

## PARECER TÉCNICO MON 15985

A documentação encaminhada para análise consiste em solicitação de liberação para plantio comercial do algodão MON 15985 e suas progênes geradas através melhoramento genético clássico. A empresa solicita liberação para plantio comercial e uso posterior para produção de fibra, ração animal e alimentação humana sendo que o algodão MON 15985 já foi liberado em diversos países.

O material encaminhado para avaliação é constituído de 12 capítulos e 01 anexo. Os capítulos tratam de aspectos da biologia do organismo; da metodologia, plasmídeos e genes utilizados no evento de transformação selecionado MON 15985; sua caracterização molecular e estabilidade genética. São também avaliadas as características ambientais e nutricionais e respectivos aspectos de segurança. Constam do documento 77 tabelas que relatam os pontos acima mencionados e aspectos agrônômicos do algodão MON 15985 quanto à diminuição de infestação por insetos praga. Os estudos de avaliação ambiental foram realizados em três localidades no Brasil (GO, MT e SP) na safra 2005/2006 representando a região Centro-Sul de plantio de algodão.

### **Aspectos gerais da presente solicitação**

A espécie botânica de base dos eventos de transformação genética relatados a seguir é *Gossypium hirsutum* que corresponde a 90% da área plantada mundialmente. Esta espécie alotetraplóide corresponde a um híbrido natural com data aproximada de 1,5 Ma. A variedade Coker 312, pertence ao tipo Eastern, é o genótipo utilizado na geração do algodão Bollgard<sup>®</sup> cujo plantio já foi autorizado no Brasil em 2005. A partir do algodão Bollgard<sup>®</sup> dois novos eventos de transformação foram realizados e resultaram em MON 1445 e MON 15985. Este último é caracterizado pela introdução dos genes *cry2Ab2* e *uidA*. O algodão Bollgard<sup>®</sup> contém além do seu genoma original, dois eventos de integração conforme detalhado no Parecer Técnico Prévio Conclusivo nº 513/2005. Apenas um dos eventos é funcional e resulta na presença das proteínas Cry1Ac e NPTII. A presença da proteína Cry1Ac confere tolerância demonstrada em campo a larvas de diversos lepidópteros. A introdução do gene *cry2Ab2* e consequente presença da proteína por ele codificada resulta em proteção adicional à lagarta-do-cartucho (*Spodoptera*

*frugiperda*). O desenvolvimento do algodão MON 15985 visa contribuir ao manejo agrícola reduzindo a aplicação direta de inseticidas *in planta* e no solo.

### **Aspectos moleculares relacionados a obtenção de MON 15985**

A introdução da informação genética desejada (cassete contendo o gene *cry2Ab2* e gene *uidA*) foi efetuada através da metodologia de biobalística que resulta na entrada direta do fragmento de DNA de interesse na célula vegetal. A seleção de células transformadas é possível através do uso do gene marcador *uidA*. A variedade DP50B é o genótipo recipiente do fragmento de interesse, sendo esta derivada do evento MON531 (algodão Bollgard<sup>®</sup>). Como dito anteriormente, o algodão Bollgard<sup>®</sup> contém inserido de modo estável os genes *cry1Ac* e *nptII*. As plantas regeneradas por procedimentos rotineiros em cultura de tecido e micropropagação de plantas foram propagadas para análise subsequente dos aspectos moleculares referente ao evento de transformação. A descrição do arcabouço do fragmento introduzido permite constatar que todos os genes estão sob o controle do mesmo promotor E35S, o que pretende garantir a expressão de modo semelhante dos genes sob seu controle. A única exceção feita é para o gene *aad* que está sob controle de um promotor que se expressa unicamente em bactérias garantindo o monitoramento de eventos de transformação nestas células.

As proteínas alvo deste parecer são a proteína Cry2Ab2 e a enzima  $\beta$ -D-glucuronidase (GUS). As demais já foram descritas em parecer anterior. A proteína Cry2Ab2 está presente na bactéria *B. thuringiensis* amplamente representada na microbiota do solo. Sua utilização na agricultura em formulações de inseticidas é usual desde 1958. O gene *cry2Ab2* foi isolado da bactéria *B. thuringiensis* susp. *kurstaki* sendo posteriormente otimizado para melhor expressão em plantas de algodão. A proteína é direcionada ao cloroplasto, e devido a fusão com um peptídeo de trânsito a versão final da proteína após processamento contém três aminoácidos suplementares em sua posição N-terminal. O gene *uidA* codifica para a enzima  $\beta$ -D-glucuronidase e foi inicialmente isolada da bactéria *Escherichia coli* cepa K12. Esta enzima catalisa a hidrólise de diversos  $\beta$ -glucoronídeos entre os quais o p-nitrofenil-  $\beta$ -D-glucoronídeo que resulta em composto cromogênico de coloração azulada. A bactéria *E.coli* é habitante do sistema digestivo de vertebrados, inclusive de humanos.

O evento de transformação que resulta no algodão MON 15985 foi minuciosamente avaliado através de métodos moleculares consagrados para avaliação da inserção do cassete no genoma da planta e expressão do mesmo. Este último foi avaliado pela presença e quantificação das proteínas alvo nos tecidos. A avaliação do evento de integração genômica foi realizada mediante diversas metodologias entre elas a hibridação genômica em membrana fazendo uso de sondas radioativas, ensaios de polimerização em cadeia (PCR) sequenciamento e clonagem de fragmentos de DNA. Estes ensaios permitiram determinar a presença de um único inserto. Análise do padrão de hibridação permite a visualização de mais de um fragmento nas canaletas de MON 15985, sendo um comum ao genótipo de origem DP50B. O sinal observado é decorrente de regiões comuns compartilhadas entre os dois fragmentos introduzidos sendo eles a região promotora (*P-E35S*) e terminadora (*NOS 3'*). A integridade do inserto foi avaliada através do padrão de hibridação e perfis de restrição específicos para cada parte do inserto. Procedeu-se também à caracterização dos insertos presentes na linhagem parental, o algodão Bollgard<sup>®</sup>. Em ambos os casos foram identificadas as regiões genômicas que flanqueiam os insertos. A estabilidade genética dos insertos foi monitorada em 4 gerações sucessivas e respeitaram as predições de segregação mendeliana para um único locus. A estabilidade molecular foi monitorada por ensaios de hibridação conforme descrito acima.

### **Análise do conteúdo protéico no algodão MON 15985**

A expressão dos genes introduzidos no algodão MON 15985 foi monitorada através de ensaios ELISA nos Estados Unidos, Índia Austrália e Brasil a partir de diferentes tecidos (folhas jovens, sementes, planta total, pólen entre outros). Em todos os experimentos realizados o algodão convencional não apresentou as proteínas Cry1Ac, Cry2Ab2, NPTII e GUS. O teor das proteínas variou entre as localidades refletindo a variação ambiental existente, como esperado. Em todos os casos, verificou-se que a proteína Cry2Ab2 acumula em maior quantidade nos tecidos das plantas em comparação com a quantidade detectada pela mesma metodologia da proteína Cry1Ac. Há variação segundo a localidade do tecido que apresenta o maior conteúdo das proteínas em estudo. De modo geral, observa-se que as folhas apresentam maior quantidade de Cry2Ab2 e Cry1Ac quando comprado em particular com botão floral, semente ou pólen. No Brasil, os

valores apresentados representam a média dos valores obtidos a partir de três ensaios em campo realizados em Santa Cruz das Palmeiras (SP), Santa Helena de Goiás (GO) e Sorriso (MT). Os valores médios obtidos em tecidos foliares e caroços para o algodão MON 15895 foram: Cry2Ab2, 660 e 250 µg/g de peso seco, respectivamente; Cry1Ac, 53 e 1,9 µg/g de peso seco, respectivamente; NPTII, 35 e 2,7 µg/g de peso seco, respectivamente; e GUS, 2600 e 140 µg/g de peso seco, respectivamente. A proteína AAD não foi detectada nos tecidos, como era de se esperar, por estar sob controle de um promotor bacteriano.

Estudos de toxicidade foram realizados em animais assim como de estabilidade protéica. Não foram verificados efeitos adversos pela presença das proteínas Cry1Ac, Cry2Ab, NPTII e GUS em camundongos. Verificou-se que todas as proteínas introduzidas no algodão MON 15985 apresentaram rápida degradação em presença de fluido gástrico (pH 1,2) sendo as proteínas hidrolisadas a peptídeos menores.

### **Aspectos agronômicos relacionados ao algodão MON 15985**

No Relatório de Biossegurança Alimentar e Ambiental encaminhado, os aspectos agronômicos e ambientais são tratados em maior detalhe nos capítulos VII-XI. São relatados resultados obtidos em 250 experimentos de campo realizados nos países que autorizaram o plantio do algodão MON 15985. Quando comparada a susceptibilidade a doenças mais frequentes induzidas por bactérias ou fungos verifica-se que o algodão MON 15985 e linhagens convencionais se comportam de modo similar. Por outro lado, constatou-se maior tolerância de algodão MON 15985 à lagartas de lepidópteros monitoradas quando comparado a DP50 e DP50B. Observações qualitativas realizadas durante duas safras mostram que 41% das localidades em estudo apresentam diferenças em insetos alvo. Outras observações apontam que 24% dos locais não mostraram diferenças para outros tipos de insetos. A conclusão dos estudos suporta que há um valor aditivo de Cry2Ab2 e Cry1Ac no controle de insetos-praga da família de lepidópteros e que não há diferenças substanciais entre o algodão MON 15985 e as plantas controle na infestação de insetos não-alvo. A análise de características agronômicas relacionadas à produção de fibra avaliada por kg/ha demonstra uma tendência a aumento na média de rendimento. Outros estudos não encontram suporte estatístico.

No Brasil, os experimentos foram conduzidos em três localidades e constituído de um conjunto de 9 cultivares sendo seis derivados do algodão MON15985 e os demais cultivares convencionais usados como controle. Estes foram avaliados em 4 repetições e submetidos à análise de variância pelo teste F, e suas médias comparadas pelo teste Tukey com 5% de probabilidade. Foram avaliadas características agronômicas diversas como aspectos fisiológicos da planta e de produtividade e qualidade da fibra. A partir dos experimentos apresentados foi possível selecionar um grupo de cultivares com desempenho superior não obstante seja necessário dar continuidade aos experimentos para confirmação da superioridade do grupo selecionado. Constata-se a partir dos experimentos realizados que a presença dos genes *cry1Ac*, *cry2Ab2*, *nptII*, *uidA* e *aad* não altera o perfil das características biológicas de crescimento e desenvolvimento das plantas de algodão MON 15985 a exceção do aumento de tolerância aos insetos alvo como será visto a seguir.

Experimentos foram conduzidos em todas as três localidades e delineados de forma a comparar o algodão convencional (DP50) e o algodão MON 15985 (DP50BII). Comparou-se a eficácia no controle de curuquerê-do-algodoeiro (*Alabama argillacea*), lagarta-da-maçã (*Heliothis virescens*), lagarta rosada (*Pectinophora gossypiella*) e espodóptera (*Spodoptera frugiperda*). Os tratamentos realizados comparou parcelas tratadas com inseticidas para todas as pragas, inclusive lepidópteros e tratadas com inseticidas contra todas as pragas exceto lepidópteros. A pulverização dos produtos comerciais esteve sujeita às determinações registradas para a cultura de algodoeiro. Os resultados obtidos nos ensaios realizados no Brasil também demonstram a eficiência do algodão MON 15985 no controle dos lepidópteros alvo. Em todos os casos analisados o número médio de botões florais danificados foi menor nas plantas DP50BII comparado a DP50.

A produtividade de algodão medida em caroço em kg/ha foi superior em Sorriso (MT) quando comparada ao algodão convencional sem inseticidas para lepidópteros enquanto não houve diferença significativa entre os tratamentos nas demais localidades. Vale ressaltar que a aplicação de inseticidas contra lepidópteros nas plantas DP50 resultaram em produtividade semelhante entre plantas DP50 e as plantas DP50BII demonstrando a equivalência entre ambas as condições.

O efeito esperado em lepidópteros alvo pela aplicação exógena das proteínas Cry1Ac e Cry2Ab em formulações de inseticidas ou expressa pela planta é semelhante sendo o alvo de ação receptores de membrana presentes nas células intestinais das larvas.

### **Aspectos nutricionais associados ao algodão MON 15985**

Análises de bromatologia e gossipol (livre e total) permitem considerar o algodão MON 15985 equivalente ao algodão convencional tanto no Brasil, nas três localidades estudadas, quanto nos demais países onde as análises foram realizadas. Resultados são apresentados e comparados com o banco de dados “Crop Composition Database” disponível no ILSI (International Life Science Institute) onde é possível verificar a variabilidade natural da composição das culturas convencionais quanto aos teores nutricionais observados. A composição do algodão MON 15985 foi considerada dentro da variabilidade natural da cultura de algodão. Os componentes nutricionais e antinutricionais são comparáveis aos do algodão convencional.

### **Aspectos de segurança ambiental e alimentar do algodão MON 15985**

O cultivo do algodão MON 15985 à semelhança do algodão Bollgard<sup>®</sup> permite aos cotonicultores uma redução efetiva no número aplicações de inseticidas por ano. Também constata-se a possibilidade de recuperação de áreas para plantio que foram abandonadas pelo elevado grau de infestação. Do mesmo modo, campos próximos de caminhos d'água ou lagos, casas e comércio onde há restrição de aplicação de inseticidas foliares podem ser utilizados. Além de diminuir a aplicação direta de inseticidas, uma redução na entrada de máquinas no campo é esperada. A expectativa é uma melhor preservação da qualidade do solo e das águas. A medida do impacto ambiental da aplicação de inseticidas descrito pelo coeficiente EIQ permitiu mensurar uma redução 34,4 no coeficiente de impacto ambiental resultante do plantio de MON 15985 e Bollgard<sup>®</sup> nos Estados Unidos. Isto corresponde a uma redução do volume da aplicação de inseticida de 0,28 kg/ha. Na Austrália os valores são de 2,2 kg/ha no plantio de MON 15985 comparado a 11,1 kg/ha no plantio de algodão convencional e 4,3 kg/ha no caso do algodão Bollgard<sup>®</sup>. Diversos países apresentam a redução do coeficiente EIQ incluindo a Argentina, onde uma redução de 44% foi

observada. Impacto semelhante é calculado no que tange à emissão de gases que contribuem para o efeito estufa.

O manejo integrado de pragas (MIP) e o manejo de resistência a insetos (MRI) pretendem garantir ao agricultor o controle da aquisição de resistência por parte dos insetos, o que é um fenômeno natural. Neste contexto, a delimitação de áreas de refúgio e bordadura devem evitar ou retardar a aquisição de resistência. O uso do algodão MON 15985 deve ser inserido dentro de um programa de trabalho conjunto entre as partes implicadas no processo. São apresentadas as distâncias mínimas e máximas entre o refúgio e o plantio do algodão MON 15985 assim como a área de refúgio correspondendo a proporção de 5% da área total plantada com o algodão MON 15985.

O algodão cultivado apresenta-se como uma planta preferencialmente dependente de autopolinização. Polinização cruzada natural pode ocorrer porém a uma distância máxima calculada entre 30-60 m uma vez que o grão de pólen é pesado e viscoso. O fenômeno de transferência horizontal é raro e sujeito a forte seleção. Os genes introduzidos no algodão MON 15985 tornam-se parte integral do genoma desta planta e portanto apresentam a mesma probabilidade de qualquer outro gene do algodão de ser transferido para espécies não relacionadas. Apesar de estudos exaustivos para determinar a probabilidade de eventos de transferência horizontal, não há registro deste fenômeno fora aqueles descritos para bactérias. Zonas de exclusão e áreas de refúgio podem ser consideradas no manejo da cultura de modo a preservar a diversidade biológica e evitar a eventual transferência vertical ainda que pouco provável.

De modo geral, com base no documento apresentado é possível considerar o algodão MON 15985 semelhante ao algodão Bollgard<sup>®</sup> e portanto aplicar legislação semelhante àquela aprovada anteriormente pela CTNBio.



Profª. Dra. Marie-Anne Van Sluys  
Departamento de Botânica – IBUSP  
São Paulo, 15 de novembro de 2008