

PARECER DO RELATOR

Liberação Comercial de Organismo Geneticamente Modificado – RN5

Processo: 01200. 005751/2015-13

Data de Protocolo: 17/12/15

Próton: 79847/2015

Requerente: Monsanto do Brasil Ltda.

CQB: 03/96

Total de Páginas: 224

CNPJ: 64.858.525/0001-45

Endereço: Avenida Nações Unidas, nº 12901, 3º, 7º, 8º, 9º e 19º andares, São Paulo (SP)

Presidente da CIBio: Geraldo U. Berger

Extrato Prévio: 4.940/2016, publicado no D.O.U. nº 10 em 15/01/16

Título da proposta: “Relatório de Biossegurança Alimentar e Ambiental do Milho MON 87427” - geneticamente modificado para tolerância ao herbicida glifosato

Descrição do OGM: milho evento MON 87427, geneticamente modificado para tolerância ao herbicida glifosato

Classificação de risco: Classe de Risco I

Resolução Normativa: RN 5

Finalidade (objetivo): Liberação comercial do milho MON 87427

Uso proposto: Liberação no meio ambiente, seu uso comercial e quaisquer outras atividades relacionadas a esse OGM e quaisquer progênes dele derivadas.

Países onde o OGM já foi avaliado e aprovado: A biossegurança do milho MON 87427, objeto da solicitação, já foi avaliada por órgãos análogos à CTNBio de outros países, tendo sido APROVADO em 13 países (Austrália, Canadá, Colômbia, Coréia do Sul, Estados Unidos da América, Filipinas, Indonésia, Japão, México, Nova Zelândia, Singapura, Taiwan e Vietnã), seja para plantio (02 países), ração animal (04 países) ou alimentação humana (13 países), conforme descrito na Tabela abaixo.

Tabela: Países onde o evento MON 87427 já foi aprovado e para que finalidade¹.

País	Alimentação Humana	Ração Animal	Plantio
Austrália	2012		
Canadá	2012	2012	2012
Colômbia	2014		
Indonésia	2016		
Japão	2013	2013	
México	2012		
Nova Zelândia	2012		
Filipinas	2014		
Singapura	2016		
Coreia do Sul	2014		
Taiwan	2012		
Estados Unidos	2012	2012	2013
Vietnã	2015	2015	

¹Fonte: <http://www.isaaa.org/gmaprovaldatabase/event/default.asp?EventID=265>

Última atualização: 20/09/2016

Objetivo e utilização do OGM e seus derivados: o milho (*Zea mays* L.) difere de outras culturas como soja e algodão, pois é plantado tipicamente como um híbrido, sendo assim utilizados em quase todas as áreas de produção no país. Uma característica inerente a sementes produzidas a partir de plantas híbridas é que elas apresentam a perda do vigor híbrido e, em virtude disso, não são comumente utilizadas para replantio. Além disso, as sementes não são geneticamente uniformes e demonstram segregação para uma grande variedade de características, tornando o manejo e o cultivo dessas sementes muito difíceis em gerações subsequentes. Assim, novas sementes híbridas são usadas a cada ano para o plantio. A produção de sementes híbridas é realizada através da combinação do material genético de parentais de linhagem pura, sendo um parental fêmea e outro parental macho. O pólen do pendão (flor masculina) do parental masculino é utilizado para fertilizar a espiga (flor feminina) do parental feminino. A separação física das flores masculina e feminina no milho torna a produção de sementes híbridas possível.

O fato do parental feminino produzir pólen ao mesmo tempo em que o parental masculino é um complicador na produção de sementes de milho híbrido. Assim, 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 de duas maneiras: remoção de pólen do parental feminino por despendoamento manual ou 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, estas duas maneiras apresentam aspectos negativos. Enquanto o despendoamento exige 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 MEC exige um intensivo processo de integração de cruzamento para direcioná-la 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).

O milho MON 87427, por apresentar tolerância tecido-seletiva ao herbicida glifosato, é uma alternativa para facilitar a produção de sementes viáveis de milho híbrido (Feng *et al*, 2014). Essa tecnologia permite uma otimização do despendoamento para a produção de sementes de milho híbrido, tornando-a uma ferramenta mais eficiente, enquanto produz sementes com os mesmos padrões de aceitação comercial. O milho MON 87427 utiliza uma combinação específica de promotor e íntron (*e35S-hsp70*) para dirigir a expressão da proteína CP4 EPSPS da cepa CP4 de *Agrobacterium* sp. 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 provêem nutrientes para o pólen. Assim, os tecidos reprodutivos masculinos críticos para o desenvolvimento do gametófito masculino no milho MON 87427 não são tolerantes ao glifosato.

Apenas as aplicações de glifosato que forem feitas em momentos específicos, começando imediatamente antes e/ou durante os estádios de desenvolvimento do pendão (aproximadamente

entre os estádios de crescimento vegetativo V8 e V19) produzirão um fenótipo macho-estéril através da tolerância tecido-seletiva ao glifosato, e irão otimizar a etapa de despendoamento usada na produção de sementes de milho híbrido. O glifosato é um herbicida sistêmico prontamente translocado através do floema em plantas e, uma vez no floema, se transloca para áreas de alta atividade meristemática, seguindo uma típica distribuição fonte-dreno. O desenvolvimento completo do pólen em uma planta de milho dura aproximadamente quatro semanas e os estádios precoces do crescimento do pendão começam aproximadamente no estádio de crescimento vegetativo do milho V9. Portanto, aplicações de glifosato feitas aproximadamente nesse momento permitem uma translocação máxima de glifosato para os tecidos reprodutivos masculinos, causando morte celular seletiva apenas nas células que não são tolerantes ao glifosato, ou seja, células de pólen e do *tapetum*. Aplicações de glifosato feitas durante estádios vegetativos precoces, de acordo com os momentos de aplicação especificados na bula atual dos herbicidas da marca comercial 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 nesses estádios. A tolerância tecido-seletiva ao glifosato no milho MON 87427 permite que a planta, quando tratada com o herbicida glifosato, sirva como uma linhagem parental feminina pura para a produção de sementes híbridas. O pólen da linhagem parental masculina pura correspondente irá fertilizar o milho MON 87427, resultando em uma semente de milho híbrido que carrega o gene *cp4 epsps* (em heterozigose) para a tolerância tecido-seletiva ao glifosato.

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.

Informações analisadas para emissão do parecer: o Relatório de Biossegurança Alimentar e Ambiental do milho MON 87427 apresentado pela proponente e as informações disponíveis na literatura.

1. INFORMAÇÕES SOBRE O OGM

Designação do OGM: Milho MON 87427

Espécie: *Zea mays* L.

1.1 Característica inserida: o milho evento MON 87427 (daqui em diante denominado milho MON 87427), classificado como Classe de Risco I, contém a sequência do gene *cp4 epsps* da cepa CP4 de *Agrobacterium* sp., também denominado de gene *aroA:CP4* segundo a nomenclatura utilizada para *E. coli*. A sequência de nucleotídeos do gene *cp4 epsps* de *Agrobacterium* foi modificada para ficar com os códons otimizados para expressão nas plantas de milho, sem que tenha havido modificação dos aminoácidos codificados. O gene *cp4 epsps* codifica a enzima 5-enolpiruvato-chiquimato-3-fosfato sintetase (CP4 EPSPS), a qual confere tolerância ao herbicida glifosato às plantas que a possuem (Barry *et al*, 2001), sendo que esta tolerância se deve ao fato de que esta EPSPS de *Agrobacterium* tem uma baixa afinidade pelo

glifosato, não sendo inibida pelo mesmo (Steinrücken e Amrhein, 1980) Todas as plantas possuem uma enzima EPSPS nativa que atua na via do ácido chiquímico, via esta que é responsável pela biossíntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, os quais são componentes essenciais não apenas para a síntese de proteínas mas também são precursores para a biossíntese de uma série de compostos secundários que são necessários para o crescimento das plantas (Tzin e Galili, 2010). A enzima EPSPS nativa é inibida pelo glifosato, levando à morte da planta. A presença na planta da enzima exógena CP4 EPSPS de *Agrobacterium* confere à mesma tolerância ao glifosato, mesmo com a inibição de sua EPSPS nativa. A via do ácido chiquímico, assim como a enzima EPSPS, não está presente em mamíferos, peixes, aves, répteis e insetos (Giesy *et al*, 2000, Hammond *et al*, 2013).

1.2 Método de introdução da característica e seleção de transformantes: O gene *cp4 epsps* da cepa CP4 de *Agrobacterium* sp., presente no plasmídeo PV-ZMAP1043, foi introduzido em embriões imaturos de um cultivar convencional de milho (LH198 x Hill) pelo método de transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Sidorov e Duncan, 2009). Após o co-cultivo dos embriões imaturos com *A. tumefaciens* carregando o plasmídeo PV-ZMAP1043, os embriões foram selecionados em meio contendo glifosato e carbenicilina para inibir o crescimento de células vegetais não transformadas e o excesso de *A. tumefaciens*, respectivamente. Após o enraizamento das plantas R₀ em meio condutivo, as que apresentavam características fenotípicas normais foram selecionadas e transferidas para solo. A partir de uma única planta R₀, a linhagem LH198 foi utilizada como o parental recorrente em quatro gerações de retrocruzamento. As progênes desses retrocruzamentos foram avaliadas para a característica de tolerância ao glifosato utilizando uma dose representativa de doses comerciais. As plantas sobreviventes foram então autopolinizadas para produzir plantas homozigotas, que foram identificadas por PCR quantitativa (qPCR). O milho MON 87427 foi selecionado como um evento líder com base em características fenotípicas superiores e no perfil molecular completo.

1.3 Vetor utilizado e características genético-moleculares do cassete de expressão: O plasmídeo PV-ZMAP1043, utilizado para a obtenção do milho MON 87427 por agrotransformação, continha o cassete de expressão do gene *cp4 epsps* T-DNA inserido no DNA de transferência (T-DNA) do plasmídeo. O cassete de expressão continha os seguintes elementos genéticos: 1) o promotor *e35S* do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) (Odell *et al*, 1985) contendo a região *enhancer* duplicada (Kay *et al*, 1987), que direciona a transcrição em células vegetais; 2) o primeiro intron do gene da proteína de choque térmico *hsp70* de milho (Brown e Santino, 1997); 3) a sequência alvo *CTP2* do gene *ShkG* que codifica a região do peptídeo de trânsito para o cloroplasto da EPSPS de *Arabidopsis thaliana* (Klee *et al*, 1987), que direciona o transporte da proteína CP4 EPSPS ao cloroplasto; 4) a sequência códon-otimizada do gene *cp4 epsps* da cepa CP4 de *Agrobacterium* sp., que codifica a proteína CP4 EPSPS (Barry *et al*, 2001, Padgett *et al*, 1996) e 5) a sequência da região 3' não-traduzida do gene da nopalina sintase (*nos*) de *A. tumefaciens*, que finaliza a transcrição e direciona a poliadenilação (Bevan *et al*, 1983). Fora da região T-DNA, o plasmídeo continha o gene *aadA* do transposon Tn7 (Fling *et al*, 1965), que confere resistência aos antibióticos espectinomicina e estreptomomicina. Por estar fora do t-DNA, este gene não foi transferido para o milho MON 87427 e foi utilizado apenas como elemento de seleção.

1.4 Proteínas Expressas e local da expressão: a única proteína exógena expressa pelo milho MON 87427 é a CP4 EPSPS da cepa CP4 de *Agrobacterium* sp. 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. Tecidos reprodutivos masculinos, como micrósporos de pólen e células do *tapetum*, não produzem a proteína.

1.5 Caracterização molecular do inserto no organismo receptor: A caracterização molecular do inserto de DNA no milho MON 87427 foi feita por análises de *Southern blot* e sequenciamento de DNA.

Os resultados mostraram que o evento MON 87427 contém uma única cópia do cassete de expressão do gene *cp4 epsps*, e que este está estavelmente integrada em um único *locus* e que é herdada de acordo com princípios mendelianos por múltiplas gerações (estudo por cinco gerações). Nenhuma sequência indesejada do vetor original foi detectada, sendo que apenas as sequências esperadas foram integradas.

1.6 Caracterização do produto da expressão do gene inserido no organismo receptor: A avaliação de risco de plantas geneticamente modificadas inclui a caracterização das proteínas exógenas produzidas na planta, a confirmação de suas funções e propriedades físico-químicas e a segurança de cada proteína. Como a expressão das proteínas exógenas em planta é geralmente muito baixa para permitir a purificação de quantidades suficientes para o uso nos estudos de biossegurança, torna-se necessário produzir as proteínas em sistemas hospedeiros recombinantes adequados, como bactérias, a fim de obter quantidades suficientes das proteínas de interesse para as análises necessárias relativas à sua segurança.

A proteína exógena produzida pelo milho MON 87427 é a CP4 EPSPS (5-enolpiruvoilchiquimato-3-fosfato sintetase) da cepa CP4 de *Agrobacterium tumefaciens* e a segurança da proteína CP4 EPSPS produzida em *E. coli* e purificada já foi avaliada previamente e os resultados foram publicados e estão disponíveis na literatura científica (Harrison *et al*, 1996).

No dossiê apresentado pela requerente, a proteína CP4 EPSPS foi produzida em grande quantidade em *Escherichia coli* e purificada e 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, que incluiu:

- (1) sequenciamento N-terminal da proteína CP4 EPSPS produzida no milho MON 87427. A sequência dos 15 primeiros aminoácidos foi igual à sequência codificada pelo gene introduzido na planta, exceto pela ausência da metionina inicial, o que é esperado. A remoção da metionina N-terminal, catalisada pela metionina aminopeptidase, é uma modificação comum que ocorre cotraducionalmente antes da finalização da cadeia de proteínas nascentes (Gigliione e Meinnel, 2001);
- (2) Identidade da proteína CP4 EPSPS por mapeamento de peptídeos trípticos utilizando espectrometria de massas (MALDI-TOF MS). Utilizando esta metodologia, 70,3% (320 de 455 aminoácidos) da sequência esperada da proteína foram identificados;

- (3) Análise da massa intacta da proteína produzida no milho MON 87427 por MALDI-TOF MS. A massa encontrada foi de 47.552 Da. A massa teórica da proteína inteira, sem a metionina N-terminal, é 47.481 Da. A diferença entre as massas medida e teórica é menor que 0,15%, estando dentro da janela de acurácia ($\pm 0,4\%$) do instrumento MALDI-TOF MS. Essa análise confirmou a identidade da proteína CP4 EPSPS produzida no milho MON 87427.
- (4) Análise de *Western blot* para estabelecer a equivalência de identidade e de imunoreatividade entre a proteína CP4 EPSPS produzida no milho MON 87427 e em *E. coli* usando um anticorpo anti-CP4 EPSPS. Tanto a CP4 EPSPS produzida no milho MON 87427 como a produzida em *E. coli* apresentaram a mesma migração e foram igualmente reconhecidas pelo anticorpo;
- (5) Equivalência da massa molecular aparente da proteína CP4 EPSPS produzida no milho MON 87427 e em *E. coli*. A eletroforese em gel de poli(acrilamida) com SDS (SDS-PAGE) revelou que as duas proteínas apresentam a mesma mobilidade relativa em SDS-PAGE e massas moleculares aparentes equivalentes. A pureza da proteína CP4 EPSPS purificada do milho MON 87427 foi determinada como sendo 96%.
- (6) Análise de glicosilação. A glicosilação, que é uma modificação pós-traducional, pode alterar as propriedades termodinâmicas, estruturais e cinéticas das proteínas (Lee *et al*, 2015; Mitra *et al*, 2006). Os eucariotos possuem sistemas de modificação pós-traducional, enquanto que o mesmo não está presente nos procariotos. Assim, a proteína CP4 EPSPS produzida por *E. coli* não apresenta glicosilação. Os resultados apresentados no dossiê indicam que a proteína CP4 EPSPS produzida no milho MON 87427 não é glicosilada pela planta.
- (7) Atividade funcional. A enzima CP4 EPSPS sintase catalisa reação chiquimato-3-fosfato (S3P) + fosfoenolpiruvato (PEP) produzindo 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato (EPSP) + fosfato inorgânico (Pi). Desta maneira a atividade da enzima pode ser determinada pela quantificação do Pi liberado num determinado tempo de reação. Tanto a CP4 EPSPS produzida no milho MON 87427 como a produzida em *E. coli* apresentaram atividades funcionais equivalentes.

1.7 Expressão da proteína CP4 EPSPS no milho MON 87427: a quantificação dos níveis de expressão da proteína CP4 EPSPS, relevantes para a avaliação do risco, foi realizada em folhas, forragem e grãos do milho MON 87427 em ensaios de campo tanto nos Estados Unidos (safra 2008) como no Brasil (2014/2015), utilizando o ensaio imunoenzimático ELISA.

No Brasil, os tecidos do milho MON 87427 foram coletados em experimentos conduzidos em seis locais representativos da cultura do milho: Cachoeira Dourada, MG; Não-Me-Toque, RS; Sorriso, MT; Rolândia, PR; Luís Eduardo Magalhães, BA e Santa Cruz das Palmeiras, SP. A média da quantificação do nível de expressão da proteína CP4 EPSPS, dos seis locais diferentes, foi de: 486 $\mu\text{g/g ms}$ em folha, 167 $\mu\text{g/g ms}$ em forragem e 3,9 $\mu\text{g/g ms}$ em grãos do milho, sendo que esses níveis de expressão são suficientes para a eficácia da característica exógena introduzida no milho (tolerância ao glifosato).

Nos Estados Unidos, os tecidos do milho MON 87427 foram coletados em três repetições, em cinco locais representativos da cultura do milho, e foram analisados 19 tipos de

tecidos. Os resultados obtidos para folha, forragem e grãos foram de 370 µg/g ms e 120 µg/g ms e 4,2 µg/g ms, respectivamente.

1.8 Técnicas de detecção gerais e específicas do OGM: é de fundamental importância a existência de métodos que possam identificar de maneira inequívoca o OGM. No presente caso, a técnica de detecção geral que pode ser utilizada para o milho MON 87427 consiste de aplicação de glifosato em níveis subletais para verificar a tolerância ao herbicida nos tecidos específicos vegetativos e reprodutivos femininos. A técnica de detecção específica é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando iniciadores específicos para os elementos presentes no cassete introduzido e para as sequências genômicas flanqueadoras presentes no local da inserção.

1.9. Padrão de herança genética dos genes inseridos: a avaliação da herdabilidade e estabilidade do cassete de expressão do gene *cp4 epsps* presente no milho MON 87427 foi realizada utilizando dados de segregação de 6 gerações (da 4ª. à 9ª. geração após a transformação) e uma análise qui-quadrado (χ^2). Essa análise é baseada no teste da taxa de segregação observada em relação à taxa de segregação esperada de acordo com princípios mendelianos. Os resultados obtidos indicam que o cassete de expressão do gene *cp4 epsps* responsável pela característica de tolerância tecido-seletiva ao glifosato no milho MON 87427 reside em um único *locus* no genoma do milho e é herdado de acordo com princípios de herança mendeliana. Esses resultados são também consistentes com os dados de caracterização molecular, que indicam que o milho MON 87427 contém uma cópia intacta e única do cassete de expressão do gene *cp4 epsps* que foi inserido no genoma do milho em um único *locus*.

1.10. Efeitos pleiotrópicos e epistáticos dos genes inseridos, quando observados: nenhum efeito pleiotrópico foi observado no milho MON 87427 durante os experimentos de campo realizados no Brasil e nos Estados Unidos. Não foram encontradas diferenças significativas na morfologia, no crescimento ou no desenvolvimento do milho MON 87427 quando este foi comparado ao milho controle convencional nesses experimentos de campo.

1.11 Grau de estabilidade genotípica: a estabilidade do T-DNA presente no milho MON 87427 ao longo de múltiplas gerações, foi avaliada por análise de *Southern blot* e utilizou DNA obtido de cinco gerações de melhoramento do milho MON 87427. Os resultados indicam que o milho MON 87427 contém uma cópia única do T-DNA estavelmente mantida ao longo de múltiplas gerações.

1.12. Existência de interações com efeitos adversos, quando dois ou mais genes forem introduzidos no mesmo OGM e suas possíveis consequências: o milho MON 87427 possui apenas o cassete de expressão do gene *cp4 epsps* que, quando transcrito e traduzido, resulta na expressão tecido-específica da proteína CP4 EPSPS nas partes vegetativas e femininas da planta. Portanto, aspectos envolvendo a existência de interações no caso de dois ou mais genes introduzidos no OGM não se aplica ao milho MON 87427.

1.13 Modificações genéticas incluídas no OGM que podem alterar sua capacidade de reprodução, sobrevivência, disseminação ou transferência de genes inseridos para outros

organismos: para avaliar se a modificação genética introduzida no milho MON 87427 alterou sua capacidade de reprodução, sobrevivência, disseminação ou transferência de genes inseridos para outros organismos, em comparação ao milho controle convencional e à referências comerciais de milho, foram conduzidos experimentos de campo em seis locais representativos do cultivo de milho no Brasil na safra 2014/2015, que geraram dados relativos a dormência, vigor e germinação de sementes, características fenotípicas e agrônomicas, interações ecológicas e abundância de artrópodes, sendo esses dados suportados pelos dados de campo gerados nos Estados Unidos (safra 2008).

A caracterização comparativa entre plantas derivadas de biotecnologia e plantas convencionais leva em consideração o Princípio de Equivalência Substancial, ou seja, exceto para o objetivo da modificação genética (a tolerância ao glifosato no caso do milho MON 87427), as demais características não deveriam se alterar além de uma variação conhecida e aceitável.

Parâmetros avaliados nos experimentos de campo realizados no Brasil:

- 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)
- vigor e germinação
- plantas voluntárias
- potenciais como planta daninha.

Conclusões sobre as avaliações agrônomicas, fenotípicas e das interações ecológicas realizadas no Brasil:

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 agrônômicas 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.

Conclusões sobre as avaliações agrônômicas, fenotípicas e das interações ambientais em experimentos de campo conduzidos nos Estados Unidos:

Os dados foram coletados em 16 locais de campo nos Estados Unidos durante a safra 2008 e forneceram um intervalo amplo de condições ambientais e agrônômicas representativas de áreas de produção comercial de milho naquele país.

Os resultados dessa avaliação demonstraram que a tolerância tecido-seletiva ao glifosato não alterou o potencial do milho MON 87427 tornar-se uma planta daninha quando comparado ao milho controle convencional.

A ausência de diferenças biologicamente significativas na resposta a estresses abióticos, danos causados por doenças, danos causados por artrópodes e abundância de insetos praga e benéficos apoia a conclusão de ser improvável que a características de tolerância tecido-seletiva ao glifosato no milho MON 87427 resulte em um aumento do seu potencial como planta daninha ou gere um impacto ambiental alterado quando comparado ao milho controle convencional.

2. ASPECTOS RELACIONADOS À SAÚDE HUMANA E ANIMAL

Os aspectos de segurança relacionados à saúde humana e animal foram abordados em parecer específico das Subcomissões Setoriais Permanentes Humana e Animal. A conclusão foi pela segurança do OGM em relação à saúde humana e animal, emtindo parecer favorável à liberação comercial do evento em reunião da setorial realizada em agosto de 2016.

3. ASPECTOS RELACIONADOS AO MEIO AMBIENTE

3.1. A área de ocorrência natural do organismo parental do OGM, seus ancestrais e parentes silvestres: o milho (*Zea mays* L.) é uma cultura que vêm sendo domesticada pelo homem há muitos séculos. A origem do milho foi muito estudada (Galinat, 1988; Mangelsdorf, 1974). Sua domesticação parece ter acontecido no sul do México há mais de 7.000 anos. Essa domesticação consistiu de inúmeras alterações selecionadas empiricamente, seguidas de cruzamentos dirigidos, hibridações e mutações. Os híbridos de milho são os primeiros exemplos das teorias genéticas aplicadas com sucesso para a produção de alimentos (Duvick, 2001).

Existem várias hipóteses quanto à origem e genealogia do milho (Galinat, 1988; Mangelsdorf, 1974), que é encontrado em todos os continentes e cultivado principalmente para a

produção de grãos utilizados no consumo humano e animal. Atualmente, o milho é conhecido somente na forma cultivada e não apresenta indícios de que poderia sobreviver no ambiente sem o auxílio do homem e, portanto, não é uma espécie considerada como planta daninha (Magalhães *et al*, 2002).

A origem do milho foi amplamente estudada e são quatro as hipóteses sugeridas (OECD, 2003a):

- 1) Descendente do teosinte: o milho originou de seleção direta do teosinte;
- 2) Hipótese tripartida: a) o milho originou do milho pod, b) o teosinte derivou de um cruzamento de milho com *Tripsacum*, e c) as variedades modernas de milho evoluíram de intercruzamentos do milho com o teosinte ou o *Tripsacum* ou ambos (Mangelsdorf, 1974);
- 3) Hipótese da origem comum: o milho, o teosinte e o *Tripsacum* descendem independentemente de um ancestral comum desconhecido;
- 4) Hipótese da catastrófica transmutação sexual: o milho moderno se originou do teosinte por uma mutação sexual epigenética causando o desenvolvimento da espiga.

Vários estudos têm sido realizados para embasar as diferentes hipóteses, mas eles aparentemente suportam principalmente a hipótese de que o milho é descendente do teosinte (Galinat, 1988). O genoma do teosinte é similar ao do milho, sendo que o teosinte se cruza facilmente com o milho e tem várias características morfológicas similares a essa planta. O teosinte parece mais com uma planta daninha e tem mais perfilhos que as variedades modernas de milho. Uma das maiores diferenças que distingue as duas espécies é a inflorescência feminina, ou espiga. As variedades de milho modernas têm de um a três ramos laterais que terminam em uma espiga com 8 a 24 fileiras de grãos com 50 sementes, e a espiga é coberta com folhas modificadas ou palhas. O teosinte também possui ramos laterais, mas eles terminam em espiguetas de duas fileiras ou talvez 12 cápsulas de frutos, sendo que em cada uma contém apenas uma semente encapsulada por uma gluma endurecida (Goodman e Brown, 1988; Goodman e Galinat, 1988). O teosinte não está presente no Brasil e sua distribuição natural é limitada às zonas de secas sazonais e zonas subtropicais com chuvas de verão no México e Guatemala, e ao Platô Central do México (Gonzales e Corral, 1995; Wilkes, 1972).

3.2 Características fenotípicas e agronômicas do milho MON 87427:

As características fenotípicas e agronômicas do milho MON 87427 são iguais ou diferentes às do parental que lhe deu origem? O comportamento apresentado pelo OGM em relação ao parental e outros milhos comerciais é fundamental para se avaliar a sua biossegurança. Para responder esta pergunta, a proponente conduziu estudos de campo no Brasil e nos Estados Unidos

Estudos no Brasil: os experimentos de campo para avaliar as características fenotípicas e agronômicas, e interações ambientais do milho MON 87427 em comparação ao milho controle convencional e às referências comerciais foram conduzidos durante a safra 2014/2015 em seis locais no Brasil (Soares, 2015). As Estações Experimentais onde esse estudo foi conduzido foram: Cachoeira Dourada, MG; Não-Me-Toque, RS; Sorriso, MT; Rolândia, PR; Luís Eduardo Magalhães, BA e Santa Cruz das Palmeiras, SP.

Em relação às características fenotípicas agronômicas foram analisadas: estágio de crescimento; estande inicial; vigor das plantas; dias para 50% plantas com pólen; dias para 50% espigas com cabelo; altura da espiga, altura da planta; *stay green*; espigas caídas, plantas caídas; estande final; massa de 1 litro; umidade de grãos; rendimento de grãos e massa de 1000 grãos.

Os resultados apresentados indicam que o milho MON 87427 é comparável aos híbridos de milho plantados no Brasil, não sendo observadas discrepâncias nas avaliações visuais de vigor de plantas, bem como nas observações de estágio de crescimento do milho MON 87427 e do milho controle convencional nos seis locais de plantio desde o período vegetativo até o fechamento do ciclo.

O estande inicial do milho MON 87427 foi significativamente inferior em comparação ao milho controle convencional (81,9 vs. 84,6 plantas/2 linhas), mas dentro do intervalo das referências comerciais. O rendimento do milho MON 87427 foi significativamente superior em comparação ao do milho controle convencional (15,23 vs. 12,75 kg), mas dentro do intervalo das referências comerciais.

Estudos nos Estados Unidos: Os dados foram coletados em 16 locais de campo nos Estados Unidos durante a safra 2008. Ao todo, catorze características fenotípicas e agronômicas foram avaliadas. Na análise combinada dos locais, na qual um agrupamento dos dados entre os locais foi realizado, diferenças significativas (nível de significância de 5%) entre o milho MON 87427 e o milho controle convencional não foram detectadas para contagem de estande inicial, dias para 50% de emissão de pólen, dias para 50% de emissão estilo-estigma, *stay green*, altura da espiga, altura da planta, espigas caídas, plantas acamadas pelo colmo, plantas acamadas pela raiz, contagem de estande final, umidade de grãos, massa do teste e rendimento.

3.3 Germinação e dormência da semente:

A característica de dormência da semente pode alterar a sobrevivência e disseminação das plantas que se propagam por semente. Assim, é importante verificar se esta característica foi alterada no OGM pela introdução do transgene.

A dormência de sementes é uma característica importante frequentemente associada a plantas daninhas (Anderson, 1996; Lingenfelter e Hartwig, 2003). Os mecanismos de dormência, incluindo semente dura, variam com as espécies e tendem a envolver processos complexos. Para milho, o número de sementes duras é desprezível ou inexistente. Ensaio de germinação padronizados são utilizados rotineiramente para medir as características de germinação da semente de milho (AOSA, 2002).

Estudos realizados no Brasil:

O objetivo do estudo realizado no Brasil para a obtenção de informações sobre possíveis alterações no vigor e na germinação de grãos amostrados de parcelas cultivadas com o milho MON 87427, em comparação ao milho controle convencional, utilizou sementes do milho MON 87427 e do milho controle convencional, coletadas na safra 2014/2015 em seis Estações Experimentais da Monsanto: Cachoeira Dourada, MG; Não-Me-Toque, RS; Sorriso, MT; Rolândia, PR; Luís Eduardo Magalhães, BA e Santa Cruz das Palmeiras, SP. As amostras de

grãos foram coletadas no estádio reprodutivo R6 e enviadas ao Laboratório de Sementes da Monsanto do Brasil Ltda. em Uberlândia, MG. O experimento foi conduzido de maio a julho de 2015. Os resultados de germinação e vigor dos grãos coletados nas parcelas com o milho MON 87427 foram comparados aos resultados obtidos nas parcelas com o milho controle convencional e ao intervalo de valores dos grãos coletados nas parcelas com as referências comerciais em comparações individuais por local e combinada dos locais. Os dados coletados foram submetidos à análise estatística por meio do teste t para a comparação das médias do milho MON 87427 com as médias do milho controle convencional, ao nível de significância de 5%.

A conclusão é de que as variações na taxa de germinação e vigor encontradas são naturais e não influenciadas pela modificação genética e pela presença da proteína CP4 EPSPS no milho MON 87427.

Estudos realizados nos Estados Unidos:

No estudo realizado nos Estados Unidos com grãos da safra de 2008 foram avaliadas 5 características de dormência e germinação de sementes sob 7 regimes distintos de temperatura e foram utilizados o milho MON 87427, o milho controle convencional e outras sete referências comerciais para fornecer um intervalo de valores comparativos que são representativos da variabilidade natural de híbridos comerciais de milho. Os lotes de sementes do milho MON 87427, do milho controle convencional e das referências comerciais foram produzidos em ensaios de campo replicados durante a safra 2008 nos estados de Iowa (IA) e Illinois (IL), áreas geográficas que representam condições ambientais relevantes para a produção de milho nos Estados Unidos e para o evento em questão. Nesses ensaios não houve tratamento com o herbicida glifosato.

As características biológicas avaliadas neste estudo foram utilizadas para caracterizar o milho MON 87427 no contexto da avaliação do risco desse milho tornar-se uma planta daninha. Com base nas características de dormência e germinação avaliadas, os resultados do estudo, particularmente a ausência de um aumento da proporção de sementes duras, demonstram que não houve mudanças indicativas de um aumento do potencial do milho MON 87427 tornar-se uma planta daninha quando comparado ao milho controle convencional.

3.4 Morfologia e viabilidade do pólen

A presença do transgene no milho MON 87427 altera alguma característica do pólen deste milho GM?

Para responder esta questão, foram realizadas análises tanto com pólen coletado em experimentos a campo no Brasil como nos Estados Unidos.

No Brasil, os estudos foram realizados em janeiro de 2015 em experimento conduzido na Estação Experimental de Santa Cruz das Palmeiras-SP. Os dados coletados foram submetidos à análise estatística por meio do teste t para a comparação das médias do híbrido teste em relação ao híbrido controle, ao nível de significância de 5%. Os dados indicam que o milho MON 87427 não difere consistentemente do milho controle convencional quanto à viabilidade e morfologia dos grãos de pólen.

Nos Estados Unidos, o pólen foi coletado do milho MON 87427, do milho controle convencional e de quatro referências comerciais, todos cultivados sob condições agronômicas similares em um estudo de campo no estado do Missouri na safra de 2008. De forma geral, os resultados demonstram que a característica de tolerância tecido-seletiva ao glifosato no milho MON 87427 não alterou a morfologia ou a viabilidade desse evento, quando da comparação com o milho controle convencional.

Assim, a conclusão é de que a morfologia e a viabilidade do pólen não foram alteradas no milho GM MON 87427 pela introdução do transgene.

3.5 Capacidade de dispersão das estruturas de propagação e reprodução do milho MON 87427

O milho GM MON 87427 teve alteração na sua capacidade de propagação e reprodução em relação ao híbrido convencional controle?

O processo de domesticação tornou o milho atual uma planta altamente dependente do homem para se reproduzir. A dispersão das sementes do milho somente ocorre através da intervenção do homem. Sem o plantio das sementes e os tratos culturais a espécie não sobrevive no campo. O milho convencional não é uma espécie invasiva em ecossistemas naturais e nem exibe tendência de proliferar-se como planta daninha (CFIA, 1994). Portanto, como o milho GM MON 87427 não apresentou nenhuma característica diferente do híbrido convencional controle em relação a características agronômicas, germinação e dormência da semente e morfologia e viabilidade do pólen, não se vislumbra que o mesmo venha a ter um comportamento de invasibilidade ou de planta daninha.

Não há nenhum registro de regeneração natural do milho a partir de tecido vegetativo. As sementes são as únicas estruturas de sobrevivência, não apresentam dormência e estão aptas para germinação logo após a maturação fisiológica. Em condições de campo, perdem rapidamente o poder germinativo quando expostas, na superfície do solo, à umidade e alta temperatura. Sementes remanescentes no solo de uma safra para a seguinte podem germinar, em condições favoráveis de temperatura e umidade do solo. Entretanto, as plantas voluntárias de milho com o gene *epsps*, assim como as do milho convencional, são facilmente eliminadas através de métodos manuais, mecânicos ou químicos (herbicidas). A única diferença é que as plantas voluntárias deste milho GM deverão ser controladas com herbicidas cujo ingrediente ativo seja diferente de glifosato.

3.6 Fluxo gênico

O transgene pode ser transferido a campo (polinização natural) para outras variedades de milho ou espécies selvagens compatíveis sexualmente?

O milho é uma planta alógama, com taxa de cruzamento de aproximadamente 90% (Bueno *et al*, 2013). A polinização é feita pela ação dos ventos, embora ocorra a presença de insetos polinizadores de outros vegetais na época da antese, principalmente abelhas e vespas, à procura de pólen. O milho MON 87427, por ser similar ao milho convencional, cruza com facilidade com outros milhos cultivados, bem como com espécies selvagens próximas. A espécie

mais estreitamente relacionada com o milho é o teosinte (*Zea mays mexicana*), que se encontra em algumas regiões do México e Guatemala e cruza, eventualmente, com o milho produzindo descendentes férteis. Smith *et al* (1985), entretanto, não conseguiram demonstrar a ocorrência de introgressão recente entre o milho e teosinte. Outro parente mais distante do milho é o *Tripsacum*, que ocorre na América do Sul, incluindo o Brasil. Não se tem, entretanto, evidências de introgressão natural ou retrocruzamentos entre *Tripsacum* e o milho (De Wet *et al*, 1981). Embora algumas espécies de *Tripsacum* possam cruzar com o milho através de polinização artificial, em condições de laboratório, de casa de vegetação ou de campo, é altamente improvável, se não impossível, que ocorram cruzamentos entre as duas espécies através de fertilização natural (Beadle, 1980). Os híbridos produzidos sob condições controladas são estéreis ou sua progênie apresenta fertilidade significativamente reduzida (Galinat, 1988).

O milho MON 87427, assim como o milho convencional, é sexualmente compatível com outros indivíduos não-GM da mesma espécie, quer sejam de variedades crioulas, de variedades sintéticas ou de milhos híbridos. Existem, entretanto, medidas simples para evitar o cruzamento entre diferentes híbridos (ou cultivares) de milho, como por exemplo o isolamento temporal ou o isolamento espacial. Portanto, o plantio do milho MON 87427, após liberação comercial, deverá obedecer à legislação brasileira vigente que trata da coexistência entre lavouras de milho GM e lavouras de milho convencional, impedindo assim o fluxo gênico.

O fluxo gênico em milho foi estudado a campo no Brasil quando da primeira liberação de milho geneticamente modificado resistente a insetos, o milho MON 810, contendo o gene *cry1Ab*. Os estudos conduzidos pela Monsanto do Brasil Ltda. durante as safras 2008/2009, 2009/2010 e 2010/2011, como parte do monitoramento pós-liberação comercial desse produto aprovado em 2007 pela CTNBio, mostraram que houve uma baixa taxa de fluxo gênico em distâncias acima de 20 metros da fonte de pólen. Assim, espera-se que o resultado obtido para o milho contendo o gene *cry1Ab* (MON 810) seja válido para milho contendo o gene *cp4 epsps* (MON 87427), uma vez que este não difere do milho convencional nas suas características reprodutivas, fenotípicas e agrônômicas. Portanto, 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.

3.7 Efeito do milho MON 87427 em características físico-químicas do solo

As modificações genéticas introduzidas alteram a capacidade da planta GM em adicionar ou remover substâncias do solo em decorrência da introdução de novas características, verificando possíveis alterações físicas e químicas no solo e contaminação dos corpos de água adjacentes resultantes das interações com o milho MON 87427, comparativamente aos sistemas convencionais?

O milho MON 87427 produz a proteína CP4 EPSPS 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 característica de tolerância ao glifosato em tecidos específicos não confere ao milho MON 87427 nenhuma capacidade de adicionar ou remover substâncias do solo. Além disso, a proteína CP4 EPSPS, que pertence à

família de proteínas EPSPS amplamente encontrada na natureza em plantas, fungos e bactérias, se comporta como essas outras proteínas de sua família.

Para responder esta questão, um estudo foi realizado para obter informações sobre possíveis alterações nos atributos físico-químicos de amostras de solo de parcelas cultivadas com o milho MON 87427 em comparação ao milho controle convencional coletadas em seis Estações Experimentais da Monsanto (Bellini, 2015): Cachoeira Dourada, MG; Não-Me-Toque, RS; Sorriso, MT; Rolândia, PR; Luís Eduardo Magalhães, BA e Santa Cruz das Palmeiras, SP. As amostras de solo foram coletadas após a colheita da cultura. Uma parte das amostras foi enviada para o Laboratório de Solos da Universidade de Passo Fundo (UPF), em Passo Fundo, RS, para realização das análises químicas. Outra parte das amostras foi enviada para a Estação Experimental da Monsanto de Não-Me-Toque, RS, para realização das análises físicas. As análises físicas e químicas foram realizadas entre junho e julho de 2015.

Os dados indicam não haver efeito ou influência da presença da proteína CP4 EPSPS expressa no milho MON 87427 sobre a composição físico-química do solo.

3.8 Biodegradabilidade da planta GM

A biodegradabilidade dos restos culturais do milho GM MON 87427 no solo é diferente da do híbrido controle? Em outras palavras, o transgene introduzido modificou a biodegradabilidade do OGM quando comparada com a do seu iso-híbrido? A resposta a esta pergunta é importante, pois mudanças nesta característica tem o potencial de afetar tanto as características do solo como a sua biota.

A biodegradabilidade do milho MON 87427 foi avaliada em estudo realizado no Brasil. O experimento foi realizado em seis locais representativos da cultura do milho e os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre a degradação da palha (biomassa) do milho MON 87427 e do milho controle convencional, não contribuindo, portanto, para qualquer alteração ambiental como consequência da nova característica introduzida no milho (tolerância ao glifosato).

3.9 Transferência horizontal da característica introduzida no OGM para a microbiota do solo

Este risco existe? Qual a chance dele ocorrer?

O gene *cp4 epsps* presente no milho MON 87427 codifica a proteína CP4 EPSPS, que confere tolerância ao herbicida glifosato. Este gene foi isolado da cepa CP4 de *Agrobacterium* sp., uma bactéria de solo, ou seja, de um organismo que já ocorre nos ambientes naturais de plantio de milho. Associado a isso, não há na literatura descrição de mecanismo conhecido, ou demonstração definitiva, da transferência de DNA de plantas para microrganismos (Calgene, 1993; WHO, 1993; FDA, 1994; Redenbaugh *et al* 1994; Prins e Zadoks, 1994; Schluter *et al* 1999; Connor *et al*, 2003). Mas, supondo que fosse possível a transferência horizontal, o microrganismo recipiente dessa transferência do gene *cp4 epsps* teria o mesmo risco de receber o gene da própria *Agrobacterium* sp., organismo a que seres humanos e animais já estão expostos, e do qual o gene é originário. Além disso, os dados de biossegurança apresentados na presente

solicitação em relação à proteína CP4 EPSPS indicam claramente que a mesma não apresenta riscos para a saúde humana, animal ou para o meio ambiente. O herbicida aos qual o OGM é tolerante não apresentam ação antibiótica.

A chance de ocorrer transferência horizontal é muito remota e o risco é negligenciável.

3.10 Impactos negativos ou positivos aos organismos alvo e não-alvos com a liberação do milho MON

O milho GM MON 87427 pode apresentar impactos negativos ou positivos aos organismos alvo e não-alvos?

No presente caso, a presença do gene *cp4 epsps* da bactéria de solo *Agrobacterium* sp. confere ao milho GM MON 87427 apenas tolerância ao herbicida glifosato. Afora esta característica, os estudos realizados mostraram que o milho MON 87427 não difere do milho convencional em características agrônômicas, morfológicas e reprodutivas, assim como é equivalente em composição química e nutricional ao milho convencional, sendo tão seguro quanto o mesmo. A proteína CP4 EPSPS produzida pelo milho GM MON 87427 é uma enzima que não tem efeito inseticida, nematocida, fungicida, bactericida ou outros efeitos que não o de tornar a planta resistente ao herbicida glifosato. Portanto, o conceito de “organismo alvo” não se aplica ao milho GM MON 87427. Este conceito se aplica por exemplo a OGMs que apresentam resistência a insetos.

A expressão do gene *cp4 epsps* permite que o milho MON 87427 tolere a aplicação do herbicida glifosato, enquanto que as plantas que não o expressam morrem após a aplicação deste herbicida. Quando aplicado sobre a lavoura de milho MON 87427, o glifosato eliminará as plantas daninhas sensíveis a seu ingrediente ativo, levando a alterações no número de indivíduos destas populações na área de cultivo e provavelmente a redução em seu banco de sementes no solo. Esse efeito é observado em áreas onde se implementa qualquer estratégia de controle de plantas daninhas, tanto através de métodos químicos por outros herbicidas, como através de métodos mecânicos como capina ou gradagem.

Os estudos realizados para verificar a abundância de artrópodes nos campos cultivados com o milho MON 87427 no Brasil na safra 2014/2015 e nos Estados Unidos na safra 2008 mostraram que não houve alteração nas interações planta-artrópodes, incluindo artrópodes benéficos, nem alterou a suscetibilidade a doenças em comparação aos híbridos convencionais de milho.

Pelos resultados dos estudos apresentados e do conhecimento disponível na literatura, pode-se concluir que o evento MON 87427 não produz alterações significativas em organismos que compartilham o mesmo ambiente da lavoura diferente daquelas que ocorrem no cultivo do milho convencional. O milho é uma base alimentar importante para milhares de pessoas no mundo e também muito utilizado para ração animal, ou seja, é uma das principais fontes de proteína vegetal para transformação em proteína animal

4. APLICABILIDADE

O milho evento MON 87427, que apresenta tolerância ao herbicida glifosato, foi desenvolvido para ser utilizado como uma ferramenta na produção de sementes de milho híbrido.

O cassete inserido 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 a folhas, colmo e raiz, bem como a 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 possibilita o seu uso como uma ferramenta na produção de sementes de milho híbrido.

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.

5. PARECER

Considerando que:

- 1) O milho é a espécie que atingiu o mais elevado grau de domesticação entre as plantas cultivadas, sendo incapaz de sobreviver na natureza sem intervenção humana;
- 2) Não há no Brasil espécies silvestres nativas com que o milho possa se inter cruzar;
- 3) Os estudos realizados no Brasil e Estados Unidos demonstraram que o milho MON 87427 não difere do milho convencional em características agrônomicas, morfológicas, reprodutivas, nas características de sobrevivência e na forma de disseminação das plantas, na resposta aos principais patógenos e pragas, bem como na composição química e nutricional, com exceção apenas à característica de tolerância ao herbicida glifosato, conferida pela presença e expressão do gene *cp4 epsps* de *Agrbocaterium* sp.;
- 4) A biossegurança deste evento já foi avaliada pelos sistemas regulatórios de 13 países, sendo aprovado em todos para o uso pretendido (plantio, ração animal, nutrição humana);

- 5) O OGM apresenta risco negligenciável de alergenicidade e de toxicidade, bem como risco negligenciável para a saúde humana e animal e para o meio ambiente;
- 6) O OGM não apresenta risco de invasibilidade ou de planta daninha;
- 7) O milho MON 87427 apresenta equivalência substancial com o milho convencional e, por conseguinte, o valor nutritivo é comparável;
- 8) A disponibilidade do milho MON 87427 constituir-se-á numa alternativa importante para atender às necessidades dos produtores de milho no Brasil no controle de plantas daninhas com maior segurança e, principalmente, como uma ferramenta para a produção de híbridos de maneira mais segura e menos laboriosa;
- 9) É perfeitamente possível a coexistência no campo entre lavouras de milho GM MON 87427 e lavouras de milho convencional ou crioulo;
- 10) A existência de uma vasta literatura gerada em quase duas décadas sobre culturas que expressam a proteína CP4 EPSPS, e um histórico de uso e exposição à *Agrobacterium* sp., bactéria ubíqua na natureza que deu origem ao gene CP4 EPSPS.
- 11) As informações atualmente disponíveis na literatura científica.

Conclui-se, portanto, que o milho MON 87427 é substancialmente equivalente ao milho convencional, sendo seu consumo seguro para a saúde humana e animal tanto quanto o é o milho convencional. No tocante ao meio ambiente, concluiu-se que o milho MON 87427 não é potencialmente causador de significativa degradação do meio ambiente, guardando com a biota relação idêntica ao milho convencional. Assim, manifesto-me pelo DEFERIMENTO da solicitação de liberação comercial do milho MON 87427.

6. Restrições ao uso do OGM e seus derivados

Não há restrições quanto ao uso do uso e seus derivados

7. Considerações sobre particularidades das diferentes regiões do País (subsídios aos órgãos de fiscalização)

No Brasil, não há espécies silvestres nativas que possam ser polinizadas pelo milho. A espécie silvestre mais próxima ao milho é o teosinte, encontrado no México e em alguns locais da América Central, onde pode cruzar com o milho cultivado em campos de produção. Assim, não há motivos para se restringir o plantio do milho GM no que diz respeito à possibilidade de o mesmo cruzar com espécies silvestres nativas da flora brasileira.

Entretanto, conforme estabelecido no art. 1º da Lei 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”.

8. Conclusão

Diante do exposto, e considerando os critérios internacionalmente aceitos no processo de análise de risco de matérias-primas geneticamente modificadas, é possível concluir que o milho MON

87427 é tão seguro quanto seus equivalentes convencionais. No âmbito das competências que lhe são atribuídas pelo art. 14 da Lei 11.105/05, a CTNBio considerou que o pedido atende às normas e às legislações vigentes que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal, e concluiu que o milho MON 87427 é substancialmente equivalente ao milho convencional, sendo seu consumo seguro para a saúde humana e animal. No tocante ao meio ambiente, a CTNBio concluiu que o milho MON 87427 não é potencialmente causador de significativa degradação do meio ambiente, guardando com a biota relação idêntica ao milho convencional.

Os estudos realizados consideram as particularidades das diferentes regiões do Brasil conforme estabelecido no Parágrafo 4º do Artigo XXIII da lei 11.105 de 24 de março de 2005.

A CTNBio considera que essa atividade não é potencialmente causadora de significativa degradação do meio ambiente ou de agravos à saúde humana e animal. As restrições ao uso do OGM em análise e seus derivados estão condicionadas ao disposto na Lei 11.460, de 21 de março de 2007.

A análise da CTNBio considerou os pareceres emitidos pelos membros da Comissão; documentos aportados na Secretaria Executiva da CTNBio pela requerente e resultados de liberações planejadas no meio ambiente. Foram também considerados e consultados estudos e publicações científicas independentes da requerente e realizados por terceiros.

9. Monitoramento

Com relação ao plano de monitoramento pós-liberação comercial a CTNBio determina que sejam seguidas as instruções e executadas as ações técnicas de monitoramento constante na Resolução Normativa 09 da CTNBio de 02 de dezembro de 2011.

Recomendações que devem ser consideradas e 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

10. Referências Bibliográficas

- Anderson, W.P. 1996. Weed ecology. Weed Science: Principles and Applications. West Publishing Company, St. Paul, Minnesota. p. 27-38.
- AOSA. 2002. Rules for testing seeds. Association of Official Seed Analysts, Lincoln, NE. p. 166.
- Barry, G.F., Kishore, G.M., Padgett, S.R., Stallings, W.C. 2001. Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases. US Patent No: 6,248,876
- Beadle, G. 1980. The Ancestry of Corn. Scientific American, v. 242, p. 96-103.
- Bellini, L.F. 2015. Avaliação do efeito do milho geneticamente modificado MON 87427, do milho controle convencional e de referências comerciais sobre os parâmetros físico-químicos do solo. Relatório Interno da Monsanto do Brasil Ltda. Monsanto do Brasil Ltda. p. 14.
- Bevan, M., Barnes, W.M., Chilton, M.D. 1983. Structure and transcription of the nopalinesynthase gene region of T-DNA. Nucleic Acids Research, v. 11, p. 369-85.
- Brown, S. M., Santino, C.G. 1997. Enhanced expression in plants. US Patent No: 5,593,874
- Bueno, L.C.S, Mendes, A.N.G., Carvalho, S.P. 2013. Melhoramento Genético de Plantas - princípios e procedimentos. Editora UFPA, 2ª edição, 1ª. reimpressão, p. 319.
- CaJacob, C.A., Feng, P.C.C., Heck, G.R., Alibhai, M.F., Sammons, R.D., Padgett, S.R. 2004. Engineering 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.
- Calgene, Inc. 1993. Food additive petition for the APH(3'') II as a processing aid FDA Docket Number: 93F-0232.
- CFIA. 1994. Regulatory directive Dir94-11: The Biology of Zea mays L. (Corn/Maize). Canadian Food Inspection Agency, Plant Products Division, Plant Biotechnology Office, Ottawa.
- Connor, J.A. Glare, T.R. Nap, J.P. 2003. The release of genetically modified crops into environment. Part II. Overview of ecological risk assessment. The Plant Journal, v. 33, p. 19-46.
- De Wet, J.M.J., Timothy, D.H., Hilu, K.W., Fletcher, G.B. 1981. Systematics of South American *Tripsacum* (Gramineae). Amer. J. Bot., v. 68, p. 269-276.
- Duvick, J. 2001. Prospects for reducing fumonisin contamination of maize through genetic modification. Environmental Health Perspectives, v.109, p. 337-342.
- FDA (Food & Drug Administration). 1994. U. S. Food & Drug Administration. Statement of policy: foods derived from new plant varieties. Fed. Reg. (USA). 57:22984-23005.
- Feng, P.C.C., Qi, Y., Chiu, T., Stoecker, M.A., Schuster, C.L., Johnson, S.C., Fonseca, A.E., Huang, J. 2014. Improving hybrid seed production in corn with glyphosate-mediated male sterility. Pest Management Science, v. 70, p. 212-218.

- Fling, M.E., Kopf, J., Richards, C. 1985. Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3''(9)-O-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Research*, v. 13, p. 7095-7106.
- Galinat, W.C. 1988. The origin of 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. 1-31.
- Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K.R. 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 167, p. 35-120.
- Giglione, C., Meinel, T. 2001. Organellar peptide deformylases: universality of the N-terminal methionine cleavage mechanism. *Trends in Plant Science*, v. 6, p. 566-572.
- Goldberg, R.B., Beals, T.P., Sanders, P.M. 1993. Anther development: basic principles and practical applications. *The Plant Cell*, v. 5, p. 1217-1229.
- Gonzalez, J.J.S., Corral, J.A.R. 1995. Teosinte distribution in Mexico. Proceedings of a forum: gene flow among maize landraces, improved maize, varieties and Teosinte: implications for transgenic maize: 18-35. <http://libcatalog.cimmyt.org/download/cim/64078.pdf> (30/09/2016)
- Goodman, M.M., Brown, W.L. 1988. Races of 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. 33-79.
- Goodman, M.M., Galinat, W.C. 1988. The history and evolution of maize. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v.7, p. 197-220.
- Hamilton, D.A., Roy, M., Rueda, J., Sindhu, R.K., Stanford, J., Mascarenhas, J.P. 1992. Dissection of a pollen-specific promoter from maize by transient transformation assay. *Plant Molecular Biology*, v. 18, p. 211-218.
- Hammond, B., Kough, J., Herouet-Guicheney, C., Jez, J.M. 2013. Toxicological evaluation of proteins introduced into food crops. *Critical Reviews in Toxicology* 43(Suppl 2): 25-42.
- Harrison, L.A., Bailey, M.R., Naylor, M.W., Ream, J.E., Hammond, B.G., Nida, D.L., Burnette, B.L., Nickson, T.E., Mitsky, T.A., Taylor, M.L., Fuchs, R.L., Padgett, S.R. 1996. The expressed protein in glyphosate-tolerant soybean, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Agrobacterium* sp. strain CP4, is rapidly digested in vitro and is not toxic to acutely gavaged mice. *Journal of Nutrition*, v. 126, p. 728-740.
- Huang, M.-D., Wei, F.-J., Wu, C.-C., Hsing, Y.-I.C., 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*, v. 149, p. 694-707.
- Kay, R., Chan, A., Daly, M., McPherson, J. 1987. Duplication of CaMV 35S Promoter Sequences Creates a Strong Enhancer for Plant Genes. *Science*, v. 236, p. 1299-302.
- Klee, H.J., Muskopf, Y.M., Gasser, C.S. 1987. Cloning of an Arabidopsis thaliana gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. *Molecular and General Genetics*, v. 210, p. 437-42.

- Laughnan, J.R., Gabay-Laughnan, S. 1983. Cytoplasmic male sterility in maize. *Annual Review of Genetics*, v. 17, p. 27-48.
- Lee, H.S., Qi, Y., Ima, W. 2015. Effects of N-glycosylation on protein conformation and dynamics: Protein Data Bank analysis and molecular dynamics simulation study. *Scientific Reports*, v. 5:8926.
- Lingenfelter, D.D., Hartwig, N.L. 2003. Introduction to weeds and herbicides. Penn State University Agricultural Research and Cooperative Extension, University Park, Pennsylvania.
- Magalhães, P.C., Durães, F.O.M., Carneiro, N.P. e Paiva, E. 2002. Fisiologia do Milho. Circular Técnica 22. Embrapa, Sete Lagoas, MG.
- Mangelsdorf, P.C. 1974. Corn. Its Origin, Evolution and Improvement. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts
- Mitra, N., Sinha, S., Ramya, T.N.C, Surolia, A. 2006. N-linked oligosaccharides as outfitters for glycoprotein folding, form and function. *Trends in Biochemical Science*, v. 31, p.156–163.
- Odell, J.T., Nagy, F., Chua, N-H. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*, v. 313, p. 810-812.
- OECD. 2003a. Consensus Document on the Biology of Zea Mays Subsp. Mays (Maize). <http://www.oecd.org/>.
- 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., Zadoks, J.C. 1994. Horizontal gene transfer in plants, a biohazard? Outcome of a literature review. *Euphytica*, v.76, p. 133-138.
- Redenbaugh, K.; Hiatt, W.; Martineau, B.; Linfrman, J., Emlay, D. 1994. Aminoglycoside 3^ophosphotransferase II (aph (3^o)II): review of its safety & use the production of genetically engineered plants. *Food Biotechnology*, v.8, p. 137-165.
- Sidorov, V., Duncan D. 2009. Agrobacterium-mediated maize transformation: immature embryos versus callus. *Methods in Molecular Biology*, v. 526, p. 47-58.
- Smith, J. S. C., Goodman, C. W., Stuber, C. W. 1985. Relationships between maize & teosinte of Mexico & Guatemala: numerical analysis of allozyme data. *Economic Botany*, v. 39, p. 12-24.
- Soares, D.J. 2015. Observações fenotípicas e interações ecológicas de organismos não alvo em híbridos de milho MON 87427, híbridos de milho convencional e híbridos referências comerciais em ambiente natural. Relatório Interno da Monsanto do Brasil Ltda. Monsanto do Brasil Ltda. p. 34.

- Steinrücken, H.C., Amrhein, N. 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 94, p. 1207-1212.
- Schluter, T.H.; Potting R.P.J.; Denholm, I.; Poppy, G.M. 1999. Parasitoid behaviour & Bt plants. *Nature*. v. 400, p. 855.
- Tzin, V., Galili, G. 2010. The Biosynthetic Pathways for Shikimate and Aromatic Amino Acids in *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis Book*. 8: e0132.
- WHO - World Health Organization. 1993. "Health Aspects of Marker Genes in Genetically Modified Plants." Report of the WHO Workshop held in Copenhagen, Denmark on September 1993.
- Wilkes, H.G. 1972. Maize and its wild relatives. *Science*, v. 177, p.1071-1077.
- 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.

Data: 03 de outubro de 2016



Dr. Jesus Aparecido Ferro
Membro da CTNBio

Assessoria: Norma Paes