringiensis*—Derived Insect Control Protein (No. 42; Series on harmonisation of regulatory oversight in biotechnology, pp. 324-350). OECD Publishing. <https://doi.org/10.1787/9789264053465-14-en>

Orta, C., Reyes-Aguero J.A., Luis-Martínez, M. A., Muñoz-Robles, C. A., Méndez, H. (2022). Mariposas bioindicadoras ecológicas en México. Artículo de revisión. *Acta Zoológica Mexicana (nueva serie)*, Volumen 38, 1–33.

Pallottini, M., Goretti E., Argenti C., La Porta G., Tositti, L., Dinelli E., Moroni B., Petroselli C., Gravina P., Selvaggi R. y Cappelletti D. 2023. Butterflies as bioindicators of metal contamination. *Environmental Science and Pollution Research* 30:95606–95620

Pereira Martins, L., da Costa Araujo Junior, E., Pereira Martins, A. R., Duarte, M., Garcia Azevedo, G. (2017). Species diversity and community structure of fruit-feeding butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae) in an eastern amazonian forest. *Papéis Avulsos de Zoologia, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo*. Volume 57(38):481-489.

Teles Porath, I. A. & Aranda, R. (2020). Frugivorous butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae) as a habitat quality indicator in Cerrado urban fragment. *EntomoBrasilis* 13: e904. e-ISSN 1983-0572.