



Consiglio dei Diritti Genetici
Osservatorio Agrobiotecnologie

Rapporto di valutazione della notifica C/ES/04/01

“Richiesta per la commercializzazione in Europa, per qualsiasi uso, compresa la coltivazione, del mais ibrido (NK603 x MON810) ottenuto da linee geneticamente modificate per la tolleranza al glifosato e la resistenza ai Lepidotteri”

Presentata all’**A**utorità **C**ompetente della **S**pagna
da *Monsanto Europe S.A.*

Rapporto numero: 1-2004
12-02-2004

Rapporto di valutazione della notifica C/ES/04/01

PREMESSA

Secondo la direttiva 2001/18/CE qualsiasi soggetto che intenda commercializzare un qualsiasi OGM dovrà presentare una domanda, denominata *notifica*, all'Autorità Competente di uno Stato Membro. Essa dovrà contenere, così come indicato negli allegati tecnici della direttiva, tutte le informazioni necessarie affinché sia effettuabile la valutazione del rischio e i piani di monitoraggio dei possibili effetti diretti e indiretti, immediati e differiti sull'ambiente e sulla salute umana.

Il notificante deve inoltre fornire una Sintesi della Notifica (SNIF), compilata secondo il formato previsto dalla decisione 812/2003/CE: essa viene trasmessa immediatamente alla Commissione Europea che provvede a renderla pubblica attraverso il sito WEB dedicato http://qmoinfo.jrc.it/gmc_browse.asp. **Il pubblico ha 30 giorni di tempo per inviare le proprie osservazioni alla Commissione.**

L' autorità competente provvede a valutare i dati contenuti nella notifica ed elabora una relazione di valutazione che viene trasmessa alla Commissione e pubblicata online sul sito http://qmoinfo.jrc.it/gmc_browse.asp. **Il pubblico ha 30 giorni di tempo per inviare le proprie osservazioni alla Commissione.**

Al fine di promuovere e garantire una effettiva partecipazione del pubblico ai processi decisionali relativi ai rilasci di OGM, il **CDG (Consiglio dei Diritti Genetici)**, in veste di gruppo organizzato, ha attivato l'**Osservatorio Agrobiotecnologie**, composto da un gruppo di esperti del settore. L'Osservatorio intende concorrere direttamente al processo di autorizzazione dei nuovi OGM, realizzando un rapporto di valutazione basato sia sulle notizie rese disponibili al pubblico secondo le modalità previste dalla direttiva, sia sulle informazioni scientifiche fornite da altre fonti pubbliche. Il rapporto così realizzato ha la finalità di evidenziare gli eventuali punti non chiariti nella notifica e nel rapporto di valutazione, fornendo così gli elementi necessari per la formulazione di eventuali osservazioni da inviare alla Commissione.

In considerazione della scarsità del tempo lasciato al pubblico per procedere ad un'attenta valutazione delle richieste di rilascio di OGM e della difficoltà di reperimento delle informazioni scientifiche relative alla valutazione del rischio degli OGM, tale rapporto non può essere considerato come un oggetto statico e definitivo, bensì come un lavoro in fase di elaborazione che potrà arricchirsi di tutti i contributi che saranno resi disponibili in futuro.

A. Riassunto

La notifica in oggetto è stata presentata dalla Monsanto Europa S.A. all'Autorità Competente spagnola ai sensi della Direttiva 2001/18 CE, in data 14 gennaio 2004.

Nella notifica si richiede l'autorizzazione all'immissione in commercio per qualsiasi uso, alla stregua di un mais convenzionale, **inclusa la coltivazione**, di mais GM (Geneticamente

Modificato) NK603 X MON810 resistente ai lepidotteri fitofagi e tollerante all'erbicida Roundup. Lo SNIF è stato reso pubblico sul sito europeo dedicato alle richieste presentate ai sensi della direttiva 2001/18/CE, http://gmoinfo.jrc.it/gmc_browse.asp; il pubblico potrà inviare le eventuali osservazioni **entro il 13 febbraio** alla Commissione alla E-mail gmoinfo-comments@jrc.it specificando nell'oggetto "Comment on SNIF C/ES/04/01".

Quando verrà pubblicata la Relazione di Valutazione (Assessment Report) dell'Autorità spagnola, il pubblico avrà nuovamente 30 giorni di tempo per inviare le eventuali osservazioni.

L'**Osservatorio Agrobiotecnologie** del **CDG (Consiglio dei Diritti Genetici)** ha esaminato i documenti messi a disposizione del pubblico e ritiene che:

- Il tempo previsto dalla direttiva, pari a 30 giorni dalla pubblicazione dello SNIF, non è sufficiente per effettuare un'analisi approfondita.
- Le informazioni riportate nello SNIF sono in più punti poco chiare, carenti o ridondanti.
- In generale non c'è la possibilità di verificare le informazioni fornite, per mancanza degli appropriati riferimenti bibliografici, ed il linguaggio usato a volte manca di rigore scientifico come richiesto dalla direttiva.
- Nella sezione dello SNIF relativa alle "Informazioni sul potenziale impatto ambientale da rilascio di GMHP", si fa riferimento al contenuto della sezione D2 dell'allegato II della direttiva 2001/18/CE, tuttavia i punti previsti nello SNIF non corrispondono a quelli richiesti nell'allegato II.

B. Introduzione

Il 14 gennaio 2004 la Monsanto Europa S.A. ha presentato una richiesta per la commercializzazione di Mais GM, all'Autorità Competente della Spagna: il mais GM NK603 X MON810 ottenuto per incrocio classico di varietà di mais delle linee GM NK603 e MON810, precedentemente sviluppate dalla Monsanto.

La linea NK603 è stata trasformata per ottenere un mais tollerante agli erbicidi a base di glifosato (Roundup), attraverso l'inserimento del gene EPSPS di *Agrobacterium* sp. ceppo CP4.

La linea MON810 è stata trasformata per ottenere un mais resistente ai Lepidotteri nello specifico piralide (*Ostrinia nubilalis*) e sesamia (*Sesamia* spp.), attraverso l'inserimento del gene troncato per la tossina Cry1A(b) di *Bacillus thuringiensis* sp kurstaky.

La varietà ibride di mais NK603 X MON810 risultano quindi resistenti ai lepidotteri fitofagi e tolleranti all'erbicida Roundup.

Lo SNIF è stato reso pubblico sul sito europeo dedicato alle richieste presentate ai sensi della direttiva: http://gmoinfo.jrc.it/gmc_browse.asp.

Il pubblico potrà inviare le eventuali osservazioni **entro il 13 febbraio** alla Commissione alla E-mail gmoinfo-comments@jrc.it specificando nell'oggetto "Comment on SNIF C/ES/04/01".

Commenti di carattere generale sulla notifica in esame

Il documento pubblico cui si fa riferimento nel presente rapporto è:

- SNIF C/ES/04/01¹

Relativamente a tale documentazione riscontriamo la mancanza degli appropriati riferimenti bibliografici necessari a verificare le informazioni fornite; per sopperire a tale carenza abbiamo presentato una richiesta di accesso alla Notifica completa, tuttavia i tempi non sono stati sufficienti per ottenere una risposta in merito.

C. Analisi tecnica dei documenti e nostre osservazioni

C.1 Caratterizzazione molecolare della PSGM

Analisi dei documenti:

- le linee parentali di mais NK603 e MON810 sono state trasformate indipendentemente attraverso la tecnica biolistica (particle acceleration method o gene gun)
- le analisi per Southern blot dimostrano che "non vi sono indicazioni per la presenza di frammenti addizionali in entrambe le inserzioni" e che "la taglia, la struttura e le sequenze attualmente inserite nelle linee parentali NK603 e MON810 ed ereditate nell'ibrido NK603 X MON810 sono riportate nelle Tabelle 1 e 2"²
- entrambe le linee parentali NK603 X MON810 hanno un singolo sito di inserzione, stabilmente integrato nel genoma della pianta
- in entrambe le linee parentali NK603 X MON810 è presente un'unica copia dell'inserito ereditabile come carattere mendeliano dominante come confermato da analisi fenotipiche e per Southern blot
- si riporta che l'espressione delle nuove proteine EPSPS e Cry1A(b) è attesa in tutte le parti della pianta dato che sono regolate da promotori costitutivi, dalla lettura della frase sembra che non siano state effettuate analisi per verificare l'ipotesi³

Osservazioni:

- nello SNIF C/ES/00/01 relativo alla linea parentale **NK603** è indicato che sono state sequenziate le regione fiancheggianti il sito di inserzione e risulta che all'estremità 3' dell'inserito si trova un altro piccolo frammento di DNA (217 bp) che presenta omologia con una porzione dell'inserito stesso; sempre all'estremità 3' dell'inserito si trova un

¹<http://gmoinfo.jrc.it/csnifs/C-ES-04-01.pdf>

² SNIF punto 20

³ SNIF punto 21/b

altro piccolo frammento di DNA (305 bp) che presenta omologia con DNA di origine cloroplastica

- nel documento di Assessment Report prodotto dall'Autorità nazionale tedesca relativo alla notifica C/DE/02/9 concernete tra l'altro la linea parentale **MON 810** si indica che sono state sequenziate le regione fiancheggiante il sito di inserzione e risulta che all'estremità 5' dell'inserito è presente un frammento di DNA con omologia con geni di *Zea mays*, in particolare con il gene della zeina, mentre all'estremità 3' è presente un frammento di DNA con una forte omologia con frammenti genici di origine mitocondriale
- Hernandez et al. 2003, riferiscono dati di sequenziamento dell'inserito di MON810 rilevano la presenza di una delezione interna alla regione che codifica per la tossina Cry1A(b) e che i primers selezionati in base alle sequenze delle regioni adiacenti al sito di inserzione di MON810 non sono in grado di amplificare il DNA genomico del mais corrispondente isogenico; questi dati suggeriscono la possibilità che si siano verificati delezioni e/o riarrangiamenti del DNA genomico della pianta adiacente al sito di inserzione.

In conclusione si ritiene che:

- I dati riportati nello SNIF sono inesatti ed insufficienti
- Le informazioni fornite dal sequenziamento degli inserti evidenziano la presenza di sequenze ridondanti per le quali non è stata effettuata alcuna valutazione del rischio
- La presenza di sequenze ridondanti alle estremità degli inserti fra le quali sequenze di origine mitocondriale e cloroplastica nonché i riarrangiamenti del sito di inserzione in MON 810 lasciano supporre che altre indesiderate mutazioni collegate alla tecnica di trasformazione utilizzata potrebbero essere state introdotte, pertanto sarebbe opportuno quantificare le mutazioni introdotte da tali tecniche utilizzando metodiche per l'analisi dei polimorfismi quali RFLP, RAPD, AFLP, RAMP, confrontando le varietà GM con le varietà isogeniche wild type
- È opportuno indicare il numero di backcrossing e o outcrossing che si sono effettuati per sviluppare le varietà commercializzate
- In MON 810 in particolare andrebbero approfondite le analisi in modo da caratterizzare la natura delle mutazioni introdotte a livello del sito di inserzione
- Verificare i potenziali effetti indesiderati sull'espressione di altri geni della pianta dovuti alla presenza di mutazioni potenzialmente introdotte, confrontando i pattern di espressione di mRNA e di sintesi proteica delle piante GM con i corrispettivi isogenici tramite RNA microarray and protein microarray

C.2 Valutazione dei rischi sulla salute animale e umana

Analisi dei documenti:

- assenza di indicazioni di tossicità acuta in mice cui è stata somministrata oralmente la proteina CP4 EPSPS⁴
- rapida degradazione della stessa proteina e perdita di attività enzimatica in simulazioni di fluidi umani gastrici ed intestinali⁵
- mancanza di omologie tra la proteina CP4 EPSPS e proteine tossiche o allergeniche conosciute⁵
- presenza di bassi livelli della proteina CP4 EPSPS nel mais NK603 x MON810⁵
- equivalenza del mais NK603 x MON810 con il mais tradizionale anche a seguito di studi di alimentazione sui broiler chickens⁵
- assenza di tossicità acuta in mice cui è stata somministrata la proteina CryIA(b) oralmente⁵
- rapida degradazione e perdita di attività insetticida in simulazioni di simulata digestione dei mammiferi⁵
- assenza di similitudini nella sequenza amminoacidica con tossine conosciute, altre proteine a parte il Bt e assenza di similitudini rilevanti immunologicamente nella sequenza con altri allergeni⁵
- bassa concentrazione della proteina CryIA(b) nel mais con conseguente bassa esposizione dell'animale⁵
- storia di una sicurezza nell'uso per le varietà di mais MON810 che esprimono la stessa proteina e sono state approvate, commercializzate e consumate dal 1996 anche nella UE⁵
- "..fanno parte di una famiglia di proteine con una lunga storia di consumo sicuro, inclusa la CP4 EPSPS presente nella soia Roundup Ready"⁵
- "..la proteina CryIA(b) fu dimostrata essere altamente selettiva per certi insetti, con nessuna tossicità verso altri tipi di organismi viventi come mammiferi, pesci, uccelli o invertebrati"⁵

Osservazioni:

- Si ritiene che sarebbero necessari studi anche su animali quali ruminanti e pesci alimentati con granella GM per escludere eventuali effetti negativi per la salute animale e, conseguentemente, umana⁶.

⁴ SNIF punto 24

⁵ SNIF punto 24

⁶ Hilbeck A., Baumgartner M., Fried P.M., Bigler F., 1998 - Effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn-fed prey on mortality and development time of immature *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Environ. Entomol.*, 27(2): 480-487.

Hilbeck A., Moar W.J., Pusztai-carey M., Filippini A., Bigler F., 1998 - Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin to the predator *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Environ. Entomol.*, 27 (5): 1255-1263.

Hilbeck A., Moar W.J., Pusztai-carey M., Filippini A., Bigler F., 1999 - Prey-mediated effects of Cry1Ab toxin and protoxin and Cry2A protoxin on the predator *Chrysoperla carnea*. *Entomol. Exp. Appl.*, 91: 305 - 316.

- Si richiede che vengano fornite informazioni e riferimenti bibliografici per verificare se siano stati studiati gli effetti cumulativi derivanti dalle possibili interazioni dovute alla contemporanea espressione delle proteine CP4 EPSPS e CryIA(b) ed eventuali informazioni sulla tossicità a lungo termine.
- Si richiede bibliografia per poter motivare le informazioni riportate sullo SNIF riguardo alla proteina CP4 EPSPS.
- Si richiede bibliografia di supporto alle informazioni fornite sulla mancanza di tossicità della proteina CryIA(b), per tutte le specie citate.
- Si richiede bibliografia degli studi composizionali fatti e studi condotti alimentando animali con varietà GM utilizzando più specie target per valutare la complessità degli effetti sull'animale. La durata degli studi di nutrizione dovrebbe coprire l'intero ciclo di produzione dell'animale.

C.3 Valutazione dei rischi ambientali

Analisi dei documenti:

- “..il rischio ambientale globale posto dalle piante GMHP è irrilevante...”⁷
- “ ..l'utilizzo del mais NK 603 x MON 810 avrà un potenziale impatto positivo sulle correnti pratiche agronomiche....”
- “I benefici delle piante di mais Btk includono: 1) un efficiente mezzo di controllo dei lepidotteri target. 2) controllo degli insetti target mentre mantengono le specie utili.. 3) ridotto uso di pesticidi chimici...”
- “livelli di micotossine come le fumosine potenzialmente ridotte nella granella.”
- per quanto riguarda gli effetti sulle specie target “Nessuna caratteristica potenzialmente dannosa aggiuntiva può essere identificata...”
- “in conclusione c'è un potenziale irrilevante di effetti ambientali avversi del mais NK 603 x MON 810 sugli organismi no-target attraverso le loro interazioni ecologiche dirette ed indirette con questo mais o attraverso il contatto con le proteine espresse CP4 EPSPS e Cry1A(b).”

Osservazioni:

- I rischi per l'ambiente correlati alla coltivazione del mais Bt e del mais tollerante al glifosato sono ben documentati nella letteratura scientifica. In effetti è ampiamente dimostrato che la tossina Bt viene secreta dalle radici e si accumula nel suolo mantenendo la sua attività per diversi mesi (Saxena and Stotzky, 2003; Zwahlen et al, 2003). Studi riportano la persistenza del DNA nel suolo (Ceccherini et al. 2002; Nielsen et al. 2002; Lorenz and Wackernagel, 1992), in ambiente acquatico (Paul et al., 1989) e nel tratto digerente dei topi (Schubbert et al., 1997), e sebbene in minor proporzione nei ruminanti (Duggan et al., 2000; Gay, 2001). L'utilizzo di PGM potrebbe provocare il trasferimento genetico

⁷ SNIF punti 29/30/31

tra specie diverse con diffusione incontrollata dei transgeni tra le comunità microbiche del suolo (Miller, 1998). Oltre al trasferimento genetico orizzontale che può avvenire tra suolo e piante, studi riportano la possibilità che, questo, possa avvenire anche tra la micoflora batterica che popola l'intestino umano e quello degli animali (Landis et al., 2000; Salyers, 1993; Jarris et al., 2001; Jarvis et al., 2001; Nielsen et al., 2002).

- Tra gli effetti differiti il cambiamento delle pratiche agronomiche dovuto all'utilizzo di mais GM e il conseguente aumento del glifosato potrebbero avere gravi effetti sulla biodiversità. Inoltre studi eseguiti da Donegan et al. (1999) hanno riportato cambiamenti delle proprietà del suolo, in particolare della rizosfera.
- La tossina Bt sebbene specifica per gruppi di insetti non è in grado di discriminare tra specie appartenenti allo stesso gruppo, con il conseguente impatto sulla biodiversità e sulle catene trofiche. Studi eseguiti da Malone et al (2000) hanno dimostrato che l'accumulo della tossina Bt influenzava la longevità dell'adulto di *Apis Mellifera*. Inoltre secondo Hilbeck A. et al (1999) ci sono effetti negativi sul predatore *Chrysoperla carnea* mediati dalla preda. Studi effettuati da Benbrook C.M. hanno dimostrato che nel medio periodo, dopo i tre anni, si ha un incremento nell'uso di pesticidi.
- Allo stato attuale, un unico studio ampiamente citato nelle valutazioni del rischio elaborate dai produttori di mais-bt è quello di Munkvold et al., 1999, che ha dimostrato come conseguenza di un ridotto attacco della piralide una diminuzione della presenza di micotossine nella granella di mais-bt. Tale studio è stato, però, effettuato in condizioni controllate che sicuramente non rispecchiano le condizioni reali della filiera produttiva (coltivazione, raccolta, selezione e stoccaggio della granella).
Si fa presente che il grado di infezione fungina della granella dipende dalle condizioni di conservazione e dallo stato di salute della pianta, che risente di numerosissimi fattori abiotici e biotici fra i quali è compresa anche la *Piralide*.
La letteratura scientifica ha abbondantemente messo in discussione la reale portata di questa protezione in condizioni di pieno campo (Dowd, 2000; Dowd, 2001).
- Non è stato preso in considerazione il fenomeno dello sviluppo di resistenza nelle popolazioni di lepidotteri target, rilevato invece in alcuni studi di Tabashnik B.E. (1994)
- Anche se diversi studi sembrano dimostrare l'assenza di effetti dannosi sulla microfauna del suolo, alcuni autori hanno riportato effetti negativi del mais Bt su diversi organismi no-target. Ad esempio, Losey et al (1999) riportano gli effetti del mais Bt sulla farfalla monarca, Hilbeck A. et al sulla *Chrysoperla carnea*, Donegan KK e R Seidler (1999) sui cicli dei nutrienti e Zwahlen, C et al (2003) su invertebrati.

C.4 Piani di sorveglianza e monitoraggio

Analisi dei documenti:

- "... il rischio di potenziali effetti avversi..... sull'ambiente è irrilevante relativamente a:
 -
 - potenziale trasferimento genetico
 - impatto sugli organismi target
 - impatto sugli organismi non target
 -
 - effetti sui processi biogeochimici
 -⁸

Osservazioni:

Anche se le conclusioni della valutazione del rischio ambientale condotto dal notificante fossero accettabili, ovvero che i rischi connessi con il rilascio ambientale della PSGM sono da considerarsi TRASCURABILI, sarebbe comunque necessario attivare specifici piani di monitoraggio. Infatti l'allegato VII della direttiva 2001/18/CE indica che l'obiettivo dei suddetti piani di monitoraggio sia:

- "confermare che le ipotesi relative al verificarsi di potenziali effetti negativi dell'OGM o del suo impiego e al loro impatto, contenute nella valutazione del rischio ambientale, sono corrette e
- individuare il verificarsi di effetti negativi dell'OGM o del suo impiego sulla salute umana o sull'ambiente che non siano stati anticipati nella valutazione del rischio ambientale."

Bibliografia

- Benbrook C.M. BioTech InfoNet, Technical Paper No 6, Nov 2003
- Donegan, K.K., Seidler, R.J., Doyle, J.D., Porteous, L.A., Digiovanni, G., Widmer, F. and Watrud, L.S. (1999) A field study with genetically engineered alfalfa inoculated with recombinant *Sinorhizobium meliloti*: effects on the soil ecosystem. *J. Appl. Ecol.* 36, 920–936.
- Donegan KK et al., R. R. D. in *Microbiology*, 3, 1999
- Dowd P.F., (2001). Indirect reduction of ear molds and associated mycotoxins in *Bacillus thuringiensis* corn under controlled and open field conditions: utility and limitations. *J Econ Entomol.* 2000 Dec;93(6):1669-79.
- Dowd P.F., (2001). Biotic and abiotic factors limiting efficacy of Bt corn in indirectly reducing mycotoxin levels in commercial fields. *J Econ Entomol.* 2001 Oct; 94(5):1067-74.

⁸ SNIF sezione D punto 1

- Duggan, P.S., Chambers, P.A., Heritage, J. and Forbes, J.M. (2000) Survival of free DNA encoding antibiotic resistance from transgenic maize and the transformation activity of DNA in ovine saliva rumen fluid and silage effluent. *FEMS Microbiol. Lett.* 191,71–77.
- Gay, P. (2001) The biosafety of antibiotic resistance markers in plant transformation and the dissemination of genes through horizontal gene flow. In *Safety of Genetically Engineered Crops* (Custers, R., ed.). Zwijnaarde, Belgium: Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology, pp. 135–159 (<http://www.vib.be/downloads/bioveiligheidseducatie/report.pdf>).
- Hilbeck A. et al, *Entomology, Experimental and Applied*, 91, 1999
- Jarvis G.N., Kurtovic A., Kay A.G. and Russel J.B. (2001). The physiological and genetic diversity of bovine streptococcus bovis strains. *FEMS Microbial Ecology* 35: 49-56
- Losey et al, *Nature*, 399, 1999
- Miller R., (1998). Scambio di geni in natura. *Le scienze* 335:69-73
- Nielsen K.M., Choi M., Pietramellara G., Nannipieri P., Bensasson D. (2002). *Advances in Microbial Ecology* 17
- Munkvold, G.P., Hellmich R.L., Rice L.G., (1999). Comparison of Fumonisin Concentrations in Kernels of Transgenic Bt Maize Hybrids and Nontransgenic Hybrids. *Plant Disease* Vol. 83 No. 2
- Paul, W.J., Jeffrey, W.H., David, A.W., De Flaun, M.F. and Cazares, L.H. (1989). Turnover of extracellular DNA in eutrophic and oligotrophic freshwater environments of Southwest Florida. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1823–1828.
- Saxena and Stotzky, *Biosafety Reviews* marzo 2003
- Schubbert, R., Renz, D., Schmitz, B. and Doerfler, W. (1997) Foreign (M13) DNA ingested by mice reaches peripheral leukocytes, spleen, and liver via the intestinal wall mucosa and can be covalently linked to mouse DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 961–966.
- Tabashnik B.E., *Annual Review of Entomology*, 39, 1994
- Zwahlen, C., Hilbeck, A. & Nentwig, W (2003) Degradation of Cry1Ab within *Bacillus Thuringensis* corn tissue in the field. *Molecular Ecology* (2003)12, 765-775
- Zwahlen, C., Hilbeck, A. & Nentwig, W. (2003) Effects of transgenic Bt corn litter on the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Mol. Ecol.*:(2003) 12, 1077-1086.