

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

**GRUPO AD HOC SOBRE ORGANISMOS NO BLANCO
Talleres de Trabajo 2018**

El grupo *Ad hoc* de Organismos no Blanco está integrado por evaluadores del INASE, INIA, MGAP, IIBCE y MVOTMA.

Se solicita la autorización del evento apilado en maíz **MON87427XMON89034XMON810XMIR162XMON87411XMON87419** para ensayo de investigación, Evaluación Nacional de Cultivares (INASE).

Características introducidas

Evento MON 87427: expresa la proteína 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa (CP4 EPSPS) derivada de *Agrobacterium* sp. cepa CP4, la cual otorga tolerancia a herbicidas a base de glifosato tejido-selectiva. La proteína CP4 EPSPS no se expresa en los tejidos reproductivos masculinos confiriendo así el fenotipo de androesterilidad que es inducido por la aplicación de herbicidas a base de glifosato. El evento MON 87427 será utilizado como línea parental femenina durante la producción de semillas híbridas, siendo su principal ventaja facilitar los procedimientos involucrados en la producción de semilla híbrida de maíz.

Evento MON 89034: expresa las proteínas lepidopteridas Cry1A.105 y Cry2Ab2. La proteína Cry1A.105 es una versión modificada de la proteína Cry1A de *B. thuringiensis* y la Cry2Ab2 es una proteína derivada de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*.

Evento MON 810: expresa las proteínas lepidopteridas Cry1Ab es una proteína derivada de *B. thuringiensis* subsp. *Kurstaki*.

Evento MIR162: expresa la proteína Vip3Aa20 de *B. thuringiensis* que otorga protección frente al ataque de ciertos lepidópteros plaga y la enzima manosa-6-fosfato isomerasa (PMI) de *Escherichia coli* que se utilizó como marcador de selección en la transformación de plantas.

Evento MON 87411: expresa la enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa (CP4 EPSPS) derivada de *Agrobacterium* sp. cepa CP4 que otorga tolerancia a herbicidas a base de glifosato, y la proteína coleopterida Cry3Bb1 derivada *B. thuringiensis* subsp. *kumamotoensis* que otorga protección frente a ciertos coleópteros de la familia *Chrysomelidae*. También expresa una secuencia con repeticiones invertidas derivada de *Diabrotica virgifera* (conocido en Estados Unidos como “gusano occidental de la raíz del maíz”). La expresión de esta secuencia da como resultado la formación de 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 DvSnf7 forme una estructura secundaria de tipo horquilla con la región DvSnf7 como doble cadena (ARNdc DvSnf7). Este ARNdc ejerce su

modo de acción al ser ingerido por el insecto blanco, desencadenando en él el silenciamiento génico de un gen vital, a través de un mecanismo de interferencia mediada por ARN (ARNi).

Evento MON 87419: expresa la proteína dicamba mono-oxygenasa (DMO) derivada de *Stenotrophomonas maltophilia* la cual otorga el fenotipo de tolerancia a herbicidas a base de dicamba (ácido 3,6-dicloro-2-metoxi benzoico) y la proteína Fosfotricina Acetil-transferasa (PAT) derivada de *Streptomyces viridochromogenes* que confiere tolerancia a herbicidas a base de glufosinato.

Análisis de riesgo sobre organismos no blanco

Los eventos que presentan características insecticidas son: MON 89034, MON 810, MIR 162 y MON 87411.

Los eventos MON 89034, MON 810 y MIR 162 están autorizados en Uruguay para uso comercial, mientras que es la primer solicitud de autorización para el evento MON 87411.

El análisis de impacto sobre organismos no blanco para la acumulación de eventos MON 87427 x MON 89034 x MON 810 x MIR 162 x MON 87411 x MON 87419 se estudian mediante los productos de expresión con actividad insecticida: Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry1Ab y Vip3Aa20 para el control de ciertos lepidópteros plaga y en función de la proteína Cry3Bb1 y del ARN DvSnf7 para el control de coleópteros plaga.

Los modos de acción de la CP4 EPSPS, DMO y PAT no tienen especies animales blanco en sus modos de acción y por lo tanto, no es necesario plantear un análisis de impacto sobre organismo no blanco para estas enzimas.

El apilado de eventos MON 87427 x MON 89034 x MON 810 x MIR 162 x MON 87411 x MON 87419 presenta tolerancia a herbicidas a base a glifosato, dicamba y glufosinato, además de protección frente al ataque de ciertos insectos plagas del orden Lepidoptera y Coleoptera. Desde el punto de vista del impacto sobre especies no blanco, 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.

Cuando la actividad entomotóxica es aditiva, como es en el caso de las proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry1Ab y Vip3Aa20 (Chen y Martin, 2017 – B5.2), el impacto de la mezcla de las proteínas sobre organismos no blanco se deduce de los estudios realizados para cada uno de los productos por separado (U.S. EPA, 2007). El segundo componente en el análisis de riesgo del OVGGM sobre los organismos no blanco es el escenario de exposición. En el caso del maíz MON 87427 x MON 89034 x MON 810 x MIR 162 x MON 87411 x MON 87419, los niveles de expresión de cada uno de estos productos insecticidas resultaron comparables a los niveles de expresión de los mismos en los eventos individuales (Chinnadurai, 2017; Chen y Malven, 2017). Se considera que para la etapa de liberación para ensayo de investigación es suficiente con el análisis del efecto sobre organismos no blanco de la expresión de las proteínas individuales Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry1Ab y Vip3Aa20

Proteína Cry3Bb1 y ARN DvSnf7 expresados en el evento MON 87411

El evento de maíz MON 87411 presenta protección contra ciertos insectos del orden Coleoptera, más específicamente de la Familia Chrysomelidae. Esta protección está dada por la proteína insecticida Cry3Bb1 proveniente de *Bacillus thuringiensis* y por el ARN DvSnf7 cuya secuencia parcial DvSnf7p proviene de *Diabrotica virgifera*. Esta estrategia de protección contra insectos mediada por ARNi ha sido exhaustivamente caracterizada en cuanto a su modo de acción (Bolognesi et al., 2012; Ramaseshadri et al., 2013) y el espectro de actividad por Bachman et al (2013).

En los estudios de laboratorio reportados por Head et al. (2001) para diversas especies de insectos de diferentes órdenes taxonómicos en relación al espectro de actividad de la proteína Cry3Bb1 (resistencia a insectos de la familia Chrysomelidae), no se observó un impacto significativo en la mortalidad, ni en el desarrollo para coleópteros de otras familias como: *Coccinellidae*, *Tenebrionidae* y *Curculionidae*. Tampoco se observó efecto sobre diversas especies de insectos de otros órdenes evaluados como: *Ostrinia nubilalis* y *Helicoverpa zea* del orden Lepidoptera, avispas parasitoides y abejas (orden *Hymenoptera*), crisopas (predadores del orden *Neuroptera*) y *Folsomia candida* (orden *Collembola*) (U.S. EPA, 2010). Se concluyó que la proteína Cry3Bb1 expresada en el evento de maíz MON 88017 no representa un riesgo para organismos no blanco.

Los organismos no blanco evaluados por la EPA fueron representativos de seis órdenes taxonómicos diferentes de invertebrados, e incluyen grupos funcionales clave que se encuentran habitualmente presentes en el agroecosistema de los cultivos de maíz:

- *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae)
- *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae)
- *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae)
- *Hippodamia convergens* (Coleoptera: Coccinellidae)
- *Coleomegilla maculata* (Coleoptera: Coccinellidae)
- *Danaus plexippus* (Lepidoptera, Nymphalidae)
- *Folsomia candida* (Collembola: Isotomidae)
- *Eisenia fetida* (Annelida: Oligochaeta)

En resumen, la actividad insecticida de la proteína Cry3Bb1 se encuentra restringida únicamente a ciertos miembros de la familia Chrysomelidae del orden Coleoptera.

En el evento MON 87411 se expresa un ARN que, una vez maduro, consiste en 968 nucleótidos que forman una estructura doble hebra del tipo horquilla donde la parte biológicamente activa es la porción bicatenaria de 240 nucleótidos. La presencia de esta estructura de ARN doble hebra (ARNdc) desencadena en los insectos blanco la supresión del gen DvSnf7 por medio del mecanismo de interferencia por ARN (ARNi). El mecanismo de ARNi es altamente específico, estando determinada la especificidad por la complementariedad de secuencia necesaria para que el ARNdc desencadene el mecanismo en el insecto.

En las hipótesis de riesgo se consideran varios factores: i) la naturaleza de la molécula, ii) la posibilidad de que sea incorporada por los organismos no blanco a partir de su dieta (es decir, ruta de exposición por la herbivoría o predación de herbívoros), iii) la posibilidad de que las especies herbívoras puedan incorporar el ARNdc DvSnf7 en sus células ("ARNi ambiental"), y iv) que la especie cuente con un gen ortólogo a DvSnf7 con la suficiente identidad de

secuencia con la porción DvSnf7 para formar la complementariedad necesaria para desencadenar el mecanismo de ARNi en sus células.

I. Los ácidos nucleicos per-se son generalmente reconocidos como seguros por lo que no representan un riesgo para la seguridad alimentaria o ambiental (U.S. FDA, 1992).

II. En el caso del cultivo de maíz, las plagas fitófagas no blanco relevantes, los predadores y los parasitoides son considerados como especies clave en la evaluación de riesgo realizada a nivel de laboratorio, exponiendo dichas especies a altas dosis del ARN DvSnf7 y a campo en condiciones más realistas de exposición. No generando riesgos para que se incorpore a otro organismo por las mismas barreras determinadas en el mecanismo de acción del ARNi.

III. En el mecanismo de acción del ARN DvSnf7, existen diversas barreras que impiden que este se desencadene en diferentes especies de insectos. a) las moléculas de ARNdc pueden degradarse antes de ser ingeridas, o en las primeras secciones del tracto digestivo por acción de diversas enzimas o hidrólisis química (Price y Gatehouse, 2008; Allen y Walker, 2012), b) no todos los organismos pueden incorporar el ARNdc a partir de la dieta en forma eficiente o propagar su señal al resto de los tejidos (Whangbo y Hunter, 2008; Huvenne y Smagghe, 2010; Gu y Knipple., 2013), c) algunas especies han mostrado baja persistencia del ARNdc en su hemolinfa (Garbutt et al., 2013). En consecuencia, la posibilidad de que las especies herbívoras puedan incorporar el ARNdc DvSnf7 en sus células es muy baja.

IV. El ARNdc en las células es altamente específico para la secuencia nucleotídica de la porción bicatenaria del ARN. Whyard et al. (2009) demostraron que se puede controlar ciertas especies de *Drosophila* sin afectar otras especies cercanamente emparentadas dentro del mismo género usando secuencias de ARNdc que no tengan complementariedad de secuencia de 19-21 nucleótidos con las especies no blanco. Esta alta especificidad otorgada por el mecanismo de acción del ARNdc para controlar insectos ha sido detallada por diferentes autores (Price y Gatehouse, 2008; Burand y Hunter, 2013; Huvenne y Smagghe, 2010 y Gu y Knipple 2013).

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. La información presentada permite avalar la seguridad de las proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry1Ab, Cry3Bb1, Vip3Aa20 y el producto ARN DvSnf7 expresados en el maíz MON 87427 × MON 89034 × MON 810 × MIR 162 × MON 87411 × MON 87419 con respecto al efecto sobre especies no blanco con el fin de ser utilizado en ensayos de investigación y evaluación nacional de cultivos.

Nivel de riesgo detectado

El nivel de riesgo detectado para los usos propuestos de este OGM 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".