
PARECER TÉCNICO

Processo: 01200.005712/2015-16

Data de Protocolo: 17/12/2015

Próton: 79.355/2015

Requerente: Syngenta Seeds Ltda.

Assunto: Liberação comercial do milho Bt11 x MIR162 x MON 89034 x GA21, milho Bt11 x MIR162 x MON 89034 e milho MIR162 x MON 89034.

CQB: 001/96

CNPJ: 49.156.326/0001-00

Endereço: Rodovia BR-452, Km 142, Uberlândia/MG.

Presidente da CIBio: Cristhiane A.Bothona

Descrição do OGM: milho Bt11 x MIR162 x MON 89034 x GA21, milho Bt11 x MIR162 x MON 89034 e milho MIR162 x MON 89034. Portanto, são três cultivares sendo um com quatro e outros dois com três e dois transgenes.

Classificação: Classe de Risco I

Resolução Normativa: RN 05/2005

- ✓ Designação do OGM: milho Bt11 x MIR162 x MON 89034 x GA21, milho Bt11 x MIR162 x MON 89034 e milho MIR162 x MON 89034.
- ✓ Espécie: Zea mays L.
- ✓ Característica Inserida: Tolerância a herbicidas e resistência a insetos.
- ✓ Método de introdução da característica: O milho Bt11xMIR162xMON 89034xGA21 foi desenvolvido através de melhoramento genético clássico, por cruzamento sexual entre linhagens geneticamente modificadas contendo o evento Bt11, o evento MIR162, o evento MON 89034 e o evento GA21.
- ✓ Uso proposto: cultivo, consumo animal e humano, manipulação, transporte, descarte, importação e exportação, e quaisquer outras atividades relacionadas a esse milho e suas progênies

1. Proteínas Expressas:

- ✓ CP4 EPSPS - confere tolerância ao glifosato;
- ✓ Cry1A.105 – confere resistência a insetos;
- ✓ Cry2Ab2 – confere resistência a insetos;
- ✓ Cry1Ab – confere resistência a insetos;
- ✓ NPTII - marcador de seleção;
- ✓ PAT – confere tolerância ao glufosinato de amônio;
- ✓ Vip3Aa20 – confere resistência a insetos;

2. Área de Restrição Ambiental: 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”.

3. Fundamentação Técnica:

A requerente através dos requisitos estabelecidos no Art. 4 da Resolução Normativa 05 da CTNBio, solicita a liberação para uso comercial milho Bt11x MIR162xMON34xGA21 e das sub-combinações dos milhos milho Bt11 x MIR162 x MON 89034 e milho MIR162 x MON 89034 (Art. 4 da RN5 e Art. 1 da RN 15).

A proposta de liberação comercial foi reestrutura de acordo com os requisitos da RNA 5 nas seguinte partes:

PARTE I – DOCUMENTAÇÃO REQUERIDA

I – Requerimento de liberação comercial assinado pelo representante legal;

Está na proposta inicial. Portanto, não houve alterações.

II – Parecer técnico da CIBio.

Também está na proposta inicial. Portanto, não houve alterações.

III – Declaração de veracidade das informações fornecidas pelo responsável legal.

Também está na proposta inicial. Portanto, não houve alterações.

PARTE II – RESUMO EXECUTIVO

O Resumo Executivo é o mesmo apresentado na proposta inicial, com um resumo geral da proposta, cujos pontos principais incluem:

O milho Bt11xMIR162xMON 89034xGA21 foi desenvolvido através de melhoramento genético clássico, por cruzamento sexual entre linhagens geneticamente modificadas contendo o evento Bt11, o evento MIR162, o evento MON 89034 e o evento GA21 aprovados previamente para liberação comercial pela CTNBio. Os milhos Bt11, MIR162, MON 89034 e o milho GA21 já são comercializados no Brasil e em outros países e informações sobre seus eventos de transformação são bastante conhecidas. Ao longo do processo de desenvolvimento do milho Bt11xMIR162xMON 89034xGA21 não houve outras modificações genéticas, além da introgressão destes eventos nas linhagens de milho, por meio de melhoramento genético clássico.

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

O milho MIR162 foi obtido a partir da inserção do gene vip3Aa20 de *Bacillus thuringiensis*, que confere resistência a insetos lepidópteros.

O milho MON 89034 foi produzido a partir da inserção dos genes cry1A.105 e cry2Ab2 de *Bacillus thuringiensis*, que conferem resistência a certos insetos lepidópteros.

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

O objetivo de desenvolver o milho Bt11xMIR162xMON 89034xGA21 é propiciar controle da praga *Spodoptera frugiperda*, uma das principais pragas da cultura do milho, e maior flexibilidade no manejo de plantas daninhas, pela tolerância aos herbicidas glufosinato

de amônio e glifosato, proporcionando uma importante ferramenta de manejo da resistência, já que as proteínas expressas apresentam mecanismos de ação distintos.

Considerando que os eventos Bt11, MIR162, MON 89034 e GA21 já tiveram suas avaliações de biossegurança realizadas, no presente processo de pedido de liberação comercial foram contempladas as informações do milho Bt11xMIR162xMON 89034xGA21 quanto a sua caracterização molecular, possível interação das proteínas expressas, equivalência substancial, equivalência agrônômica, eficácia no controle da lagarta do cartucho, eficácia da tolerância aos herbicidas glufosinato de amônio e glifosato e impacto de seu cultivo sobre organismos não-alvos.

Análise molecular comparativa foi realizada com a finalidade de confirmar a integridade genética dos insertos individuais ao longo do processo de melhoramento genético clássico utilizado para obter o milho Bt11xMIR162xMON 89034xGA21. Os fragmentos hibridizados a partir do DNA do milho combinado Bt11xMIR162xMON 89034xGA21 apresentaram o tamanho esperado para os eventos Bt11, MIR162, MON 89034 e GA21, demonstrando que a integridade dos insertos foi mantida durante o processo de melhoramento.

Não foi evidenciada nenhuma tendência a mudanças da expressão das proteínas ou outro efeito em função da combinação destes eventos por melhoramento genético clássico. Não foram observadas diferenças na composição de grãos e forragem de plantas derivadas do milho Bt11xMIR162xMON89034xGA21 e seu controle não GM. Avaliação das características agrônômicas e fenotípicas realizados em cinco locais do Brasil comprovaram que o milho Bt11xMIR162xMON 89034xGA21 apresenta as mesmas características do milho não GM, e que a combinação dos eventos através de melhoramento genético clássico não levou à expressão de qualquer outra característica diferente daquela já esperada.

Conforme levantamento de entomofauna realizado para o milho Bt11xMIR162xMON 89034xGA21 em comparação ao milho não GM, em ensaios conduzidos no Brasil, na safra 2014/2015, seu cultivo não causa diferente impacto sobre organismos não alvo quando comparado ao cultivo de um milho não geneticamente modificado.

Considerando o conjunto de evidências obtidas que demonstram a segurança para consumo e cultivo do milho (*Zea mays* L. spp *Mays*.) Bt11xMIR162xMON 89034xGA21, a CIBio da Syngenta Seeds Ltda apresentou o presente processo, visando a autorização da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) para a liberação comercial do milho (*Zea mays* L. spp *Mays*) Bt11xMIR162xMON 89034xGA21, no que se refere ao cultivo, produção, manipulação, transporte, transferência, comercialização, importação, exportação, armazenamento, consumo, liberação e descarte deste OGM e seus derivados, bem como suas progênes, nos preceitos da Lei nº 11.105, de 24/03/2005. Solicita ainda, conforme Art. 4º-A da Resolução Normativa nº 5, de 12 de março de 2005, acrescido através do artigo Art. 1º da Resolução Normativa nº 15 de 13 de fevereiro de 2015, a aprovação do milho (*Zea mays* L. spp *Mays*) Bt11xMIR162xMON 89034 e do milho (*Zea mays* L. spp *Mays*) MIR162xMON 89034, no que se refere ao cultivo, produção, manipulação, transporte, transferência, comercialização, importação, exportação, armazenamento, consumo, liberação e descarte deste OGM e seus derivados, bem como suas progênes, nos preceitos da Lei nº 11.105, de 24/03/2005.

Portanto, o relatório executivo conclui pela segurança do milho Bt11xMIR162xMON 89034xGA21.

PARTE III – INFORMAÇÕES RELATIVAS AO OGM

1. Identificação do Evento de Transformação Genética, Objetivo e Utilização do OGM e seus Derivados.

O milho Bt11xMIR162xMON 89034xGA21 foi desenvolvido por meio de melhoramento genético clássico, por cruzamento sexual entre linhagens geneticamente modificadas (GM) contendo os eventos Bt11, MIR162, MON 89034 e GA21 já aprovados para liberação comercial pela CTNBio.

No Brasil foram aprovados pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) para utilização comercial, milhos contendo as combinações Bt11 x MIR162, Bt11 x GA21, Bt11 x MIR162 x GA21, Bt11 x MIR162 x MIR604 x GA21, Bt11 x MIR162 x MIR604 x TC1507 x 5307 x GA21, MON 89034 x NK603, MON 89034 x TC1507 x NK603 e MON 89034 x MON 88017. Os processos relacionados à liberação comercial desses eventos estão relacionados no requerimento de liberação comercial.

O objetivo de desenvolver o milho Bt11xMIR162xMON89034xGA21 é propiciar contra os danos produzidos por insetos lepidópteros e tolerância aos herbicidas glufosinato de amônio e glifosato. A resistência a lepidópteros é dada pela expressão das proteínas Cry1Ab, Cry1A.105, Cry2Ab2 e Vip3Aa20 provenientes dos parentais Bt11, MON 89034 e MIR162, respectivamente, já a tolerância ao glufosinato de amônio e glifosato é dada pela expressão das proteínas PAT e mEPSPS provenientes dos parentais Bt11 e GA21, respectivamente. As proteínas Cry (Cry1Ab, Cry1A.105, Cry2Ab2) são d-endotoxinas altamente específicas para as lagartas de certas espécies de lepidópteros. As proteínas Vip3A (Vip3Aa20) é secretada na fase de crescimento vegetativo de *Bacillus thuringiensis*. A proteína Vip3Aa20 expressa no milho Bt11xMIR162xMON 89034xGA21 é parte do grupo de proteínas Vip3A, caracterizadas e claramente distintas do grupo de proteínas Cry. Esta molécula de aproximadamente 88 kDa é ativada em um fragmento de aproximadamente 62 kDa ao longo da digestão do inseto. Nesse caso, apesar da ocorrência de outras modificações estruturais, a ativação proteolítica é considerada a etapa crítica para o modo de ação de Vip3A, já que a proteína íntegra é incapaz de formar poros no intestino dos insetos.

A análise do padrão de digestão do DNA genômico foi feita em comparação com DNA dos eventos únicos (Bt11, MIR 162, MON 89034, GA21) e os controle (milho não GM). Os resultados demonstram que o padrão de bandas em Southern blot foi idêntico em todos os casos, indicando que no processo de melhoramento não alteração da inserção desses genes.

O milho Bt11 foi liberado no Brasil em 2008, o milho MIR162 em 2009, o milho MON89034 em 2009, o milho GA21 em 2008, o híbrido duplo Bt11 x GA21 em 2009 e o triplo Bt11xMIR162xGA2 em 2010.

Todos os eventos individuais (Bt11, MIR 162, MON 89034, GA21) já liberados comercialmente em vários países. O milho Bt11xMIR162xMON 89034xGA21 foi somente liberado na Argentina em 2016, de acordo com o site da ISAA (<http://www.isaaa.org/>, consultado em fevereiro de 2017).

De acordo com o Art. 4 da RN 15 de 13/02/2015 a empresa solicita também a liberação comercial dos milhos Bt11 x MIR162 x MON 89034 e milho MIR162 x MON 89034.

2. Classificação taxonômica

O milho (*Zea mays* L. spp *mays*) pertence à família das gramíneas (*Poaceae*), subfamília *Panicoideae*, tribo *Maydeae*, gênero *Zea* e espécie *mays*. É diplóide, com $2n = 20$ cromossomos, apresentando, portanto, dez pares de cromossomos.

3. Genes introduzidos, organismos de origem e suas funções específicas

O milho Bt11xMIR162xMON89034xGA21 foi desenvolvido através de melhoramento genético clássico, por cruzamento sexual entre linhagens geneticamente modificadas contendo o evento Bt11, o evento MIR162, o evento MON 89034 e o evento GA21 aprovados previamente para liberação comercial pela CTNBio.

O **milho Bt11** foi obtido a partir da inserção do gene *cry1Ab* de *Bacillus thuringiensis*, que confere resistência a certos insetos lepidópteros, e o gene *pat*, derivado do microorganismo de solo *Streptomyces viridochromogenes*, que confere tolerância ao herbicida glufosinato de amônio.

O **milho MIR162** foi obtido a partir da inserção do gene *vip3Aa19*, que confere resistência a insetos lepidópteros, e do gene *pmi* (*manA*), obtido a partir de *Escherichia coli* cepa K-12, que codifica a enzima Fosfomanose Isomerase (PMI) e foi utilizado apenas como marcador de seleção no processo de transformação. Uma modificação ocasionada pelo processo de transformação resultou em uma diferença em dois códons do gene *vip3Aa19* inserido, sendo então denominado *vip3Aa20* no milho MIR162

O milho **MON 89034** foi produzido através da metodologia de transformação mediada por *Agrobacterium* com o plasmídeo PV-ZMIR245, que é um vetor binário contendo dois T-DNAs. O primeiro T-DNA, designado como T-DNA I, contém os cassetes de expressão dos genes *cry1A.105* e *cry2Ab2*, que confere resistência à praga *Spodoptera frugiperda*, proteção contra *Helicoverpa zea*, elevado controle das espécies de *Ostrinia* (broca europeia do milho e broca asiática do milho) e *Diatraea saccharalis*. O segundo T-DNA, designado como T-DNA II, contém o cassete de expressão do gene *nptII* (neomicina fosfotransferase II). Durante a transformação, os dois T-DNAs foram inseridos no genoma do milho. O gene *nptII* foi usado como marcador de seleção de células transformadas. Uma vez identificadas as células geneticamente modificadas, o marcador de seleção não foi mais necessário. Portanto, o melhoramento genético clássico foi utilizado para isolar as plantas que continham os cassetes de expressão com os genes *cry1A.105* e *cry2Ab2* (T-DNA I) e não continham o cassete de expressão do gene *nptII* (T-DNA II), produzindo assim o evento de milho MON 89034 livre de marcador de seleção.

O **evento GA21** contém o gene *mepsps* que expressa a enzima Sintase 5-Enolpiruvil Shikimato-3-Fosfato mutada (mEPSPS).

Os modos de ação das **proteínas Vip3A e Cry** diferem significativamente em relação ao seu alvo e efeito no intestino das lagartas do lepidópteros-alvo. Esta distinção é evidenciada pela ausência de homologia entre as sequências de aminoácidos de Vip3A e Cry, pelo modo de ação proteolítica, processo de ligação às proteínas de membrana do intestino médio dos insetos alvo e formação de poros.

4. Vetor utilizado e seu espectro de hospedeiros

O milho Bt11xMIR162xMON-89034xGA21 foi desenvolvido através de melhoramento genético clássico, por cruzamento sexual entre linhagens geneticamente modificadas contendo o evento Bt11, o evento MIR162, o evento MON 89034 e o evento GA21 aprovados previamente para liberação comercial pela CTNBio. Avaliações de eficácia realizadas no milho Bt11xMIR162xMON 89034xGA21, não indicaram nenhum padrão consistente que sugerisse mudanças biologicamente significativas, decorrente da combinação destes eventos, diferentes daquelas esperadas, ou seja, resistência a insetos e tolerância a herbicida.

Os estudos de biossegurança utilizados pela CTNBio na avaliação dos eventos simples, que compõem o milho Bt11xMIR162xMON 89034xGA21 estão em seus respectivos processos, citados a seguir.

Também é citado a seguir o número do parecer técnico da CTNBio de aprovação de cada evento simples.

Bt11 - Processo no 01200.002109/2000-04, Parecer Técnico no 1.255/2008.

MIR162 - Processo no 01200.007493/2007-08, Parecer Técnico no 2.042/2009.

MON 89034 - Processo nº 01200.003326/2008-61, Parecer Técnico nº 2.052/2009.

GA21 - Processo nº 01200.000062/2006-21, Parecer Técnico nº 1.597/2008.

5. Mapa genético utilizado no processo de transformação (transgene/vetor), indicando as regiões que especificam função (promotores, elementos reguladores em cis, genes marcadores de seleção e origem de replicação).

Nessa nova versão do requerimento de liberação comercial foram detalhadas os mapas genéticos de todos os plasmídeos utilizados na produção dos eventos individuais:

Bt11: O milho Bt11 contém arcabouço do plasmídeo pUC18, incluindo a origem de replicação e sítios de reconhecimento de endonucleases que permitiram a adaptação das sequências. Esses fragmentos de DNA vetorial possuem 1520 pb de extensão e não há quaisquer evidências de que sejam expressos nas células vegetais. A versão final do plasmídeo utilizado na transformação genética de milho foi denominada de pZO1502 e possui 6.120 pb, incluindo todos os cassetes e elementos de DNA acima descritos. Este plasmídeo foi destituído do gene de resistência bacteriana a antibióticos derivados de penicilinas, como a ampicilina (gene ampR), originalmente presente na forma parental pUC18” (CTNBio 2008).

MIR162: O milho MIR162 foi produzido através de transformação por bactéria *Agrobacterium tumefaciens*, portando o plasmídeo pNOV1300 com dois cassetes de expressão: um deles possui o promotor ZmUBiInt de milho, a região codificante otimizada do peptídeo vip3Aa de *Bacillus thuringiensis*, seguida da região que contém o intron 9 da fosfoenolpiruvato carboxilase de milho (para aumentar a expressão gênica), finalizando com a região terminadora 3’UTR 35S do vírus do mosaico da couve-flor. O segundo cassete de expressão foi composto pelo promotor ZmUBiInt de milho, a região codificante composta pelo gene manA de *E. coli* que codifica a proteína fosfomanose isomerase (PMI), seguido da região 3’UTR do gene da nopalina sintase de *A. tumefaciens* (CTNBio 2009).

GA21: O evento GA21 foi produzido via bombardeamento com microprojéteis de uma suspensão de células de cultura, utilizando-se o plasmídeo pDPG434, derivado do vetor pSK, o qual é comumente usado em biologia molecular e é derivado do vetor pUC19. Os elementos destinados a inserção do gene de interesse estão contidos dentro do fragmento de restrição NotI, contendo o cassete de expressão usado para a geração do evento GA21” (CTNBio 2008-2): a) Actina 1: região 5’ do gene actina 1 do arroz (*Oryza sativa*) contendo o promotor, o primeiro exon e o primeiro íntron; b) OTP: sequências N-terminais do peptídeo de trânsito de cloroplasto (CTP) baseado nas sequências CTP de girassol (*Helianthus annuus*) e milho (*Z. mays*), presentes para dirigir a proteína mEPSPS ao cloroplasto; c) mepsps: sequência que codifica a proteína modificada de milho (*Z. mays*) mEPSPS, que confere tolerância ao glifosato (25); d) nos – região não traduzida 3’ do gene da nopalina sintase de *Agrobacterium tumefaciens* TDNA, o qual termina a transcrição e dirige a poliadenilação do mRNA.

MON89034: Para o milho MON 89034, o plasmídeo PV-ZMIR245 foi montado através de clonagem tradicional. Um fragmento do plasmídeo A, gerado pela clivagem com as enzimas de restrição Apa1-Kpn1 e que contém o cassete do gene cry2Ab2 e o cassete parcial do gene cry1A.105, foi adicionado no sítio de restrição referente às enzimas Apa1-Kpn1 no plasmídeo, B que contém o fragmento remanescente do cassete do gene cry1A.105, o cassete do gene nptII e as origens de replicação. O plasmídeo PV-ZMIR245 contém duas regiões T-DNA designadas como T-DNA I e T-DNA II. O cassete de expressão do gene cry1A.105 que codifica a proteína Cry1A.105 consiste do promotor (P-e35S) da sequência líder do RNA 35S do CaMV com uma região *enhancer* duplicada. Esse cassete também contém a sequência líder 5’ não traduzida da proteína que se liga à clorofila a/b de trigo (L-Cab), o íntron do gene da actina de arroz (I-Ract1), a sequência do gene cry1A.105 otimizada para expressão em monocotiledôneas e a região 3’ não traduzida da proteína Hsp17.3 de trigo (T-Hsp17).

6. Resumo das construções para a obtenção do OGM

Foram apresentados os esquemas para os eventos **Bt11**, **MIR162** e a descrição do mapa do plasmídeo PV-ZMIR245 para o milho **MON89034**. Não foi apresentado o mapa do plasmídeo do milho **GA21** (teria sido o plasmídeo pNOV1300, sobre o qual não há informações no processo). O plasmídeo pDPG343 do evento MIR162 também não foi descrito.

7. Classificação de risco do OGM

Classe de risco I.

8. Métodos utilizados para a modificação genética

O milho Bt11xMIR162xMON-89034xGA21 foi desenvolvido através de melhoramento genético clássico, por cruzamento sexual entre linhagens geneticamente modificadas contendo o evento Bt11, o evento MIR162, o evento MON 89034 e o evento GA21 aprovados previamente para liberação comercial pela CTNBio.

O evento de milho transgênico **Bt11** foi obtido pela transferência direta de DNA do plasmídeo pZO1502 em protoplastos da linhagem H8540 de milho, derivados de células embriogênicas em cultura em suspensão tratadas com enzimas para degradação da parede celular.

O milho **MIR162** foi produzido através de transformação por bactéria *Agrobacterium tumefaciens*, portando o plasmídeo pNOV1300.

O evento **GA21** foi produzido via bombardeamento com microprojéteis de uma suspensão de células de cultura, utilizando-se o plasmídeo pDPG434, derivado do vetor pSK, o qual é comumente usado em biologia molecular e é derivado do vetor pUC19.

A metodologia de transformação genética utilizada para a produção do **milho MON 89034** foi o sistema indireto mediado pela bactéria *Agrobacterium tumefaciens*, onde embriões imaturos e recém isolados foram utilizados.

9. Caracterização molecular do inserto no organismo receptor....

O número de cópias inseridas dos eventos simples (Bt11, MIR162, MON-89034 e GA21) que fazem parte do milho Bt11xMIR162xMON-89034xGA21 foram confirmadas através de Análises de *Southern blot*, que foram realizadas utilizando técnicas padrão de biologia molecular para confirmar a integridade dos insertos geneticamente modificados no milho Bt11xMIR162xMON 89034xGA21, que foi obtido por melhoramento convencional através de cruzamento sexual entre linhagens contendo os eventos Bt11, MIR162, MON 89034 e GA21.

Para comparar os padrões de hibridização do milho Bt11xMIR162xMON 89034xGA21 com o observado para seus correspondentes eventos únicos (Bt11, MIR162, MON 89034, GA21), foram utilizadas as sondas específicas de cada gene de interesse, *cry1Ab*-, *pat*-, *vip3Aa19*-, *cry1A.105*-, *cry2Ab2*- e *mepsps*-.

Na análise de Southern blot, os padrões de hibridização para o milho **Bt11** e o milho Bt11xMIR162xMON 89034xGA21 foram idênticos. Estes resultados demonstraram que a integridade do cassete de *cry1Ab* do milho Bt11 foi preservada durante o melhoramento convencional para produção do milho Bt11xMIR162xMON 89034xGA21.

Na análise de Southern blot, os padrões de hibridização dos milhos **MIR162** e Bt11xMIR162xMON 89034xGA21 foram idênticos. Estes resultados demonstraram que a integridade do cassete de *vip3Aa20* do milho MIR162 foi preservada durante o melhoramento convencional para produção do milho Bt11xMIR162xMON 89034xGA21.

Na análise de Southern blot, os padrões de hibridização de DNA para os milhos **GA21** e Bt11xMIR162xMON 89034xGA21 foram idênticos. Estes resultados demonstraram que a

integridade do cassete de mepsps foi preservada durante o melhoramento convencional para produção do milho Bt11xMIR162xMON 89034xGA21.

Assim, os padrões de hibridização de DNA do milho Bt11xMIR162xMON 89034xGA21 correspondem às bandas de hibridação observadas para os eventos individuais Bt11, MIR162, MON 89034 e GA21, concluindo, portanto, que a integridade dos insertos a partir dos eventos individuais foi preservada durante o melhoramento genético convencional para a produção do milho Bt11xMIR162xMON 89034xGA21.

10. Produto da expressão do gene inserido no organismo receptor descrito em detalhes

O milho Bt11xMIR162xMON-89034xGA21 expressa quatro proteínas inseticidas Cry1Ab, Vip3Aa20, Cry1A.105 e Cry2AB2 e as enzimas mEPSPS e PAT, que caracterizam a resistência à herbicidas. Também está presente no evento combinado a proteína PMI, que foi utilizada como marcador de seleção, no processo de obtenção do evento MIR162.

As proteínas Cry1Ab, Vip3Aa20, PMI, Cry1A.105 e Cry2AB2, mEPSPS e PAT já foram avaliadas quanto a sua segurança tanto de forma individual quanto em combinação, onde não foram observados efeitos adversos advindos da sua combinação.

No presente documento, as concentrações das proteínas Cry1Ab, mEPSPS, PAT, Vip3Aa20, PMI, Cry1A.105 e Cry2Ab2 em plantas de milho Bt11xMIR162xMON-89034xGA21, desenvolvido por melhoramento convencional, foram medidas durante o seu cultivo nas unidades experimentais da Syngenta Seeds Ltda em Uberlândia-MG e Holambra-SP, durante a safra 2014/2015 em LPMA autorizada pela CTNBio (Processo nº 01200.002315/2014-10). As proteínas foram quantificadas por meio de ensaios imunoenzimáticos ELISA em diferentes tecidos (folha, raiz, planta inteira, pólen e grão) de plantas nos estádios de desenvolvimento vegetativo, reprodutivo e maturidade da semente.

De forma geral, as concentrações das proteínas Cry1Ab, PAT, Vip3Aa20, mEPSPS, PMI, Cry1Ab e Cry2aAb2 em tecidos de milho híbrido de Bt11xMIR162xMON-89034xGA21 encontram-se dentro do valor esperado e da margem de segurança determinada pelas avaliações de risco em laboratório. Diferenças pontuais entre valores máximos e mínimos de cada intervalo não representam riscos adicionais que necessitem ser endereçados e são consistentes com o que é observado em tipos de tecidos ou estágios de desenvolvimento.

Não houve diferença significativa na mortalidade das lagartas de *Helicoverpa zea* expostas à mistura de Cry1Ab + Vip3Aa20 sozinha ou na mistura de Cry1Ab + Vip3Aa20 acrescida da dose sub-letal da mistura de Cry1A.105 + Cry2Ab2. Da mesma forma, não houve diferença significativa na mortalidade das lagartas de *Helicoverpa zea* expostas à mistura de Cry1A.105 + Cry2Ab2 sozinha ou na mistura de Cry1A.105 + Cry2Ab2 acrescida da dose sub-letal da mistura de Cry1Ab + Vip3Aa20. Estes resultados de bioensaios inseticidas, por conseguinte, indicam que a mistura de proteína ativa Cry1A.105 + Cry2Ab2 não afeta a atividade inseticida da mistura de proteína ativa Cry1Ab + Vip3Aa20 contra *Helicoverpa zea* e que a mistura de proteína ativa Cry1Ab + Vip3Aa20 não afeta a atividade inseticida da mistura de proteína ativa Cry1A.105 + Cry2Ab2 contra *Helicoverpa zea*. Esses resultados apresentados neste estudo indicariam que não há interação com relação à atividade inseticida entre as misturas de Cry1Ab + Vip3Aa20 e Cry1A.105 + Cry2Ab2.

11. Técnicas de detecção gerais e específicas do OGM.

Para a detecção do DNA genômico do Evento Bt11, GA21 e MIR162 utiliza-se PCR quantitativo desenvolvido pela Syngenta.

A técnica de detecção geral que pode ser utilizada para o milho MON 89034 consiste tanto de bioensaios com as pragas-alvo da cultura, mostrando a eficácia de controle proporcionada pelas proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2, como de uso da técnica de PCR.

12. Padrão de herança dos genes inseridos

A demonstração de estabilidade genotípica e fenotípica, através dos estudos agronômicos realizados em diferentes regiões produtoras de milho no Brasil e o fato dos genes exógenos introduzidos apresentarem segregação mendeliana, permite a conclusão de que os genes exógenos inseridos no genoma de milho atuam como se fossem genes naturais da espécie. Como o milho Bt11xMIR162xMON-89034xGA21 foi obtido por melhoramento genético clássico, pode-se inferir que os descendentes e as futuras gerações deste milho apresentarão também segregação mendeliana dos genes inseridos nos eventos singulares, assim como deverão mostrar estabilidade fenotípica e genotípica. Não foram mostradas evidências experimentais.

13. Descrição dos efeitos pleiotrópicos e epistáticos dos genes inserido

Uma extensiva caracterização agronômica foi conduzida em condições de campo no Brasil nos anos de 2014 e 2015 em 5 localidades de cultivo representativas da cultura do milho no Brasil, a saber: Uberlândia (MG), Ituiutaba (MG), Itápolis (SP), Holambra (SP) e Lucas do Rio Verde (MT), em LPMA aprovada pela CTNBio (processo 01200.003989/2014-23), onde não foram detectados efeitos pleiotrópicos e epistáticos quando foram comparados o milho Bt11xMIR162xMON-89034xGA21 e o milho não GM. Estes resultados são suportados também com os estudos de caracterização molecular, onde foi demonstrado que a inserção dos transgenes no referido milho não gerou, ampliou ou modificou a expressão de outros genes de forma relevante ou observável, em relação aos eventos individuais que compõem o milho combinado. Também não foram mostradas evidências experimentais.

14. Grau de estabilidade genotípica

A informação sobre o grau de estabilidade genotípica foi apresentada no relatório e demonstrariam, por meio de análises de Southern blot, a estabilidade dos cassetes cry1Ab, vip3Aa20, cry1A.105, cry2AB2, pat e mepsps. Além disso não há evidências de qualquer alteração na estabilidade genotípica destes eventos após sua combinação, também por cruzamento sexual convencional entre as linhagens, conforme demonstrado nos processos de liberação comercial do evento Bt11xMIR162xGA2113 e outras combinações já aprovadas pela CTNBio e que são comercializadas pela Syngenta e estão em fase de monitoramento pós liberação comercial.

15. Existência de interações com efeitos adversos, quando dois ou mais genes forem introduzidos no mesmo OGM por técnicas de ADN recombinante e suas possíveis consequências.

O milho Bt11xMIR162xMON-89034xGA21 foi desenvolvido por meio de melhoramento genético clássico, por cruzamento sexual entre os eventos individuais. A análise molecular comparativa demonstrou que os genes dos eventos Bt11, MIR162, MON- 89034 e GA21 são independentes. A análise de biossegurança é de grande relevância quando existem dois ou mais genes que atuam na mesma rota metabólica ou vias bioquimicamente complementares. Porém, neste caso, trata-se de vias distintas e, portanto, não se deve esperar que a presença dos genes tenha algum efeito diferente daquele que se espera para cada característica quando presentes de forma independente. As informações provenientes de análise molecular comparativa, de considerações sobre a expressão e interação de proteínas, perfil composicional e avaliações agronômicas corroboram com o fato de que os genes presentes nos referidos eventos atuam independentemente.

16. Modificações genéticas no OGM que podem alterar a capacidade de reprodução, sobrevivência, disseminação ou transferência de genes para outros organismos.

Nenhuma modificação genética visando a alteração da capacidade de reprodução, sobrevivência e disseminação ou transferência de genes para outros organismos foi inserida nos milhos Bt11xMIR162xMON-89034xGA21.

A resistência destes eventos a insetos pragas e a tolerância do milho Bt11xMIR162xMON-89034xGA21 a herbicidas torna pouco provável o aumento da sua capacidade de invasão, devido a biologia das plantas de milho e sua alta domesticação. Em avaliações agrônômicas realizadas em diversos ecossistemas de regiões representativas para a cultura do milho no território brasileiro para o milho Bt11xMIR162xMON 89034xGA21, não foram observadas interações entre estes eventos que levassem a efeitos diferentes daqueles esperados, ou seja, as características de resistência a insetos e tolerância a herbicidas (glifosato e glufosinato).

IV – AVALIAÇÃO DE RISCO À SAÚDE HUMANA

1. Histórico de uso na alimentação, no Brasil e em outros Países do organismo parental e ou doador, indicando o nível de consumo e as espécies animais que se alimentam desses organismos.

O novo requerimento traz uma apresentação geral do uso do milho em vários processos, bem como produtos derivados.

2. Possíveis efeitos na cadeia alimentar humana e animal pela ingestão de OGM e seus derivados.

Estudos científicos realizados para avaliação de biossegurança, características agrônômicas e fenotípicas, como parte da avaliação de risco deste milho geneticamente modificado, incluíram diversos ecossistemas de regiões representativas para a cultura do milho no território brasileiro. Extensiva massa de dados já foi produzida e destaca que os efeitos dos produtos GM devem ser caracterizados a partir das proteínas expressas pelas características inseridas ou os genes inseridos. No milho Bt11xMIR162xMON-89034xGA21 as proteínas expressas são as que expressam propriedades para tolerância a herbicidas (PAT e mEPSPS) e as que expressam resistência a insetos praga da classe dos lepidópteros (Cry1AB, Vip3A20, Cry1A.105 e Cry2AB2), todas elas já aprovadas em vários produtos avaliados pela CTNBio.

O gene modificado do milho *epsps*, denominado *mepsps*, foi usado para dar tolerância ao herbicida glifosato no evento de milho GA21 e é uma forma nativa de *epsps* produzido no milho do tipo selvagem

É provável que espécies de mamíferos e animais selvagens potencialmente expostas a mEPSPS, via tecido de milho GA21 ou solo, teriam sido expostas previamente à mesma enzima ou enzimas com função similar. Não são conhecidos efeitos danosos pela exposição das enzimas EPSPS nas concentrações que ocorrem naturalmente ou em cultivos de produtos contendo milho GA21 em anos de uso no campo. Os humanos têm uma longa história de exposição dietética à EPSPS de proteomas endógenos de microrganismos e do milho, e sua presença em muitas plantas de culturas transgênicas disponíveis comercialmente, incluindo milho, algodão e soja. Nenhum efeito adverso associado com sua ingestão foi relatado

Existem mais de 54 produtos GM aprovados contendo o a proteína EPSP, destes 37 são milho, 10 algodão, 5 soja, 1 beterraba e 1 canola, que foram aprovadas para uso global (ILSI 2011b, OECD 2015). Não há relatos de problemas sobre EPSPS no modo como existe em culturas transgênicas de alimentos disponíveis comercialmente até o presente momento.

O milho Bt11xMIR162xMON-89034xGA21 também contém o gene *pat*, derivado da

bactéria do solo *Streptomyces viridochromogenes*, que codifica a enzima PAT. A enzima PAT acetila o glufosinato de amônio, com isso inativando-o, e conferindo tolerância a herbicidas contendo glufosinato de amônio em formulações comerciais. O glufosinato de amônio (L-fosfotricina) inibe a glutamina sintase, uma enzima chave na cadeia da assimilação de nitrogênio. PAT é uma enzima altamente específica para a acetilação do glufosinato de amônio, e não acetila o glutamato (o mais próximo análogo estrutural do glufosinato de amônio) ou outros L-aminoácidos. PAT pertence à classe das enzimas acetiltransferases, comuns em plantas e animais, e compartilha uma estrutura tridimensional muito similar, peso molecular e propriedades funcionais com outras enzimas acetiltransferases, que estão presentes como componentes naturais nas dietas do homem e dos animais. Não há relatos de toxidez ou alergenicidade associados com a classe das enzimas acetiltransferases. Existem mais de 49 produtos GM aprovados contendo o a proteína PAT, destes 34 são milho, 9 algodão, 4 canola e 2 soja, que foram aprovadas para uso global (ILSI 2011b, OECD 2015). Não há relatos de preocupações com PAT do modo como existe, em alimentos derivados de plantas transgênicas comercialmente disponíveis.

A grande maioria dos estudos corrobora com as avaliações de risco já realizadas para os milhos Bt11, MIR162, MON 89034 e GA21, demonstrando que estes são tão seguros quanto os seus equivalentes convencionais e que o cultivo dos mesmos não é potencialmente causador de significativa degradação do meio ambiente ou de agravos à saúde humana e animal.

Ampla revisão bibliográfica sobre o efeito de proteínas Bt em organismos não alvos é apresentado, concluindo-se pela inexistência de efeito danoso nesses organismos (minhocas, polinizadores, invertebrados de solo, etc.)

Com base no peso das evidências da literatura científica atual disponível para as proteínas Cry1Ab, Vip3Aa20, Cry1A.105, Cry2Ab2, PAT e mEPSPS e das evidências apresentadas sobre a ausência de interação entre eventos do milho Bt11xMIR162xMON 89034xGA21, não é esperado nenhum novo risco em relação a sua segurança alimentar e ambiental. Avaliações de eficácia realizadas no milho Bt11xMIR162xMON 89034xGA21, não indicaram nenhum padrão consistente que sugerisse mudanças biologicamente significativas, decorrente da combinação destes eventos, diferentes daquelas esperadas, ou seja, resistência a insetos e tolerância a herbicida. O conjunto de evidências obtidas nos resultados da análise molecular comparativa, na análise composicional química e nutricional, no estudo de comparação agrônômica e de eficácia, como também no estudo do impacto sobre organismos não alvo no cultivo do milho Bt11xMIR162xMON 89034xGA21, indica que os níveis de exposição para organismos não alvo e na alimentação humana e animal a estas proteínas serão os mesmos que para os milhos Bt11, MIR162, MON 89034 e milho GA21 isoladamente.

3. Diferenças de composição química e nutricional entre o alimento oriundo do vegetal geneticamente modificado e do vegetal não modificado in natura ou após processamento e a existência de equivalência substancial entre o OGM e seu organismo parental.

A fim de demonstrar a equivalência substancial entre o milho Bt11xMIR162xMON 89034xGA21 e o milho convencional, foram conduzidas análises em diversos grupos de componentes: composicional (forragem e grãos), perfil de minerais, perfil de vitaminas, perfil de ácidos graxos, perfil de aminoácidos, metabólitos secundários e anti-nutrientes, sendo estes cinco últimos grupos realizados apenas para grãos. Os componentes foram selecionados com base em recomendações da OECD (2002).

O milho Bt11xMIR162xMON-89034xGA21 e o seu correspondente não geneticamente modificado foram cultivados em dois locais no Brasil (Holambra-SP e Uberlândia-MG), na safra 2014/2015 (Liberação Planejada no Meio Ambiente – LPMA processo no 01200.002315/2014-10). Em cada local, foi utilizado o mesmo delineamento de blocos

casualizados com quatro repetições para cada genótipo. Forragem e grãos foram colhidos e analisados para os principais nutrientes da alimentação humana e animal antinutrientes, minerais, vitaminas, aminoácidos e metabólitos secundários,

Conclui-se que não existem diferenças biologicamente significantes na composição química e nutricional dos grãos e forragem do milho Bt11xMIR162xMON 89034xGA21 GM e o milho não GM assim como nenhuma diferença notável entre o milho geneticamente modificado, tratado com herbicidas evento específico e não geneticamente modificado o que confirma a equivalência composicional química e nutricional entre todos os materiais comparados e a ausência de impacto na qualidade nutricional ou segurança alimentar do milho Bt11xMIR162xMON 89034xGA21.

4. Alterações relativas ao desempenho do animal quando alimentado com o OGM...

Com base nas evidências apresentadas sobre a ausência de interação entre as proteínas Cry1Ab, Vip3Aa20, Cry1A.105, Cry2Ab2, PAT e mEPSPS expressas no milho Bt11xMIR162xMON-89034xGA21, não é esperado nenhum novo risco em relação a sua segurança alimentar e ambiental. Avaliações de eficácia realizadas no milho Bt11xMIR162xMON-89034xGA21, não indicaram nenhum padrão consistente que sugerisse mudanças biologicamente significativas, decorrente da combinação destes eventos, diferentes daquelas esperadas, ou seja, resistência a insetos e tolerância a herbicida. O conjunto de evidências obtidas nos resultados da análise molecular comparativa, na análise composicional química e nutricional, no estudo de comparação agrônômica e de eficácia, como também no estudo do impacto sobre organismos não alvo no cultivo do milho Bt11xMIR162xMON 89034xGA21, indica que os níveis de exposição para organismos não alvo e na alimentação humana e animal a estas proteínas serão os mesmos que para os milhos Bt11, MIR162, MON 89034 e milho GA21 isoladamente.

5. Estabilidade à digestão e ao processamento industrial da proteína especificada pelo transgene com base nas propriedades físico-químicas.

Foram apresentados resumos de resultados sobre digestibilidade das proteínas individuais produzidas pelos transgenes nos milhos Bt11, MIR162, MON89034 e GA21.

Os resultados obtidos foram consistentes com as observações para outras proteínas Cry que tiveram sua segurança demonstrada. O fato de tanto a proteína Cry1A.105, como a proteína Cry2Ab2, serem prontamente digeridas em SGF torna improvável suas atividades como um alérgenos alimentares. Para o milho GA21, os dados apresentados mostraram que a incubação por 30 minutos a 65°C ou 95°C desativou a atividade enzimática específica de mEPSPS, indicando uma probabilidade extremamente baixa desta proteína intacta ser absorvida através da mucosa intestinal durante o consumo e estabelecer afinidade imunoquímica por anticorpos, incluindo os anticorpos IgE, primariamente responsáveis pelas reações alérgicas. Adicionalmente, dados disponíveis na literatura têm indicado digestibilidade normal para as variedades de milho transgênico liberados para consumo humano. De fato, a enzima mEPSPS é rapidamente degradada por hidrólise ácida e enzimática quando exposta a fluidos que se assemelham aos fluidos gástricos ou intestinais.

Os estudos de biossegurança utilizados pela CTNBio na avaliação dos eventos simples, que compõem o milho Bt11xMIR162xMON-89034xGA21 estão em seus respectivos processos, citados a seguir. Também é citado a seguir o número do parecer técnico da CTNBio de aprovação de cada evento simples.

Bt11 - Processo no 01200.002109/2000-04, Parecer Técnico no 1.255/2008.

MIR162 - Processo no 01200.007493/2007-08, Parecer Técnico no 2.042/2009.

MON 89034 - Processo nº 01200.003326/2008-61, Parecer Técnico nº 2.052/2009.

6. Possíveis efeitos deletérios do OGM em animais prenhes e seu potencial teratogênico.

Todas as proteínas do milho Bt11xMIR162xMON-89034xGA21 já foram avaliadas pela CTNBio em ensaios de toxicidade aguda. A administração oral de PMI, Cry1Ab, Vip3Aa20, Cry1A.105, Cry2Ab2, PAT e mEPSPS em ratos, não produziu efeitos adversos, portanto todas são consideradas proteínas não-tóxicas. Além disso, os estudos de digestibilidade no requerimento, demonstram que todas elas são prontamente digeridas tanto em ambiente gástrico quanto em condições intestinais típicas de mamíferos. Portanto, é improvável que estas proteínas exógenas sejam absorvidas de maneira intacta em quantidades suficientes e então entrem na circulação fetal.

As proteínas PMI, Cry1Ab, Vip3Aa20, Cry1A.105, Cry2Ab2, PAT e mEPSPS, apresentam histórico de uso seguro em alimentos e rações, e não tem características associadas às proteínas tóxicas ou alergênicos conhecidos, com aprovação em vários países, incluindo o Brasil.

7. As conclusões de análise imunológicas e histológicas de tecidos relevantes, especialmente do trato digestivo.

Os resultados dos estudos apresentados no requerimento comprovariam a segurança à saúde humana e animal no que diz respeito à exposição e/ou alimentação com o milho geneticamente modificados Bt11xMIR162xMON-89034xGA21 e seguem as ferramentas disponíveis e validadas internacionalmente, sendo que estas, assim como os guias de avaliação de culturas geneticamente modificadas produzidos e/ou atualizados, por organizações de renome internacional, continuarão a ser utilizados quando necessário para assegurar que os alimentos derivados da biotecnologia possam ser consumidos com segurança.

Nenhuma relação entre as substâncias testes e a mortalidade ocorreu durante os estudos e não foram observados sinais clínicos atribuíveis às substâncias testes. Não foram observados efeitos relacionados ao tratamento no peso corporal, consumo de alimento, ou peso dos órgãos, nem quaisquer efeitos relacionados ao tratamento foram observados após exame macroscópico ou microscópico dos tecidos.

8. Capacidade do OGM de produzir toxinas ou metabólitos que causem efeitos adversos ao consumidor, animal ou humano, relatando as evidências experimentais.

O estabelecimento da equivalência substancial da composição química do produto transgênico com o que lhe deu origem, ao lado da inocuidade da proteína expressa, tem-se mostrado suficiente, na maioria dos casos, para a avaliação da segurança do produto GM.

Tais testes foram realizados e seus resultados aqui apresentados para o milho Bt11xMIR162xMON 89034xGA21 demonstram que: não há diferenças de composição química e nutricional entre o milho geneticamente modificado e o convencional que possa levar o híbrido geneticamente modificado a produzir toxinas ou metabólitos. Além do mais, não há evidências que a presença das proteínas PMI, Cry1Ab, Vip3Aa20, Cry1A.105, Cry2Ab2, PAT e mEPSPS, em dietas de animais alterem o desempenho dos animais. Todos esses estudos corroboram a conclusão de que o milho Bt11xMIR162xMON 89034xGA21, objeto dessa avaliação não possui capacidade de produzir toxinas ou metabólitos que possam causar risco ao consumo humano e/ou animal. Os resultados dos testes realizados para os eventos já aprovados, milhos Bt11, MIR162 MON 89034 e GA21, também demonstram a ausência na capacidade de produzirem toxinas ou metabólitos que causem efeitos adversos.

9. Avaliações toxicológicas e farmacológicas realizadas em animais experimentais,

descrevendo os resultados.

Foram apresentados resultados dos eventos simples. Quanto ao milho Bt11xMIR162xMON-89034xGA21, uma vez que as proteínas expressas encontravam-se dentro do valor esperado e da margem de segurança determinada pelas avaliações de risco em laboratório, as avaliações toxicológicas e farmacológicas realizadas para os eventos individuais Bt11, MIR162, MON 89034 e GA21, podem ser consideradas para o milho Bt11xMIR162xMON 89034xGA21.

10. Similaridade dos produtos de expressão do OGM com alérgenos conhecidos, relatando possíveis reações alérgicas identificadas após ingestão do OGM nas avaliações em animais experimentais, descrevendo os resultados.

Foram apresentados resultados dos eventos simples. Utilizam-se das mesmas informações apresentadas no item 9 acima. Embora os eventos individuais sejam aprovados em vários países, o milho Bt11xMIR162xMON 89034xGA21 só teve aprovação comercial na Argentina até o momento.

V – AVALIAÇÃO DE RISCO AO MEIO AMBIENTE

1. Área de ocorrência natural do organismo parental do OGM e seus ancestrais e parentes silvestres – Centros de Origem e Diversidade Genética – e espécies ancestrais ou parentais silvestres, existentes em algum ecossistema brasileiro e mesmo gênero da espécie parental não-modificada.

O possível local (ou locais) do qual o milho domesticado tenha se originado tem sido amplamente discutido, entretanto, com base nas evidências atuais, é mais provável que tenha se originado no México.

2. História de cultivo e de uso do organismo parental em termos de segurança para o meio ambiente, para o consumo humano e animal, informando sobre a possibilidade de hibridação introgressiva com as espécies sexualmente compatíveis e sobre a possível vantagem seletiva do transgene.

Todas essas informações estão bem apresentadas no dossiê sobre o milho Bt11xMIR162xMON-89034xGA21. Não se espera que as características conferidas pela introdução dos genes presentes no milho Bt11xMIR162xMON-89034xGA21 proporcionem qualquer vantagem competitiva ou uma maior agressividade, que resultaria em uma espécie invasiva.

3. Possíveis efeitos em organismos indicadores relevantes

Para estudar a influência do milho Bt11xMIR162xMON-89034xGA21 sobre a comunidade de insetos em ambientes de cultivo de milho no Brasil foi realizado um estudo em áreas de importância no cultivo da cultura do milho no Brasil. Os experimentos foram conduzidos nas cidades de Holambra–SP e Lucas do Rio Verde– MT. O delineamento utilizado foi o de blocos inteiramente casualizados, com 3 repetições, sendo que foram instaladas 5 armadilhas para amostragem em cada repetição, totalizando 15 pontos de amostragem por tratamento. As parcelas foram constituídas por 42 linhas de plantio, de 25,2 metros de comprimento e aproximadamente 0,6 metros de espaçamento entre si. Além disso, foram utilizados três métodos de amostragem: armadilha de cartelas adesivas, inspeção visual e armadilhas do tipo pitfall. As coletas ocorreram durante os mesmos estádios de desenvolvimento da cultura para ambos os locais: V8-V9, V10-V11, VT, R1-R2, R3 e R5.

A análise dos dados foi realizada por localidade, ou seja, as avaliações estatísticas da comparação do cultivo do milho Bt11xMIR162xMON-89034xGA21 com o milho convencional não GM, estão divididas para Holambra-SP e Lucas do Rio Verde-MT (LPMA's processos nº 01200.002315/2014-10 e nº 01200.003989/2014-23). As avaliações estatísticas foram realizadas para os itens: abundância média, curva de resposta principal (PRC), parâmetros ecológicos (Abundância, Riqueza, Diversidade e Equidade) e função ecológica.

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que o milho Bt11xMIR162xMON-89034xGA21 não apresentou efeito adverso sobre a comunidade de insetos não alvo quando comparado ao milho não GM

4. Capacidade de dispersão das estruturas de propagação e reprodução do OGM além das áreas de cultivo e os mecanismos.

O milho Bt11xMIR162xMON-89034xGA21 foi agronomicamente avaliado em condições de campo e casa de vegetação em vários experimentos realizados nos Brasil, Estados Unidos e Argentina. Nestes estudos, vários parâmetros fenotípicos e genotípicos foram testados comparativamente com genótipos isogênicos não transgênicos. O conjunto destas avaliações mostraram que o evento Bt11xMIR162xMON-89034xGA21 apresentou os mesmos parâmetros fenotípicos de suas isolinhas convencionais e não houve diferença quanto a capacidade de dispersão das sementes, na dispersão do pólen e polinização ou mesmo na viabilidade e morfologia do pólen. Não apresentam dados sobre essas avaliações.

5. Possibilidade de formação de estruturas de reprodução a longo prazo no organismo parental.

A resistência do milho combinado Bt11xMIR162xMON-89034xGA21 a alguns insetos pragas adicionado a tolerância a herbicidas, torna bem pouco provável que a capacidade de invasão aumente, porque a facilidade no controle de plantas daninhas, a falta de competitividade, ausência de dormência são as principais razões que não torna o milho uma planta daninha persistente. Não apresentam informações sobre essas características.

6. Frequência com que ocorre o cruzamento do organismo parental OGM, dentro da mesma espécie e com espécies sexualmente compatíveis, arrolando as espécies avaliadas, as técnicas utilizadas e os efeitos resultantes.

A CTNBio definiu normas de coexistência mais rigorosas, que exigem isolamento de 100 metros, ou 20 metros contendo 10 fileiras de milho não transgênico, que impedem a dispersão do pólen do milho geneticamente modificado. As evidências científicas apontam para a eficiência dessas medidas e o cumprimento das normas da CTNBio será cada vez mais relevante para a liberdade de escolha dos agricultores.

Devido à ausência de espécies sexualmente compatíveis relacionadas com *Z. mays* no Brasil não existe a possibilidade de ocorrência de fluxo gênico interespecífico.

7. Os efeitos resultantes da transferência horizontal para a microbiota do solo, caso ocorra.

Os resultados de laboratório e estudos de campo demonstraram, portanto, que as proteínas Cry são intrinsecamente degradáveis no solo, provavelmente via degradação enzimática pela presença de proteases do solo. As proteínas não se acumulam no solo, mesmo quando as plantas são cultivadas continuamente por várias safras.

Para que ocorra a transferência horizontal de genes de plantas transgênicas para as bactérias de solo, o DNA liberado dos tecidos e as células da planta devem estar disponíveis no solo e bastante próximos de bactérias competentes. Isso se traduz em fator bastante limitante

para a ocorrência dessa transferência de genes. Somando-se ao fato da rápida degradação inicial que o DNA das plantas sofre no ambiente, a frequência da possível transferência de algum de seus genes para os microrganismos ser bastante baixa, sendo restrita a micro habitats que contem resíduos de tecidos dessas plantas e DNA complexado em partículas do solo. Desta forma, com base nas evidências científicas, a possibilidade da transferência horizontal dos genes introduzidos no milho Bt11xMIR162xMON-89034xGA21 é altamente improvável e, caso viesse a ocorrer, seu impacto seria insignificante.

8. Impactos negativos e positivos aos organismos alvo e não alvo que poderão ocorrer com a liberação do OGM, arrolando as espécies avaliadas, as razões da escolha e as técnicas utilizadas para demonstrar os impactos.

Essas informações estão muito apresentadas e apoiadas em dados experimentais no requerimento de liberação comercial do milho Bt11xMIR162xMON-89034xGA21.

De forma geral, as concentrações das proteínas Cry1Ab, PAT, Vip3Aa20, mEPSPS, PMI, Cry1Ab e Cry2aAb2 em tecidos de milho híbrido de Bt11xMIR162xMON-89034xGA21 encontravam-se dentro do valor esperado e da margem de segurança determinada pelas avaliações de risco em laboratório e, portanto, a avaliação do risco realizada para os eventos individualmente pode ser aplicada quando em forma combinada.

9. Modificações da capacidade da planta em adicionar ou remover substâncias do solo, em decorrência da introdução de novas características, descrevendo possíveis alterações físicas e químicas no solo e contaminação dos corpos d'água adjacentes resultantes das interações com o OGM, comparativamente aos sistemas convencionais.

Com base nas evidências científicas, as modificações da capacidade da planta em adicionar ou remover substâncias do solo e a contaminação dos corpos d'água adjacentes, em decorrência da introdução do milho Bt11xMIR162xMON-89034xGA21 é altamente improvável. Conforme demonstrado no requerimento de liberação comercial, de forma geral, as concentrações das proteínas Cry1Ab, PAT, Vip3Aa20, mEPSPS, PMI, Cry1Ab e Cry2aAb2 em tecidos de milho híbrido de Bt11xMIR162xMON-89034xGA21 encontram-se dentro do valor esperado e da margem de segurança determinada pelas avaliações de risco em laboratório, portanto também não é esperada qualquer alteração em relação a estes ambientes pelo cultivo do referido milho combinado.

10. Possíveis modificações da biodegradabilidade da planta GM, comparativamente ao genótipo parental.

As características inseridas no milho Bt11xMIR162xMON-89034xGA21 não devem alterar essas características e, conforme apresentado nos itens anteriores, a atividade dos microrganismos decompositores não é influenciada pelas proteínas expressas. Não apresentam nenhum resultado nesse sentido.

11. Possível resistência a agentes químicos conferida pela característica introduzida.

Apresentação sucinta sobre a resistência a glifosato, glufosinato e nada mais.

12. Histórico do uso do OGM e os países onde já foram autorizados ou recusados a sua comercialização e plantio apreentando, nesse caso, dados de monitoramento ou de estudos pós liberação comercial, se houver.

O milho Bt11 está aprovado para cultivo na Argentina, Brasil, Colômbia, Canadá, Japão, Filipinas, Vietnã, África do Sul, Estados Unidos, Paraguai, Uruguai e aprovado para consumo animal e/ou humano na Argentina, Austrália, Brasil, Canadá, China, Colômbia, União

Europeia, Japão, Coréia, Malásia, México, Filipinas, Indonésia, Rússia, Turquia, África do Sul, Taiwan, Estados Unidos, Uruguai e Paraguai.

O milho MIR162 está aprovado para cultivo na Argentina, Brasil, Estados Unidos, Canadá, Colômbia, Japão, Paraguai e Uruguai e para consumo animal e/ou humano no Brasil, Argentina, Estados Unidos, Canadá, Austrália, Nova Zelândia, Japão, Coréia, Filipinas, União Europeia, Rússia, África do Sul, México, Vietnã, Colômbia, Uruguai, Indonésia, China, Taiwan e Paraguai.

O milho MON 89034 está aprovado para cultivo na Argentina, Brasil, Canadá, Filipinas, Rússia, África do Sul, Estados Unidos, Uruguai e aprovado para consumo humano e/ou animal na Argentina, Austrália, Brasil, Canadá, China, Colômbia, União Europeia, Indonésia, Japão, Coréia, Malásia, México, Nova Zelândia, Filipinas, Rússia, Taiwan, Ucrânia, Estados Unidos e Uruguai.

O milho GA21 está aprovado para cultivo na Argentina, Canadá, Uruguai, Estados Unidos, Japão, Brasil, Colômbia, África do Sul, Filipinas e aprovado para consumo humano e/ou animal na Argentina, África do Sul, México, Canadá, Uruguai, Japão, Turquia, Estados Unidos, Austrália, União Europeia, Rússia, Brasil, Coréia, Colômbia, Indonésia, Taiwan, Filipinas, Vietnã e China.

Além do Brasil, a autorização para cultivo e consumo do milho Bt11xMIR162xMON 89034xGA21 está sendo solicitada em todos os países de importância comercial para a cultura do milho, como Estados Unidos, México, Japão, Coréia e Comunidade Europeia, entre outros. Já foi aprovado na Argentina.

13. Alterações na capacidade de sobrevivência do OGM em ambientes distintos daqueles ocupados pelo parental, provocadas pelas novas características introduzidas.

Não se espera que as características conferidas pela introdução dos genes presentes no milho Bt11xMIR162xMON-89034xGA21 proporcionem quaisquer alterações na capacidade de sobrevivência em detrimento às características introduzidas. Estes eventos já foram aprovados em vários países, inclusive no Brasil, em suas formas individuais e combinações menores, sem nenhuma evidência de vantagem seletiva. Além disso, a similaridade nas características fenotípicas e agrônômicas entre o milho Bt11xMIR162xMON-89034xGA21 e seu isogênico convencional, sustenta a hipótese que o referido milho geneticamente modificado não apresenta potencial em se tornar planta daninha.

Parecer:

Trata-se de requerimento para liberação comercial dos milhos Bt11xMIR162xMON 89034xGA21 (com quatro eventos), Bt11xMIR162xMON89034xGA21 (três eventos) e MIR162 x MON 89034 (dois eventos). O processo já entrou em duas diligências por estar incompleto e não atender a todos os requisitos dos anexos da RN5.

A razão principal das diligências foi essencialmente falta de informações no requerimento. Na primeira diligência foi solicitado que a requerente atendesse aos anexos da RN5, relacionando item a item que é solicitado. Na segunda apresentação do requerimento, a empresa atendeu a divisão das informações em itens, mas grande parte desses itens não continha informação. Nessa terceira avaliação a requerente atentou para cumprir essas exigências da RN 5, apresentando informações próprias ou de literatura sobre os itens solicitados. Grande parte das informações foram obtidas de avaliações dos eventos simples.

No parecer anterior ficou claro que Uma vez que os eventos individuais já foram aprovados previamente, as informações relativas aos eventos individuais a essas LPMAs ou liberação comercial estão disponíveis na CTNBio ou com as empresas detentoras desses eventos originais. O Art. 4 da RN5 fala que ‘a critério da CTNBio poderão ser dispensadas a

análise e a emissão de novo parecer técnico sobre OGMs que contenham mais de um evento, combinados através de melhoramento genético clássico e que já tenham sido previamente aprovados para liberação comercial pela CTNBio'. Portanto, deve ficar claro que se o processo não solicita dispensa de análise e de emissão de parecer técnico, ele deve conter todas as informações requeridas pela RN5. Desse modo, considera-se que elas devem ser incluídas nesse requerimento de liberação comercial.'

Grande parte das informações referem-se aos eventos individuais. Apesar disso, ele pode ser considerado completo no que diz respeito aos requisitos dos anexos da RN5. Nesse sentido, portanto, recomenda-se à CTNBio sua aprovação.

Data: 08/02/2017

Dr. Marcos Antonio Machado
Membro da CTNBio

Orlando Cardoso
Assessor Técnico