

Processo nº: 01200.004553/2012-90

Data de Protocolo: 09/11/2012

Próton: 46894/12

Requerente: Syngenta Seeds Ltda.

CQB:

Total de Páginas: 381

CNPJ: 49.156.326/0001-00

Endereço: Av. das Nações Unidas, 18001, 4º Andar, 04795-900, São Paulo, SP

Presidente da CIBio: Cristhiane Abegg Bothona

Título da proposta: “Liberação comercial de milho MIR604 e do milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21”

Descrição dos OGMs: milho MIR604 (milho resistente a insetos e tolerante ao glufosinato de amônio) e milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21 (milho resistente a insetos e tolerante ao glifosato)

Resolução Normativa: RN 5

Finalidade (objetivo): cultivo, produção, manipulação, transporte, transferência, comercialização, importação, exportação, armazenamento, consumo, liberação e descarte destes OGMs e de seus derivados, bem como suas progênes.

PARECER TÉCNICO

I. Identificação do OGM

Designação dos OGMs:

- milho MIR604

- milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21

Requerente: Syngenta Seeds Ltda

Espécie: *Zea mays* L..

Característica(s) inserida(s): MIR604 (Resistencia a insetos); Bt11xMIR162xMIR604xGA21 (Resistência a insetos, tolerância a herbicidas).

Método de introdução da(s) característica(s): MIR604 - Transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*

Uso proposto: cultivo, produção, manipulação, transporte, transferência, comercialização, importação, exportação, armazenamento, consumo, liberação e descarte destes OGMs e de seus derivados, bem como suas progênes.

II – Considerações Técnicas

O milho **MIR604** expressa a proteína inseticida mCry3A, que protege a planta dos danos causados pela Diabrotica speciosa, considerada uma das principais pragas iniciais da cultura do milho. O milho MIR604 foi produzido por meio de transformação via *Agrobacterium tumefaciens* de embriões imaturos de milho, por meio do vetor plasmidial pZM26. Este vetor contém o gene modificado cry3A (mcry3A) proveniente de *Bacillus thuringiensis* que codifica uma proteína de 598 aminoácidos e está sob regulação do promotor MTL de *Zea mays* e do terminador nopalina sintase (NOS) de *Agrobacterium tumefaciens*. Este vetor também contém o gene pmi (manA), que codifica a enzima Fosfomanose Isomerase (PMI), utilizada como



PRÓTON: 25774 / 20 14

R

marcador de seleção no processo de transformação e que no vetor pZM26 está sob regulação do promotor do gene da ubiquitina de *Zea mays* e do terminador NOS de *A. tumefaciens*.

O milho **Bt11xMIR162xMIR604xGA21** foi desenvolvido por meio de melhoramento genético clássico, por cruzamento sexual entre linhagens geneticamente modificadas contendo os eventos Bt11, MIR162, GA21 e MIR604. Os três primeiros eventos citados (Bt11, MIR162, GA21) já foram estudados e aprovados para liberação comercial pela CTNBio, individualmente, e também em suas formas combinadas Bt11xGA212 e Bt11xMIR162xGA213.

O evento Bt11 contém o gene cry1Ab de *Bacillus thuringiensis*, que confere resistência a certos insetos lepidópteros, e o gene pat, derivado do microorganismo do solo *Streptomyces viridochromogenes*, que confere tolerância ao herbicida glufosinato de amônia e foi utilizado como marcador de seleção durante o processo de transformação.

O evento MIR162 foi obtido a partir da inserção do gene vip3Aa20, que confere resistência a insetos lepidópteros, e do gene pmi (manA) que codifica a enzima Fosfomanose Isomerase (PMI), utilizado como marcador de seleção no processo de transformação.

O evento MIR604, como descrito anteriormente, contém o gene modificado cry3A (mcry3A), que codifica a proteína inseticida mCry3A, e o gene pmi (manA), que codifica a enzima Fosfomanose Isomerase (PMI), utilizada como marcador de seleção no processo de transformação.

O evento GA21 contém o gene mepsps que expressa a enzima Sintase 5-Enolpiruvil Shikimato-3-Fosfato (mEPSPS). A EPSPS é uma enzima chave no processo do ácido shikímico, envolvido na biossíntese dos aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano), encontrada naturalmente em plantas, fungos e bactérias, e ausente nos animais. A EPSPS é altamente sensível a produtos herbicidas contendo glifosato.

Caracterização molecular do transgene: Dados das análises Southern Blot e o sequenciamento do DNA do milho MIR604 demonstram que (1) apenas uma cópia do gene cry3A modificado (mcry3A), do gene da fosfomanose isomerase pmi (manA), do promotor MTL e do promotor ZmUbiInt estão presentes; (2) o milho MIR604 não contém qualquer sequência estrutural do plasmídeo de transformação pZM26. As análises de sequência de todo o T-DNA presente no evento MIR604 confirmaram que a inserção estava intacta e que a contigüidade dos elementos funcionais foi mantida. Uma truncagem de 43 pb na borda direita (RB) da junção da inserção T-DNA e uma truncagem de 44 pb na borda esquerda (LB) da junção da inserção T-DNA foram identificadas. Três mudanças de um só nucleotídeo também foram identificadas na inserção T-DNA. Uma dessas mudanças ocorreu dentro do promotor MTL, uma região regulatória que não codifica proteína. As duas outras mudanças ocorreram dentro da sequência codificadora de PMI e dá origem a duas mudanças em aminoácidos. Estas substituições não resultaram em qualquer alteração aparente no PMI funcional tal como expresso no milho MIR604.

Padrão de herança genética: As informações sobre o padrão de herança dos genes introduzidos nos eventos Bt11, MIR162 e GA21 foram detalhadas em seus respectivos processos de pedido de liberação comercial. Para esses eventos, todos os transgenes (cry1Ab, pat, vip3Aa20, pmi (manA), mepsps) foram herdados de maneira previsível, de acordo com os princípios Mendelianos. No presente pedido de liberação, o padrão de herança dos genes introduzidos no evento MIR604 foi analisado. Plantas da geração T5 foram avaliadas para a presença da proteína mCry3A por imuno-deteção (ELISA), assim como por PCR TaqMan®, para ambos os genes pmi (manA) e mcry3A. Análises estatísticas confirmaram a proporção esperada da herança Mendeliana entre plantas positivas e negativas para uma característica hemizigótica nessas populações de 3:1 tanto para o gene mcry3A como para o gene pmi (manA).

A estabilidade genotípica do transgene foi avaliada através de análise de Southern blot ao longo de três gerações de MIR604 (BC4, BC5 e BC6), utilizando uma sonda do gene mCry3A. As diferentes gerações de MIR604 apresentaram um padrão de hibridação idêntico, o que demonstra que a inserção do tDNA do pZM26 incorporado no MIR604 é estável ao longo de várias gerações. As informações sobre o grau de estabilidade genotípica dos eventos individuais Bt11, MIR162 e GA21 foram detalhadas em seus respectivos processos de pedido de liberação comercial e demonstraram, por meio de análises de Southern blot, a estabilidade dos cassetes cry1Ab, vip3Aa20 e mepsps por múltiplas gerações.

Uma análise molecular comparativa foi realizada com a finalidade de confirmar a integridade genética dos insertos Bt11, MIR162, MIR604 e GA21 ao longo do processo de melhoramento genético clássico utilizado para obter, por meio de cruzamentos sexuais entre linhagens contendo estes eventos, o milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21. Os fragmentos hibridizados a partir do milho combinado Bt11xMIR162xMIR604xGA21 apresentaram o tamanho esperado para os eventos Bt11, MIR162, MIR604 e GA21, demonstrando que a integridade dos insertos foi mantida durante o processo de melhoramento genético clássico com finalidade de combinação destes eventos.

Expressão dos genes introduzidos: Para caracterizar o intervalo dos níveis de expressão das proteínas mCry3A e PMI no milho MIR604, as concentrações das proteínas foram determinadas por ELISA em vários tecidos vegetais e na planta inteira em quatro estágios de crescimento (cartucho, antese, semente, maturidade da semente e senescência) no milho MIR604 e no isogênico convencional, com mesmo background genético. Concentrações mensuráveis da proteína mCry3A foram detectadas em todos os tecidos analisados provenientes dos híbridos de milho MIR604, exceto pólen. As concentrações de mCry3A foram determinadas tanto com base no peso seco como no peso fresco de cada tecido. A proteína mCry3A não foi detectada nas amostras de tecidos do híbrido controle isogênico não GM, conforme esperado. Concentrações mensuráveis da proteína PMI foram detectadas em todos os tecidos analisados provenientes dos híbridos de milho MIR604, na maioria dos estágios de desenvolvimento. As concentrações de PMI foram determinadas tanto com base no peso seco como no peso fresco de cada tecido. A proteína PMI não foi detectada nas amostras de tecidos do híbrido controle isogênico não GM, conforme esperado.

Para avaliar se o nível de expressão das proteínas nas plantas de milho contendo os eventos combinados (Bt11xMIR162xMIR604xGA21) se diferia do nível de expressão dos eventos individuais, foi realizado um estudo comparativo do nível de expressão de cada proteína introduzida. A concentração das proteínas Cry1Ab, PAT, Vip3Aa20, PMI, mCry3A e mEPSPS presentes no milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21 foi determinada por meio de ensaios imunoenzimáticos ELISA em diferentes tecidos (folha, raiz, planta inteira, pólen e grão) e em dois estágios do desenvolvimento (antese e maturidade) de plantas cultivadas no Brasil. Com os resultados obtidos foi possível concluir que a expressão das seis proteínas analisadas (Cry1Ab, PAT, Vip3Aa20, mCry3A, PMI e mEPSPS) para os cinco diferentes tipos de milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21 foi consistentemente similar à expressão dos eventos quando apresentados individualmente no milho, ou seja, milho Bt11, milho GA21, milho MIR162 e milho MIR604.

Vantagem competitiva do transgene: Não foi verificado que as características conferidas pela introdução dos genes presentes no milho MIR604 e milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21 proporcionem qualquer vantagem competitiva ou uma maior agressividade, que resultaria em uma espécie invasiva. A tolerância ao glifosato e ao glifosinato de amônio só confere vantagem competitiva às plantas submetidas à pulverização com esses herbicidas. Enquanto que a

resistência a algumas espécies de insetos somente concederia uma vantagem adaptativa no meio ambiente em sistemas em que os insetos fossem os agentes limitantes para a propagação da planta, ou seja, se houvesse uma forte pressão de seleção por parte das pragas. Assim, não se verifica qualquer vantagem competitiva dos referidos eventos em condições naturais de sobrevivência.

Equivalência Substancial: Para demonstrar a equivalência entre o milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21 e o milho convencional, foram conduzidas análises nos seguintes componentes: composicional (forragem e grãos), perfil de minerais, perfil de vitaminas, perfil de ácidos graxos, metabolitos secundários e perfil de aminoácidos. Com base nos resultados apresentados, pode-se concluir que os componentes centesimais de forragem e grãos do milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21 em amostras colhidas no Brasil, na safra 2011/12, foram equivalentes ao milho convencional.

Características agronômicas: O milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21 foi comparado com seu isogênico convencional (controle) e mais sete híbridos convencionais. Foram avaliadas nove características fenotípicas e agronômicas: florescimento masculino, florescimento feminino, doenças foliares, altura de plantas, altura da inserção da espiga, porcentagem de plantas eretas por ocasião da colheita, textura de grão, cor do grão e rendimento de grãos. O milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21 apresentou desempenho semelhante em relação ao híbrido controle. Com relação aos híbridos comerciais, algumas diferenças para algumas das características foram observadas, mas com nenhum valor fora do esperado para a cultura. Essas pequenas diferenças são esperadas, visto que tratam-se de materiais com background genético diferentes.

Experimentos foram realizados também nos Estados Unidos e Argentina, onde o milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21 foi comparado com um híbrido controle isogênico. Nesses locais também não foram observadas diferenças significativas.

Efeito em organismos indicadores: Para verificar possíveis efeitos em artrópodes em geral, foi feita uma comparação entre o milho GM Bt11xMIR162xMIR604xGA21 em comparação com ao seu isogênico convencional. Foram coletados artrópodes em parcelas de milho transgênico e em parcelas com milho convencional isogênico utilizando quatro métodos de amostragem. Os artrópodes coletados foram classificados em táxons. Nesse estudo foram avaliados insetos predadores, insetos parasitoides, insetos polinizadores, insetos fitófagos, insetos decompositores, entre outros. A análise conjunta dos artrópodes observados e capturados nos ensaios em duas localidades, considerando os 4 métodos e as datas de amostragens, mostrou que não houve diferenças significativas entre cada um dos 84 táxons nos tratamentos Milho GM (Bt11xMIR162xMIR604xGA21) e Milho Isohíbrido não GM. No total, foram coletados 14965 artrópodes no Milho Isohíbrido e 14842 no Milho GM.

Impacto em organismos não alvos: Em estudo conduzido em laboratório, para a avaliação da potencial exposição de organismos não-alvo à mCry3A pelo cultivo do milho MIR604, foi considerado o pior cenário para perigo, utilizando espécies taxonomicamente relacionadas com a praga alvo e espécies que se espera que tenham maior exposição à mCry3A, como aves (codorna), peixes (truta), artrópode não alvo da parte aérea (joaninha, percevejo das flores), habitantes do solo (besouros e minhocas), insetos polinizadores (abelha) e mamíferos (rato). Conforme avaliação de risco apresentada, os resultados deste estudo indicaram risco mínimo do milho MIR604 aos organismos não-alvo.



III – Parecer Final

Diante do exposto e considerando os critérios internacionalmente aceitos no processo de análise de risco de matérias-primas geneticamente modificadas considero que o milho MIR604, classificado como classe de risco 1, bem como a combinação de eventos Bt11xMIR162xMIR604xGA21, são tão seguros quanto seus equivalentes convencionais, e que não são potencialmente causadores de significativa degradação do meio ambiente ou à saúde humana e animal. Assim, encaminho para a **aprovação** da solicitação de liberação comercial do milho geneticamente modificado MIR604 e do milho contendo a combinação dos eventos Bt11xMIR162xMIR604xGA21.

Londrina, 28 de Fevereiro de 2014

Ricardo Vilela Abdelnoor
Relator / Membro da CTNBio

