



Recursos Genéticos e Biotecnologia

## Parecer Técnico

Processo número: 01200.007232/2006-07

Assunto do processo: Solicitação de liberação comercial do milho transgênico Herculex, evento TC1507.

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

O milho transgênico Herculex, evento TC1507, contém o transgene *cry1F* e o transgene *pat*. O gene *cry1F*, proveniente da cepa PS811 de *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai*, codifica a expressão de uma proteína inseticida que confere resistência as plantas de milho GM ao ataque das lagartas *Spodoptera frugiperda* (lagarta do cartucho do milho), *Agrotis ipsilon* (lagarta rosca) e *Diatraea saccharalis* (lagarta-da-cana). O gene *pat* é proveniente da bactéria *Streptomyces viridochromogenes* e codifica a expressão da enzima fosfinotricina acetiltransferase (PAT) que confere as plantas de milho GM tolerância ao glufosinato de amônio (herbicida).

O processo contém informações relacionadas ao OGM, às avaliações de risco à saúde humana e animal, à avaliação de risco ao meio ambiente, além de cópias de documentos exigidos pela legislação. O processo não contém um plano de monitoramento pós-liberação comercial conforme solicitação do anexo I da Resolução Normativa Nº 5 da CTNBio. Analisei o processo, concentrando-me em algumas das informações solicitadas no anexo IV da Resolução Normativa Nº 5, relacionadas às avaliações de risco ao meio ambiente.

### Resolução Normativa Nº 5/ Anexo IV – Avaliação de risco ao meio ambiente:

3. os possíveis efeitos em organismos indicadores relevantes (*simbiontes, predadores, polinizadores, parasitas ou competidores do OGM*) **nos ecossistemas onde se pretende efetuar o seu cultivo**, em comparação com o organismo parental do OGM em um sistema de produção convencional;

Resumo das informações apresentadas: No Brasil, foram realizados dois experimentos de campo na safra de 2005/2006, um em Itumbiara (GO) e outro em Toledo (PR) com o objetivo de avaliar os possíveis impactos sobre a fauna de artrópodes não-alvo da tecnologia (Fernandes, 2006). Foram testados três tratamentos com três repetições cada (milho Bt, milho convencional com inseticida, milho convencional sem inseticida). Cada parcela experimental tinha uma área de 1.500 m<sup>2</sup> (30 X 50 m). A fauna total de artrópodes associada às plantas de milho foi amostrada semanalmente durante o ciclo da cultura através de quatro métodos: observação direta nas plantas, coleta em

armadilhas adesivas, coleta em armadilhas de solo, coletas em armadilhas d'água (bandejas amarelas contendo água).

Os indivíduos coletados em cada um dos tipos de amostragem foram identificados em nível de ordem, família e morfoespécie/ gênero. Os herbívoros não-alvo e inimigos naturais foram agrupados por família, com exceção das espécies de predadores *Orius* sp., *Geocoris* sp. e *Doru luteipes* e da lagarta *Helicoverpa zea* que foram analisadas separadamente. Para cada um dos métodos de amostragem foi realizada análise faunística através dos cálculos dos índices de dominância, abundância, frequência e constância para os grupos de organismos e espécies de predadores nos três tratamentos. Foram também realizadas para cada local, análises para verificar possíveis diferenças na composição de organismos não-alvo entre as datas de amostragem e tratamentos (análise de agrupamento e análise de componentes principais). As análises de agrupamento e componentes principais mostraram que o estágio fenológico da planta foi mais importante dos que os tratamentos para explicar as diferenças encontradas na diversidade de artrópodes não-alvo sobre as plantas de milho. Com base nesses dados, foi inferido que a diversidade de organismos não-alvo foi semelhante nas áreas submetidas aos diferentes tratamentos.

Para os predadores *D. luteipes*, *Orius* sp., para o grupo de espécies da família Coccinellidae e número total de predadores, o número médio de indivíduos observados por data de amostragem nos três tratamentos foram comparados usando análise de variância (teste F seguido por Teste Tukey para separação de médias). De um modo geral, não foram encontradas diferenças nas densidades de tesourinhas presentes nas plantas entre os tratamentos (milho Bt, milho convencional com inseticida e milho convencional sem inseticida), com exceção de duas datas de amostragem. Na amostragem de 24/01/2006 em Toledo (PR) foi observada uma densidade mais alta nas plantas de milho Bt comparada àquelas observadas no milho convencional com inseticida e em 12/12/2005 em Itumbiara (GO) onde foi registrada uma densidade mais alta de tesourinhas no milho Bt comparada àquelas observadas no milho convencional sem inseticida. O número total (média/ data de coleta) de predadores também não diferiu entre os tratamentos, com exceção de uma data em Toledo (PR) (milho Bt > milho convencional com inseticida) e uma data em Itumbiara (GO) (milho Bt > milho convencional sem inseticida).

O processo apresenta os resultados de um outro estudo realizado em campo nos EUA durante a safra 1999 em uma estação experimental da Pioneer em Iowa (Higgins, 1999). Foram comparadas as densidades de artrópodes benéficos (predadores e parasitóides) em parcelas de milho Bt (Cry1F) com aquelas observadas em parcelas plantadas com milho convencional (linhagem parental). Os resultados demonstraram que não houve diferença na presença de predadores e parasitóides entre as áreas de milho Bt e milho convencional.

#### Comentários sobre os dados apresentados:

a) Os resultados dos estudos apresentados (Higgins,1999; Fernandes, 2006) indicam que a proteína Cry1F expressa no milho não afetou a presença de

artrópodes benéficos que ocorrem no milho. Porém, esses resultados não demonstram que a proteína Cry1F não afeta negativamente os inimigos naturais importantes para cultura do milho no Brasil. Os ensaios foram conduzidos durante apenas uma safra e muito dos efeitos que poderiam causar redução na população são dependentes de uma escala temporal (exposição continuada à toxina). Na fase de avaliação de risco pré-liberação comercial, devido à disponibilidade de material e também devido às restrições da legislação, as avaliações de campo, sobre os possíveis efeitos das plantas Bt sobre inimigos naturais são conduzidas, ou numa escala pequena ou em períodos curtos de tempo. Porém, alguns dos possíveis impactos das culturas GM resistentes a insetos sobre os organismos não alvo (inimigos naturais, polinizadores e pragas não-alvo) são dependentes da escala (espacial e/ou temporal), como, por exemplo, redução na densidade populacional de predadores em função da redução da fecundidade das fêmeas após gerações alimentando-se em presas (herbívoros não-alvo) contendo as toxinas Bt. Estudos recentes, em laboratório, relataram menores frequências de oviposição em *Popilia japonica*, um Coccinellidae, quando alimentada com *Aphis gossypii*, o pulgão do algodoeiro, criado em plantas de algodoeiro GM (GK-12 e NuCOTN 33B) expressando toxinas Bt (Zhang *et al.* 2006). Não é conhecido o quanto essa frequência menor de oviposição poderá afetar a densidade populacional de *P. japonica* nas áreas de plantio de algodão na China, já que uma das principais presas dessa joaninha é o pulgão do algodoeiro *Aphis gossypii*, uma praga que não é afetada, mas pode acumular em seu corpo a proteína Bt expressa no algodão GM. Assim é importante estender as análises de risco além dos experimentos de campo de pequena escala para escalas maiores como grandes plantios empresariais monitorando as possíveis alterações nas funções ecológicas relevantes para o sistema estudo (p.ex. predação). Estas avaliações, por uma questão de logística, devem ser realizadas após a liberação comercial para detectar possíveis efeitos cumulativos ao longo do tempo e tomando como base as avaliações prévias de laboratório (ver comentários abaixo sobre os bioensaios de toxicidade sobre organismos não-alvo).

b) Em geral, nos dois locais estudados (Itumbiara e Toledo) os coeficientes de variação foram altos em todas as datas de amostragem, mostrando que existiu uma variabilidade muito alta nas densidades populacionais de *Doru luteipes* e outros predadores entre as parcelas experimentais. Essa variabilidade alta nas densidades de predadores entre as parcelas experimentais pode ter sido consequência da variabilidade intrínseca das espécies e assim um número maior de repetições seria necessário para a detecção de possíveis diferenças entre os tratamentos e também avaliações em anos consecutivos (Marvier 2002; Andow 2003). Outra possibilidade é a de que a movimentação dos indivíduos entre as parcelas experimentais, apesar do tamanho das mesmas, tenha causado essa alta variabilidade nas densidades populacionais observadas para as espécies/ grupos avaliados.

c) Em geral, as avaliações de campo dos possíveis efeitos das plantas GM resistentes a insetos sobre organismos não-alvo tem se concentrado em estudos sobre a biodiversidade total associada ao sistema agrícola em questão (revisões de Fontes *et al.* 2002; Wolfenbarger *et al.* 2008). Devemos ser

cuidadosos na avaliação dos estudos de diversidade e densidade de inimigos naturais para a avaliação de risco ambiental, particularmente estudos amplos de comunidade que incluem todas as espécies possíveis. Estes estudos de biodiversidade total servem de base para a seleção de determinados grupos ou espécies de artrópodes e para a construção/ descrição de relações tróficas que tenham importância ecológica no sistema agrícola em questão (Naranjo 2005). A construção de teias tróficas é muito importante para a escolha dos insetos alvos dos estudos, para o estabelecimento das rotas de exposição e construção das hipóteses de risco a serem testadas e também para o estabelecimento de metodologias adequadas para avaliação de toxicidade.

As avaliações de campo, utilizando o método de coleta direta nas plantas, conduzidas por Fernandes (2005) no Brasil e Higgins (1999) no EUA se concentraram em grupos específicos de predadores e pragas não-alvo da tecnologia (dados apresentados nesse processo). Apesar dos estudos de campo com o milho Herculex no Brasil terem sido conduzidos durante apenas uma safra, a avaliação por grupo funcional confirmou o que vários trabalhos já haviam demonstrado que a tesourinha *Doru luteipes* é a espécie de predador mais abundante nas áreas de milho quando comparado às demais espécies de inimigos naturais. Os resultados apresentados e dados de literatura (Cruz & Oliveira 1997) indicam que *D. luteipes* deve ser um organismo não-alvo (inimigo natural) a ser considerado nas análises de risco de variedades de milho GM resistente a insetos-praga. O percevejo pirata, *Orius* sp. e as joaninhas (família Coccinellidae) depois das tesourinhas, foram os predadores mais frequentes nos três tratamentos nas duas áreas amostradas.

**8. os impactos negativos e positivos aos organismos alvo e não-alvo que poderão ocorrer com a liberação do OGM, arrolando as espécies avaliadas, as razões da escolha e as técnicas utilizadas para demonstrar os impactos;**

O processo apresenta resultados de avaliação do efeito do milho transgênico Herculex, evento TC1507, sobre diferentes espécies de herbívoros-praga do milho (pragas alvo e não alvo da tecnologia). Foram realizados bioensaios em laboratório e avaliações de campo. O processo também apresenta avaliação do efeito da proteína Cry1F sobre um grupo de organismos indicadores.

Herbívoros-praga / Ensaios de laboratório: A atividade biológica da proteína Cry1F (produzida em *Pseudomonas fluorescens*) foi avaliada em diversas espécies de insetos-praga do milho em bioensaios utilizando aplicações de formulações aquosas da proteína a dietas artificiais. Foram testados lepidópteros-alvo da tecnologia e outras espécies de praga não-alvo. Os seguintes insetos que ocorrem no milho no Brasil foram susceptíveis à toxina Cry1F: *Spodoptera frugiperda* (lagarta do cartucho do milho), *Agrotis ipsilon* (lagarta rosca), *Elasmopalpus lignosellus* (lagarta elasmó), *Helicoverpa zea* (lagarta da espiga do milho), *Diatraea saccharalis* (broca da cana-de-açúcar) e *Diatraea grandiosella* (broca do milho do sudoeste). Não foi verificada atividade sobre as espécies: *Rhopalosiphum maidis* (pulgão da folha do milho) e *Dalbulus maidis* (cigarrinha do milho).

Praças-alvo / Ensaios de campo: A eficiência de diferentes híbridos de milho transgênico expressando a proteína Cry1F no controle da lagarta *Spodoptera frugiperda* e *Diatraea saccharalis* foi avaliada durante a safra de 2005/2006. Foram realizados ensaios em 4 localidades para a lagarta-do-cartucho (Itumbiara/Go, Toledo/PR, Indianópolis/MG e Jardinópolis/SP) e em Indianópolis/MG para a lagarta da cana-de-açúcar. Foram avaliados os danos provocados pelas lagartas nas folhas infestando as plantas de milho com larvas de primeiro instar de *S. frugiperda* e *D. saccharalis* provenientes de uma colônia de laboratório. Os resultados dos testes de campo confirmaram que o milho Herculex, evento TC1507 é eficiente no controle do ataque das lagartas de *S. frugiperda* e *D. saccharalis*.

Organismos não-alvo: Seguindo o modelo toxicológico aplicado nas análises de risco de substâncias inseticidas, foram apresentados resultados de testes de toxicidade aguda da proteína Cry1F nos seguintes organismos indicadores: *Daphnia magna* (organismo aquático); Collembola e minhoca (organismos de solo); *Colinus virginianus*, (aves); ratos (mamíferos); insetos predadores (*Chrysoperla carnea*; *Hippodamia convergens*); insetos parasitóides (*Nasonia vitripennis*), polinizadores (*Apis mellifera*) e *Danaus plexippus* (borboleta Monarca). Apesar dos dados sobre os níveis de expressão da proteína Cry1F terem sido coletados nas condições de campo do Chile, essas informações poderiam ter sido utilizadas para traçar as rotas de exposição à toxina bem como para a construção das hipóteses de risco relevantes a serem testadas e consequentemente a escolha de organismos não-alvo importantes para as condições de campo no Brasil. No caso específico dos inimigos naturais é mais relevante avaliar os possíveis efeitos da proteína Cry1F sobre os predadores *Doru luteipes*, *Cycloneda sanguinea* e *Orius insidiosus*, do que em *Chrysoperla carnea*, uma espécie de crisopídeo que não ocorre no Brasil. No Brasil, a tesourinha *D. luteipes* é o predador mais abundante em milho [ver Cruz & Oliveira (1997), Fernandes *et al* 2007 e os resultados apresentados nesse processo] e é considerada um predador importante de ovos e larvas de primeiro instar de diferentes espécies de lepidópteros. *Cycloneda sanguinea*, é uma joaninha predadora amplamente distribuída pelo país, ocorre associada a diferentes culturas (milho, algodão, hortaliças, etc.) e alimenta-se de pulgões, ovos de lepidópteros, néctar e pólen. Nas áreas experimentais com o milho Herculex e convencional esse predador foi abundante durante o período de floração (Fernandes 2006), o que leva a uma exposição direta desse predador às toxinas contidas no pólen.

No caso dos polinizadores, a abelha *Apis mellifera* foi o organismo indicador nos testes. Pela sua importância econômica (produção de mel, utilização na polinização de culturas) e ampla distribuição mundial, essa espécie de abelha é amplamente utilizada nos testes de toxicidade de inseticidas e proteínas Bt. A maioria dos estudos publicados na literatura e apresentados em relatórios técnicos, incluindo os dados apresentados nesse processo, utilizou mortalidade larval como principal parâmetro para análise de toxicidade aguda das proteínas Bt sobre *Apis mellifera*. Os resultados dos testes realizados com a proteína Cry1F purificada e pólen do milho Bt (Cry1F) apresentados nesse processo indicaram que a presença da proteína Cry1F na dieta das larvas não afetou a sobrevivência larval e emergência dos adultos (Maggi, 1999). Esses resultados

estão de acordo com o que vem sendo registrado na literatura sobre os efeitos das proteínas Cry ativas para lepidópteros (classes Cry1, Cry2, Cry9) e coleópteros (classe Cry3) sobre a sobrevivência das larvas ou adultos de *Apis mellifera* onde nenhum efeito agudo foi registrado (revisão 25 estudos de laboratório publicada por Duan *et al* 2008).

Porém, a abundância e riqueza de espécies de abelhas silvestres existente no país (Raw *et al* 2006, Silveira & Campos 1995, Silveira *et al.* 2002) e o comportamento diferenciado de alimentação das crias dessas abelhas comparado a *Apis mellifera*, torna esse grupo de abelhas um alvo para as análises de risco das plantas *Bt*. Pesquisas com abelhas nativas do Brasil tornam-se particularmente importantes devido ao recente aumento da área cultivada com cultivos GM no país, e também devido a crescente utilização das abelhas silvestres para polinização e produção de mel (Kevan & Imperatriz-Fonseca 2006). Assim, além de *Apis mellifera*, outra espécie de abelha silvestre deveria ser incluída nas análises de risco da proteína Cry1F, considerando inclusive os poucos dados existentes na literatura sobre os possíveis efeitos dessa toxina sobre esse grupo de não-alvo [uma publicação de Hanley *et al* (2003) e o relatório técnico de Maggi (1999) apresentado nesse processo]

*Bioensaios:* Os experimentos conduzidos com as diferentes espécies de inimigos naturais e polinizadores, em geral analisaram taxas de mortalidade de indivíduos submetidos a altas doses da proteína purificada. Não foram encontrados efeitos da proteína Cry1F sobre a sobrevivência dos organismos testados. Essas avaliações de mortalidade foram conduzidas durante períodos curtos do ciclo de vida do organismo, em geral durante alguns dias da fase larval/ ninfal. Porém algumas das espécies testadas, podem viver meses e assim estarem expostas a períodos mais longos à toxina Cry1F. Desse modo, não foi possível analisar os possíveis efeitos da toxina em parâmetros associados a adaptabilidade do organismo que podem resultar em redução das populações em campo como tamanho, longevidade, fecundidade e fertilidade das fêmeas.

Outro ponto a ressaltar foi o número pequeno de repetições usadas nos bioensaios (*Chrysoperla carnea*, 30 larvas/ tratamento; *Hippodamia convergens*, 3 repetições com 25 adultos em cada/ tratamento; *Nasonia vitripennis*, 3 repetições com 25 adultos em cada/ tratamento; *Apis mellifera*, 4 repetições com 20 larvas em cada/ tratamento). Um número pequeno de repetições pode limitar o poder das análises estatísticas em detectar efeitos dos negativos dos tratamentos (Marvier 2002, Andow 2003, Lövei & Arpaia 2005, Duan *et a.* 2008). Segundo Rose *et al.* (2007) nos bioensaios com *Apis mellifera* por exemplo, “*estudos de laboratório para medir sobrevivência de adultos de abelhas, deveria testar pelo menos seis coortes de 50 abelhas por tratamento para detectar 50% de redução com 80% de poder estatístico*”. Marvier (2002) argumenta que um pequeno aumento no número de repetições

12. o histórico de uso do OGM e os países onde já foram autorizadas ou recusadas a sua comercialização e plantio apresentando, neste caso, dados de monitoramento ou de estudos pós-liberação comercial, se houver;

Informações sobre as autorizações para experimentação em campo com a linhagem de milho TC 1507 (gene Cry1F e *pat*) obtidas na Argentina (1997 – 2000), Canadá (2000), Chile (1998 – 2000), França (1999-2000), Itália (1998-2000), África do Sul (1998-2000) e Estados Unidos (1997-2001) estão relacionadas nas páginas 28, 29, 30 e 31 do processo e constam de: data, órgão responsável pela autorização, número da autorização, objetivo da liberação e empresa responsável. Linhagens do milho Bt Cry1F foram autorizadas para uso comercial nos Estados Unidos em 2001, Argentina em 2005, Colômbia e União Européia em 2006. Não foram apresentados dados de monitoramento pós-liberação comercial para nenhum dos países onde o milho Bt Cry1F já é plantado comercialmente.

### Literatura Citada

- Andow, D.A. 2003. Negative and positive data, statistical power, and confidence Intervals. *Environ. Biosafety Res.* 2:75–80.
- Cruz I. , Oliveira, A.C. 1997. Flutuação populacional do predador *Doru luteipes* Scudder em plantas de milho. *Pesq. Agropec. Bras.* 32: 363-368.
- Duan, J.J.; Marvier, M.; Huesing, J.; Dively, G.; Huang Z.Y. 2008. A meta-analysis of effects of Bt crops on honey bees (Hymenoptera: Apidae). *PLoS ONE*, 3(1): 1-6.
- Fernandes, O.A.; Faria, M.; Martinelli, S.; Schmidt, F. Carvalho, V.F.; Moro, G. 2007. Short-term assessment of *Bt* maize on non-target arthropods in Brazil. *Sci. Agric.* 64(3):249-255.
- Fontes, E.M.G.; Pires, C.S.S.; Sujii, E.R.; Panizzi, A.R. 2002. The environmental effects of genetically modified crops resistant to insects. *Neotropical Entomology*, 31(4): 497-513.
- Hanley, A.V.; Huang, Z.Y.; Pett, W.L. 2003. Effects of dietary transgenic Bt corn pollen on larvae of *Apis mellifera* and *Galleria mellonella*. *J. Apic. Res.* 42: 77-81.
- Head, G.; Moar, W.; Eubanks, M.; Freeman, B.; Ruberson, J.; Hagerty, A.; Turnipseed, S.A. 2005. Multiyear, large-scale comparison of arthropod populations on commercially managed *Bt* and non-*Bt* cotton fields. 2005. *Environmental Entomology*, 34: (5):1257-1266.
- Kevan, P.G; Imperatriz-Fonseca, V. (Ed.). 2006. *Pollinating bees: the conservation link between agriculture and nature*. 2<sup>nd</sup> Ed., Brasília: MMA, p. 247-301.
- Lövei, G.L.; Arpaia, S. 2005. The impact of transgenic plants on natural enemies: a critical review of laboratory studies. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 114: 1–14.
- Marvier, M. 2002. Improving risk assessment for nontarget safety of transgenic crops. 2002. *Ecological Applications*, 12(4):1119–1124.

- Naranjo, S. Long-term assessment of the effects of transgenic *Bt* cotton on the function of the natural enemy community. 2005. *Environmental Entomology*, 34(5):1211-1223.
- Raw, A.; Boaventura, M.C.; Freitas, G.S. 2006. The diversity of a bee fauna: the species of the cerrados of Central Brazil. *In: Kevan, PG & Imperatriz-Fonseca, V. (Ed.). Pollinating bees: the conservation link between agriculture and nature. 2<sup>nd</sup> Ed., Brasília: MMA, p. 321.*
- Rose, R.; Dively, G.P; Pettis, J. 2007. Effects os Bt corn pollen on honey bees: Emphasis on protocol development. *Apidologie*, 38: 368-377.
- Silveira, F.A., Campos, M.J.A. 1995. A melissofauna de Corumbataí (SP) e Paraopeba (MG) e uma análise da biogeografia das abelhas do cerrado brasileiro (Hymenoptera, Apoidea). *Revista Brasileira de Entomologia*, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 371-401.
- Silveira, F.A.; Melo, G.A.R.; Almeida, E.A.B. 2002. *Abelhas brasileiras: sistemática e Identificação*. Belo Horizonte: Ed. do autor, 2002. 253 p.
- Wolfenbarger L.L., Naranjo S.E., Lundgren J.G., Bitzer R.J., Watrud L.S. 2008. Bt Crop Effects on Functional Guilds of Non-Target Arthropods: A Meta-Analysis. *PLoS ONE*, 3(5): 1-11.
- Zhang, G.F.; Wan, F.H.; Lövei, G.L.; Liu, W.X.; Guo, J.Y. Transmission of *Bt* toxin to the predator *Propylaea japonica* (Coleoptera: Coccinellidae) through its aphid prey feedins on transgenic *Bt* cotton. *Environmental Entomology*, 35(1): 143-150. 2006.

**Recomendação:** Sugiro que antes da liberação para plantios em grandes áreas sejam analisados os efeitos da toxina Cry 1F sobre o predador *Doru luteipes* e sobre uma espécie de abelha indígena. No caso do predador, essas análises devem cobrir todo o ciclo de vida do inseto e avaliar possíveis efeitos sub-letais medindo os parâmetros; tamanho, longevidade, fecundidade e fertilidade dos adultos, além das taxas de mortalidade nas diferentes fases do ciclo. Assim será possível fazer previsões sobre possíveis efeitos negativos da proteína Cry1F sobre as populações desse predador em função de uma escala temporal e espacial do plantio comercial do milho Bt.

Brasília 15 de agosto de 2008

Carmen Sílvia Soares Pires  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Biologia/Ecologia de Insetos, PhD