



C.n.º.<sup>1</sup>

Londrina 14 de Julho de 2008

Ao Sr Coordenador  
Dr. Jairon Alcir Santos do Nascimento  
Coordenador Geral da CTNBio  
Assunto: Parecer Ad Hoc – Liberação Comercial -Milho Geneticamente  
Modificado Resistente a Insetos (Milho Mir 162)  
Processo no. 01200.007493/2007-08

Prezado Senhor,

Estou encaminhando em anexo o parecer sobre o processo submetido a CTNBio. Os documentos recebidos constam na Tabela 1. Informo que o anexo 19 não consta entre os documentos enviados.

Atenciosamente,

Daniel R. Sosa-Gomez  
Pesquisador  
Embrapa Soja

---

<sup>1</sup> *Ministério da Agricultura  
e do Abastecimento*

## PARECER ENVIADO 14 EM JULHO DE 2008

Tabela1. Anexos recebidos

Anexo #	Título do anexo sucinto	Volume	
1	Caracterização da proteína Vip3A expressa no milho (evento MIR162) e comparação com proteína produzida p via microbiana e derivada de plantas	Volume I	
2	Caracterização molecular do DNA transgênico no evento MIR162	Volume I	
3	Avaliação agrônômica de híbridos de milho MIR162 tropical	Volume I	
4	Avaliação agrônômica de híbrido de milho MIR162 tropical	Volume I	
5	Eficácia do milho MIR162 p controle de <i>S. frugiperda</i> , <i>H. zea</i> e <i>D. saccharalis</i>	Volume I	
6	Eficácia do milho MIR162 p controle de <i>S. frugiperda</i> em estágio inicial de desenvolvimento do milho	Volume I	
7	Avaliação da homologia seqüência de aminoácidos de Vip3Aa20 c toxinas conhecidas	Volume I	
8	Avaliação da homologia seqüência de aminoácidos da proteína PMI c toxinas conhecidas	Volume I	
9	Toxidez por dose oral única em camundongos	Volume I	
10	Vip3A20: Avaliação da homologia na seqüência de aminoácidos com	Volume I	

	alergênicos conhecidos		
11	Fosfomanose isomerase: Avaliação da homologia na seqüência de aminoácidos com alergênicos conhecidos	Volume II	
12	Análise de composição de grãos e de forragem do milho MIR162	Volume II	
13	Análise comparativa entre híbridos de milho convencional e MIR162: avaliação de contaminação p fungos e micotoxinas	Volume II	
14	Estudo de segurança de 90 dias de grãos de milho MIR162 como alimento de ratos	número de volume não informado	em apenso
15	Avaliação do milho MIR162 em frangos de corte	Volume II	
16	Quantificação de Vip3Aa20 e PMI em tecidos provenientes de milho MIR162	Volume II	
17	Vip3Aa20: estudo da prole de abelha <i>Apis mellifera</i> L. (Hymenoptera: Apidae)	Volume II	
18	Avaliação da influência de milho transgênico sobre a comunidade de insetos	Volume II	
19	<b><u>Não consta no processo</u></b>		
20	Folha de informação ao público		
Não informado	8. Bibliografia complementar	Traduções	#2029 #1933 #2159 #2077 #2079

			#2078
--	--	--	-------

<sup>1</sup> NI, não informado

A empresa Syngenta Seeds Ltda., transformou milho (*Zea mays* L.) mediante a introdução do gene *vip3Aa20* que codifica a proteína vip3Aa20, a qual confere resistência a lepidopteros-pragas de ocorrência nacional, tais como a lagarta-do cartucho-do milho (*Spodoptera frugiperda*), a broca do colmo do milho (*Diatraea saccharalis*) e a lagarta da espiga (*Helicoverpa zea*). A proteína vip3Aa20 é uma variante da proteína Vip3Aa1 de ocorrência natural na cepa AB88 de *Bacillus thuringiensis*. Outra variante dessa mesma proteína (Vip3Aa19) esta presente na transformação realizada no algodão COT102, liberada nos Estados Unidos e Austrália (<http://www.agbios.com/dbase.php?action=Submit&evidx=512>). A diferença da proteína Vip3Aa19 em relação à proteína nativa consiste na substituição de dois aminoácidos localizados nas posições 129 e 284. Além disso, no mesmo material foi inserido o gene *manA* que codifica a enzima fosfomanose isomerase (PMI), a qual serve como marcador para facilitar o processo de seleção durante as etapas de desenvolvimento do milho MIR162.

A proteína Vip3a é ativada mediante proteólise de maneira semelhante às toxinas Cry1A, a toxina ativa possui 62kDA que liga-se as vesículas das microvilosidades (“Brush Border Membrane Vesicles”) do intestino médio dos insetos da ordem lepidóptera. Após a ligação da proteína Vip3 aos receptores específicos são formados poros cation-específicos que ocasionam a interrupção do fluxo de íons no mesenteron causando paralisia e morte (Lee et al. 2006). A toxina não se liga aos mesmos receptores das toxinas Cry 1A e seu modo de ação parece ser único (Lee et al. 2006). Assim, os estudos iniciais indicam potencial reduzido para ocorrer resistência cruzada com as toxinas Cry. O conhecimento sobre o modo de ação das proteínas Vip, comparativamente com as proteínas Cry, não foi dilucidado em profundidade.

O processo de transformação utilizado para obter o milho MIR162 foi mediante a transformação de embriões imaturos mediante a bactéria *Agrobacterium tumefaciens*, utilizando como vetor de transformação o plasmídeo pNOV1300. Nesse plasmídeo foi inserido o cassete de expressão continha a região codificadora de vip3Aa19, regulada pelo promotor polyubiquitin (ZmUbilnt) do milho e seqüências de poliadenilação 35S do vírus do mosaico da couve-flor. O cassete de expressão manA continha a região codificadora *manA* regulada pelo promotor ZmUbilnt e a seqüência de poliadenilação nopalina sintetase (NOS). O gene *manA* é proveniente de *Escherichia coli* e codifica a enzima fosfomanose isomerase (PMI). As células de milho transformadas que expressam manA podem utilizar manose como fonte primaria de C, entretanto as células sem essa capacidade não podem desenvolver em meios de cultura com esse monossacarídeo com fonte única de C.

Segundo o proponente a presença de uma única cópia do inserto no cromossomo cinco do milho foi determinada mediante análise de Southern Blot (pág. 23 volume I) e seqüenciamento de seus nucleotídeos (Fig. 15, página 51 do Anexo II).

O inserto ocorreu no cromossomo cinco do milho, na região 5.03 e as informações sobre as seqüências adjacentes ao inserto foram fornecidas nas Figuras 18 e 19 do anexo 2, volume I. Essa informação é relevante para determinar precisamente localização da inserção e para futuramente poder realizar o "tracking" dos materiais liberados, mediante PCR convencional o PCR TaqMan. A detecção da do inserto no genoma da planta transformada é de importância para o acompanhamento e identificação nos processo de rotulagem.

Os dados que constam na Tabela 15 (pág. 58 volume I), indicam variação considerável nos teores da proteína VipAa20 dependendo do tecido e da fase da cultura, portanto seria conveniente especificar na página 84 (Ensaio de diluição do tecido) quais tecidos foram utilizados e em que fases da cultura

foram extraídos. Não texto que considera o referido assunto não foram citados nestes parágrafos (parágrafos 1, 2 e 3 da página 84) quais ou qual são os anexos que correspondem a esta informação. Assim como não foi possível localizar o anexo onde consta a informação referida no parágrafo anterior. Os itens referidos anteriormente possuem importância quando é considerando o manejo da resistência de insetos a essa proteína.

Na tabela 17 (pág. 60, volume I) constam os efeitos da proteína sobre diversos organismos testados, algumas espécies de organismos mencionadas não ocorrem no Brasil, outras são de reduzida expressão na cultura do milho. A empresa deverá realizar ensaios sobre as espécies mais importantes, representativas e de ocorrência freqüente em diversos sistemas agrícolas no Brasil, como exemplo podem ser citadas espécies de parasitóides (*Trichogramma* sp.) e predadoras das famílias Coccinelidae (*Cycloneda sanguinea*, *Hippodamia convergens*, *Scymnus* sp.), Carabidae (*Lebia concinna*) e Forficulidae (*Doru luteipes*).

A transformação realizada não alterou os níveis cinza, gordura, proteína, carboidratos, minerais e ácidos graxos e aminoácidos conforme as tabelas 1 a 5 do anexo 12, as conclusões foram realizadas mediante comparações com as amplitudes definidas pelo ILSI (2004). No foram realizadas análises estatística no entanto, na página 3 do mesmo anexo (Anexo 12, Volume II) refere-se a utilização de delineamento experimental de blocos casualizados (DBC) com 3 repetições.

As tabelas 13, 14 do anexo 13 volume II não apresentam as dimensões dos valores de fumonisina.

Nos experimentos realizados em condições de campo (pág. 12 do Anexo 18) falta o controle utilizando inseticidas seletivos (sem tratamento com inseticidas de amplo espectro) para realizar as comparações em uma situação que favoreça a presença ou abundância dos inimigos naturais. Os inseticidas

seletivos foram mencionados na página 12, último parágrafo do próprio anexo 18.

As referências colocadas no final da pág. 17 e primeiro parágrafo da pág. 18 do anexo 18 sobre proteínas Cry (Saxena et al. 1999, Yu et al. 2002) e seu destino no solo não são relacionadas com o presente processo sobre proteínas Vip, cujas propriedades estruturais e funcionais são diferentes. Portanto infere-se que não existem informações relacionadas a sua persistência/degradação no solo, e provavelmente com menos possibilidades para as condições do Brasil.

As avaliações de artrópodes no solo utilizando os diferentes métodos (alçapões e bandejas) na foram analisados estatisticamente.

Embora seja possível que não sejam observados efeitos sobre a fauna benéfica do referido evento essa informação caso exista deveria ser informada e no caso contrario, deverá ser gerada, para atender qualquer questionamento que possa ser realizado.

Portanto, sugiro à CTNBio submeter processo à diligência para respostas às questões enumeradas a seguir:

- 1) Acrescentar um anexo com as informações sobre quais tecidos foram utilizados e em que fases da cultura foram extraídos, página 84 (Ensaio de diluição do tecido)
- 2) Fornecer informações de laboratório e de campo dos efeitos ou ausência de efeitos, da proteína sobre organismos benéficos cujas espécies ocorrem no Brasil.
- 3) Completar com análise estatísticas os itens da página 3 do Anexo 12, Volume II e o item sobre avaliação de artrópode no solo, referidos no parecer.
- 4) Acrescenta nos experimentos realizados em condições de campo (pág. 12 do Anexo 18) um tratamento utilizando inseticidas seletivos (sem tratamento com inseticidas de amplo espectro) para realizar as comparações em uma situação que favoreça a presença ou abundância dos inimigos naturais.

4) Proporcionar informações quantitativas sobre persistência e degradação da proteína no solo.

#### Literatura Citada

Lee MK, Miles P, Chen JS. 2006. Brush border membrane binding properties of *Bacillus thuringiensis* Vip3A toxin to *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* midguts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 339 (2006) 1043–1047.

Atenciosamente,

Daniel R. Sosa-Gomez

Embrapa