

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

GRUPO AD HOC SOBRE ORGANISMOS NO BLANCO Talleres de Trabajo 2020

Se estudian los riesgos asociados a la autorización para uso comercial del evento en Maíz **MON87427 x MON89034 x MON810 x MIR162 x MON87411 x MON87419**.

Participaron de los diferentes talleres evaluadores de las siguientes instituciones del CAI: INASE, INIA y MGAP. La información y CV de los evaluadores se encuentra disponible en la Oficina de Bioseguridad.

CARACTERÍSTICAS INTRODUCIDAS

Característica/s que se espera que presente el OVGM:

El maíz portador de los eventos apilados MON 87427 x MON 89034 x MON810 x MIR162 x MON87411 x MON87419 se generó mediante cruzamiento convencional. Este apilado proporciona la protección frente al ataque de ciertos insectos lepidópteros (tales como *Spodoptera frugiperda*, *Helicoverpa zea* y *Diatraea saccharalis*) y coleópteros (como especies del género *Diabrotica*) y de tolerancia a la aplicación de herbicidas a base de glifosato, dicamba y glufosinato.

Aprobaciones de los eventos involucrados en este apilado:

Ver informe ERB/CAI.

Identificación de peligros sobre Organismos No Blanco

- Proteína CP4 EPSPS: tolerancia a herbicidas a base de glifosato.
- Proteína DMO: tolerancia a herbicidas a base de dicamba.
- Proteína PAT: tolerancia a herbicidas a base de glufosinato.
- Proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry1Ab, Vip3Aa20: resistencia a ciertas especies de lepidópteros plaga.
- Proteína Cry3Bb1 y ARNdc *DvSnf7*: resistencia a ciertos coleópteros de la familia Chrysomelidae.

Análisis de Riesgo

De los eventos incluidos en el apilado tres ya fueron aprobados en Uruguay para uso comercial, MON89034, MON810 y MIR162, solos o formando parte de otros apilados. Los tres eventos restantes, MON87427, MON87411, MON87419 no han sido analizados previamente, ni en forma individual ni como parte de apilados. De ellos, MON87427 y MON87419 otorgan tolerancia a herbicidas y el evento MON87411

además de tolerancia a herbicidas proporciona resistencia a algunas especies de Coleoptera.

Los estudios de equivalencia fenotípica y agronómica del maíz MON87427 x MON89034 x MON810 x MIR162 x MON87411 x MON87419 con respecto a la línea convencional demostraron que no existieron diferencias significativas entre ambos. Para los eventos que no han sido aprobados previamente se presentan estudios que evaluaron la equivalencia agronómica y fenotípica. Para los dos eventos con tolerancia a herbicidas, MON87427 y MON87419 no se detectaron diferencias significativas entre las plantas de maíz GM y el control convencional para la mayoría de los parámetros analizados y en los casos donde se detectó una diferencia se realizó el análisis de sitios combinados, llegándose a la conclusión que las diferencias observadas no eran relevantes desde el punto de vista biológico y en la mayoría de estos casos los valores obtenidos se encontraron dentro del rango de referencia para el cultivo (Whitsel et al., 2010, Grimi, 2014)

Los modos de acción de las proteínas que otorgan la tolerancia a herbicidas, CP4 EPSPS, DMO y PAT no tienen especies animales blanco en sus modos de acción. Asimismo, no se encontró evidencia científica de que el fenotipo de tolerancia a herbicidas y las enzimas que lo confieren representen un riesgo para artrópodos, y otros grupos animales y por lo tanto, no es necesario plantear un análisis de impacto sobre organismos no blanco para estas enzimas.

Para las proteínas insecticidas Cry1A.105 y Cry2Ab2 (expresadas por MON89034), Cry1Ab (expresada por MON810) y Vip3Aa20 (expresada por MIR162) ya fue analizado su efecto en los eventos aprobados previamente y de acuerdo a lo que plantea U.S. EPA (2007) no es necesario evaluar la nueva combinación en este apilado ya que el impacto de la mezcla de las proteínas sobre organismos no blanco se deduce de los estudios realizados para cada una de los productos por separado. Se presentó evidencia de que la expresión de cada uno de estos productos insecticidas resultaron comparables a los niveles de expresión de los mismos en los eventos individuales.

Chinnadurai (2017) realizó ensayos para determinar la cantidad de proteína producida por el apilado, tanto insecticidas como de tolerancia a herbicidas en las distintas partes de la planta. Dentro de las proteínas insecticidas, todas tienen la mayor expresión en las hojas de temporada (over season leaf) y los menores niveles de expresión en polen y granos, salvo para Vip3Aa20 donde los menores valores se dieron en raíces y a éstos sí les siguen polen y granos. Por otra parte Chen y Malven (2017) evaluaron el nivel de expresión del ARNdc DvSnf7, dando como resultado que los valores para polen fueron los únicos que quedaron por debajo del límite de detección del estudio, lo que quiere decir que son los más bajos de todos los tejidos estudiados, luego le sigue los valores en grano.

Análisis del evento MON 87411

Como se mencionó, de los tres eventos que no han sido analizados previamente, el evento MON87411 es el único que cuenta con actividad insecticida. Presenta protección contra ciertos insectos del orden Coleoptera, más específicamente de la Familia Chrysomelidae. Esta protección se debe a la síntesis de una proteína insecticida, Cry3Bb1 y un ARN de interferencia, ARN DvSnf7.

En estudios de laboratorio realizados para evaluar el espectro de actividad de la proteína Cry3Bb1, se introdujo esta proteína en una dieta artificial que fue suministrada a varios taxones con el fin de evaluar las propiedades insecticidas de la proteína (Head, 2001). La proteína utilizada fue una variante sintetizada en laboratorio que tenía una diferencia de 4 aminoácidos con respecto a la original Cry3Bb1, dejando constancia que esta diferencia no afecta las funciones y propiedades de la proteína (EPA, 2007).

Se utilizaron concentraciones crecientes de la proteína hasta valores estimados de la máxima concentración que puede llegar a expresar el evento en el campo. Se testearon varias especies con diferente grado de parentesco, desde especies de la familia Chrysomelidae (*Leptinotarsa decemlineata*, *Diabrotica virgifera*) y coleópteros de otras familias, hasta lepidópteros (*Ostrinia nubilalis*, *Danaus plexippus*) y otras especies de importancia como *Apis mellifera*, *Hippodamia convergens* y *Chrysopa carnea* entre otras. Los organismos no blanco evaluados incluyen grupos funcionales clave que se encuentran habitualmente presentes en el agroecosistema de los cultivos de maíz.

Como resultado sólo se observó actividad insecticida en las dos especies de la familia Chrysomelidae y no se encontraron efectos significativos en mortalidad o desarrollo en los otros grupos (Head, 2001)

Por otra parte este evento expresa también el ARNdc DvSnf7. Esta es una secuencia con repeticiones invertidas derivada de *Diabrotica virgifera* que da como resultado un transcrito de ARN que contiene dos copias de una porción del gen *Snf7* de *D. virgifera* en dirección invertida, lo cual permite que este ARN forme una estructura secundaria de tipo horquilla con la región DvSnf7 de doble cadena de 240 nucleótidos biológicamente activa.

Al ser ingerido por el insecto este ARNdc es absorbido a la altura del mesenterón e ingresa a las células, donde es reconocido por la maquinaria del ARN de interferencia provocando silenciamiento de genes con efecto cascada.

Se presenta información sobre ensayos de letalidad y tiempo de exposición para dos especies del género *Diabrotica*, consideradas como organismos objetivo para el ARNdc producido por este evento. Lograron una letalidad en larvas de 50% al darles 1000 ng/ml de dieta por 2 horas de exposición y un 50% de letalidad luego de darles por 12 horas 50 ng/ml (Bolognesi et al., 2012).

Se presenta evidencia de ensayos que evalúan el espectro de actividad de ARNdc DvSnf7 (Bachman et al., 2013). En ellos se testearon insectos de la misma familia de las plagas objetivo (ejemplares de *Diabrotica sp*) como *Galerucella calmariensis* y *Cerotoma trifurcata* (de la subfamilia Galerucinae), *Chrysolina quadrigemina* y *Microtheca ochroloma* (de la subfamilia Chrysomelinae), así como coleópteros plaga de otras familias y benéficos como *Coleomegilla maculata* y *Poecilus chalcites*. Además se utilizaron algunos lepidópteros plaga como *Spodoptera frugiperda* y *Helicoverpa zea* e insectos benéficos de otros órdenes como *Pediobius foveolatus* y *Apis mellifera* (Hymenoptera) y *Orius insidiosus* (Hemiptera). Para la evaluación sometieron a dieta artificial a estas y otras especies con concentraciones del ARN expresado por el evento MON87411 de 500 a 5000 ng/ml que son de 250 a 2500 veces la concentración máxima esperada en el campo. Como resultado observaron que la actividad biológica del ARN

solo fue evidente en los ejemplares de la familia Chrysomelidae y más específicamente en la subfamilia Galerucinae. A esta subfamilia pertenece el género *Diabrotica*.

Se demuestra una alta especificidad del ARNdc DvSnf7, solo un pequeño grupo de la familia Chrysomelidae es susceptible y la posibilidad de un efecto negativo en organismos no blanco es poco probable.

Presentan también información sobre ensayos realizados a campo para el evento MON87411 (Negri Aranguren et al., 2013) donde se monitorearon especies benéficas en 4 sitios de Argentina. Como resultado, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las plantas de maíz MON 87411 y el control convencional para la mayoría de las comparaciones. Para unos pocos casos, 4 de 46, las diferencias fueron significativas, pero de acuerdo a los análisis de sitios combinados, no las consideraron biológicamente relevantes.

En base a la información analizada se espera que el efecto de la proteína Cry 3Bb1 sea perjudicial únicamente para algunas especies de la familia Chrysomelidae. Esta familia incluye insectos fitófagos, muchos de ellos plagas de diversos cultivos. Por lo tanto la única forma de exposición es el consumo directo de partes vegetales.

Para el caso del ARNdc, al exponer a plagas fitófagas no blanco, depredadores y parasitoides a altas dosis en ensayos de laboratorio y en el campo no se generaron efectos adversos significativos y debido a la especificidad de la secuencia los estudios científicos plantean que es muy poco probable el efecto negativo en otras especies no objetivo. Además, de acuerdo a la información relevada, existen instancias que pueden considerarse barreras adicionales junto con la especificidad de la secuencia, como ser la posibilidad de que el ARN se degrade luego de la ingestión a lo largo del tubo digestivo antes de llegar al sitio de absorción; o que las células de la pared digestiva no incorporen este ARN, no todos los organismos pueden incorporar el ARNdc a partir de la dieta en forma eficiente; o que luego el efecto no sea pasado de célula a célula (“non-cell autonomus RNA”) y no se pueda propagar su señal al resto de los tejidos (Price y Gatehouse, 2008; Whangbo y Hunter, 2008; Huvenne y Smagghe, 2010; Allen y Walker, 2012).

Conclusión del análisis de riesgo:

Se concluye que para las proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry1Ab, Cry3Bb1, Vip3Aa20 y el ARN DvSnf7 no se detectaron efectos adversos para los organismos no blanco.

Se considera que las proteínas aportadas por los eventos de tolerancia a herbicidas (CP4 EPSPS, DMO y PAT) no interfieren con el accionar de los productos de expresión insecticida y tampoco existe evidencia de que por sí solos generen algún efecto adverso.

A pesar de que se plantea que el maíz no es una especie que necesite de polinización entomófila, existen evidencias empíricas que acreditan que varios grupos de polinizadores, principalmente abejas y abejorros visitan los cultivos de maíz y tienen contacto con el polen, por lo tanto se debe evaluar su efecto en estos grupos. En base a esto es que se menciona en este informe los datos de expresión de las proteínas

insecticidas y el ARNdc en las distintas partes de la planta, con los valores más bajos de expresión en el polen. Esto implica que en caso de que los insectos polinizadores tengan contacto con el polen, los niveles de exposición serían extremadamente bajos y sumado a la especificidad de acción se concluye que el riesgo para este grupo de insectos es muy bajo.

Un aspecto de riesgo que debe tenerse en cuenta en cuanto al ARNdc expresado en este apilado es que existen ejemplos de especies dentro de la familia Chrysomelidae y más específicamente dentro de la subfamilia Galerucinae, como es el caso de *Galerucella calmariensis* que son utilizadas en algunas partes del mundo como controladores biológicos de malezas. Como este ARN tiene un efecto negativo particularmente en esta subfamilia, debe considerarse este tipo de situaciones. Se deja constancia igualmente que hasta la fecha en Uruguay no se está realizando una introducción de una especie controladora como esta.

Nivel de riesgo detectado

El nivel de riesgo detectado para el uso propuesto, liberación comercial, sobre organismos no blanco, de acuerdo a la hipótesis de riesgo enmarcados en los “Términos de Referencia para el análisis de la evaluación del riesgo” (Acta 192, CGR) es “**Bajo**”. Dado que las consecuencias serían “Despreciables” a “Menores” y la probabilidad de ocurrencia serían “Rara” a “Poco Probable”.

Bibliografía

Allen M. L. y W. B. Walker. 2012. Saliva of *Lygus lineolaris* digests double stranded ribonucleic acids. *Journal of Insect Physiology*, 58, 391-396.

Bachman P. M., R. Bolognesi, W. J. Moar, G. M. Mueller, M. S. Paradise, P. Ramaseshadri, J. Tan, J. P. Uffman, J. Warren, B. E. Wiggins y S. L. Levine. 2013. Characterization of the spectrum of insecticidal activity of a double-stranded RNA with targeted activity against Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). *Transgenic Research*, 22, 1207-1222.

Bolognesi R., P. Ramaseshadri, J. Anderson, P. Bachman, W. Clinton, R. Flannagan, O. Ilagan, C. Lawrence, S. Levine, W. Moar, G. Mueller, J. Tan, J. Uffman, E. Wiggins,

G. Heck y G. Segers. 2012. Characterizing the mechanism of action of double-stranded RNA activity against western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). PLoS ONE, 7, e47534.

Chen, H. and Malven, M. 2017. Assessment of DvSnf7 RNA Levels in Maize Tissues Collected from MON 87427 × MON 89034 × MON 810 × MIR162 × MON 87411 × MON 87419 Produced in United States Field Trials During 2016. Monsanto Technical Report MSL0028376. Saint Louis, Missouri.

Chinnadurai, P. and Phil, M. 2017. Assessment of CP4 EPSPS, Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry1Ab, Vip3Aa20, PMI, Cry3Bb1, DMO and PAT (pat) Protein Levels in Maize Tissues Collected from MON 87427 × MON 89034 × MON 810 × MIR162 × MON 87411 × MON 87419 Produced in United States Field Trials During 2016. Monsanto Technical Report MSL0029126. Saint Louis, Missouri.

EPA. 2007. White paper on tier-based testing for the effects of proteinaceous insecticidal plant-incorporated protectants on non-target arthropods for regulatory risk assessments. In: B. R. S. a. B. a. P. P. Division (ed.). U.S. Environmental Protection Agency, Biotechnology Regulatory Services and Biopesticides and Pollution Prevention Division, Washington, D.C.

Grimi D.A. 2014. Phenotypic Evaluation and Environmental Interactions of Maize MON 87419 in 2013-14 Argentina Field Trials. Monsanto Technical Report, MSL0026135. Monsanto Company, St. Louis, MO.

Head G., Pleau M., Sivausupramanian S., y Vaughn T. 2001. Insecticidal Spectrum of Activity for Cry3Bb Protein in vitro. Monsanto Technical Report Number C3NTO. St. Louis, MO.

Huvenne H. y G. Smagghe. 2010. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: A review. Journal of Insect Physiology, 56, 227-235.

Negri Aranguren I., D. Grimi y A. Ahmad. 2013. Phenotypic Evaluation and Environmental Interactions of Maize MON 87411 in Argentina Field Trials During 2012-13. Monsanto Technical Report MSL0025051. Monsanto Company, St. Louis, MO.

Price D. R. y J. A. Gatehouse. 2008. RNAi-mediated crop protection against insects. Trends Biotechnol. 26, 393-400.

Whangbo J. y G. Hunter. 2008. Environmental RNA interference. Trends in Genetics Vol.24 (6):297-305.

Whitsel J., S. Eskelsen, F. Lloyd y C. Brown. 2010. Phenotypic Evaluations and Ecological Interactions of MON 87427 in U.S. Field Trials During 2008. Monsanto Technical Report, MSL22501. Monsanto Company, St. Louis, MO.