

PARECER TÉCNICO DA RELATORA

Processo: 01200.005751/2015-13

Data de Protocolo: 18/12/2015

Assunto: Liberação Comercial de Organismo Geneticamente Modificado

Requerente: Monsanto do Brasil Ltda.

CNPJ: 08.636.452/0001-76

Endereço: Av. Nações Unidas, 12.901. CENU - Torre Norte - 9º andar. CEP 04578-910 - São Paulo/ SP.

CQB: 003/96

Presidente da CIBio: Geraldo Berger

Proposta: Emissão de “Decisão Técnica relativa à biossegurança do milho MON 87427 tolerante ao glifosato para efeito de sua liberação no meio ambiente, seu uso comercial e quaisquer outras atividades relacionadas a esse OGM e quaisquer progênies dele derivados”.

Descrição do OGM: O milho MON 87427 tolerante ao glifosato é resultante da transformação de embriões imaturos de milho mediada por *Agrobacterium* e o plasmídeo PV-ZMAP1043 (Sidorov e Duncan, 2009). O milho MON 87427 contém o gene *cp4 epsps*, derivado de *Agrobacterium* sp. cepa CP4, o qual codifica a proteína CP4 EPSPS (5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase), que confere tolerância ao herbicida glifosato, o ingrediente ativo dos herbicidas Roundup®. O milho MON 87427 utiliza uma combinação específica de promotor e íntron (*e35S-hsp70*) para dirigir a expressão da proteína CP4 EPSPS em tecidos vegetativos e reprodutivos femininos, conferindo tolerância ao glifosato em folhas, colmo e raiz, bem como em tecidos que se desenvolvem em sementes ou grãos e estilo-estigma. O uso dessa combinação específica de promotor e íntron também resulta em uma produção limitada ou ausente da proteína CP4 EPSPS em dois tecidos reprodutivos masculinos principais: micrósoros, que se desenvolvem em grãos de pólen, e células do *tapetum*, que provêm nutrientes para o pólen (Goldberg *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 2009). Assim, os tecidos reprodutivos masculinos críticos para o desenvolvimento do gametófito masculino no milho MON 87427 não são tolerantes ao glifosato. Tanto o promotor *e35S* quanto o promotor *CaMV 35S*, a partir do qual o promotor *e35S* foi originado (Kay *et al.*, 1987; Odell *et al.*, 1985), já demonstraram uma habilidade limitada em dirigir a expressão de um gene de interesse em pólen para certas culturas (CaJacob *et al.*, 2004; Hamilton *et al.*, 1992). A expressão tecido-seletiva da proteína CP4 EPSPS no milho MON 87427 permite a extensão do uso do milho tolerante ao glifosato para incluir seu uso como uma ferramenta na produção de sementes de milho híbrido.

O milho MON 87427 foi selecionado como evento líder, com base nas características fenotípicas superiores e no perfil molecular completo, contendo os elementos genéticos, suas funções, posições no plasmídeo PV-ZMAP1043 e respectivas referências bibliográficas.

Classificação de Risco: Classe de risco I (baixo risco individual e baixo risco para a coletividade), conforme classificação apresentada pela requerente com base no Art. 8º da RN 2/2006.

Liberações comerciais do Milho Mon 87427: O milho MON 87427 já se encontra aprovado nos Estados Unidos (2012), na Austrália e Nova Zelândia (2012), no Canadá (2012), na Colômbia (2014),

no Japão (2013), na Coreia do Sul (2013), no México (2012), nas Filipinas (2014), em Taiwan (2012) e no Vietnã (2015)

Uso Proposto: Liberação comercial do milho MON 87427 bem como suas progênes, nas modalidades de cultivo, consumo animal e humano, manipulação, transporte, descarte, importação e exportação, bem como quaisquer outras atividades relacionadas.

Fundamentação Técnica

A requerente, empresa Monsanto do Brasil Ltda., detentora do CQB 03/96, solicita através do processo nº 01200.005751/2015-13 a liberação comercial do milho geneticamente modificado evento MON 87427, contendo genes que conferem tolerância ao herbicida glifosato. O milho MON 87427, apresenta tolerância tecido-seletiva ao herbicida glifosato para facilitar a produção de sementes viáveis de milho híbrido (Feng *et al.*, 2013). Essa tecnologia permite uma otimização do despendoamento para a produção de sementes de milho híbrido, tornando-a mais eficiente, enquanto produz sementes com os mesmos padrões de aceitação comercial. O milho MON 87427 produz a proteína CP4 EPSPS através da incorporação da sequência codificadora do gene *cp4 epsps*. A expressão tecido-seletiva da proteína CP4 EPSPS no milho MON 87427 permite a extensão do uso do milho tolerante ao glifosato para incluir seu uso como uma ferramenta na produção de sementes de milho híbrido. O evento foi desenvolvido através de transformação genética mediada por *Agrobacterium*. O MON 87427 apresenta tolerância tecido-seletiva ao herbicida glifosato, produz a mesma proteína 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (CP4 EPSPS) produzida em outras culturas comerciais Roundup Ready1, através da incorporação da sequência codificadora do gene *cp4 epsps*. A proteína CP4 EPSPS confere tolerância ao herbicida glifosato. O cassete de transformação utilizado na geração do milho MON 87427 possui uma combinação específica de promotor e íntron (*e35S-hsp70*) para dirigir a expressão da proteína CP4 EPSPS em tecidos vegetativos e reprodutivos femininos, conferindo tolerância ao glifosato nas folhas, colmo e raiz, bem como em tecidos que se desenvolvem em sementes ou grãos e estilo-estigma. Esta combinação específica de promotor e íntron também resulta em uma produção limitada ou ausente da proteína CP4 EPSPS em dois tecidos reprodutivos masculinos principais: micrósporos, que se desenvolvem em grãos de pólen, e células do tapete (ou *tapetum*), que provêm nutrientes para o pólen. Assim, os tecidos reprodutivos masculinos críticos para o desenvolvimento do gametófito masculino no milho MON 87427 não são tolerantes ao herbicida glifosato. Isso permite que linhagens puras contendo o evento MON 87427, quando tratadas com o glifosato, sirvam como parental feminino na produção de sementes híbridas. Duas aplicações de glifosato realizadas logo antes e/ou durante os estádios de desenvolvimento do pendão (aproximadamente entre os estádios de crescimento vegetativo do milho entre V8 e V19) produzirão um fenótipo macho-estéril por conta da tolerância tecido-seletiva ao glifosato, otimizando a etapa de despendoamento usada na produção de sementes de milho híbrido. Em um sistema de produção de milho híbrido, as linhagens puras contendo o evento MON 87427, com glifosato aplicado nos momentos de desenvolvimento do pendão, serão polinizadas por plantas doadoras de pólen (masculinas), resultando em sementes viáveis de milho híbrido contendo o gene *cp4 epsps* para tolerância tecido-seletiva ao glifosato. Para o controle de plantas daninhas ao longo da produção de sementes e em campos comerciais, o glifosato poderá ser aplicado sobre o milho MON 87427 nos estádios vegetativos indicados nas bulas de produtos agrícolas Roundup, nas mesmas doses usadas em outros eventos de milho Roundup Ready já liberados comercialmente no país. E sua

expressão tecido-seletiva no milho MON 87427 permite uma extensão do uso do milho tolerante ao glifosato como ferramenta na produção de sementes viáveis de milho híbrido.

Como o glifosato é um herbicida sistêmico que após a aplicação é translocado rapidamente através do floema das plantas. Uma vez no floema, o glifosato move-se para áreas de alta atividade meristemática, seguindo uma típica distribuição fonte-dreno. O desenvolvimento completo do pólen dura aproximadamente quatro semanas em uma planta de milho. Os estádios precoces do crescimento do pendão começam aproximadamente no estágio de crescimento vegetativo do milho V9 e, portanto, aplicações de glifosato feitas aproximadamente nesse momento permitem uma translocação de glifosato para os tecidos reprodutivos masculinos, causando morte celular seletiva apenas nas células que não são tolerantes ao glifosato (*i.e.*, células de pólen e do *tapetum*). Aplicações de glifosato realizadas durante estádios vegetativos precoces, consistentes com os momentos de aplicação especificados na bula atual de produtos agrícolas Roundup para o controle de plantas daninhas, não afetam a produção de pólen no milho MON 87427, pois os tecidos reprodutivos masculinos sensíveis não estão se desenvolvendo ativamente naqueles momentos. Os benefícios do milho MON 87427 incluem o aumento da flexibilidade e a redução de custos para os produtores de sementes híbridas. Apenas as aplicações de glifosato realizadas em momentos específicos que comecem logo antes e/ou durante os estádios de desenvolvimento do pendão produzirão um fenótipo macho-estéril através da tolerância tecido-seletiva ao glifosato em linhagens puras de milho contendo o evento MON 87427.

Uma questão intrínseca à produção de sementes de milho híbrido é o fato de o parental feminino produzir pólen ao mesmo tempo em que o parental masculino. Portanto, o pólen do parental feminino precisa ser removido ou eliminado para garantir que a transferência genética via pólen ocorra apenas a partir do parental masculino para o parental feminino. O pólen do parental feminino é removido ou eliminado seguindo uma de duas maneiras no atual sistema de produção de sementes de milho híbrido. A primeira opção para a remoção de pólen do parental feminino durante a produção de sementes de milho híbrido é o despendoamento manual, que é realizado pela retirada física da flor masculina (pendão) do parental feminino antes da emissão do pólen. Apesar de o despendoamento ser a primeira opção para a remoção do pólen do parental feminino, aspectos negativos relacionados a ele incluem a grande necessidade de mão de obra para realizar um trabalho físico exigente em um tempo restrito (3-4 dias), aliado à necessidade de observação repetitiva para garantir que apenas o pólen apropriado esteja disponível para a produção de sementes híbridas. A outra opção para a eliminação de pólen do parental feminino é através do uso do milho que apresenta a Macho-Esterilidade Citoplasmática (MEC), uma característica natural herdada através da planta parental feminina e conhecida por produzir plantas masculinas estéreis (Laughnan e Gabay-Laughnan, 1983). Entretanto, um intensivo processo de integração de cruzamento é necessário para direcionar a MEC para o *background* de uma linhagem pura particular, sendo que há relatos de macho-esterilidade incompleta na MEC, o que resulta na necessidade de despendoamento (Wych, 1988).

Os benefícios do milho MON 87427 na produção de sementes híbridas incluem:

- **Aumento da flexibilidade na produção de sementes híbridas:** a cada ano, as áreas destinadas à produção de sementes de milho híbrido no Brasil precisam ter as plantas despendoadas para que as necessidades dos produtores comerciais sejam atendidas. O período de tempo crítico para o despendoamento se dá após a emissão do pendão, mas antes da polinização ou emissão dos estilo-estigmas, e engloba uma janela média de 3-4 dias. As práticas atuais de despendoamento podem requerer até dois passos com

equipamento de despendoamento mecânico, e até três passos no despendoamento manual. Atividades de despendoamento ainda mais complexas envolvem o planejamento logístico necessário para se transportar a mão de obra e os recursos para os campos de produção de sementes híbridas no tempo apropriado. As aplicações de glifosato sobre o milho MON 87427, que irão resultar no fenótipo macho-estéril pela tolerância tecido-seletiva ao glifosato, ocorrerão aproximadamente entre os estádios V8 e V19 de crescimento vegetativo do milho. As duas aplicações de glifosato acontecerão durante uma janela de aproximadamente 14 dias dentro desses estádios vegetativos, um período de tempo bem mais longo quando comparado à janela média de 3-4 dias entre a emissão do pendão e a polinização e emissão dos estilo-estigmas. Este incremento de tempo na janela média para as atividades de despendoamento resulta em uma melhoria significativa na flexibilidade da produção de sementes híbridas.

- **Benefícios econômicos para os produtores de sementes híbridas:** produtores de sementes continuamente procuram formas de melhorar a produtividade de sementes híbridas, otimizando os recursos e diminuindo a área de plantio utilizados para produzir sementes híbridas de alta qualidade. A utilização do milho MON 87427 irá otimizar esses aspectos.

Na proposta de liberação comercial do evento MON 87427 as informações apresentadas incluem:

- Descrição detalhada do evento
- Caracterização molecular do evento
- Caracterização das proteínas expressas
- Avaliação do potencial de toxicidade e alergenicidade das proteínas
- Avaliação de composição e nutricional
- Caracterização fenotípica e agronômica
- Avaliação das interações ecológicas
- Efeitos no solo
- Potencial de invasividade e persistência
- Fluxo gênico
- Efeitos em organismos alvo e não alvo
- Técnicas de detecção gerais e específicas do OGM com metodologia pertinente

Os estudos foram realizados nas estações experimentais localizadas em diferentes locais do Brasil representativos do cultivo em Liberações Planejadas no Meio Ambiente (LPMA) aprovadas pela CTNBio. Esses estudos tiveram o objetivo de coletar dados a fim de corroborar a afirmativa da requerente de que “o milho MON 87427 pode ser considerado tão seguro quanto o milho convencional”.

A análise da avaliação de risco do evento MON 87427 deverá considerar, portanto, os dados e resultados apresentados na presente proposta para liberação comercial do evento conforme previsto no Art. 3º da RN 5/2008. Dessa forma, é importante ressaltar que vários eventos expressando a proteína CP4 EPSPS já foram analisados pela CTNBio em diferentes culturas como: soja e algodão.

O milho MON 87427 já se encontra aprovado nos Estados Unidos (2012), na Austrália e Nova Zelândia (2012), no Canadá (2012), na Colômbia (2014), no Japão (2013), na Coreia do Sul (2013), no México (2012), nas Filipinas (2014), em Taiwan (2012) e no Vietnã (2015).

1) DESCRIÇÃO DO EVENTO MON 87427

1.1. Milho MON 87427

O milho MON 87427 foi desenvolvido utilizando-se a transformação mediada por *Agrobacterium*, embriões imaturos de milho e o plasmídeo PV-ZMAP1043 (Sidorov e Duncan, 2009). O milho MON 87427 contém o gene *cp4 epsps*, derivado de *Agrobacterium* sp. cepa CP4, o qual codifica a proteína CP4 EPSPS (5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase), que confere tolerância ao herbicida glifosato, o ingrediente ativo dos herbicidas Roundup®. O milho MON 87427 produz essa proteína apenas em tecidos vegetativos e reprodutivos femininos, como tecidos de folhas, colmos e raízes, e tecidos que se desenvolvem em sementes ou grãos e estilo-estigma. Tecidos reprodutivos masculinos, como micrósporos de pólen e células do *tapetum*, não produzem a proteína CP4 EPSPS.

A caracterização molecular do inserto de DNA no milho MON 87427 foi conduzida por análises de *Southern blot* e sequenciamento de DNA. Os resultados dessa caracterização mostraram que o milho MON 87427 contém uma cópia única do inserto que contém o cassete de expressão do gene *cp4 epsps* (T-DNA), e que este está estavelmente integrado em um único *locus* e é herdado de acordo com princípios mendelianos por múltiplas gerações. As conclusões se basearam nas seguintes linhas de evidenciada:

- 1) análises de *Southern blot* avaliaram o genoma completo do milho para a presença de DNA derivado do plasmídeo PV-ZMAP1043 e demonstraram que apenas uma cópia única do T-DNA foi inserida em um único local, e que nenhuma sequência da matriz do plasmídeo foi detectada no milho MON 87427;
- 2) análises de sequenciamento de DNA determinaram a sequência exata do DNA inserido e permitiram uma comparação da sequência do T-DNA no plasmídeo, confirmando que apenas as sequências esperadas foram integradas;
- 3) análises de *fingerprint* por *Southern blot* demonstraram a estabilidade do T-DNA presente no milho MON 87427 por cinco gerações;
- 4) análises de segregação mostraram que a herdabilidade e a estabilidade esperadas para o inserto ocorreram ao longo de múltiplas gerações.

Concluiu-se sobre a caracterização molecular do milho MON 87427 por análises de *Southern blot* que uma única cópia da sequência do T-DNA do plasmídeo PV-ZMAP1043 foi integrada no genoma do milho em um único *locus*. Elementos genéticos adicionais não foram detectados, incluindo sequências da matriz do plasmídeo, conectados ou não ao T-DNA intacto presente no milho MON 87427.

As análises de PCR e de sequenciamento de DNA realizadas com o milho MON 87427 confirmaram a organização dos elementos dentro do inserto, avaliaram potenciais rearranjos no local de inserção e resultaram na sequência de DNA completa do T-DNA e DNA genômico adjacente (flanqueador) no milho MON 87427. A análise do local de inserção do T-DNA indica que houve uma deleção de 140 pb de DNA genômico no local de inserção no milho MON 87427. Além disso, duas inserções, uma de 41 pb e uma de 24 pb, foram identificadas nas sequências 5' e 3' flanqueadora, respectivamente.

A análise de estabilidade em múltiplas gerações por *Southern blot* demonstrou que o milho MON 87427 foi mantido através de cinco gerações, portanto confirmando a estabilidade do T-DNA no milho MON 87427. Os resultados das análises de segregação mostram que a herdabilidade e a estabilidade do inserto ocorreram como esperado ao longo de múltiplas gerações, o que corrobora a análise molecular de estabilidade do inserto e estabelece

o comportamento genético do T-DNA no milho MON 87427 como presente em um único *locus* cromossômico.

2) RESUMO DOS ESTUDOS APRESENTADOS PELA REQUERENTE

(i) Caracterização molecular:

Foram apresentados os resultados detalhados dos estudos sobre a caracterização molecular do evento do milho MON 87427. Os resultados desses estudos permitiram confirmar a estabilidade e equivalência do DNA inserido através de transformação genética via *Agrobacteria* no evento MON 87427, e sua comparação ao evento não modificado geneticamente. Usando a técnica de análise molecular por *Southern Blot* que uma única cópia da sequência do T-DNA do plasmídeo PV-ZMAP1043 foi integrada no genoma do milho em um único *locus*. Elementos genéticos adicionais não foram detectados, incluindo sequências da matriz do plasmídeo, conectados ou não ao T-DNA intacto presente no milho MON 87427.

As análises de PCR e de sequenciamento de DNA realizadas com o milho MON 87427 confirmaram a organização dos elementos dentro do inserto, avaliaram potenciais rearranjos no local de inserção e resultaram na sequência de DNA completa do T-DNA e DNA genômico adjacente (flanqueador) no milho MON 87427. A análise do local de inserção do T-DNA indica que houve uma deleção de 140 pb de DNA genômico no local de inserção no milho MON 87427. Além disso, duas inserções, uma de 41 pb e uma de 24 pb, foram identificadas nas sequências 5' e 3' flanqueadora, respectivamente.

A análise de estabilidade em múltiplas gerações por *Southern blot* demonstrou que o milho MON 87427 foi mantido através de cinco gerações, portanto confirmando a estabilidade do T-DNA no milho MON 87427. Os resultados das análises de segregação mostram que a herdabilidade e a estabilidade do inserto ocorreram como esperado ao longo de várias gerações, sendo herdados mendelianamente.

(ii) Estudos de expressão das proteínas:

A enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) catalisa um dos passos enzimáticos da via do ácido chiquímico, e é alvo do herbicida de amplo espectro glifosato (Haslam, 1993; Herrmann e Weaver, 1999; Kishore e Shah, 1988; Steinrücken e Amrhein, 1980). A via do ácido chiquímico e as enzimas EPSPS são ubíquas em plantas e microrganismos, mas ausentes em mamíferos, peixes, aves, répteis e insetos (Alibhai e Stallings, 2001).

O gene *cp4 epsps* no milho MON 87427 é derivado da EPSPS de *Agrobacterium* sp. cepa CP4. A sequência codificadora *cp4 epsps* codifica uma proteína CP4 EPSPS que consiste de um único polipeptídeo de 455 aminoácidos (Padgett *et al.*, 1996). Em plantas geneticamente modificadas tolerantes ao glifosato, os requerimentos por aminoácidos aromáticos e outros metabólitos essenciais são alcançados pela ação continuada da proteína CP4 EPSPS na presença do glifosato (Padgett *et al.*, 1996). A proteína CP4 EPSPS expressa no milho MON 87427 é idêntica à proteína CP4 EPSPS expressa em outros produtos tolerantes ao glifosato (Roundup Ready®) em culturas como soja, milho, canola, algodão, beterraba e alfafa, culturas estas já aprovadas comercialmente em vários países, algumas há quase duas décadas. No milho MON 87427, em função dos elementos genéticos presentes no cassete de transformação, a expressão da proteína CP4 EPSPS ocorre apenas em tecidos vegetativos,

como tecidos de folhas, colmos e raízes, reprodutivos femininos (estilo-estigma) e tecidos que se desenvolvem em sementes ou grãos. Tecidos reprodutivos masculinos, como micrósoros de pólen e células do *tapetum*, não produzem a proteína CP4 EPSPS. As análises de expressão da proteína CP4 EPSPS também apresentaram essa resposta.

(iii) **Caracterização e equivalência da proteína CP4 EPSPS do milho MON 87427.**

A proteína CP4 EPSPS foi produzida e purificada em *Escherichia coli*. Pequenas quantidades da proteína CP4 EPSPS foram purificadas de grãos do milho MON 87427. A identidade da proteína do milho MON 87427 foi confirmada e as propriedades físico-químicas e atividade funcional foram comparadas com os padrões produzidos em bactérias. A equivalência entre essas duas proteínas foi avaliada por uma série de testes analíticos, incluindo:

- (1) sequenciamento N-terminal da proteína CP4 EPSPS produzida no milho MON 87427 para estabelecer sua identidade;
- (2) análise MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-Of-Flight Mass Spectrometry*) de peptídeos derivados do núcleo trípico digerido da proteína CP4 EPSPS produzida no milho MON 87427 e da mesma proteína intacta para estabelecer a identidade e determinar a massa intacta, respectivamente;
- (3) análise de *Western blot* para estabelecer a equivalência de identidade e de imunorreatividade entre a proteína CP4 EPSPS produzida no milho MON 87427 e em *E. coli* usando um anticorpo anti-CP4 EPSPS;
- (4) SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) para estabelecer a equivalência da massa molecular aparente a proteína CP4 EPSPS produzida no milho MON 87427 e em *E. coli*;
- (5) análise do estado de glicosilação da proteína CP4 EPSPS produzida no milho MON 87427 e estabelecimento da equivalência com a proteína CP4 EPSPS produzida em *E. coli*; e
- (6) análise da atividade enzimática da proteína CP4 EPSPS para demonstrar

(iv) **Análise da sequência N-terminal**

O sequenciamento N-terminal dos primeiros 15 aminoácidos da proteína CP4 EPSPS produzida no milho MON 87427 resultou na sequência esperada da mesma, com exceção da metionina N-terminal, que não foi detectada. Esse resultado é esperado quando da remoção da metionina N-terminal, catalisada pela metionina aminopeptidase, uma modificação comum que ocorre cotraducionalmente antes da finalização da cadeia de proteínas nascentes (Giglione e Meinel, 2001). Assim, a informação da sequência N-terminal confirma a identidade da proteína CP4 EPSPS isolada de grãos do milho MON 87427.

(v) **Análise de imunorreatividade**

A análise de *Western blot* foi conduzida usando o anticorpo policlonal de cabra anti-CP4 EPSPS como meio adicional para confirmar a identidade da proteína CP4 EPSPS isolada de grãos do milho MON 87427 e para avaliar a equivalência da imunorreatividade entre a proteína CP4 EPSPS produzida no milho MON 87427 e em *E. coli*. Os resultados mostram que o anticorpo anti-CP4 EPSPS reconheceu a proteína CP4 EPSPS produzida no milho MON 87427, que migrou numa posição idêntica à da proteína CP4 EPSPS produzida em *E.*

coli. Além disso, o sinal imunorreativo aumentou com o aumento das quantidades da proteína CP4 EPSPS adicionada.

Para comparar a imunorreatividade das proteínas CP4 EPSPS produzidas no milho MON 87427 e em *E. coli*, uma análise densitométrica foi realizada. A intensidade média do sinal das canaletas contendo a proteína CP4 EPSPS produzida no milho MON 87427 foi 9,6% maior que a das canaletas contendo a proteína CP4 EPSPS produzida em *E. coli*. Contudo, essa diferença ficou dentro do critério de aceitação para imunorreatividade ($\pm 35\%$). Em síntese, essa análise da densitometria do *Western blot* estabeleceu a identidade da proteína CP4 EPSPS produzida no milho MON 87427 e demonstrou que esta e a proteína CP4 EPSPS produzida em *E. coli* possuem imunorreatividade equivalente com o anticorpo específico para CP4 EPSPS

(vi) Determinação da massa molecular e da pureza da proteína CP4 EPSPS produzida no milho MON 87427

A massa molecular e a pureza da proteína CP4 EPSPS produzida na planta foram determinadas usando análise de densitometria em gel SDS-PAGE corado com *Brilliant Blue G Colloidal* e os resultados mostram que a proteína CP4 EPSPS produzida no milho MON 87427 migrou na mesma posição do gel que a proteína CP4 EPSPS produzida em *E. coli* e a massa molecular aparente foi calculada como sendo 44,1 kDa. A massa molecular aparente da proteína CP4 EPSPS produzida em *E. coli* no Certificado de Análise foi 43,8 kDa. Portanto, a diferença entre as duas foi de 0,7% estando dentro dos padrões de aceitação e as proteínas migraram a posições similares no gel de poliacrilamida, considerou-se então que as proteínas CP4 EPSPS produzidas no milho MON 87427 e em *E. coli* possuem massas moleculares aparentes equivalentes.

Ausência de glicosilação

Análises para avaliar se a proteína CP4 EPSPS produzida no milho MON 87427 foi pós-traducionalmente glicosilada, uma amostra da proteína purificada foi submetida à análise de glicosilação usando o *Pro-Q® Emerald 488 Glycoprotein Gel and Blot Stain Kit* (Molecular Probes, Eugene, OR). Em particular, a glicosilação resultaria no aumento relativo da massa da proteína em relação à massa teórica calculada. A concordância entre a massa da proteína CP4 EPSPS produzida no milho MON 87427 (47.552 Da), conforme detectado na análise de espectrometria de massa MALDI-TOF, com a massa teórica (47.481 Da) não confirma a existência de espécies glicosiladas, uma vez que a adição de um único açúcar deveria aumentar a massa em pelo menos 160 Da.

Para confirmar que as proteínas CP4 EPSPS produzidas no milho MON 87427 e em *E. coli* estavam presentes nas amostras para a detecção de carboidratos e a análise de glicosilação, a membrana foi corada com *Coomassie Brilliant Blue*. Ambas as proteínas, a proteína CP4 EPSPS produzida no milho MON 87427 e a produzida em *E. coli* foram claramente detectadas. Esses dados indicam que o estado de glicosilação da proteína CP4 EPSPS produzida no milho MON 87427 é equivalente ao da proteína CP4 EPSPS produzida em *E. coli*, e que nenhuma delas é glicosilada.

Expressão da proteína CP4 EPSPS no milho MON 87427.

Amostras coletadas no Brasil.

Um estudo de campo foi conduzido com o objetivo de quantificar os níveis de expressão da proteína CP4 EPSPS, relevantes para a avaliação do risco, em folhas, forragem e grãos do milho MON 87427 produzidos em ensaios de campo no Brasil na safra 2014/2015, utilizando-se o ensaio imunoenzimático ELISA (do inglês *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) (Joaquim, 2015b). Os tecidos do milho MON 87427 foram coletados em experimentos conduzidos em seis locais representativos da cultura do milho. São eles: Cachoeira Dourada, MG (MGCH); Não-Me-Toque, RS (RSNM); Sorriso, MT (MTSO); Rolândia, PR (PRRO); Luís Eduardo Magalhães, BA (BALM); Santa Cruz das Palmeiras, SP (SPSD).

Amostras coletadas nos Estados Unidos.

Um estudo de campo foi conduzido com o objetivo de quantificar os níveis de expressão da proteína CP4 EPSPS, o que é relevante para a avaliação do risco, em diferentes tecidos do milho MON 87427 produzidos em ensaios de campo nos Estados Unidos na safra 2008, utilizando-se o ensaio imunoenzimático ELISA. Os tecidos do milho MON 87427 foram coletados em três repetições em cinco locais representativos da cultura do milho nos Estados Unidos: Jackson County, Arkansas; Jefferson County, Iowa; Stark County, Illinois; Parke County, Indiana; e York County, Nebraska, locais representativos da cultura do milho nos Estados Unidos.

A descrição dos efeitos pleiotrópicos e epistáticos dos genes inseridos, quando observados.

Nenhum efeito pleiotrópico foi observado no milho MON 87427 até o presente momento durante os experimentos de campo realizados em diferentes países. Diferenças significativas na morfologia, no crescimento ou no desenvolvimento do milho MON 87427 não foram encontradas quando este foi comparado ao milho controle convencional nesses experimentos de campo, inclusive naqueles realizados no Brasil.

Avaliações de campo do milho MON 87427 - experimentos no Brasil.

Os dados de avaliação agrônômica e fenotípica foram coletados em experimentos realizados a campo nos Estados Unidos e no Brasil

No Brasil, experimentos de campo para avaliar características fenotípicas e agrônômicas, e interações ambientais do milho MON 87427, em comparação ao milho controle convencional e às referências comerciais de milho, foram conduzidos durante a safra 2014/2015 em seis locais (Soares, 2015e). Os parâmetros avaliados e a época de avaliação e coleta dos dados são descritos:

- Estádio de crescimento
- Estande inicial
- Vigor de plantas
- Dias para 50% plantas com pólen
- Dias para 50% espigas com cabelo
- Altura de espiga
- Altura de planta
- Stay green*
- Espigas caídas
- Plantas caídas

Estande final
Massa de 1 litro
Umidade de grãos
Rendimento de grãos
Massa de 1000 grãos
Interações ambientais (estresse abiótico/biótico)
Interações ambientais (organismos não alvo)
Interações ambientais (danos causados por artrópodes)

Também foram avaliados outros parâmetros nesse mesmo experimento, como vigor e germinação, plantas voluntárias e potenciais como planta daninha. As Estações Experimentais onde esse estudo foi conduzido no Brasil, seis locais representativos do cultivo de milho no Brasil. As identidades do milho MON 87427, do milho controle convencional e das referências comerciais foram verificadas por análises de PCR. A presença do gene *cp4 epsps* foi certificada no milho MON 87427. As observações fenotípicas e de interações ambientais avaliadas nesse estudo demonstram que o milho MON 87427 não difere consistentemente do milho controle convencional, e que as diferenças significativas encontradas foram pontuais e não representam características que constituem potenciais riscos ambientais e potencial aumento da persistência da cultura como planta daninha. Baseando-se nessas informações, conclui-se que o milho MON 87427 é tão seguro quanto o milho controle convencional utilizado no estudo.

Estudo de campo conduzido nos Estados Unidos, com o objetivo de quantificar os níveis de expressão da proteína CP4 EPSPS, em diferentes tecidos do milho MON 87427 produzidos em ensaios de campo na safra 2008, utilizando-se o ensaio imunoenzimático ELISA. Os tecidos do milho MON 87427 foram coletados em três repetições em cinco locais representativos da cultura do milho nos Estados Unidos. Os níveis de expressão da proteína CP4 EPSPS foram determinados em 19 tipos de tecidos, com amostras coletadas nos cinco locais. Os níveis da proteína CP4 EPSPS no milho MON 87427. Os dados de expressão da proteína CP4 EPSPS do milho MON 87427 são consistentes com o conceito do produto MON 87427. O milho MON 87427 utiliza uma combinação específica de promotor e íntron (*e35S-hsp70*) que leva a expressão da proteína CP4 EPSPS em tecidos vegetativos e reprodutivos. Todos os dados coletados foram submetidos à análise estatística por meio do teste t para a comparação das médias ao nível de significância de 5%.

- Histórico de Uso Seguro:

Conforme revisão apresentada pela requerente, o milho evoluiu como uma espécie de polinização aberta (fertilização cruzada), e até o século XX, somente variedades de milho de polinização aberta eram cultivadas. Como o milho apresenta polinização cruzada, as variedades de milho formam uma coleção de indivíduos (genótipos) heterozigotos e heterogêneos. As variedades foram desenvolvidas por simples seleção em massa pelos nativos indígenas antes da chegada de Colombo. Seus métodos de seleção eram simples pelos padrões atuais, mas foram obviamente efetivos no desenvolvimento de raças, variedades e linhagens para satisfazer suas necessidades de alimento, combustível, ração animal e também culturais. A produção de híbridos ocorreu entre variedades como culturas movidas dentro do hemisfério ocidental, liberando variabilidade genética para desenvolver outras variedades únicas (Brieger, 1943; Brieger, 1949a; Brieger, 1949b).

Como o milho naturalmente apresenta fertilização cruzada, a composição genética de cada planta não é conhecida. A autopolinização contínua de indivíduos por sete a dez gerações resultou em linhagens puras dentro das quais cada planta tinha características similares. A interpretação correta do que aconteceu durante a purificação (transformação em linhagem pura) foi baseada na genética mendeliana. A fixação dos alelos em linhagens puras causou uma redução geral no vigor e na produtividade. Técnicas como o melhoramento assistido por marcadores têm reduzido o tempo e o número de gerações necessárias para a produção de linhagens puras (Yousef e Juvik, 2001).

Observou-se que após o cruzamento de duas linhagens puras o vigor foi restabelecido. Se nenhuma seleção ocorreu durante a purificação, o desempenho médio (rendimento de grãos) de todos os cruzamentos possíveis foi similar ao desempenho da variedade original na qual a purificação foi iniciada. Alguns cruzamentos, entretanto, foram melhores que a variedade original de polinização aberta e podem ser reproduzidos a partir dos cruzamentos de parentais de linhagens puras do cruzamento. Assim, o conceito de híbridos de milho foi determinado: autopolinização para desenvolver linhagens puras, cruzamento das linhagens puras para produzir híbridos, avaliação para determinar o melhor híbrido e uso dos parentais da linhagem pura para reproduzir o híbrido superior e distribuí-lo para uso pelos agricultores (Shull, 1908).

A hibridação é utilizada em muitas fases do melhoramento de milho pela expressão da heterose. A hibridação é usada para produzir populações melhoradas (F2) para desenvolver linhagens puras para uso em híbridos, para produzir cruzamentos das linhagens superiores para distribuição aos agricultores. A hibridação é facilmente alcançada através de polinização manual ou por vento em grandes campos de cruzamento (linhagens puras macho e fêmea) com o objetivo de produzir grandes quantidades de sementes híbridas de alta qualidade.

- Descrição de efeitos pleiotrópicos e epistáticos do gene inserido, quando observados:

É importante ressaltar que a interação entre genes ocorre a todo momento na descendência de cruzamentos de indivíduos em programas de melhoramento e nas gerações seguintes a seleção artificial atua no sentido de harmonizar a ação dos genes para adaptação ao ambiente agrícola. Os efeitos desfavoráveis resultantes de efeitos pleiotrópicos ou de efeitos epistáticos são eliminados ao longo do processo de seleção. Nas plantas geneticamente modificadas, na fase de transformação genética muitos transformantes são eliminados num processo de seleção em decorrência de características desfavoráveis que surgem da inserção das construções gênicas no genoma da planta. Nesse processo são selecionados transformantes que mantêm as características morfológicas, fisiológicas e químicas da planta convencional, inicialmente essa seleção é feita em casa de vegetação e em seguida em parcelas de campo expostas às condições ambientais. Da mesma forma, ao longo das diversas etapas do melhoramento genético, características desfavoráveis são eliminadas precocemente nos programas de seleção e apenas as linhagens resultantes comprovadamente com alta performance são usadas para produção comercial de grãos.

Em relação ao milho MON 87427, nenhum efeito pleiotrópico ou epistático foi observado até o momento durante os experimentos de campo realizados em diferentes países. Comparações entre o milho MON 87427 e o milho controle convencional não apresentaram diferenças significativas na morfologia, no crescimento ou no desenvolvimento das plantas tanto em experimentos de campo, inclusive no Brasil, quanto em plantios comerciais em vários países. A equivalência substancial entre o milho MON 87427 e o milho controle

convencional é demonstrada no presente documento através dos dados e informações aportados.

- Potencial de invasividade e persistência no ambiente:

Conforme dados apresentados na proposta da requerente, o fenótipo das plantas transformadas contendo o evento MON 87427 é equivalente ao fenótipo da planta original, no que se refere aos órgãos reprodutivos, à duração do período de desenvolvimento e crescimento da planta, dormência e germinação, sobrevivência e persistência no campo, dentre outras características. Além disso, o milho MON 87427, assim como o milho convencional, não é considerado uma espécie invasivas em ecossistemas naturais e não apresentam tendência a proliferar-se como planta daninha. As modificações genéticas incluídas no milho MON 87427 não possui qualquer ação ou relação com os processos naturais de reprodução, disseminação e sobrevivência da espécie receptora, concluindo-se que nenhuma vantagem competitiva foi proporcionada. A avaliação do impacto nas práticas agrônomicas usuais também indica que o milho MON 89427 não causa impacto nas práticas de cultivo e de rotação, ou no manejo de insetos ou doenças que sejam maior chance de se estabelecer no meio ambiente como uma planta daninha que o milho convencional.

- Fluxo gênico:

Na avaliação de segurança de milhos geneticamente modificados tem sido demonstrado que existe equivalência com o milho convencional em termos das características fenotípicas, reprodutivas, de dispersão, de reprodução e outras. No caso do milho MON 87427, os dados apresentados, gerados em seis locais no Brasil e em 16 locais nos Estados Unidos, mostram essa equivalência. A única diferença é que o milho MON 87427 produz a proteína CP4 EPSPS em tecidos vegetativos e reprodutivos femininos, como tecidos de folhas, colmos e raízes, e tecidos que se desenvolvem em sementes ou grãos e estilo-estigma. Tecidos reprodutivos masculinos, como micrósporos de pólen e células do *tapetum*, não produzem a proteína CP4 EPSPS. Da mesma forma, o esperado é que a dispersão de pólen do milho geneticamente modificado também seja semelhante à do milho convencional.

O fluxo gênico da primeira geração de milho geneticamente modificado resistente a insetos, o milho MON 810, foi estudado pela Monsanto do Brasil Ltda. como parte do monitoramento pós-liberação comercial desse produto aprovado em 2007 pela CTNBio (EPT nº 1.100/2007). O monitoramento do milho MON 810 foi realizado durante as safras 2008/2009, 2009/2010 e 2010/2011, onde o fluxo genico foi estudado e acompanhado no campo. Os resultados do estudo de fluxo gênico no milho MON 810 foram utilizados para demonstrar a baixa taxa de fluxo gênico na cultura de milho em distâncias acima de 20 metros da fonte de pólen. Assim, pode-se embasar o racional da conclusão de que o gene *cp4 epsps* no milho MON 87427 segue o padrão de fluxo gênico do milho MON 810, uma vez que este não difere do milho convencional nas suas características reprodutivas, fenotípicas e agrônomicas. Assim, espera-se que para o milho MON 87427 a frequência do fluxo gênico entre plantas a 20 metros da fonte do pólen seja também reduzida. Tais resultados ilustram o fluxo gênico da cultura do milho, e devem ser considerados no contexto da cultura e não da característica introduzida, uma vez que os dados agrônomicos e fenotípicos mostram que o milho geneticamente modificado é equivalente ao milho convencional, exceto pela característica introduzida intencionalmente pela modificação genética. Os resultados obtidos nesses estudos de monitoramento pós-comercial em três safras no Brasil mostram que a

coexistência de diferentes tipos de milho é possível, uma vez que a frequência do fluxo gênico entre plantas de milho diminui com distâncias acima de 20 metros da fonte de pólen

Considerando que o fluxo de pólen geneticamente modificado poderá ocorrer em pequenas taxas entre os plantios, não se espera, no entanto, que a característica conferida pela introdução do gene *cp4 epsps* proporcione qualquer vantagem competitiva ao milho. Considera-se ainda que tal proteína é segura e não representariam qualquer risco a saúde ou ao meio ambiente.

- Estudos de Eficácia:

Com relação ao evento MON 87427, esse milho foi desenvolvido para ser utilizado como uma ferramenta na produção de sementes de milho híbrido. O milho MON 87427, que confere tolerância ao herbicida glifosato, o ingrediente ativo dos herbicidas Roundup®. utiliza uma combinação específica de promotor e íntron (*e35S-hsp70*) para dirigir a expressão da proteína CP4 EPSPS em tecidos vegetativos e reprodutivos femininos, conferindo tolerância ao glifosato em folhas, colmo e raiz, bem como em tecidos que se desenvolvem em sementes ou grãos e estilo-estigma. O uso dessa combinação específica de promotor e íntron também resulta em uma produção limitada ou ausente da proteína CP4 EPSPS em dois tecidos reprodutivos masculinos principais: micrósporos, que se desenvolvem em grãos de pólen, e células do *tapetum*, que provêm nutrientes para o pólen (Goldberg *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 2009). Assim, os tecidos reprodutivos masculinos críticos para o desenvolvimento do gametófito masculino no milho MON 87427 não são tolerantes ao glifosato. Tanto o promotor *e35S* quanto o promotor *CaMV 35S*, a partir do qual o promotor *e35S* foi originado (Kay *et al.*, 1987; Odell *et al.*, 1985), já demonstraram uma habilidade limitada em dirigir a expressão de um gene de interesse em pólen para certas culturas (CaJacob *et al.*, 2004; Hamilton *et al.*, 1992). A expressão tecido-seletiva da proteína CP4 EPSPS no milho MON 87427 permite a extensão do uso do milho tolerante ao glifosato para incluir seu uso como uma ferramenta na produção de sementes de milho híbrido.

- Impactos na microbiota do solo:

Nas avaliações de segurança de plantas desenvolvidas por meio da biotecnologia, o risco de transferência gênica horizontal é analisado, uma vez que resultaria em dispersão de genes inseridos nas plantas pela transferência para microrganismos no campo ou no trato digestivo de animais que consomem tais plantas. Não existem relatos de transferência gênica do milho para outras espécies com as quais não possa haver cruzamento sexual. A probabilidade de transferência gênica horizontal é considerada desprezível. Mesmo que ela ocorresse, as consequências seriam negligíveis, pois o gene introduzido no milho MON 87427 é de origem bacteriana e a proteína CP4 EPSPS não representa toxicidade para humanos e outros organismos não alvo nas condições de uso. As preocupações com esse tipo de transferência são particularmente direcionadas à dispersão hipotética de genes que conferem resistência aos antibióticos utilizados para bactérias patogênicas, comprometendo, assim, o uso desses antibióticos (Bertolla e Simonet, 1999; Prins e Zadoks, 1994; Smalla *et al.*, 2000). Entretanto, a transferência de sequências que incluem um gene intacto é desprezível, o que faz com que ele não seja funcional no organismo receptor mesmo que fosse transferido, pois provavelmente não teria as sequências regulatórias necessárias à sua expressão associadas a ele (Conner *et al.*, 2003).

Microrganismos encontrados no solo ou em associações com as plantas, no rúmen ou no intestino de animais, são capazes de receber DNA de outros organismos por meio de mecanismos especializados de transferência, como conjugação, transdução e transformação (Davison, 1999). Porém a transferência gênica horizontal de plantas para microrganismos é um evento raro que seria viabilizado apenas pelo mecanismo de transformação (Bertolla e Simonet, 1999; Prins e Zadoks, 1994; Smalla *et al.*, 2000).

No caso do milho MON 87427, o gene *nptII* que codifica a enzima neomicina fosfotransferase tipo II (NPTII) não está presente no plasmídeo utilizado para transformar a planta, e o gene *aad* que codifica a enzima AAD está apenas presente na sequência estrutural do plasmídeo, mas não foi integrado ao genoma da planta uma vez que não faz parte do T-DNA. Esses dois genes são marcadores de seleção utilizados no processo de modificação genética e que conferem resistência a antibióticos como canamicina, espectinomicina e estreptomicina. Como o milho MON 87427 não possui os genes *nptII* ou *aad* em seu genoma, as preocupações com a possibilidade de transferência horizontal de genes marcadores de seleção que conferem resistência aos antibióticos neste caso são irrelevantes.

Possibilidade de transferência horizontal do transgene:

Na revisão apresentada, a requerente afirma que o cultivo milho MON 87427 é tão seguro à microbiota do solo quanto o cultivo do milho convencional, uma vez que não existe nenhum mecanismo conhecido, ou demonstração definitiva que o DNA possa se transferir de plantas para microorganismos e, mesmo que pudesse ocorrer uma transferência de genes marcadores de seleção como o *nptII* e o *aad*, é improvável que esses genes possam contribuir de alguma maneira para a dispersão da resistência a antibióticos em populações bacterianas, visto que genes de resistência já estão amplamente dispersos no meio ambiente e particularmente no solo e em bactérias que colonizam os tratos digestivos animais.

As preocupações com o risco de ocorrência de transferência horizontal devem tomar em consideração o fato de que esse é um processo natural de movimento de genes entre espécies filogeneticamente distantes, responsável por mudanças no *pool* gênico de populações e que possui importância no processo evolutivo das espécies. Apesar da possibilidade da transferência horizontal do gene introduzido no milho MON 87427 (gene *cp4 epsps*) para bactérias e outros organismos não poder ser totalmente eliminada, essa transferência é altamente improvável e, caso viesse a ocorrer, seu impacto seria insignificante. Vale lembrar que genes *epsps*, é derivado de *Agrobacterium* sp. cepa CP4 e estão amplamente dispersos no meio ambiente.

Os impactos negativos e positivos aos organismos alvo e não alvo

O milho MON 87427 não tem organismos alvo, uma vez que a proteína CP4 EPSPS nele expressa não tem ação sobre insetos ou outros organismos. A avaliação dos impactos de uma cultura derivada de biotecnologia sobre organismos não alvo e espécies ameaçadas e em perigo é um componente da avaliação da capacidade do milho tornar-se um organismo causador de doenças de planta. Dado que o milho MON 87427 não possui atividade pesticida, todos os organismos que interagem com esse milho são considerados organismos não alvo. A avaliação ambiental demonstrou que a presença da característica de tolerância ao glifosato em tecidos vegetativos e reprodutivos femininos do milho MON 87427 (tecidos de folhas, colmos e raízes, e tecidos que se desenvolvem em sementes ou grãos e estilo-estigma) e a aplicação

desse herbicida sobre esse milho, seja para controle de plantas daninhas, seja para o despendoamento químico, não alterou interações planta-artrópodes, incluindo artrópodes benéficos, nem alterou a suscetibilidade a doenças em comparação aos híbridos convencionais de milho.

As informações bioquímicas e os dados experimentais para a avaliação do milho MON 87427 incluíram caracterização molecular, avaliações de segurança da proteína CP4 EPSPS; histórico de exposição ambiental à família de proteínas EPSPS; informações da avaliação de interações ambientais; análises de composição nutricional; estudos para avaliações fenotípicas e agronômicas, dentre outros. Em conjunto, todos os dados coletados para o milho MON 87427 permitem concluir que esse milho não tem nenhum mecanismo razoável que poderia causar danos aos organismos não alvo, ou representar um risco adicional a espécies ameaçadas e em perigo, se for comparado aos híbridos convencionais de milho. Os estudos realizados para verificar os impactos de uma cultura derivada de biotecnologia sobre organismos não alvo e espécies ameaçadas e em perigo nos campos cultivados com o milho MON 87427 no Brasil na safra 2014/2015 e nos Estados Unidos na safra 2008, conclui que os organismos estudados não são influenciadas pela expressão da proteína CP4 EPSPS no milho MON 87427.

Avaliações agronômicas, fenotípicas e das interações ecológicas realizadas no Brasil.

Uma grande quantidade de informações foi gerada em experimentos de campo utilizando o milho MON 87427 com o objetivo de verificar se a modificação genética alterou o potencial dessa planta para se tornar planta daninha, quando comparada ao milho controle convencional. A avaliação foi baseada na caracterização agronômica e fenotípica, nos dados de germinação e vigor, nas observações das interações ambientais e plantas voluntárias, dados esses coletados no Brasil em experimentos de campo realizados na safra 2014/2015 em várias regiões representativas do país. Os resultados das avaliações de vários parâmetros indicam que o milho MON 87427 não possui características que possam conferir um risco dessa planta se tornar uma planta daninha ou causar impacto ecológico significativo quando comparado ao milho controle convencional. Dados de interações ambientais também indicam que o milho MON 87427 não possui nenhuma suscetibilidade ou tolerância maior a doenças ou insetos. Avaliados em conjunto, esses dados mostram que o milho MON 87427 não impõe risco como planta daninha ou resulta em impacto ecológico significativo quando comparado ao milho controle convencional e às referências comerciais. Além disso, os dados apresentados mostram que a expressão da proteína CP4 EPSPS no milho MON 87427 não altera o fenótipo, as características agronômicas e as interações ambientais da planta além do intencionado pela modificação genética em questão. Portanto, a única diferença do milho MON 87427 em relação aos híbridos convencionais é aquela intencionada pela modificação genética, ou seja, a tolerância ao glifosato em tecidos vegetativos e reprodutivos femininos.

Avaliações de campo do milho MON 87427 - experimentos nos Estados Unidos.

A avaliação das características fenotípicas, agronômicas e de interações ambientais do milho MON 87427 comparado ao milho controle convencional (LH198 × LH287) fornecem dados que apoiam a conclusão de que o milho MON 87427 é semelhante ao milho controle convencional, com exceção da característica de tolerância tecido-seletiva ao herbicida

glifosato. Portanto, é improvável que o milho MON 87427 represente um risco de se tornar uma planta daninha ou gerar um impacto ambiental significativo quando comparado ao milho controle convencional. As conclusões são baseadas nos estudos das diversas avaliações apresentadas no presente documento.

As características fenotípicas, agronômicas e de interações ambientais do milho MON 87427 foram analisadas de forma comparativa a fim de se avaliar o potencial desse evento tornar-se uma planta daninha (OECD, 1993b). Essas avaliações incluíram cinco parâmetros de germinação de sementes, quatorze características de crescimento e desenvolvimento de plantas, observações de respostas a estresses abióticos, interações planta-doença e planta-artrópodes, e duas características de pólen. Os resultados das avaliações fenotípicas, agronômicas e de interações ambientais indicam que o milho MON 87427 não possui características de planta daninha, aumento da suscetibilidade ou tolerância a estresses abióticos, doenças ou artrópodes específicos, ou ainda características que poderiam conferir um risco desse evento tornar-se uma planta daninha ou gerar um impacto ambiental significativo, quando comparado ao milho controle convencional.

Na avaliação fenotípica, agronômica e de interações ambientais do milho MON 87427, os dados foram coletados para se avaliar aspectos específicos relacionados ao potencial desse evento tornar-se uma planta daninha. A caracterização do milho MON 87427 englobou cinco categorias gerais de dados: 1) germinação, dormência e emergência; 2) crescimento vegetativo; 3) desenvolvimento reprodutivo (incluindo características de pólen); 4) acamamento e retenção de sementes; e 5) interações ambientais (resposta da planta a estresses abióticos e interações com doenças e artrópodes).

Os dados fenotípicos, agronômicos e de interações ambientais foram avaliados com base no princípio da familiaridade (Hokanson *et al.*, 1999; OECD, 1993b), e consistiram de uma combinação de estudos de campo e laboratório conduzidos por cientistas familiarizados com a produção e a avaliação da cultura de milho. Em cada uma dessas avaliações, o milho MON 87427 foi comparado ao milho controle convencional de *background* genético similar, mas sem o cassete de expressão *cp4 epsps*. Ainda, referências comerciais foram incluídas nos estudos para cada característica mensurada, visando fornecer um intervalo de valores comparativos que são representativos de híbridos de milho comercial existentes. As referências comerciais são selecionadas a partir de híbridos comercialmente disponíveis que possuem uma variação de *backgrounds* e maturidades relativas, e que são apropriados para uso nos locais de plantio escolhidos nesses estudos. As referências comerciais fornecem um intervalo de variação para características e um contexto para a interpretação de resultados experimentais.

3) AVALIAÇÃO DE RISCO À SAÚDE HUMANA E ANIMAL

A requerente lista em sua avaliação de risco alguns fatores importantes, que devem ser considerados a fim de demonstrar a segurança do Milho MON 87427

- O organismo doador do gene *cp4 epsps*, *Agrobacterium* sp. cepa CP4, é uma bactéria comumente encontrada no solo e que teve esse gene naturalmente mutado, sem a ação do homem. Essa mutação natural fez com que o gene *cp4 epsps* passasse a codificar a produção da enzima CP4 EPSPS tolerante ao glifosato. Entretanto, a enzima CP4 EPSPS é estrutural e funcionalmente semelhante às enzimas EPSPS endógenas de plantas e microrganismos, uma família maior de enzimas EPSPS que são relacionadas.

As EPSPS são ubíquas na natureza, pois ocorrem em bactérias, fungos, algas e plantas superiores. As enzimas EPSPS não possuem toxicidade conhecida, não têm associação com patogenicidade e não conferem vantagem seletiva aos organismos que as produzem;

- Existem culturas tolerantes ao glifosato que produzem essas mesmas proteínas sendo cultivadas há décadas em vários países, sem qualquer relato de alergia ou toxicidade aos mais diversos tipos de organismos;
- A segurança das proteínas, CP4 EPSPS foi avaliada quanto aos riscos para humanos e animais. Os riscos são quantificados como uma margem de exposição (MOE), que é definida como nível de efeito não observado (NOEL) em um estudo de toxicidade oral aguda com camundongos para estimar a ingestão das citadas proteínas através da dieta. Esses estudos demonstraram que essas proteínas não apresentam toxicidade aguda e não causam nenhum efeito adverso, mesmo nas doses mais altas testadas.
- As proteínas CP4 EPSPS são rapidamente digeridas em fluidos gástricos simulados. Proteínas que são rapidamente digeridas nos sistemas gastrintestinais de mamíferos apresentam probabilidade desprezível de causar alergias quando consumidas.
- As proteínas CP4 EPSPS não compartilham nenhuma similaridade de sequência de aminoácidos com alérgenos conhecidos, gliadinas, gluteninas ou proteínas tóxicas que causem efeitos adversos em mamíferos. Isso foi mostrado em avaliações utilizando ferramentas da bioinformática.

A Setorial Humana e Animal da CTNBio já concluiu a análise da avaliação de risco do MON 87427 e concluiu pela sua segurança, apresentando parecer favorável à liberação comercial do evento combinado em reunião da setorial realizada em agosto de 2016.

PARECER FINAL:

Considerando que a variedade de milho MON 87427 pertence à espécie bem caracterizada e com sólido histórico de segurança para consumo humano;

Considerando que a proteína CP4 EPSPS, que conferem tolerância ao herbicida glifosato são expressas em vários eventos de diferentes culturas agrícolas já submetidos à avaliação de risco e aprovados para uso comercial em diversos países;

Considerando que os milhos tolerantes ao herbicida Roundup pela expressão da proteína CP4 EPSPS, bem como combinações de outros eventos em milho, já foram submetidos à análise da avaliação de risco pela CTNBio e obtiveram parecer favorável para sua liberação comercial;

Considerando a caracterização molecular, os dados apresentados sobre o evento MON 87427 e o Parecer da CIBio que corroboram a afirmativa sobre a segurança dos genes inseridos e proteínas expressas nesse evento;

Considero que a solicitação da Empresa Monsanto do Brasil Ltda., CQB03/97, processo nº 01200.005751/2015-13, para liberação comercial do milho geneticamente modificado evento MON 87427, atende às normas e à legislação pertinente que visam garantir

a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal, e indico o **DEFERIMENTO** da solicitação.

Considero ainda que, **na elaboração do Plano de Monitoramento, as seguintes recomendações devem ser incluídas:**

- Elaboração de um programa de gestão responsável, incluindo a adoção de medidas que visam o manejo da resistência e uso responsável do produto;
- Clareza na identificação e descrição dos organismos alvo do controle e eficiência desse controle para informação do agricultor;
- Programas educativos para distribuidores e agricultores, visando o uso adequado da tecnologia;
- Monitoramento visando a avaliação do desenvolvimento da tolerância nas diferentes regiões do país onde a tecnologia for adotada;
- Análise dos impactos da introdução da tecnologia e a preconização de medidas mitigatórias

Data: 29/08/2016

Restrições ao uso do OGM e seus derivados

Conforme estabelecido no art. 1º da Lei nº 11.460, de 21 de março de 2007, “ficam vedados a pesquisa e o cultivo de organismos geneticamente modificados nas terras indígenas e áreas de unidades de conservação, exceto nas Áreas de Proteção Ambiental”.

Data: 29/08/2016

Dra. Maria José Vilaça de Vasconcelos
Relator – Membro da CTNBio

Assessoria técnica: **Norma Paes**

REFERÊNCIAS

- Alibhai, M.F. e Stallings, W.C. 2001. Closing down on glyphosate inhibition - With a new structure for drug discovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 2944-2946.
- Brieger, F.G. 1943. Origem do milho. *Revista da Agricultura* 18: 409-418.
- Brieger, F.G. 1949a. Origem do milho - Parte I. In: Origem e centros de domesticação do milho. *Revista de Ciência e Cultura* 1 (3): 84-90.
- Brieger, F.G. 1949b. Origem do milho - Parte II. In: Origem e centros de domesticação do milho. *Revista de Ciência e Cultura* 1 (4): 191-201.
- Bertolla, F. e Simonet, P. 1999. Horizontal gene transfers in the environment: natural transformation as a putative process for gene transfers between transgenic plants and microorganisms. *Research in Microbiology* 150: 375-384. doi:10.1016/s0923-2508(99)80072-2.
- CaJacob, C.A., Feng, P.C.C., Heck, G.R., Alibhai, M.F., Sammons, R.D. e Padgett, S.R. 2004. Enigeering resistance to herbicides. In: Christou, P. e Klee, H., editors, *Handbook of Plant Biotechnology*. John Wiley & Sons, Inc., New York, New York. p. 353-372.
- Conner, A.J., Glare, T.R. e Nap, J.P. 2003. he release of genetically modified crops into the environment. Part II. Overview of ecological risk assessment. *Plant Journal* 33: 16-46.
- Davison, J. 1999. Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* 42: 73-91.
- Feng, P.C.C., Qi, Y., Chiu, T., Stoecker, M.A., Schuster, C.L., Johnson, S.C., Fonseca, A.E. e Huang, J. 2013. Improving hybrid seed production in corn with glyphosate-mediated male sterility. *Pest Management Science* 2014: 212-218.
- Giglione, C. e Meinel, T. 2001. Organellar peptide deformylases: universality of the N-terminal methionine cleavage mechanism. *Trends in Plant Science* 6: 566-572.
- Goldberg, R.B., Beals, T.P. e Sanders, P.M. 1993. Anther development: basic principles and practical applications. *The Plant Cell* 5: 1217-1229.
- Hamilton, D.A., Roy, M., Rueda, J., Sindhu, R.K., Stanford, J. e Mascarenhas, J.P. 1992. Dissection of a pollen-specific promoter from maize by transient transformation assay. *Plant Molecular Biology* 18: 211-218.
- Huang, M.-D., Wei, F.-J., Wu, C.-C., Hsing, Y.-I.C. e Huang, A.H.C. 2009. Analyses of advanced rice anther transcriptomes reveal global tapetum secretory functions and potential proteins for lipid exine formation. *Plant Physiology* 149: 694-707. doi:10.1104/pp.108.131128.
- Kay, R., Chan, A., Daly, M. e McPherson, J. 1987. Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* 236: 1299-1302.

Joaquim, M.E.S. 2015b. Quantificação dos níveis de expressão da proteína CP4 EPSPS em folhas, forragem e grãos do milho MON 87427 produzidos em ensaios de campo no Brasil na safra 2014/2015. Relatório Interno da Monsanto do Brasil Ltda. Monsanto do Brasil Ltda. p. 21.

Laughnan, J.R. e Gabay-Laughnan, S. 1983. Cytoplasmic male sterility in maize. Annual Review of Genetics 17: 27-48.

Odell, J.T., Nagy, F. e Chua, N.-H. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. Nature 313: 810-812.

OECD. 1993b. Safety considerations for biotechnology: scale-up of crop plants. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.

Padgett, S.R., Re, D.B., Barry, G.F., Eichholtz, D.E., Delannay, X., Fuchs, R.L., Kishore, G.M. e Fraley, R.T. 1996. New weed control opportunities: development of soybeans with a Roundup Ready™ gene. In: Duke, S. O., editor Herbicide-Resistant Crops: Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory and Technical Aspects. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. p. 53-84.

Prins, T.W. e Zadoks, J.C. 1994. Horizontal gene transfer in plants, a biohazard? Outcome of a literature review. Euphytica 76: 133-138. doi:10.1007/bf00024031.

Smalla, K., Borin, S., Heuer, H., Gebhard, F., van Elsas, J.D. e Nielsen, K. 2000. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes from transgenic plants to bacteria - are there new data to fuel the debate? 6th International Symposium on the Biosafety of GMOs. Saskatoon, Saskatchewan. p. 146-154.

Shull, G.H. 1908. The composition of a field of maize. Am. Breeders' Assoc. Rep. 4: 296-301.

Sidorov, V. e Duncan, D. 2009. *Agrobacterium*-mediated maize transformation: Immature embryos versus callus. In: Scott, M. P., editor Methods in Molecular Biology: Transgenic Maize - Methods and Protocols. Humana Press, Inc, Totowa, New Jersey. p. 47-58.

Wych, R.D. 1988. Production of Hybrid Seed Corn. In: Sprague, G. F. e Dudley, J. W., editors, Corn and Corn Improvement. American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin. p. 565-607.

Yousef, G.G. e Juvik, J.A. 2001. Crop breeding, genetics and cytology. Crop Sci. 41: 645-655.