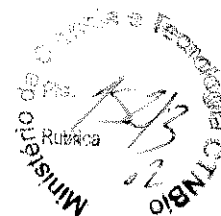


**PARECER SOBRE LIBERAÇÃO COMERCIAL****Processo:** 7493/20007-08**Proponente:** Zyngenta Seedes Ltda**Evento:** Milho MIR 162 (Milho Geneticamente Modificado Resistente a Insetos).**Relator:** Edilson Paiva**INTRODUÇÃO**

A Syngenta Seedes Ltda, solicita a CTNBio à liberação comercial, incluindo cultivo, manipulação, transporte, consumo e descarte, do organismo geneticamente modificado milho MIR 162 e seus derivados.

O milho MIR 162 contém o gene vip3Aa20 que codifica a proteína Vip 3Aa20 e o gene manA que codifica a enzima fosfomanose isomerase (PMI). A proteína Vip3Aa20 é uma variante da proteína inseticida nativa Vip3Aa1 de *Bacillus thuringiensis* (Bt) cepa AB88. A proteína Vip 3Aa20 tem propriedade inseticida contra vários lepidópteros-praga da cultura do milho como: *Helicoverpa zea*, *spodoptera frugiperda* e, *Diatrea saccharalis*. O gene manA foi utilizado como marcador de seleção durante o processo de transformação.

**CARACTERIZAÇÃO DO EVENTO**

O organismo doador do gene VIP (Vegetative Insecticidal Protein) foi a bactéria de solo *Bacillus thuringiensis*, a mesma que produz as proteínas Cry. A diferença consiste no fato de que as proteínas Vip são produzidas durante a fase de crescimento vegetativo bacteriano e são termolábeis. O Bt produz as proteínas inseticidas Cry e Vip como meio de obtenção de nutrientes a partir de insetos mortos pela ação das mesmas. A atividade inseticida das duas classes de proteína são similares mais não idênticas. Após a ingestão, as proteínas Vip são clivadas em polipeptídeos ativos de 66 kDa que ligam-se a receptores distintos daqueles das proteínas

Cry, no intestino médio de insetos susceptíveis causando a lise das células, levando o inseto a morte.

A proteína Vip3Aa produzida pelo milho transgênico MIR 162 é uma variante da proteína nativa Vip3a1. Ambas, contém 789 aminoácidos e um peso molecular de 89 kDa. No entanto, a proteína Vip3Aa20 difere em dois amino ácidos nas posições 129 e 284 quando comparada com a proteína nativa.

O milho MIR 162 expressa também o gene manA (Ou gene pmi) proveniente de E. coli cepa K-12. Este gene, codifica a enzima PMI que catalisa uma conversão reversível de manose-6-fosfato e frutose-6-fosfato permitindo o uso de manose como fonte de carbono e energia e, foi utilizado como marcador de seleção durante o processo de transformação genética. Assim, células vegetais contendo a proteína PMI sobrevivem e se desenvolvem em meio de cultura contendo manose como fonte primária e única de energia e carbono.

Estudos mostraram que a proteína PMI derivada do milho MIR 162 e de bactérias E. coli foram equivalentes do ponto de vista bioquímico e funcional.. A concentração média da proteína Vip em tecidos vegetais do evento MIR 162 é muito pequena, representando menos de 0,004% da proteína total do grão maduro.

O evento MIR 162 foi produzido, por meio de transformação via *Agrobacterium tumefaciens* utilizando embriões imaturos de milho, o que apresenta uma vantagem de produzir transformantes contendo insertos simples e com baixo número de cópias no genoma transformado. O milho MIR 162 foi obtido através um sistema de vetor binário, utilizando o plasmídeo pNOV1300 contendo o gene vip3Aa. Posteriormente, ao processo de incorporação do T-DNA no genoma do milho MIR 162, foi verificada uma mudança na posição 129 do polipeptídeo inserido. No lugar, da metionina da proteína original foi encontrada uma isoleucina, e o gene foi então denominado vip3Aa20. No mais, a integridade do T-DNA inserido no milho MIR 162 e a contigüidade dos elementos funcionais dentro da inserção foram mantidos.

Dados de análises de Southern Blot, demonstraram que o evento MIR 162 contém uma cópia única do gene vip3Aa20 e do gene manA. A inserção do T-DNA ocorreu na região 5.03 do cromossomo cinco, não interferindo em nenhum gene endógeno do milho.

Foram feitos estudos de segregação por várias gerações do milho MIR 162 e os resultados mendelianos e moleculares mostraram a integridade da inserção nas gerações testadas.

O milho MIR 162 foi agronomicamente avaliado em condições de campo e casa-de-vegetação em vários experimentos realizados nos Estados Unidos, Austrália, Argentina e Brasil. Nestes estudos, vários parâmetros fenotípicos e genotípicos foram testados comparativamente com genótipos

Ministério da Ciência e Tecnologia  
1594  
RUBRICA  
CTNBio

isogênicos não transgênicos. O conjunto destas avaliações mostraram que o evento MIR 162 apresentou performance agronômica igual ou superior às suas isolinhas e, que nenhuma diferença fenotípica significativa foi observada, a qual, pudesse conferir ao evento MIR 162 maior ou menor adaptabilidade ao meio ambiente, a não ser ao que se referia a resistência a insetos-praga da ordem lepidóptera.

Estudos conduzidos para avaliar o efeito da proteína Vip3Aa em diversos organismos não-alvo como: Animais aquáticos (Peixes, Pulga d'água); insetos benéficos (Joaninhas, crisopas, abelhas; tesourinhas); e minhocas levaram a conclusão de que o evento MIR 162 não apresenta nenhum efeito adverso sobre a comunidade de insetos e outros organismos não alvo.

Estudos sobre a degradação da proteína Vip em solos Brasileiros e Norte Americano, mostraram que a atividade biológica da mesma teve uma vida média de 6 a 13 dias. Indicando, que a proteína Vip é facilmente degradada em solos naturais.

Não há, possibilidade de fluxo gênico horizontal no território brasileiro, pois não temos nenhum parente próximo do milho, no Brasil (Teosinte e Tripsacum só ocorrem na América Central). O fluxo gênico vertical para variedades locais (chamados milhos crioulos) de polinização aberta é possível, mas apresenta o mesmo risco causado pelos genótipos comerciais disponíveis no mercado. A coexistência entre cultivares de milhos convencionais (melhoradas ou crioulas) e cultivares transgênicas de milhos é possível e simples do ponto de vista agrônomo. As comunidades antigas e os agricultores modernos têm sabido conviver, ao longo de mais de 60 anos, sem problemas, com as centenas de diferentes cultivares de milho comercial disponíveis no mercado, mantendo suas identidades genéticas ao longo desse tempo.

O milho MIR 162, já foi aprovado para liberação comercial nos USA, Austrália e Taiwan. O gene vip3Aa, também está presente no milho transgênico piramidado Bt11xMIR162 aprovado nos USA e, no evento transgênico de algodão Cot 102, aprovado nos USA e Austrália.

Com base na evidência científica disponível, meu parecer final é de que a comercialização do milho MIR 162, ou de produtos derivados do mesmo, são tão seguros quanto aqueles derivados de milho convencionais e que podem, portanto, serem utilizados para os mesmos fins. Meu parecer é pelo deferimento da liberação comercial do milho MIR162.

**Observação:** O plano de monitoramento foi apresentado de forma muito reduzida e não pode ser aprovado. Sugiro, utilizar o esquema de monitoramento apresentado pela Monsanto no processo 01200.000364/2009-42 como modelo para uma primeira análise pela CTNBio.



## LITERATURA CONSULTADA.

- Bates SL, Zhao JZ, Roush RT. 2005. Insect resistance management in GM crops: past, present and future. **Nature Biotechnology**. 23:57-62.
- Chamthiankul, ST. et al. 2008. Spore stage of a vegetative insecticidal gene increase toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. Aizawai SP41 against *Spodoptera exigua*. **Journal of Biotechnology**. 136: 122-128.
- Chen, J. et al. 2003. Comparison of the expression of *Bacillus thuringiensis* full-length and N-terminal truncated vip3A gene in *Escherichia coli* **Journal of Applied Microbiology**.95:310-316.
- Doss,VA. 2002. Cloning and expression of the vegetative insecticidal protein(vip3V) gene of *Bacillus thuringiensis* in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**. 26: 82-88.
- Estruch JJ, et al. 1996.Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran.PNAS 93:5389-5394.
- Fang, J. Et al. 2007. Characterization of Chimeric *Bacillus thuringiensis* Vip3 toxins. **Applied and Environmental Microbiology**. 73: 956-961.
- Gould F. 1998. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: Integrating pest genetics and ecology. **Annual Review of Entomology**. 43: 701-726
- Hammond B et al. 2003. Reduction of fumonisin mycotoxins in Bt corn. **The Toxicologist** 72: 1217.
- Lee MK, Walters FS, Hart H, Palekar N, Chen JS. 2003. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab delta-endotoxin. **Appl Environ Microbiol** 69:4648-4657.
- Liu, J. 2007. Identification of vip3A-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a novel vip3A-type gene. **Letters in Applied Microbiology** 45: 432-438.
- Loguercio, LL. Et al. 2002. Combined analysis of supernatant-based feeding bioassays and PCR as a first-tier screening strategy for Vip-derived

activities in *Bacillus thuringiensis* strains effective against tropical fall armyworm. **Journal of Applied Microbiology**. 93: 269-277.

Marvier M, McCreedy C, Regetz J, Kareiva P. 2007. A meta-analysis of effects of Bt cotton and maize on nontarget invertebrates. **Science** 316:1475-1477.

Peng, D. et al. 2007. Safety assessment of transgenic *Bacillus thuringiensis* with VIP insecticidal protein gene by feeding studies. **Food and Chemical Toxicology** 45: 1179-1185.

Rose R, Dively GP. 2007. Effects of insecticide-treated and Lepidopteran-active Bt transgenic sweet corn on the abundance and diversity of arthropods. **Environ Entomol** 36:1254-1268.

Selvapandiyan, A. et al. 2001. Toxicity analysis of N- and C-Terminus-deleted vegetative insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**. 67:5855-5858.

Shelton AM, Zhao JZ, Roush RT . 2002. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic. **Annual Review of Entomology**. 47:845-881.

Singh, C. et al. 2008. Detection and characterization of recombinant DNA expressing vip3A-type insecticidal gene in GMOs-standard single, multiplex and construct-specific PCR assay. **Anal Bioanal Chem**. 390:377-387.

Zhu, C. et al. 2006. Vegetative insecticidal protein enhancing the toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp *Kurstaki* against *Spodoptera exigua*. **Letters in Applied Microbiology**. 42: 109-114.

Wu F, Miller JD, & Casman EA .2004. Bt corn and mycotoxin reduction: An economic perspective. **Journal of Toxicology, Toxin Reviews** 23(2-3), 397-424.

Wu, ZL et al. 2004. Cloning and localization of vip3A gene of *Bacillus thuringiensis*. **Biotechnology Letters**. 26: 1425-1428.

Yu, C. 1997. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. **Applied and Environmental Microbiology**. 63: 532-536.

