

Processo: 01200.001455/2010-39

Data de Protocolo: 30/04/2010

Requerente: Monsanto do Brasil Ltda.

CQB: 003/96

CNPJ: 64.858.525/0001-45

Endereço: Avenida das Nações Unidas, 12901 Torre Norte SÃO PAULO – SP

Presidente da CIBio: Geraldo Berger

Requerente: Dow Agrosiences Industrial Ltda.

CQB: 107/99

CNPJ: 47.180.625/0001-46

Endereço: Rua Alexandre Dumas, 1671 - 1º andar - Ala A 04717-903 - SÃO PAULO - SP

Presidente da CIBio: Mario Von Zuben

Descrição do OGM: Milho geneticamente modificado resistente a insetos e tolerante aos herbicidas glifosato e glufosinato.

Classificação: Classe de Risco I

Resolução Normativa: RN 05/2008

1. Identificação do OGM

Designação do OGM: Milho MON 89034 x TC 1507 x NK603

Espécie: *Zea mays*

Característica Inserida: resistência a insetos e tolerância a herbicidas.

Método de introdução da característica: O milho MON89034 x TC1507 x NK603 foi gerado através do cruzamento dos milhos MON89034, TC1507 e NK603 através de melhoramento genético clássico.

Uso proposto: uso comercial e quaisquer outras atividades relacionadas ao milho geneticamente modificado resistente a insetos e tolerante aos herbicidas glifosato e glufosinato de amônio (MON89034 x TC1507 x NK603) e suas progênies

2. Proteínas Expressas:

- ✓ Cry1A.105 – Confere resistência a insetos;
- ✓ Cry2Ab2 - Confere resistência a insetos;
- ✓ Cry1F Confere resistência a insetos;
- ✓ PAT – Confere tolerância ao herbicida glufosinato de amônio;
- ✓ CP4-EPSPS – Confere tolerância ao herbicida glifosato.

3. **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”.

4. Observações da Secretaria Executiva:

Este processo contém a proposta do plano de monitoramento pós-liberação comercial que deverá ser apreciado em conjunto e o parecer apresentado à CTNBio quando da sua discussão.

5. Fundamentação Técnica e Parecer:

Considerações iniciais com base nas informações fornecidas pela empresa requerente:

Os eventos individuais MON 89034, TC1507 e NK603 que compõem o milho MON 89034 × TC1507 × NK603 foram anteriormente aprovados pela CTNBio, que emitiu Decisão Técnica favorável para cada um destes eventos, considerando-os seguros para o ambiente e a saúde humana e animal e equivalentes aos milhos convencionais não transformados e com mesmo background genético.

Os eventos MON 89034 e NK603 da empresa Monsanto foram combinados por técnicas de melhoramento ao evento TC1507 da Dow AgroSciences para gerar o milho MON 89034 × TC1507 × NK603. Os três eventos individuais são comercializados no Brasil.

O milho MON 89034 teve os genes *cry1A.105* e *cry2Ab2* inseridos em seu genoma, os quais codificam as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2, respectivamente, e são derivados de *Bacillus thuringiensis*. As proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 são ativas contra importantes lepidópteros praga do milho, dentre os quais a lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*), a lagarta da espiga (*Helicoverpa zea*) e a broca do colmo (*Diatraea saccharalis*). O segundo componente do milho MON 89034 × TC1507 × NK603 é o milho TC1507, que teve os genes *cry1F* e *pat* inseridos em seu genoma. O gene *cry1F* codifica a proteína Cry1F e é também derivado de *B. thuringiensis*. Esta proteína também confere às plantas proteção contra o ataque da lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*) e da broca do colmo (*Diatraea saccharalis*). O gene *pat*, por sua vez, codifica a proteína PAT, derivada de *Streptomyces viridochromogenes*. A expressão da proteína PAT no milho faz com que as plantas sejam tolerantes ao herbicida glufosinato de amônio. O terceiro componente do milho MON 89034 × TC1507 × NK603 é o milho NK603, que teve o gene *cp4 epsps* inserido em seu genoma, o qual expressa a proteína CP4 EPSPS. O gene *cp4 epsps* é derivado de *Agrobacterium* sp. cepa CP4, e a expressão da proteína CP4 EPSPS faz com que as plantas de milho sejam tolerantes ao herbicida glifosato.

As proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2, Cry1F e PAT, e CP4 EPSPS não compartilham sequências de aminoácidos com potencial alergênico ou alérgenos conhecidos, e são rapidamente digeridas no trato digestivo conforme resultados de digestibilidade *in vitro*.

Este milho com transgenes piramidados não difere do milho não transformado em características agronômicas, morfológicas, reprodutivas, composição química e nutricional, à exceção das características introduzidas por transformação genética nos três genitores.

Metodologia de transformação e detalhamento sobre os três eventos de transgenia:

O milho **MON 89034** foi produzido pela transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* utilizando o plasmídeo binário PV-ZMIR245. O plasmídeo, do tipo 2T-DNA, consiste de duas regiões T-DNA separadas, cada qual envolvida pelas bordas direita e esquerda do plasmídeo Ti. Um T-DNA (T-DNA I) contém os cassetes de expressão dos genes *cryIA.105* e *cry2Ab2*, enquanto o outro T-DNA (T-DNA II) contém o cassete de expressão do gene *nptII*, que confere resistência ao antibiótico canamicina e foi utilizado no processo inicial de seleção de células transformadas. Detalhamento destas estratégias moleculares pode ser consultado em Yunbi Xu, (*Molecular Plant Breeding*, CABI International, 2010). Técnicas clássicas de cruzamento e seleção foram usadas para isolar as plantas que continham apenas os cassetes de expressão com os genes *cryIA.105* e *cry2Ab2* (T-DNA I) e não continham o cassete de expressão do gene *nptII* (T-DNA II), produzindo assim o milho MON 89034 livre de marcador de seleção.

A expressão dos genes *cryIA.105* e *cry2Ab2* é regulada pelos promotores 35S e FMV, respectivamente. A caracterização molecular do milho MON 89034 por *Southern blot* demonstrou que o DNA inserido no genoma do milho está presente em um único *locus* e contém apenas uma cópia funcional dos cassetes de expressão dos genes *cryIA.105* e *cry2Ab2*. Todos os elementos genéticos estão presentes no DNA inserido. A estabilidade do DNA integrado foi demonstrada por *Southern blot* em sete gerações testadas durante o melhoramento. Adicionalmente, a análise dessas gerações indicou que não existem elementos do T-DNA II ou da sequência estrutural do plasmídeo PV-ZMIR245 presentes no milho MON 89034.

O evento de transformação TC1507 foi obtido por incorporação do inserto de DNA PHI8999 a embriões imaturos de milho. As plantas da linhagem de milho TC1507 foram obtidas por bombardeamento de micropartículas (PDS-1000He, Bio-Rad. Em meio seletivo, isolou-se a linhagem TC1507, que deu nome ao evento. O hospedeiro inicial da construção gênica inserida foi a linhagem Hi-II de *Zea mays*, resultante do cruzamento entre as linhas endogâmicas A188 e B73. O material Hi-II foi desenvolvido visando obter material com alta taxa de transformação e regeneração, isto é, capaz de facilitar a obtenção de transformantes em tempo reduzido. O gene *cryIF* sintético foi modificado para melhorar a sua expressão em plantas, o que resultou em níveis de expressão da Cry1F efetivos para o controle de lepidópteros praga no milho geneticamente modificado. O gene *cryIF* inserido no evento TC1507 tem 1.818 pb e codifica a proteína Cry1F truncada derivada da cepa PS81I (NRRL B-18484) de *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* (veja: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/toxins2.html).

O evento TC1507 também contém o gene *pat* que é uma versão sintética do gene bacteriano de *Streptomyces viridochromogenes*, que codifica a enzima fosfinotricina acetiltransferase (PAT). A versão sintética tem uma proporção modificada de bases A-T/C-G para favorecer a leitura dos códons pela célula vegetal, sem alteração na sequência de aminoácidos. O gene nativo e o sintético guardam 70% de homologia. O gene *pat* sintético confere tolerância ao herbicida glufosinato de amônio (veja <http://www.biotech.da.gov.ph/upload/25corn59122.pdf>). O transgene *pat* inserido no evento TC1507 tem 552 pb e codifica a proteína PAT com 183 aminoácidos. Os resultados de caracterização molecular do milho TC1507 pela empresa mostram que este evento contém uma única cópia do fragmento de DNA inserido. O milho TC1507 não contém o gene marcador seletivo *nptII* nem outro fragmento detectável do *backbone* do plasmídeo PHP8999.

O milho NK603 expressa a proteína CP4 EPSPS (CP4 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase) que promove tolerância ao glifosato na planta. O gene *cp4 epsps* introduzido no milho para geração do milho NK603 é oriundo da bactéria *Agrobacterium* sp. cepa CP4. A CP4 EPSPS é uma proteína de 47 kDa, que consiste de um único polipeptídeo de 455 aminoácidos. A proteína CP4 EPSPS é funcionalmente idêntica à EPSPS endógena de plantas, com a diferença que a CP4 EPSPS possui afinidade reduzida pelo herbicida glifosato. Todos os estudos de campo, casa de vegetação e laboratório realizados com o milho NK603 demonstraram que este evento é semelhante ao milho não transformado com respeito às suas características reprodutivas, agrônômicas, de segurança alimentar e ambiental e nutricionais.

Interações celulares das proteínas expressas pelo transgenes:

As proteínas Cry1F, Cry2Ab2 e Cry1A.105 são inativas no interior da célula vegetal. A ativação das proteínas do tipo Cry se dá após a sua ingestão pelo inseto, quando ocorre a solubilização dependente de pH alcalino e posterior processamento para liberação da forma ativa. Este processamento enzimático é catalizado por proteases específicas presentes no intestino do inseto. Pode-se afirmar que as proteínas Cry, mesmo quando presentes na célula vegetal mantêm mecanismos de ação isolados e independentes, interagindo apenas com seus receptores específicos depois de solubilizadas e modificadas dentro do intestino dos insetos alvo. Tabashnik et al. (*J. Econ. Entomol.* 99: 1525–1530. 2006) afirmam que a resistência a plantas Bt é rara por parte dos insetos mesmo após uma década de exposição, fato este que depende evidentemente das condições de manejo da lavoura.

A enzima PAT tem mecanismo de ação bastante conhecido, com atividade específica. Evidências mostram que a enzima PAT não é passível de interação com outras proteínas além de seu alvo, o glufosinato de amônio. A análise de sua sequência primária mostra que esta proteína em nada se assemelha a outras proteínas alergênicas conhecidas, havendo

semelhança apenas com outras acetiltransferases, nunca relacionadas a qualquer tipo de efeito negativo

O evento NK603 expressa a enzima CP4 EPSPS, que possui a mesma função da EPSPS de plantas. A semelhança com a proteína endógena garante à CP4 EPSPS atividade exclusiva dentro dos cloroplastos. Esta característica garante a sua não interação com outras proteínas.

Estabilidade genética do evento combinado:

A estabilidade genotípica do milho MON 89034 × TC1507 × NK603 foi confirmada por análises moleculares, onde se comparou a presença do DNA inserido no milho combinado com o respectivo DNA dos eventos individuais. A empresa afirma que o milho combinado mantém a integridade dos genes previamente inseridos nos eventos individuais e que tal estabilidade genética foi estudada em cada um dos eventos individuais em diferentes gerações.

Isto exposto e considerando que

- ✓ As proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry1F , PAT e CP4 EPSPS do milho MON 89034 × TC1507 × NK603 compartilham quase 100% da identidade em sequência com as proteínas selvagens produzidas nos microrganismos doadores;
- ✓ As proteínas Cry têm ações específicas para o controle de certos insetos praga, sendo facilmente digeridas no pH ácido do trato digestivo animal, e não possuem receptores específicos na membrana da célula animal;
- ✓ As proteínas Cry não compartilham seqüências imunologicamente funcionais de aminoácidos com alérgenos conhecidos;
- ✓ As proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry1F , PAT e CP4 EPSPS são seguras para o ambiente, pois são degradadas no solo após o ciclo da cultura; não mostram ação tóxica em estudos eco-toxicológicos realizados com organismos indicadores;
- ✓ As proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry1F , PAT e CP4 EPSPS são codificadas por genes conhecidos, que não conferem ao milho combinado hábitos de planta invasora e têm um longo período de ampla exposição ao ambiente em milhos aprovados em países produtores e consumidores;
- ✓ As proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry1F , PAT e CP4 EPSPS não alteram características agronômicas, morfológicas, reprodutivas e nutricionais do milho MON 89034 × TC1507 × NK603, a não ser pela sua resistência das plantas ao ataque de certas lepidópteras e a tolerância aos herbicidas glifosato e glufosinato de amônio;

Manifesto-me favorável a liberação comercial deste milho combinado.

Finalizando recomendo à empresa a leitura da publicação de *Mao Chen; Anthony Shelton & Gong-yin Ye*. Insect-Resistant Genetically Modified Rice in China: From Research to Commercialization. *Annual Review of Entomology* 56: 81-101 (Published online as a Review in Advance on September 24, 2010), cujo resumo é mostrado a seguir:

From the first insect-resistant genetically modified (IRGM) rice transformation in 1989 in China to October 2009 when the Chinese Ministry of Agriculture issued biosafety certificates for commercial production of two cry1Ab/Ac *Bacillus thuringiensis* (Bt) lines, China made a great leap forward from IRGM rice basic research to potential commercialization of the world's first IRGM rice. Research has been conducted on developing IRGM rice, assessing its environmental and food safety impacts, and evaluating its socioeconomic consequences. Laboratory and field tests have confirmed that these two Bt rice lines can provide effective and economic control of the lepidopteran complex on rice with less risk to the environment than present practices. Commercializing these Bt plants, while developing other GM plants that address the broader complex of insects and other pests, will need to be done within a comprehensive integrated pest management program to ensure the food security of China and the world.

Data: 14-12-2010

Dra. Maria Lucia Carneiro Vieira
Membro da CTNBio

Assessor Técnico: Orlando Cardoso