

**Notificação apresentada ao abrigo do artigo 5º do Decreto-Lei  
nº 72/2003 de 10 de Abril**

**PEDIDO PARA A LIBERTAÇÃO DELIBERADA DE  
MILHO DP-Ø9814Ø-6 GENETICAMENTE  
MODIFICADO**

(Programa de três anos)

**PIONEER HI-BRED SEMENTES DE PORTUGAL, S.A.**



**PIONEER®**  
A DUPONT COMPANY

## TABELA DE CONTEÚDOS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>SUMÁRIO .....</b>   | <b>3</b>  |
| <b>A. INFORMAÇÃO GERAL .....</b>   | <b>5</b>  |
| <b>B. INFORMAÇÃO RELATIVA AO RECEPTOR .....</b>  | <b>6</b>  |
| <b>C. INFORMAÇÃO RELACIONADA COM A MODIFICAÇÃO GENÉTICA .....</b>  | <b>10</b> |
| <b>D. INFORMAÇÃO RELATIVA À PLANTA GENETICAMENTE MODIFICADA ...</b>  | <b>11</b> |
| <b>E. INFORMAÇÃO RELATIVA AO LOCAL DE LIBERTAÇÃO .....</b>   | <b>18</b> |
| <b>F. INFORMAÇÃO RELATIVA À LIBERTAÇÃO.....</b>  | <b>20</b> |
| <b>G. INFORMAÇÃO RELATIVA AO CONTROLO, MONITORIZAÇÃO, PÓS-LIBERTAÇÃO E PLANOS DE TRATAMENTO DE DESPERDÍCIOS .....</b>                  | <b>22</b> |
| <b>H. INFORMAÇÃO RELATIVA AO POTENCIAL IMPACTO AMBIENTAL DA LIBERTAÇÃO DE PLANTAS SUPERIORES GENETICAMENTE MODIFICADAS (PSGM).....</b> | <b>25</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>   | <b>29</b> |
| <b>ANEXO 1 DESCRIÇÃO DO VECTOR.....</b>  | <b>29</b> |
| <b>ANEXO 1 DESCRIÇÃO DO VECTOR.....</b>  | <b>31</b> |
| <b>ANEXO 2 ANÁLISE MOLECULAR DO INSERÇÃO .....</b>   | <b>35</b> |
| <b>ANEXO 3 EXPRESSÃO DA INSERÇÃO .....</b>   | <b>44</b> |
| <b>ANEXO 4 ESTABILIDADE GENÉTICA DO INSERÇÃO .....</b>   | <b>47</b> |
| <b>ANEXO 5 PROTOCOLOS PARA AS EXPERIÊNCIAS DE 2007.....</b>  | <b>48</b> |
| <b>ANEXO 6 NOMES DE PESSOAS PRIVADOS .....</b>   | <b>50</b> |

## SUMÁRIO

**Notificador:**

Pioneer Hi-Bred Sementes de Portugal, S.A.

**Título do projecto:**

Pedido para a libertação deliberada de milho DP-Ø9814Ø-6 geneticamente modificado (referido como milho 98140).

**Objectivo da transformação:**

Obtenção de milho tolerante ao glifosato e a uma gama de herbicidas inibidores da acetolactato-sintase (ALS), tais como as sulfonilureias.

**Planta receptora:**

*Zea mays* L.

**Gene(s) de interesse introduzido(s) e sequências de controlo:**

- gene *gat4621* (gene da glifosato-N-acetiltransferase ) [as sequências de controlo são CBI<sup>1</sup>]

- gene *zm-hra* (gene da acetolactato-sintase do milho geneticamente modificado) [as sequências de controlo são CBI<sup>1</sup>]

**Contexto agronómico:**

O controlo de plantas infestantes é um ponto-chave na produção de milho, uma vez que a ausência ou o controlo desadequado de plantas infestantes reduz significativamente a qualidade e a quantidade da colheita de milho. De facto, as plantas infestantes competem directamente com as colheitas de milho, por água, elementos nutritivos e luz. O milho 98140 foi geneticamente modificado para tolerar a aplicação de glifosato, bem como uma gama de herbicidas inibidores da ALS, tais como as sulfonilureias, com vista à eliminação de plantas infestantes da colheita de milho.

**Duração do projecto:**

3 anos

**Localização da libertação:**

Os locais de ensaios serão, Rio Maior (Freiria), Salvaterra de Magos (Marinhais) e Alcochete

**Precauções a tomar:**

O fluxo de pólen das plantas geneticamente modificadas será controlado através de uma distância de isolamento de 400m de qualquer outra colheita de milho não experimental. Adicionalmente, o local de testes será rodeado por 12 linhas de bordadura de milho convencional com ciclo vegetativo semelhante, que será destruída no fim do ensaio. Toda a matéria vegetal restante, que não tenha sido colhida para análises, será cortada aos pedaços e incorporada no solo.

---

<sup>1</sup> CBI: Confidential Business Information

**Sumário de antecedentes (acontecimentos excepcionais):**

A Pioneer começou a testar o milho 98140 em 2005. Desde essa data, muitos ensaios de campo foram conduzidos por toda a região de cultura de milho dos Estados Unidos da América.

Vários ensaios de campo tiveram também lugar no Chile e na Argentina desde 2005, bem como no Canadá desde 2006. O milho 98140 tem estado em ensaios contínuos (3 sementeiras por ano) no Havai e em Porto Rico, desde 2005.

**Objectivo do projecto:**

O objectivo é recolher dados que serão usados num futuro dossier para colocar o milho 98140 no Mercado Europeu, bem como dados que apoiem o registo do glifosato e dos herbicidas inibidores da ALS, tais como as sulfonilureias, para uso neste milho geneticamente modificado.

A libertação comercial do milho 98140 será pedido na Europa nos próximos anos.

**Objectivo da libertação:**

O objectivo do programa de ensaios é avaliar o milho 98140, com ou sem aplicações de glifosato e herbicidas inibidores da ALS, tais como sulfonilureias.

Em 2007 e 2008, estão planeados ensaios de campo, de forma a avaliar os efeitos dos herbicidas no milho 98140 (i.e. comportamento residual, selectividade, eficácia no controlo de plantas infestantes), comparando com controlos, através de observações visuais, estimativas de rendimento e análise de amostras de tecido.

Adicionalmente, a partir de 2008, outras experiências usando milho 98140 poderão ser conduzidas, usando protocolos diferentes, mas ainda de acordo com o objectivo do programa de ensaios.

**Número e superfície da libertação:**

Cada local de ensaio, em 2007, terá até 6.000 m<sup>2</sup> semeados com milho 98140, sendo a área de superfície total ocupada pela libertação (todas as variedades e bordaduras incluídas) mais elevada.

Nos anos seguintes, até 3 locais de ensaios podem ser semeados, cada um ocupando até 10.000 m<sup>2</sup> do milho 98140.

## **A. INFORMAÇÃO GERAL**

### **A.1. Nome e endereço do notificador (companhia ou instituto)**

Pioneer Hi-Bred Sementes de Portugal, S.A.  
Campo Pequeno n.º 48, 6ºEsq.  
1000-081 Lisboa

### **A.2. Nome, qualificações e experiência do cientista responsável**

Cada local será supervisionado por um agrónomo  
Por favor ver informação confidencial no Anexo 6.

### **A.3. Título do Projecto**

Pedido para a libertação deliberada de milho DP-Ø9814Ø-6 geneticamente modificado (referido como milho 98140).

## 1. INFORMAÇÃO RELATIVA AO RECEPTOR

### B.1. Nome completo

- 1.1.1. Nome da Família: Poaceae (Gramineae)
- 1.1.2. Género: *Zea*
- 1.1.3. Espécie: *Z. mays* L. (2n = 20)
- 1.1.4. Subespécie: nenhuma
- 1.1.5. Cultivar/linha: variedades experimentais
- 1.1.6. Nome comum: Milho

### B.2. Reprodução / compatibilidade sexual

#### a) Informação relativa à reprodução

##### i. Modo(s) de reprodução

O milho é uma espécie alogâmica com polinização anemófila, monóica com inflorescências separadas.

- Os órgãos masculinos estão agrupados na bandeira, situada no topo do colmo, que somente contém os estames envolvidos nas glumas. Estes órgãos aparecem antes dos órgãos femininos (protandria).
- Os órgãos femininos estão agrupados numa ou várias espigas, situadas nas axilas das folhas e são reconhecidos pelos seus longos estiletos chamados barbas, que emergem das camisas (folhas modificadas), que envolvem a espiga. Cada flor contém um ovário simples.

Em condições naturais, a polinização do milho é principalmente cruzada (mais de 95%). O milho é tipicamente uma espécie alogâmica.

##### ii. Factores específicos que afectam a reprodução

O desenvolvimento da bandeira, o aparecimento das barbas e a polinização são os estádios mais críticos do desenvolvimento do milho, sendo a produção de grão fortemente afectada por stresse hídrico e stresse de fertilidade. Geralmente, a viabilidade do pólen é curta. Sob condições de alta temperatura (Herrero and Johnson, 1980) e dessecação (Hoekstra et al., 1989), a viabilidade do pólen do milho pode ser de poucos minutos; estas condições podem danificar a bandeira antes do grão de pólen cair (Lonnquist and Jugenheimer, 1943). Condições mais moderadas podem prolongar a vida do grão de pólen no campo por várias horas (Jones and Newell, 1948).

##### iii. Duração do ciclo vegetativo

O milho é uma Cultura anual, com um ciclo vegetativo que oscila entre curto, com 10 semanas e longo, com 48 semanas, desde a emergência das plantas até à maturação (Shaw, 1988). Esta variação na maturação permite que o milho se desenvolva sob uma gama vasta de condições climáticas.

Nas condições europeias, a sementeira do milho ocorre de 15 de Abril a 15 de Maio e a colheita entre o início de Setembro (para o milho usado como forragem) e meados de Dezembro (para os milhos de ciclo tardio para grão).

- b) Compatibilidade sexual com outras espécies vegetais cultivadas ou selvagens, incluindo a distribuição na Europa das espécies compatíveis.

Não existe compatibilidade sexual da planta com outras espécies cultivadas ou selvagens na Europa. Considera-se geralmente que o teosinto (*Zea mays* ssp. *mexicana*) é o único parente do milho. O teosinto é uma erva antiga e selvagem oriunda do México e da Guatemala e não está presente na União Europeia. Não existe hibridação interespecífica possível na Europa, devido à ausência de espécies afins, que se desenvolvam espontaneamente em território europeu

### **B.3. Capacidade de sobrevivência**

- c) Capacidade de formar estruturas para sobrevivência ou dormência

O milho é uma cultura anual não dormente, sendo as sementes as únicas estruturas de sobrevivência. Regra geral, apenas as espigas por debulhar permitem à semente manter a sua capacidade de germinação para o ano seguinte.

A regeneração natural do milho a partir de tecido vegetativo não é conhecida.

- d) Factores específicos que afectam a capacidade de sobrevivência (se existirem)

A sobrevivência da semente do milho depende da temperatura, humidade da semente, genótipo, protecção da camisa e estágio de desenvolvimento (Rossman, 1949). A semente do milho só pode sobreviver sob condições favoráveis. Temperaturas muito baixas têm um efeito adverso na germinação da semente do milho e foram consideradas um elevado risco na produção de sementes de milho (Wych, 1988). Também são conhecidos os efeitos nocivos sobre a viabilidade das sementes do milho, provocados por temperaturas acima dos 45°C (Craig, 1977).

Em geral, não ocorre germinação na espiga de milho. Quando a germinação ocorre nos dias a seguir à colheita, estas novas plantas são depois destruídas pelo frio. Elas não são capazes de sobreviver ao Inverno rigoroso, e assim, mesmo que esporadicamente se desenvolvam na época da colheita, não chegam à fase reprodutiva.

### **B.4. Disseminação**

- e) Formas e extensão (ex. uma estimativa de como o pólen e/ou as sementes viáveis declinam com a distância) de disseminação

A disseminação do milho pode ocorrer através do pólen ou através de sementes.

O milho tem sido domesticado desde há milhares de anos e como resultado, a dispersão de sementes individuais não ocorre naturalmente. O milho na Europa é uma espécie agrícola, sendo que a sua disseminação só ocorre por sementeira nos solos aráveis. A libertação do pólen das bandeiras ocorre durante um período de 10 a 15 dias. Os grãos de pólen são redondos, pesados e contêm uma elevada quantidade de água. Geralmente, a viabilidade do pólen é de 10 a 30 minutos, apesar de este poder permanecer viável por um período de tempo mais longo sob condições favoráveis. (Agência de Inspeção Alimentar Canadiana, 1994).

A dispersão do pólen do milho tende a ser limitada, uma vez que é influenciada pelo tamanho mais elevado e pela rápida taxa de deposição do pólen. Observou-se que a deposição do pólen do milho declina rapidamente de  $2.3 \times 10^7$  grãos  $m^{-2}$  a 1 m da fronteira do campo, para  $7.1 \times 10^3$  grãos  $m^{-2}$  a 60 m: isto representa um declínio nas concentrações de pólen de várias ordens de grandeza, que se estendem de distâncias radiais de 1 a 60 m da fronteira do campo (Raynor *et al.*, 1972).

Se o pólen viável das plantas geneticamente modificadas pudesse ser transportado pelo vento até estigmas durante o seu período de viabilidade de 30 minutos, a transferência de pólen poderia ocorrer. A probabilidade deste fenómeno ocorrer, torna-se mais reduzida, à medida que a distância em relação ao milho transgénico aumenta. Torna-se negligenciável quando a distância atinge os 200 metros, que é a distância permitida para a produção de sementes, de acordo com as normas internacionais de pureza (normas de certificação da OCDE).

f) Factores específicos que afectam a disseminação (se existirem)

A colheita mecânica e o transporte são formas de disseminar o grão, e adicionalmente, os danos causados por insectos ou pelo vento podem causar a queda das espigas maduras e evitar a colheita. Apesar da existência destas vias de disseminação, o milho não pode sobreviver sem assistência humana, em habitats selvagens na UE. Devido à sua natureza altamente domesticada, as sementes do milho requerem condições de solo uniformes, resultantes do cultivo, de forma a germinar e estabelecer-se em campos de cultivo (Agência de Inspeção Alimentar Canadiana, 1994). A dispersão das sementes é geralmente limitada a campos cultivados. De facto, as propriedades inerentes do milho, a existência de camisas que envolvem a espiga e a inserção de sementes individuais no carolo (ponto central duro), reduzem a possibilidade da dispersão natural das sementes. A sobrevivência da semente do milho é fortemente limitada pela sua sensibilidade a doenças e ao frio.

O pólen da inflorescência masculina é disseminado pela gravidade e pelo vento. A dispersão do pólen começa geralmente dois ou três dias antes do aparecimento de barbas. As flores masculinas podem durar 6 a 10 dias e não mais de 15 dias em quaisquer condições.

### **B.5. Distribuição geográfica da planta**

O milho não é indígena de Portugal ou de outros países europeus. Trata-se de uma planta originária da América Central. O milho depende do Homem para a sua dispersão geográfica. O milho é usado ou como forragem ou na produção de grão. O milho é o terceiro cereal mais cultivado no mundo.

### **B.6. No caso de espécies vegetais que não crescem normalmente no(s) Estado(s) Membro(s), descrição do habitat natural da planta, incluindo informação sobre predadores naturais, parasitas, competidores e simbioses**

O milho é uma planta originária da América Central que não pode crescer abaixo dos 9 - 10°C e que possui uma temperatura óptima de crescimento de 30-33°C. O milho tem sido cultivado na Europa, inicialmente na Europa do Sul, desde o século XVI. Sob um clima continental (Canadá, Rússia), o milho é cultivado até ao 60<sup>imo</sup> paralelo. O milho pode crescer na maioria dos países europeus.

**B.7. Outras interacções potenciais, relevantes ao OGM, da planta com organismos no ecossistema onde cresce geralmente, ou noutra local, incluindo informação sobre efeitos tóxicos em humanos, animais e outros organismos**

É sabido que o milho interage com outros organismos no seu meio, incluindo insectos, aves e mamíferos.

O milho é extensamente cultivado e tem uma história de uso seguro. O milho não é considerado nocivo ou tóxico para os seres humanos, animais e outros organismos (Del Valle *et al.*, 1983).

O milho é susceptível a uma gama de doenças fúngicas (Antracnose, Helmintosporise, Fusariose, Morrão, Crazy top) e a pragas (*Atomaria linearis*), milípedes (*Blaniulus guttulatus*), miriápodes (*Scutigera immaculata*), *Tipula paludosa*, lagarta rosca (*Agrotis ipsilon*), *Helicoverpa zea*, *Spodoptera frugiperda*, pulgões (*Dalbulus maidis*), Broca do milho (*Sesamia nonagrioides*, *Ostrinia nubilalis*), crisomelídeos (*Diabrotica virgifera virgifera*, *Diabrotica barberi*, *Diabrotica undecimpunctata howardi*), afídeos (*Rhopalosiphum maidis*)), assim como, competição com outras plantas infestantes.

## 2. INFORMAÇÃO RELACIONADA COM A MODIFICAÇÃO GENÉTICA

### C.1. Descrição do método usado para a modificação genética

O milho 98140 geneticamente modificado foi obtido através de uma transformação mediada por *Agrobacterium* com o plasmídeo PHP24279, como é descrito no Anexo 1.

### C.2. Natureza e fonte do vector utilizado

O vector utilizado para a modificação genética foi um plasmídeo de *Agrobacterium tumefaciens*, estirpe LBA4404, cuja patogenicidade foi eliminada através da remoção do seu T-DNA nativo. Em seu lugar, o local do T-DNA no plasmídeo Ti possuía o gene *gat4621*, que lhe confere tolerância a herbicidas contendo glifosato e o gene *zm-hra*, que lhe confere tolerância a uma gama de herbicidas inibidores da acetolactato-sintase (ALS), tais como as sulfonilureias; bem como os componentes regulatórios necessários para a expressão.

O plasmídeo PHP24279 foi utilizado para a transformação do milho 98140 (Tabela 1). O DNA entre as margens esquerda e direita do plasmídeo PHP24279 foi completamente sequenciado e não contém quaisquer sequências desconhecidas.

Mais informação acerca dos elementos do DNA do plasmídeo PHP24279 é fornecida no Anexo 1, pelo mapa do plasmídeo (Figura 1) e pelo mapa do T-DNA (Figura 2).

Tabela 1: Plasmídeo utilizado para transformação do milho 98140

| Plasmídeo | Anexo                  |
|-----------|------------------------|
| PHP24279  | Anexo 1, Figuras 1 & 2 |

### C.3. Dimensão, fonte (nome) do(s) organismo(s) dador(es) e função pretendida de cada fragmento constituinte da região que se pretende inserir

O T-DNA do plasmídeo PHP24279 (Figura 2) contém duas cassetes de expressão, como é descrito mais detalhadamente no Anexo 1.

Uma cassette contém o gene glifosato-N-acetiltransferase (*gat4621*) codificando a proteína GAT4621, que confere tolerância a herbicidas contendo glifosato. O gene *gat4621* teve origem na bactéria do solo *Bacillus licheniformis* e foi sintetizado por um processo de *gene shuffling*, para otimizar a actividade de acetiltransferase da enzima GAT4621 (Castle *et al.*, 2004).

A outra cassette contém um gene modificado da acetolactato-sintase de milho, *zm-hra* (*Zea mays*- alelo altamente resistente), que codifica a proteína ZM-HRA, que confere tolerância a uma gama de herbicidas inibidores da ALS, como as sulfonilureias.

Um sumário dos elementos genéticos na região T-DNA do plasmídeo PHP24279 utilizado para transformação do milho 98140 está contido no Anexo 1 (Tabela 4).

### 3. INFORMAÇÃO RELATIVA À PLANTA GENETICAMENTE MODIFICADA

#### D.1. Descrição do(s) traço(s) e características que foram introduzido(s) ou modificada(s)

O milho 98140 foi geneticamente modificado por inserção dos genes *gat4621* e *zm-hra* para que possa tolerar a aplicação de glifosato e uma gama de herbicidas inibidores da ALS, tais como sulfonilureias, com vista à eliminação de infestantes da colheita de milho.

A expressão da proteína GAT4621 no milho 98140 confere tolerância à aplicação de herbicidas contendo glifosato.

O glifosato elimina plantas não transgênicas através da inibição selectiva da actividade da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (abreviado EPSPS) que catalisa um passo crítico na via de biossíntese de aminoácidos aromáticos, nas plantas. Uma vez que os aminoácidos aromáticos, como a fenilalanina, a tirosina e o triptofano, são necessários para a síntese proteica, que é necessária para o crescimento e manutenção da planta, a aplicação de glifosato resulta na morte da planta.

O gene glifosato N-acetiltransferase (*gat4621*) foi introduzido no milho 98140 para conferir tolerância ao glifosato. A proteína GAT4621 expressa no milho 98140 acetila a amina secundária do glifosato, e a forma acetilada do glifosato não tem actividade herbicida contra o milho. A proteína GAT4621 elimina a toxicidade do glifosato, transferindo o grupo acetil do acetil CoA para o grupo do glifosato e formando N-acetilglifosato. Assim, quando plantas de milho geneticamente modificadas expressando a proteína GAT4621 são tratadas com glifosato, as plantas não são afectadas pelo herbicida, devido à acetilação do glifosato pela GAT4621. A via de biossíntese de aminoácidos aromáticos não é interrompida nas plantas geneticamente modificadas, apesar da presença do glifosato, o que permite que o desenvolvimento das plantas geneticamente modificadas continue. Assim, o glifosato, um herbicida não selectivo, sistémico, de largo espectro, pode ser utilizado para a eliminação de infestantes de campos de milho 98140.

A expressão da proteína ZM-HRA no milho 98140 confere tolerância à aplicação de uma gama de herbicidas inibidores da ALS, tais como as sulfonilureias.

Nas plantas, a acetolactato-sintase (abreviado ALS) tem um papel fundamental na via bioquímica que resulta na síntese dos aminoácidos de cadeia ramificada leucina, isoleucina e valina. Os herbicidas inibidores da ALS podem inibir selectivamente esta biossíntese de aminoácidos de cadeia ramificada. Uma vez que estes aminoácidos são necessários para a síntese proteica, que é necessária para o crescimento e manutenção da planta, a aplicação de herbicidas inibidores da ALS resulta na morte da planta.

Uma versão modificada do gene da acetolactato-sintase (*zm-hra*) endógeno do milho foi inserida no milho 98140. A modificação na proteína ZM-HRA expressa no milho 98140 permite-lhe ultrapassar a inibição da ALS endógena, causada por estes herbicidas. A proteína ZM-HRA expressa no milho 98140 não é inibida pelos herbicidas inibidores da ALS e desta forma confere tolerância a sulfonilureias. A via bioquímica que resulta na síntese dos aminoácidos de cadeia ramificada nas plantas não é interrompida nas plantas geneticamente modificadas, apesar da presença destes herbicidas, o que permite que o desenvolvimento das plantas geneticamente modificadas continue. Assim estes herbicidas

podem ser utilizados para a eliminação de plantas infestantes dos campos de milho 98140.

Os genes *gat4621* e *zm-hra* são os genes de interesse bem como marcadores selectivos. Não foram modificadas ou introduzidas quaisquer outras características no milho 98140 geneticamente modificado.

## **D.2. Informação sobre as sequências realmente inseridas/removidas**

### 3.1.1. Dimensão e estrutura da inserção e métodos utilizados para a sua caracterização, incluindo informação sobre quaisquer partes do vector introduzido na planta geneticamente modificada ou qualquer transportador ou DNA exógeno que permaneça na planta geneticamente modificada

A caracterização do DNA inserido no milho 98140 foi efectuada por uma análise de *Southern blot*. O método utilizado é descrito abaixo:

O DNA genómico foi extraído de tecido de folhas e liofilizado. Este tecido foi recolhido de amostras de milho 98140 e amostras de milho não modificado geneticamente (controlo). O DNA genómico foi digerido com endonucleases (enzimas de restrição) e os fragmentos foram separados de acordo com o seu tamanho, num gel de agarose. Um marcador de peso molecular foi corrido ao lado das amostras, de forma a permitir a estimativa da dimensão dos fragmentos.

Os fragmentos de DNA separados no gel de agarose foram depurinados, desnaturados e neutralizados *in situ*, e transferidos para uma membrana de nylon. Após a transferência para a membrana, o DNA foi ligado à membrana por *crosslinking* usando raios UV. Fragmentos homólogos aos genes *gat4621* e *zm-hra* foram gerados por PCR a partir do plasmídeo, separados por dimensão num gel de agarose e purificados, usando um kit de extracção de gel. Todas as sondas de DNA foram geradas a partir do fragmento por marcação de primers usando [<sup>32</sup>P]dCTP.

A sonda marcada foi hibridada no DNA alvo, nas membranas de nylon, para detecção dos fragmentos específicos. As lavagens após a hibridação foram efectuadas com grande rigor. As membranas foram expostas a película de raio X a -80°C para um ou mais pontos ao longo do tempo, de forma a detectar fragmentos hibridantes e visualizar marcadores de peso molecular.

A análise molecular da inserção no milho 98140 é apresentada em detalhe no Anexo 2.

Os resultados da análise por *Southern blot* do milho 98140 indicam que existe uma cópia única e intacta do T-DNA inserido no milho 98140.

Além disso, uma vez que este milho geneticamente modificado foi obtido por um método de transformação mediado por *Agrobacterium*, a ausência de incorporação de DNA de suporte exterior às margens do T-DNA também foi determinada por um método de *real-time PCR* qualitativo. Os detalhes do método utilizado são fornecidos no Anexo 2.

Os resultados sugerem que apenas o DNA contido dentro das margens do T-DNA do plasmídeo PHP24279 foi integrado no milho 98140

### 3.1.2. Em caso de deleção, dimensão e função da região(s) deletada

Não aplicável.

### 3.1.3. Número de cópias da inserção

Como foi mencionado acima, no ponto D.2.a, existe uma cópia única e intacta do T-DNA inserida no milho 98140.

### 3.1.4. Localização/ões da(s) inserção(s) nas células das plantas (integradas no cromossoma, cloroplastos, mitocôndria, ou mantidos numa forma não integrada), e métodos para a sua determinação

A inserção foi integrado no genoma nuclear do milho através de um método de transformação mediado por *Agrobacterium*.

## **D.3. Informação relativa à expressão da inserção**

### g) Informação acerca da expressão ao longo do desenvolvimento da inserção durante o ciclo de vida da planta e métodos utilizados para a sua caracterização

- A expressão da inserção no milho 98140 foi avaliada pelo método ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay).

Informações detalhadas, relacionadas com o método ELISA utilizado e o nível de expressão das proteínas GAT4621 e ZM-HRA nos tecidos do milho 98140 são fornecidas no Anexo 3.

As análises disponíveis mostram que as proteínas GAT4621 e ZM-HRA são expressas no milho 98140. Acresce ainda, que as proteínas GAT4621 e ZM-HRA não foram detectadas em amostras das plantas não transgênicas usadas como controlo.

- Outra forma de verificar a expressão da inserção nas plantas geneticamente modificadas consistiu em estimar a sua tolerância ao glifosato e às sulfonilureias

Uma experiência de tolerância a herbicidas foi conduzida nos Estados Unidos da América para determinar a tolerância do milho 98140 a herbicidas contendo glifosato ou sulfonilureias, como é descrito mais detalhadamente no Anexo 3.

Os resultados mostraram que as plantas do milho 98140 mostraram ser tolerantes a herbicidas contendo glifosato ou sulfonilureias.

### h) Partes da planta onde a inserção é expressa (por exemplo a raiz, o caule, o pólen, etc.)

Tanto o gene *gat4621* como o gene *zm-hra* são controlados por promotores constitutivos, assim espera-se que as proteínas GAT4621 e ZM-HRA sejam expressas constitutivamente em todas as partes da planta ao longo do seu ciclo de vida.

#### **D.4. Informação sobre as diferenças entre a planta geneticamente modificada e a planta receptora**

Em ensaios de campo anteriores, conduzidos em pontos diferentes ao longo das regiões onde o milho é cultivado na América do Norte e da América do Sul, as plantas transgênicas apresentaram-se normais em todos os aspectos.

Eram indistinguíveis das plantas de milho não modificado geneticamente, excepto no facto de serem tolerantes ao glifosato e herbicidas inibidores da ALS, tais como sulfonilureias, devido à modificação genética.

##### Forma(s) e/ou taxa de reprodução

A forma de reprodução da planta geneticamente modificada é a mesma que a da planta não modificada geneticamente. Não houve aumento no potencial de infestação.

##### Disseminação

A planta geneticamente modificada comporta-se da mesma forma para dispersão do pólen e para a produção de sementes que a sua equivalente não modificada. Por exemplo, as plantas geneticamente modificadas não desenvolveram um mecanismo de dispersão de sementes.

##### 3.1.5. Capacidade de sobrevivência

A capacidade de sobrevivência é a mesma; a planta geneticamente modificada continua a ser uma cultura anual. Os genes introduzidos não têm qualquer efeito na capacidade colonizadora da planta. Em condições como as que se encontram na Europa, o milho não se consegue desenvolver fora de zonas de cultivo e mesmo se a germinação aparecesse depois da colheita, as plantas não conseguiriam sobreviver ao Inverno rigoroso; assim não existiriam plantas com capacidade de reprodução no ano seguinte.

#### **D.5. Estabilidade genética da inserção e estabilidade fenotípica da planta modificada**

A segregação Mendeliana do gene *gat4621* foi analisada durante o processo de reprodução pela utilização de um spray contendo glifosato como é descrito mais detalhadamente no Anexo 4.

Dados relativos à segregação Mendeliana de transgenes evidenciam a hereditariedade estável do material genético introduzido recentemente.

#### **D.6. Qualquer alteração na capacidade de transferência de material genético da planta geneticamente modificada para outros organismos**

- Transferência horizontal

A transferência de material genético proveniente do milho 98140 para bactérias é uma preocupação negligenciável. Não há nenhum mecanismo conhecido para, ou

demonstração definitiva de, transferência de DNA de plantas para micróbios sob condições naturais.

- Transferência interespecífica or intergenérica

O potencial para transferência interespecífica or intergenérica de material genético do milho 98140 é negligenciável, uma vez que não há parentes sexualmente selvagens ou infestantes de *Zea mays* conhecidos na UE.

- Transferência intraespecífica

Se o pólen viável das plantas geneticamente modificadas pudesse ser transportado pelo vento para estigmas receptivos durante o período de 30 minutos de viabilidade do pólen, a transferência de material genético poderia ocorrer. A probabilidade deste fenómeno ocorrer, torna-se mais reduzida, à medida que a distância em relação ao milho transgénico aumenta. Torna-se negligenciável quando a distância atinge os 200 metros, que é a distância permitida para a produção de sementes, de acordo com as normas internacionais de pureza (normas de certificação da OCDE).

O fluxo de pólen das plantas geneticamente modificadas será controlado através de uma distância de isolamento de 400m de qualquer outra cultura de milho não experimental. Adicionalmente, o local de testes será rodeado por 12 linhas de bordadura de milho convencional com ciclo vegetativo semelhante, que será destruída no fim do ensaio.

#### **D.7. Informação sobre quaisquer efeitos tóxicos, alergénicos ou outro tipo de efeitos nocivos para a saúde humana induzidos pela modificação genética**

As plantas transgénicas a que se refere este pedido já foram testadas em diversos ensaios e não são conhecidos quaisquer efeitos nocivos para a saúde humana ou para o ambiente.

Efectuou-se uma análise bioinformática para avaliar o potencial alergénico das proteínas GAT4621 e ZM-HRA. A sequência de aminoácidos de cada uma das proteínas foi testada contra uma base de dados de sequências alergénicas englobando o conjunto de dados FARRP6 (Food Allergy Research and Refonte Program - versão 6) (<http://www.allergenonline.com>). Possíveis homologias entre a proteína GAT4621 e proteínas na base de dados de alergenos, bem como possíveis homologias entre a proteína ZM-HRA e proteínas na base de dados de alergenos foram avaliadas, numa primeira fase com a ferramenta de análise de sequências FASTA34 e para qualquer sequência contínua de 8 ou mais aminoácidos foram comparadas com os alergenos contidos na base de dados. Não foram detectadas homologias superiores a 35% ou correspondências de mais de 8 aminoácidos, num total 80 resíduos de aminoácidos, usando o FASTA para a proteína GAT4621, nem para a proteína ZM-HRA. Assim, não foram encontradas semelhanças significativas a alergenos conhecidos ou putativos, para qualquer uma das proteínas.

Uma pesquisa através dos conjuntos de dados públicos de proteínas, usando o BLASTP (Basic Local Alignment Search Tool) como ferramenta e a sequência da proteína GAT4621 como molde, mostrou semelhança com outras acetiltransferases (de *Bacillus* espécies próximas ou outras bactérias ou fungos). Nenhuma das correspondências

encontradas dizia respeito a toxinas proteicas ou anti-nutrientes ou aparentava possuir qualquer outro risco para a saúde.

Uma pesquisa através dos conjuntos de dados públicos de proteínas, usando o BLASTP(Basic Local Alignment Search Tool) como ferramenta e a sequência da proteína ZM-HRA como molde, mostrou semelhança com a subunidade maior da acetolactate synthase (ALS), proteínas de tamanho considerável de várias plantas de cultivo e espécies infestantes, seguidas de correspondências a sequências bacterianas e fúngicas de ALS.

Nenhuma das correspondências com outras proteínas encontradas diz respeito a toxinas proteicas conhecidas ou anti-nutrientes ou aparentava qualquer outro risco para a saúde.

Há ainda que ter em conta, o facto de que a colheita resultante destes ensaios será destruída e não irá entrar na cadeia alimentar. Assim, as medidas tomadas evitarão qualquer exposição de seres humanos.

**D.8 Informação sobre a segurança da planta geneticamente modificada para a saúde animal, particularmente no que diz respeito a qualquer efeito tóxico, alergénico ou outro tipo de efeitos nocivos para a saúde humana, induzidos pela modificação genética, nos casos em que se pretende usar a planta geneticamente modificada em rações animais.**

Não se pretende usar as plantas de milho 98140 geneticamente modificado, a que se refere o presente pedido, em rações animais. O grão proveniente dos ensaios será destruído no fim da libertação e não entrará na cadeia alimentar.

O programa plurianual na Europa, permitir-nos-á avaliar o perfil de expressão proteica de composição nutricional do milho geneticamente modificado em comparação com o seu equivalente não modificado geneticamente. As análises de composição permitirão o estudo da equivalência substancial e nutricional, bem como da segurança do milho geneticamente modificado em comparação com as plantas equivalentes não modificadas geneticamente.

**D.8.Mecanismo de interacção entre a planta geneticamente modificada e os organismos alvo, se aplicável**

O milho 98140 não tem quaisquer organismos alvo, uma vez que é apenas tolerante a herbicidas.

**D.9.Alterações potenciais nas interacções da planta geneticamente modificada com organismos não-alvo, resultantes de modificação genética**

Não são esperados quaisquer impactos ambientais potenciais imediatos e/ou retardados resultantes de interacções directas e indirectas do milho geneticamente modificado expressando as proteínas GAT4621 e ZM-HRA e organismos não-alvo no ambiente onde será inserido o milho 98140, como resultado da sua libertação deliberada. Além disso, o programa de ensaios plurianual para o milho 98140, na Europa, permitirá avaliar o impacto do cultivo de milho 98140 em populações chave de artrópodes não-alvo, em comparação com o cultivo do milho equivalente excepto no que diz respeito às modificações genéticas.

#### **D.10. Interações potenciais com o ambiente abiótico**

Espera-se que a expressão das proteínas GAT4621 e ZM-HRA no milho 98140 não altere as interações naturais das plantas com o ambiente abiótico. A fonte do gene *gat4621* é uma bactéria comum no solo, *Bacillus licheniformis*, que é ubíqua no ambiente, sendo uma fonte comum de enzimas com aplicação industrial, e está registada para uso em práticas de agricultura nos Estados Unidos da América. O gene *zm-hra* é uma versão modificada do gene da acetolactato-sintase endógeno do milho. O gene *zm-hra* codifica uma proteína, ZM-HRA, que é uma versão modificada da acetolactato-sintase endógena do milho, conferindo tolerância a uma gama de herbicidas inibidores da ALS, como as sulfonilureias.

Não se espera que a expressão das proteínas GAT4621 e ZM-HRA no milho geneticamente modificado cause possíveis efeitos imediatos e/ou retardados no processo biogeoquímico.

#### **D.11. Descrição das técnicas de detecção e identificação para a planta geneticamente modificada**

- Técnicas de descrição fenotípicas:

O milho é uma espécie cultivada da família Gramineae e foi bem caracterizado taxonomicamente, permitindo a sua detecção por observação visual.

As plantas de milho transformadas podem ser identificadas pela aplicação de certos herbicidas. A presença da proteína GAT4621 resultará em plantas saudáveis que sobrevivem à aplicação de glifosato. A presença da proteína ZM-HRA resultará em plantas saudáveis que sobrevivem à aplicação de herbicidas inibidores da ALS, como as sulfonilureias.

- Técnicas de descrição genotípica (demonstração de sequências específicas no genoma da planta):

Os genes introduzidos podem ser identificados usando PCR ou de uma análise por *Southern blot*.

Antes da colocação no mercado do milho 98140, métodos de detecção validados serão disponibilizados pelo Joint Research Centre.

#### **D.12. Informação acerca de anteriores libertações das plantas geneticamente modificadas, se aplicável**

A Pioneer começou a testar o milho 98140 em 2005. Desde essa data, muitos testes de campo foram conduzidos por toda a região de cultura de milho dos Estados Unidos da América.

Vários ensaios de campo tiveram também lugar no Chile e na Argentina desde 2005, bem como no Canadá desde 2006. O milho 98140 tem estado em ensaios contínuos (3 sementeiras por ano) no Havai e em Porto Rico, desde 2005.

Até à data, não foram reportados quaisquer problemas ambientais, relativos a estes ensaios.

As plantas de milho 98140 comportaram-se como esperado, sem evidenciar quaisquer características morfológicas ou fenotípicas não intencionais. Em particular, não surgiu qualquer evidência de aumento do potencial infestante do milho 98140. A Tabela 2 fornece uma lista de anteriores libertações do milho 98140.

**Tabela 2: Lista de anteriores libertações do milho 98140**

| Aprovação #     | Ano  | Localização                       |
|-----------------|------|-----------------------------------|
| 05-024-04R      | 2005 | Estados Unidos da América (Havai) |
| 05-024-03R      | 2005 | Estados Unidos da América         |
| 0224658/05      | 2005 | Argentina                         |
| 6225            | 2005 | Chile                             |
| 06-019-03R      | 2006 | Estados Unidos da América         |
| 06-019-04R      | 2006 | Estados Unidos da América (Havai) |
| 06-097-101n     | 2006 | Estados Unidos da América         |
| 06-PHI1-294-COR | 2006 | Canadá                            |
| 3645            | 2006 | Chile                             |

#### 4. INFORMAÇÃO RELATIVA AO LOCAL DE LIBERTAÇÃO

##### E.1. Localização dimensão do(s) local/is de libertação

Os locais de ensaios serão, Rio Maior (Freiria), Salvaterra de Magos (Marinhais) e Alcochete

Cada local de ensaio, em 2007, terá até 6.000 m<sup>2</sup> semeados com milho 98140, sendo a área de superfície total ocupada pela libertação (todas as variedades e bordaduras incluídas) mais elevada.

Nos anos seguintes, até 4 locais de ensaio podem ser semeados, cada um ocupando até 10.000 m<sup>2</sup> do milho 98140.

A libertação do milho 98140 será incluída nos ensaios de campo que também irão conter milho não geneticamente modificado e outros tipos de milho geneticamente modificado descritos noutros pedidos submetidos.

##### E.2. Descrição do ecossistema, incluindo clima, flora e fauna

O clima do da região do Ribatejo é considerado mesotérmico húmido, tipicamente mediterrâneo, com o Verão quente e seco e o Inverno frio e húmido. Na região onde se vão implantar os ensaios verificou-se uma diminuição significativa da cultura do milho, sendo substituída por cultura hortícolas que por vezes alternam com cereais praganosos. As parcelas são envolvidas por floresta (pinho e eucalipto), culturas perenes (vinha e olival) e áreas urbanas

**E.3. Presença de espécies vegetais, selvagens ou cultivadas, sexualmente compatíveis**

Não existem espécies afins, sexualmente compatíveis, na Europa.

**E.4. Proximidade a biotipos oficialmente reconhecidos ou áreas protegidas que possam ser afectadas**

A fauna e flora existentes não têm características especiais e não estão classificadas como zonas protegidas

## 5. INFORMAÇÃO RELATIVA À LIBERTAÇÃO

### F.1. Objectivo da libertação

O objectivo do programa de ensaios é o de avaliar o milho 98140, com ou sem aplicações de glifosato e herbicidas inibidores da ALS, tais como sulfonilureias.

Em 2007 e 2008, estão planeados ensaios de campo, de forma a avaliar os efeitos dos herbicidas no milho 98140 (i.e. comportamento residual, selectividade, eficácia no controlo de plantas infestantes), em comparação com controlos, através de observações visuais, estimativas de rendimento e análise de amostras de tecido.

Adicionalmente, a partir de 2008, outras experiências usando milho 98140 poderão ser conduzidas com protocolos diferentes, mas ainda de acordo com o objectivo do programa de ensaios.

### F.2. Data(s) prevista(s) e duração da libertação

A libertação do milho 98140 está planeada para 4 campanhas de cultivo de milho.

Tabela 3: Data(s) prevista(s) e duração da libertação

| CAMPANHA | ÉPOCA DE DESENVOLVIMENTO               |
|----------|--|
| 2007     | início de Abril até ao fim de Dezembro |
| 2008     | início de Abril até ao fim de Dezembro |
| 2009     | início de Abril até ao fim de Dezembro |

### F.3. Método através do qual as plantas geneticamente modificadas serão libertadas

As sementes serão semeadas grão a grão, em linhas, manualmente ou usando um semeador específico.

O comprimento de cada linha e o número de sementes por linha serão adaptadas ao tipo de ensaio. Na extremidade de cada linha, serão deixadas ruas separadoras para facilitar o acesso às plantas.

Os protocolos dos ensaios são fornecidos no Anexo 5.

### F.4. Método de preparação e gestão do local de libertação, antes, durante e após a libertação, incluindo práticas de cultivo e métodos de colheita

Os locais serão preparados de acordo com as práticas agronómicas correntes para o cultivo de milho na área.

O semeador, bem como a máquina de colheita, se forem usadas, serão cuidadosamente limpas antes de serem retiradas do local de libertação.

De acordo com as necessidades do estudo, algumas amostras de tecidos de plantas serão recolhidas, manualmente ou usando uma máquina para o efeito.

Quando alguns grãos que precisarem de ser recolhidas para análise, será colhida a espiga inteira e os grãos que não forem utilizadas serão destruídos.

No fim da libertação, toda a matéria vegetal que permaneça, sem ter sido colhida para análises será destruída, cortando-a em pequenos pedaços e incorporando-a no solo em sulcos profundos. As linhas de bordadura semeadas com milho convencional, rodeando o local de ensaio, também serão destruídas no fim da libertação. Nenhuma planta ou produto vegetal proveniente dos ensaios entrará na alimentação ou cadeias alimentares. Depois da libertação, o terreno cultivado será visitado durante todo o ano seguinte, de forma a assegurar a remoção de infestantes, se existirem. Apesar dos grãos remanescentes não poderem geralmente sobreviver ao Inverno rigoroso, as que eventualmente sobreviverem, serão monitorizadas de forma a assegurar a sua destruição.

Nenhuma sementeira de milho comercial terá lugar no terreno, no ano seguinte.

#### **F.5. Número aproximado de plantas (ou plantas por m<sup>2</sup>)**

A densidade de plantas será de cerca de 80 000 plants/ha.

## **6. INFORMAÇÃO RELATIVA AO CONTROLO, MONITORIZAÇÃO, PÓS-LIBERTAÇÃO E PLANOS DE TRATAMENTO DE DESPERDÍCIOS**

### **G.1. Quaisquer precauções tomadas**

#### **6.1.1. Distância(s) relativas a espécies vegetais sexualmente compatíveis, quer selvagens, quer cultivadas**

Não existem espécies vegetais sexualmente compatíveis com elevada probabilidade de se cruzarem com o milho, na Europa.

#### **6.1.2. Quaisquer medidas para minimizar/prevenir a dispersão de qualquer órgão reproductivo da planta geneticamente modificada (por exemplo pólen, sementes, tubérculo)**

Será mantida uma distância de isolamento de 400m de qualquer outra colheita de milho não experimental. Adicionalmente, o local de testes será rodeado por 12 linhas de bordadura de milho convencional com ciclo vegetativo semelhante, que será destruída no fim do ensaio.

A dispersão dos grãos individuais não ocorre. Estes estão fixos e revestidos por muitas camisas que protegem as sementes do contacto exterior.

De acordo com as necessidades do estudo, serão recolhidas amostras de tecido. O milho colhido nestes ensaios não entrará na cadeia alimentar humana ou animal.

### **G.2. Descrição dos métodos para tratamento do local após a libertação**

No fim da libertação, toda a matéria vegetal que permaneça, sem ter sido colhida para análises será destruída, cortando-a os pedaços e incorporando-a no solo em sulcos profundos.

Apesar das infestantes não conseguirem, geralmente, sobreviver ao Inverno rigoroso, as que eventualmente sobreviverem, serão monitorizadas. O terreno será visitado regularmente durante o ano seguinte à libertação, de forma a assegurar a remoção de plantas infestantes, se estas surgirem.

Nenhuma sementeira de milho comercial terá lugar no terreno, no ano seguinte.

### **G.3. Descrição dos métodos de tratamento da matéria vegetal, incluindo desperdícios, após a libertação**

De acordo com as necessidades do estudo, algumas amostras de tecido vegetal serão recolhidas e analisadas. Os resíduos vegetais, produzidos pela libertação das plantas geneticamente modificadas (todas as partes vegetativas da planta e o grão, se existirem) serão destruídos, cortando-os aos pedaços e incorporados no solo em sulcos profundos. As linhas de bordadura, semeadas com milho convencional, rodeando o local de ensaio, também serão destruídos no fim da libertação.

O milho colhido nos ensaios não entrará na cadeia alimentar animal ou humana.

#### G.4. Descrição dos planos e técnicas de monitorização

Durante a libertação, os locais serão visitados regularmente, de acordo com as necessidades agronómicas e experimentais, e pelo menos uma vez de quatro em quatro semanas.

Estas visitas permitirão monitorizar o desenvolvimento das plantas e a ausência de dispersão do material a ser monitorizado.

Depois da libertação, o terreno será visitado de 2 em 2 meses durante todo o ano seguinte, de forma a monitorizar eventuais plantas voluntárias. Se elas surgirem, serão removidas manualmente ou destruídas com um tratamento com herbicida, exceptuando glifosato ou inibidores da ALS, antes de florirem. Adicionalmente, de forma a facilitar o controlo de potenciais plantas voluntárias, nenhuma sementeira de milho comercial terá lugar no terreno, no ano seguinte.

##### Plano de monitorização:

| <b>Pressupostos em que se baseia a avaliação de risco</b>   | <b>Observações efectuadas pelo notificador</b>   | <b>Frequência das observações</b>   |
|---|--|---|
| <b>Vigilância geral</b>   |  |   |
| Não há diferenças nos aspectos morfológicos das plantas   | Observações das características da planta, quando comparadas com o milho não modificado geneticamente  | Pelo menos uma vez de quatro em quatro semanas durante a libertação   |
| Não há diferenças no comportamento agronómico   | Observações da floração e aspecto da planta, em comparação com talhões de controlo   | Quando for preciso durante o período de floração e pelo menos uma vez de quatro em quatro semanas durante a libertação                            |
| Não há diferenças na dispersão dos grãos no ambiente  | Observação se as camisas protegem adequadamente os grãos do carolo   | Quando o grão atingir a maturação: pelo menos de duas em duas semanas   |
| Probabilidade negligenciável de se tornarem persistentes no ambiente ou invasivas, dando origem a qualquer infestação | Monitorização de planta voluntárias  | Pelo menos uma vez de dois em dois meses durante o ano seguinte à destruição do ensaio  |
| <b>Monitorização de casos específicos</b>   |  |   |
| Ausência de impacto no ambiente devido a interações com organismos não-alvo   | Observação de qualquer alteração no local de libertação  | Pelo menos uma vez de quatro em quatro semanas durante a libertação e uma vez de dois em dois meses durante o ano seguinte à destruição do ensaio |
| Ausência de efeitos adversos na saúde humana  | Qualquer ocorrência de problema na saúde humana relacionado com a libertação, por pessoa a trabalhar com e que entre em contacto com o milho GM, será notificado | A notificação, se necessária, deverá ser feita da sementeira à colheita   |

### Notificação

Informação relativa a qualquer efeito inesperado adverso, potencial, no ambiente e na saúde humana, directamente relacionado com as plantas de milho geneticamente modificado será comunicada à Autoridade Competente e as medidas necessárias serão implementadas de acordo com a situação.

Em qualquer caso, um relatório resumindo as observações durante a libertação de campo será submtido à Autoridade Competente, no fim da libertação.

### **G.5. Descrição de quaisquer planos de emergência**

A monitorização regular dos ensaios permitirá a identificação imediata de qualquer acontecimento ou desenvolvimento indesejado, devido a fenómenos externos, tais como condições climatéricas pouco favoráveis.

Em caso de qualquer emergência, a pessoa de contacto (ver Anexo 6) informará imediatamente a Autoridade Competente, encarregada de controlar os ensaios e eles decidirão que medidas será necessário aplicar.

No pior caso, o ensaio poderá ser parado através de destruição mecânica ou aplicação de herbicida, cuja acção não seja dependente de glifosato ou inibidores da ALS, e incorporação no solo através de sulcos profundos.

De qualquer forma, a avaliação do risco ambiental não identificou qualquer efeito adverso para a saúde humana e animal ou para o ambiente, proveniente da libertação deliberada do milho 98140.

### **G.6. Protecção do local de libertação**

Para além do isolamento de 400 metros referidos, os locais de ensaios serão rodeados por 12 linhas de bordadura de milho convencional com ciclo vegetativo semelhante, que será destruída no fim da libertação.

## **7. INFORMAÇÃO RELATIVA AO POTENCIAL IMPACTO AMBIENTAL DA LIBERTAÇÃO DE PLANTAS SUPERIORES GENETICAMENTE MODIFICADAS (PSGM)**

### **H.1. Probabilidade das PSGM se tornarem mais persistentes que as plantas receptora ou parental em habitats de cultivo ou mais invasivas em habitats naturais**

Existe uma probabilidade negligenciável de o milho 98140 se tornar persistente ou invasivo no ambiente, dando origem a qualquer infestação. O milho não possui quaisquer características necessárias para se tornar infestante e a expressão das proteínas GAT4621 e ZM-HRA não modifica este facto.

As características necessárias para causar infestação têm sido geralmente descritas como

- 1) capacidade da semente da infestante germinar em vários ambientes diferentes;
- 2) germinação descontínua e grande longevidade da semente;
- 3) crescimento rápido desde a fase vegetativa até à floração;
- 4) produção contínua de sementes enquanto as condições de crescimento o permitirem
- 5) auto-compatibilidade, mas parcialmente autogâmicas e apomíticas;
- 6) capacidade de polinização cruzada por visitantes não especializados ou através do vento;
- 7) elevado rendimento na produção de sementes em ambientes e produção moderada numa vasta gama de ambientes;
- 8) adaptação a curtas e longas distâncias de dispersão;
- 9) produção ou regeneração vegetativa a partir de fragmentos e dificilmente removíveis do solo;
- 10) capacidade de competir com outras espécies através de meios especiais.

O milho não apresenta as características infestantes mencionadas acima e assim não é invasivo em ecossistemas naturais. Algumas espécies de milho desenvolvem-se com sucesso em ambientes selvagens na América Central, mas não apresentam tendências infestantes acentuadas. O milho está de tal forma domesticado, que as sementes não podem ser separadas do carolo e disseminadas, sem intervenção humana. O milho é uma cultura anual, que geralmente não sobrevive na Europa de uma época de colheita, para a seguinte, devido à fraca capacidade de dormência e sensibilidade a baixas temperaturas. Apesar da sua natureza não-dormente, a semente de milho pode ocasionalmente persistir de uma época de colheita para a seguinte, em condições climáticas favoráveis. Quando se verificam condições adequadas de temperatura e humidade, a semente germina, mas não consegue sobreviver ao rigor do Inverno. Em qualquer caso, estas plantas voluntárias são facilmente identificadas e controladas manualmente ou através de meios químicos.

**Em caso de libertação indesejada do milho 98140, as medidas agronómicas, actualmente em vigor para controlar qualquer espécie de milho comercial podem ser aplicadas, tais como a remoção manual ou mecânica, ou o uso selectivo de herbicidas (com excepção de glifosato e herbicidas inibidores da ALS).**

### **H.2. Qualquer vantagem ou desvantagem selectiva conferida à PSGM**

Como pretendido e quando cultivado, a expressão das proteínas GAT4621 e ZM-HRA, no milho, pode conferir vantagem em ambientes de cultivo, devido à tolerância ao glifosato e a uma gama de herbicidas inibidores da ALS, tais como sulfonilureias. No entanto, uma vez que o milho é altamente domesticado e tem fracas características que lhe permitam sobreviver em condições europeias, não se pode estabelecer como uma

espécie selvagem em ambientes de cultivo. As vantagens específicas, presentes no milho 98140, não lhe conferem qualquer vantagem em relação às plantas fora do ambiente de cultivo.

### **H.3. Potencial para transferência genética para a mesma ou outra espécie vegetal sexualmente compatíveis, em condições de plantação da PSGM e qualquer vantagem ou desvantagem selectiva, conferida a essas espécies vegetais**

Na EU, não se conhecem quaisquer espécies sexualmente compatíveis, selvagens ou infestantes, parentes da *Zea mays*, o que elimina qualquer possibilidade de transferência genética para tal espécie. As possibilidades de transferência genética, estão assim circunscritas a outros tipos de milho cultivado. No entanto, esta possibilidade será consideravelmente reduzida pelas condições dos ensaios, já que uma distância de isolamento de 400 metros será mantida entre o milho 98140 e qualquer outra cultura de milho não-experimental. Adicionalmente, o local de ensaio será rodeado por 12 linhas de bordadura de milho convencional com ciclo vegetativo semelhante, que será destruída no fim do ensaio. Toda a matéria vegetal restante, que não tenha sido colhida para análises, será desfeita e incorporada no solo

Como foi discutido no ponto H.2. acima, a modificação genética no milho 98140 não introduz qualquer vantagem selectiva a plantas que se desenvolvam fora de meios de cultivo, extensamente trabalhados.

### **H.4. Impacto ambiental potencial, imediato e/ou retardado, resultante de interacções directas ou indirectas entre a PSGM e organismos alvo, tais como predadores, parasitoides e organismos patogénicos (se aplicável)**

Não se espera nenhum impacto ambiental potencial, imediato e/ou retardado, resultante de interacções directas ou indirectas da PSGM e organismos alvo no ambiente receptor, causado pela libertação deliberada do milho 98140 milho que foi geneticamente modificado apenas para tolerar a aplicação de herbicidas, como o glifosato e herbicidas inibidores da ALS, tais como as sulfonilureias, com vista à eliminação de plantas infestantes da cultura de milho.

### **H.5. Possível impacto imediato e/ou retardado, resultante de interacções directas ou indirectas entre a PSGM e organismos não-alvo (também tendo em conta organismos que interagem com organismos alvo), incluindo impacto nos níveis da população de competidores, herbívoros, simbioses (onde aplicável), parasitas e organismos patogénicos**

Não se espera nenhum impacto ambiental potencial, imediato e/ou retardado, resultante de interacções directas ou indirectas da PSGM e organismos não-alvo no ambiente receptor, causado pela libertação deliberada do milho 98140.

### **H.6. Possíveis efeitos imediatos e/ou retardados na saúde humana resultantes de interacções directas ou indirectas entre a PSGM e pessoas a trabalhar com, que entrem em contacto com, ou na proximidade da libertação da PSGM**

Não se considera que o milho tenha qualquer efeito nocivo na saúde humana. Adicionalmente, o milho tem uma longa história de uso seguro na alimentação humana e em rações animais. O milho 98140 não introduz nenhum composto novo que se saiba que causa, ou preveja que cause, efeitos imediatos e/ou retardados na saúde humana, resultantes de interações directas ou indirectas entre a PSGM e pessoas a trabalhar com, que entrem em contacto com, ou na proximidade de ensaios contendo milho 98140.

Além disso, a colheita resultante da libertação não entrará na cadeia alimentar. No fim da libertação, toda a matéria vegetal que permaneça será destruída e incorporada no solo em sulcos profundos.

#### **H.7. Possíveis efeitos imediatos e/ou retardados na saúde animal e consequências para a cadeia alimentar, resultantes do consumo do OGM e de quaisquer produtos derivados deste, se se pretender usá-lo em rações animais**

Não se pretende usar as plantas de milho a que se refere a corrente libertação em rações animais. A colheita resultante da libertação não entrará na cadeia alimentar animal. Todo o material que permaneça no campo, após a colheita será destruído e incorporado no solo em sulcos profundos.

#### **H.8. Possíveis efeitos imediatos e/ou retardados em processos biogeoquímicos resultantes de interações potenciais, directas ou indirectas entre o OGM e organismos alvo e não-alvo na proximidade da libertação do OGM**

Como foi referido nos Pontos H.4 e H.5 acima, não se prevê que a expressão das proteínas GAT4621 e ZM-HRA no milho 98140 cause possíveis efeitos imediatos e/ou retardados em processos biogeoquímicos resultantes de interações potenciais, directas ou indirectas entre o OGM e organismos alvo e não-alvo na proximidade da libertação do milho 98140.

#### **H.9. Possíveis impactos ambientais, imediatos e/ou retardados, directos ou indirectos, resultantes das técnicas específicas de cultivo, tratamento e recolha, utilizadas para a PSGM, nos casos em que são diferentes das que são utilizadas para plantas superiores não modificadas geneticamente**

As técnicas específicas de cultivo, manejo e colheita utilizadas para o milho 98140 são idênticas às que são utilizadas para o milho não modificado geneticamente, com excepção do regime de herbicida e medidas de protecção (distância de isolamento e linhas de bordadura). Não se prevê que estas causem possíveis impactos ambientais, imediatos e/ou retardados, directos ou indirectos.

De acordo com as necessidades dos estudos, algumas amostras de tecido das plantas serão

colhidas, manualmente ou usando máquinas especiais de colheita.. Quando for necessário colher alguns grãos para análise, isto será feito por amostragem de toda a espiga, sendo destruídas e incorporadas no solo os grãos que não forem utilizadas. No fim da libertação, toda a matéria vegetal que permaneça, sem ter sido colhida para análises será destruída cortando-as aos pedaços e incorporada no solo em sulcos profundos. As linhas de bordadura, semeadas com milho convencional, rodeando o local de ensaio também serão destruídas no fim da libertação. Nenhuma planta ou produto vegetal proveniente dos ensaios entrará nas cadeias alimentares animal ou humana.

Depois da libertação, o terreno cultivado será visitado durante todo o ano seguinte, de forma a assegurar a remoção de plantas que surjam espontaneamente, se existirem. Apesar das plantas espontâneas não poderem geralmente sobreviver ao Inverno rigoroso, as que eventualmente sobreviverem, serão monitorizadas de forma a assegurar a sua destruição. Nenhuma cultura de milho comercial será semeado na mesma parcela de terreno, no ano seguinte

## REFERÊNCIAS

- Canadian Food Inspection Agency (1994) Regulatory Directive 94-11: The Biology of *Zea mays* L. (Corn/Milho). CFIA, Variety Section, Plant Health and Production Division, Plant Biotechnology Office, Ottawa
- Castle, L.A., Siehl, D.L, Gorton, R., Patten, P.A, Hong Chen, Y., Bertain, S., Cho, H-J., Duck, N., Wong, J., Liu, D. and Lassner M.W. (2004) Discovery and directed evolution of a glifosato tolerância gene. *Science*, 304: 1151-1154.
- Craig, W.F. (1977) Production of hybrid corn seed. *In: Corn and Corn Improvement*, Sprague, G.F. (ed). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc. and Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin, pp.671-719.
- Del Valle, F.R., Pico, M.L., Camacho, J.L. and Bourges, H. (1983) Effect of processing parameters on trypsin inhibitor and lectin contents of tortillas from whole raw corn-soybean mixtures. *J. Food Sci.*, 48, pp. 246-252.
- Herrero, M.P. and Johnson, R.R. (1980) High temperature stress and pollen viability of milho. *Crop Science*, 20:796-800.
- Hoekstra, F.A., Crowe, L.M. and Crow J.H. (1989) Differential desiccation sensitivity of corn and *Pennisetum* pollen linked to their sucrose contents. *Plant, Cell and Environment*, 12:83-91.
- Jones, M.D. and Newell, L.C. (1948) Longevity of pollen and stigmas of grasses: buffalograss, *Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm. and corn, *Zea Mays* L. *Journal of American Society of Agronomy*, 40:195-204.
- Lonnquist, J.H. and Jugenheimer, R.W. (1943) Factors affecting the success of pollination in corn. *Journal of the American Society of Agronomists*, 35:923-933.
- Raynor, G.S., Ogden, E.C. and Hayes, J.V. (1972) Dispersion and deposition of corn pollen from experimental fontes. *Agronomy J.*, 64, pp. 420-427
- Rossman, E.C. (1949) Freezing injury of inbred and hybrid milho seed. *Agronomy Journal*, 41:574-583.
- Shaw, R.H. (1988) Climate requirement. *In: Corn and Corn Improvement*, Sprague, G.F. and Dudley, J.W. (eds). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc. and Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin, pp.609-638.
- Wych, R.D. (1988) Production of hybrid seed corn. *In: Corn and Corn Improvement*, Sprague, G.F. and Dudley, J.W. (eds). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc. and Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin, pp.603-608.