

**Notificação para
a libertação deliberada
multi-anual de plantas
geneticamente modificadas:**

**DOSSIER TÉCNICO PARA TESTAR
VARIETADES DE MILHO RESISTENTES A
CERTOS INSECTOS COLEÓPTEROS
LEPIDÓPTEROS E TOLERANTES A DOIS
HERBICIDAS**

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



ÍNDICE

DOSSIER TÉCNICO

SUMÁRIO	3
INTRODUÇÃO.....	5
A. INFORMAÇÃO GERAL.....	7
B. INFORMAÇÃO RELACIONADA COM (A) A PLANTA TRANSFORMADA OU (B) (QUANDO APROPRIADO) AS LINHAS PARENTAIS (PROGENITORES).....	8
C. INFORMAÇÃO RELACIONADA COM A MODIFICAÇÃO GENÉTICA	11
D. INFORMAÇÃO RELACIONADA COM A PLANTA GENETICAMENTE MODIFICADA.....	11
E. INFORMAÇÃO RELACIONADA COM O LOCAL DE ENSAIO.....	11
F. INFORMAÇÃO RELACIONADA COM O ENSAIO (SOMENTE PARA NOTIFICAÇÕES SUBMETIDAS DE ACORDO COM OS ARTIGOS 6 E 7) ..	12
G. INFORMAÇÃO SOBRE O CONTROLO, MONITORIZAÇÃO PÓS-COLHEITA E PLANOS DE TRATAMENTO DOS RESÍDUOS.....	14
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA	16
ANEXO 1 Análise molecular das inserções.....	Erreur ! Signet non défini.
ANEXO 2 Protocolo de ensaios	Erreur ! Signet non défini.

AVALIAÇÃO DO RISCO AMBIENTAL

AVALIAÇÃO DO RISCO AMBIENTAL PARA O REGISTO SEGURO DO MILHO GENETICAMENTE MODIFICADO	19
---	-----------

SUMÁRIO

Notificador: Pioneer Hi-Bred Sementes de Portugal

Título: Programa de ensaios de campo para testar variedades de milho geneticamente modificadas, resistentes a alguns insectos Coleópteros e lepidópteros e tolerantes a dois herbicidas.

Motivo da transformação:

Usando métodos tradicionais de melhoramento nas descendências dos milhos geneticamente modificados 59122, 1507 e NK603, obteve-se milho resistente a alguns insectos coleópteros, a certos insectos lepidópteros e tolerantes a glufosinato e glifosato (59122x1507xNK603; o identificador associado da OECD é DAS-59122xDAS-Ø15Ø7-1xMON-ØØ6Ø3-6).

As linhas de milho usadas foram as seguintes:

- milho 59122 (identificador associado da OECD –DAS-59122-7)
- milho 1507 (identificador associado da OECD –DAS-)
- milho NK603 (identificador associado da OECD –MON-)

Espécie receptora:

Zea mays L.

Gene(s) de interesse introduzidos e sequências de controle:

- gene *cry34Ab1*, promotor UBIZM1(2), terminador PINII.
- gene *cry34Ab1*, promotor Peroxidase, terminador PINII.
- gene *pat*, promotor CaMV35S, gene terminador CaMV35S
- gene *cry1F* (versão truncada), promotor UBIZM1(2), e gene terminador ORF25PolyA.
- gene *pat*, promotor CaMV35S e gene terminador CaMV35S.
- gene *cp4epsps*, intrão *P-ract1/ract1 + ctp2*, terminador *NOS 3'*.
- gene *cp4epsps*, promotor CaMV *e35S + Zmhsp70 + ctp2*, terminador *NOS 3'*.

Duração do projecto:

4 anos

Local dos ensaios:

Em 2005, os locais de experimentação serão no Ribatejo, em Vila Nova, Vilar, Cadaval (Vale Poços, Sociedade Agrícola, Lda) e Entre Douro e Minho, Vila Nova de Muia, Ponte da Barca (Campo de Padrenda, lugar de Padin, António Joaquim Gomes Marques)

Precauções:

O fluxo de pólen das plantas geneticamente modificadas será controlado por uma distância de isolamento de 200m, a outros campos de milho não-experimental. O local de ensaio será também rodeado por 4 linhas de bordadura com uma variedade convencional com ciclo vegetativo semelhante que será destruída no fim do ensaio.

Resumo de antecedentes (factores relevantes):

A Pioneer começou a testar o híbrido 59122x1507xNK603 em 2003. Estas variedades de milho geneticamente modificadas têm estado a ser sujeitas a ensaios de campo conduzidos nas principais regiões produtoras de milho dos USA, Canadá e Chile desde 2003. Na Europa foram conduzidos ensaios de campo em 2004.

Objectivo do ensaio:

O objectivo do ensaio em 2005 é avaliar o comportamento residual do glufosinato e do glifosato no milho 59122x1507xNK603, após aplicações dos herbicidas Liberty^{®11} e Roundup WeatherMax^{®22} por determinação da magnitude de resíduos. O objectivo destes ensaios será suportar o registo dos herbicidas Liberty[®] e Roundup WeatherMax[®] para o milho 59122X 1507xNK603.

Número e superfície dos ensaios:

Cada ensaio em 2005 ocupará uma área até 300m² semeados coma as plantas geneticamente modificadas consideradas nesta aplicação. A superfície total do ensaio (todas as variedades e bordaduras incluídas) será superior.

Nos anos seguintes, poderão ser instalados, 4 ensaios de campo ocupando cada um uma área até 1000m², semeados com o milho geneticamente modificado considerado nesta aplicação.

¹ Liberty[®] é a marca comercial registada pela Bayer CropScience

² Roundup Weather Max[®] é a marca comercial registada pela Monsanto Company

INTRODUÇÃO

Os insectos lepidópteros, tais como *Ostrinia nubilalis* e Coleópteros tais como, *Diabrotica virgifera virgifera* e *Diabrotica barberi*, representam pragas importantes na cultura do milho.

Atacando o colmo e as espigas, as larvas de *Ostrinia nubilalis* causam importantes danos nas plantas resultando em prejuízos na colheita. Alimentando-se nas raízes do milho, escavando buracos e túneis, as larvas de *Diabrotica* spp. causam igualmente danos importantes na colheita. Os meios de combate correntemente disponíveis contra estas larvas incluem o uso de insecticidas químicos bem como a rotação de culturas no caso da *Diabrotica* spp. Estes meios somente permitem que as populações de *Ostrinia* e *Diabrotica*, reduzam os danos na cultura do milho, mas não eliminam as pragas. Sendo assim, a insistência de áreas com monocultura de milho é suficiente para manter grandes populações de *Diabrotica* e assim, permitir a sua reprodução e aumento das zonas infestadas. A melhor forma de combater estas pragas no milho é através do uso de milhos geneticamente modificados resistentes às referidas pragas.

O híbrido geneticamente modificado 59122x1507xNK603 que será testado nos ensaios propostos deriva, através de métodos de melhoramento genético tradicionais, entre as descendências dos milhos geneticamente modificados 59122, 1507 e NK603, que contém genes em cada um dos milhos: *cry34Ab1*, *cry35Ab1*, *cry1F*, *cp4epsps* e *pat*

O gene *cry1F*, isolado do *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai*, que codifica uma delta endotoxina que tem sido demonstrado ser especificamente efectiva no controlo de certos insectos lepidópteros no seu estado larvar.

O genes *cry34Ab1* e *cry35Ab1*, isolados do *Bacillus thuringiensis* estirpe 149B1, que codificam proteínas com propriedades insecticidas, que quando combinadas, actuam especificamente em espécies alvo de larvas de insectos que se alimentam de raiz do milho. Graças ao uso de variedades de milho geneticamente modificado, o aparecimento de novas zonas de infestação será evitado.

Além disso, estas variedades de milho geneticamente modificadas permitem o combate às infestantes com o herbicida glufosinato de amónio. O gene *pat* inserido como marcador seleccionado codifica para a proteína fosfinotricina acetiltransferase (PAT), a qual acetila a fosfinotricina, o ingrediente activo do glufosinato de amónio. A fosfinotricina é activa nas plantas não transgénicas pela ligação com a glutamina sintetase evitando a destoxificação do excesso de amónia resultando na morte das plantas. A acetilação através da proteína PAT converte a fosfinotricina numa forma inactiva não tóxica para as plantas transgénicas de milho. A destoxificação da amónia pode continuar conferindo às plantas geneticamente modificadas, tolerância ao glufosinato de amónio, um herbicida de largo espectro, não selectivo e não sistémico. Adicionalmente estas variedades de milho geneticamente modificadas permitem o uso do herbicida glifosato. O glifosato nas plantas não transgénicas, mata as plantas pela inibição da enzima EPSPS (5-enolpiruvilshikimato-3 fosfato sintase) que catalisa, nas plantas uma etapa critica na biossíntese dos aminoácidos aromáticos. O gene *cp4epsps* inserido nas plantas geneticamente modificadas codifica para a enzima CP4 EPSPS que confere tolerância ao glifosato. Assim, a biossíntese dos aminoácidos aromáticos, nas plantas transgénicas não é interrompida apesar da presença do glifosato, permitindo que o desenvolvimento destas plantas continue. O glifosato é um herbicida de largo espectro, não selectivo e sistémico.

Estas variedades de milho geneticamente modificadas são uma importante ferramenta que se pode pôr à disposição da agricultura em ordem a combater eficientemente os danos causados por alguns insectos Lepidópteros e certos insectos Coleópteros nas plantas do milho e ainda permitir o uso, na cultura do milho, de herbicidas de largo espectro glufosinato de amónio e glifosato.

O objectivo deste ensaio é avaliar o comportamento residual do glufosinato de amónio e glifosato no híbrido 59122x1507xNK603, após aplicações de Liberty^{®1} e Roundup WeatherMax^{®2} para suportar os registos desses herbicidas para o referido híbrido de milho.

¹ Liberty[®] is a registered trademark of Bayer CropScience

² Roundup Weather Max[®] is a registered trademark of Monsanto Company

A. INFORMAÇÃO GERAL

1. Nome e morada do proponente :

Pioneer Hi-Bred Sementes de Portugal, S.A.
Campo Pequeno, 48 – 6º Esq
Edifício Taurus
1000-081 Lisboa

2. Nome, qualificação e experiência do técnico(s) responsável

Cada ensaio será supervisionado por um Engº Agrónomo

3. Título do Projecto

Programa de ensaios de campo para testar a variedade de milho geneticamente modificado resistente a alguns insectos Coleópteros e Lepidópteros e tolerantes aos herbicidas glufosinato e glifosato.

B. INFORMAÇÃO RELACIONADA COM (A) A PLANTA TRANSFORMADA OU (B) (QUANDO APPROPRIADO) AS LINHAS PARENTAIS (PROGENITORES)

1. Descrição:

- a) Família: Gramineae
- b) Género: *Zea*
- c) Espécie: *mays* ($2n = 20$)
- d) Subespécie: nenhuma
- e) Cultivar/linha: variedades experimentais
- f) Nome comum: Milho

2. Reprodução / compatibilidade sexual

a) Informação referente 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 maçarocas (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 (se existir)

O desenvolvimento da bandeira, o aparecimento das barbas e a polinização são os estádios mais críticos do desenvolvimento do milho. A produção de grão é 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 varia de curto com 10 semanas até longo com 48 semanas, da emergência das plantas até à maturação (Shaw, 1988). Esta variabilidade na duração do ciclo permite que o milho seja cultivado numa gama variada de condições climáticas.

Nas condições Europeias, a sementeira ocorre de 15 de Abril a 15 de Maio e a colheita desde o início de Setembro (para o milho usado como forragem) até meados de Dezembro (para os milhos de ciclo longo, para grão).

b) Compatibilidade sexual com outras espécies cultivadas ou selvagens incluindo a distribuição de espécies compatíveis na Europa.

Não é possível a hibridação inter-específica na Europa devido à ausência de espécies afins no território.

3. Sobrevivência

a) Capacidade de formar estruturas para sobrevivência ou dormência

O milho é uma espécie vegetal anual, não-dormente, sendo as sementes as únicas estruturas de sobrevivência. A sobrevivência da semente do milho está dependente da temperatura, da humidade, do genótipo, da protecção da maçaroca e do estágio de desenvolvimento (Rossman, 1949). Como regra geral, só os grãos conservados nas espigas por debulhar serão capazes de conservar a capacidade de germinação para o ano próximo.

b) Factores específicos que afectam a sobrevivência (se houver)

Em geral, não existe germinação na espiga de milho. Quando esse fenómeno ocorre nos dias que se seguem à colheita as novas plantas são destruídas pelo frio. Assim, essas plantas nunca alcançam o estágio reprodutivo.

Temperaturas muito baixas têm um efeito adverso na germinação do milho, constituindo o maior risco na produção de semente do milho (Wych, 1988). Por outro lado, temperaturas superiores a 45°C causam grandes danos na viabilidade da semente do milho (Craig, 1977).

4. Disseminação

A disseminação pode ocorrer pelo pólen ou pelas sementes.

a) Formas e extensão (e.g. estimativa de como a viabilidade do pólen e/ou sementes diminuem com a distância) da disseminação

O milho na Europa é uma espécie agrícola, sendo que a sua disseminação só ocorre por sementeira nos solos aráveis dedicados à agricultura.

Se o pólen viável oriundo de plantas geneticamente modificadas pode ser transportado pelo vento atingindo estigmas receptivos durante os 30 minutos que constituem o seu período de viabilidade, pode ocorrer transferência de pólen. Este fenómeno torna-se menos realista à medida que a distância ao campo de milho transgénico aumenta. Deixa de ocorrer quando atinge 200m, distância reconhecida e autorizada para a produção de semente de acordo com as normas internacionais de pureza (normas de certificação da OCDE).

b) Factores específicos que afectam a disseminação (se houver)

O pólen liberta-se da inflorescência masculina por gravidade e pelo vento. A dispersão começa dois ou três dias antes de aparecerem os estigmas. As flores masculinas podem ter uma duração entre 6 a 10 dias.

A dispersão de semente é geralmente limitada aos campos cultivados. De facto, as propriedades inerentes à espécie, como a protecção da espiga que está coberta e a inserção de grãos individuais na maçaroca (estrutura rígida central da espiga), reduzem a possibilidade de dispersão natural das sementes. A sobrevivência da semente do milho é largamente limitada pela sua sensibilidade a doenças e ao frio. Assim, não existe geralmente, germinação na espiga.

5. Distribuição geográfica da planta

O milho não é uma espécie indígena de Portugal nem dos outros países da Europa. É uma espécie originária da América Central. É a 3ª espécie de cereais mais cultivada no mundo.

6. No caso de espécies vegetais não oriundas de nenhum Estado Membro, descrição do habitat natural da planta, incluindo informação sobre predadores naturais, parasitas, competidores e simbioses

O milho é uma espécie originária da América Central que não pode crescer abaixo de 9-10°C, situando-se a sua temperatura óptima de crescimento entre 30 e 33°C. Em condições de clima Continental (Canadá, Rússia), o milho é cultivado até ao paralelo 60. O milho pode crescer na maioria dos países Europeus.

O milho é susceptível a uma gama de doenças provocadas por fungos (Antracnose, Helmintosorrose, Fusário, Morrão, Crazy top) e a pragas (*Atomaria lineari*, *Blaniulus guttulatus*, *Scutigerella immaculata*, *Tipula paludosa*, *Agrotis ipsilon*, *Sesamia nonagrioides*, *Ostrinia nubilalis*, *Diabrotica virgifera virgifera*, *Diabrotica barberi*, *Rhopalosiphum maidis*), assim como, sobre competição com infestantes.

7. Outras interações potenciais, relevantes para OGM da planta com organismos do ecossistema onde normalmente cresce, incluindo informação sobre efeitos tóxicos em humanos, animais e outros organismos

O milho interactua com outros organismos naturais incluindo insectos, aves e mamíferos.

O milho é extensivamente cultivado tendo uma história de segurança no seu uso. Não é considerado perigoso nem susceptível de causar efeitos tóxicos em humanos, animais ou outros organismos (Del Valle *et al.*, 1983).

C. INFORMAÇÃO RELACIONADA COM A MODIFICAÇÃO GENÉTICA

Esta secção é considerada matéria Confidencial

D. INFORMAÇÃO RELACIONADA COM A PLANTA GENETICAMENTE MODIFICADA

Esta secção é considerada matéria Confidencial

E. INFORMAÇÃO RELACIONADA COM O LOCAL DE ENSAIO

1. Localização e área do(s) ensaio(s)

Em 2005, os locais de experimentação serão no Ribatejo, em Vila Nova, Vilar, Cadaval (Vale Poços, Sociedade Agrícola, Lda) e Entre Douro e Minho, Vila Nova de Muia, Ponte da Barca (Campo de Padrenda, lugar de Padin, António Joaquim Gomes Marques)

Em 2005, o ensaio com o híbrido 59122x1507xNK603, poderá ocupar uma área até 300 m² em cada local. A superfície total (variedades e bordaduras) em cada local será de aproximadamente 800 m².

Nos anos seguintes o híbrido 59122x1507xNK603 poderá ser cultivado em 4 locais, ocupando em cada um cerca de 1000 m².

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

Os locais de ensaio situam-se em zonas tradicionais da cultura do milho. A fauna e a flora não apresentam características especiais. Os campos são instalados em locais fora de zonas protegidas.

3. Presença de espécies selvagens ou cultivadas sexualmente compatíveis

Não existem, na Europa, espécies relacionadas sexualmente compatíveis com o milho.

4. Proximidade de biotopos oficialmente reconhecidos ou áreas protegidas que possam ser afectadas

Não existem biotopos oficialmente reconhecidos ou zonas protegidas cerca das zonas agrícolas onde se localizam os lugares escolhidos para os ensaios.

F. INFORMAÇÃO RELACIONADA COM O ENSAIO (SOMENTE PARA NOTIFICAÇÕES SUBMETIDAS DE ACORDO COM OS ARTIGOS 6 E 7)

1. Objectivo do ensaio

O objectivo do ensaio em 2005 é avaliar o comportamento residual do glufosinato e glifosato no milho 59122x1507xNK603, após aplicações dos herbicidas Liberty^{®1} e Roundup WeatherMax^{®2} em doses máximas, por avaliação da magnitude dos resíduos. O objectivo destes ensaios é suportar o registo dos herbicidas Liberty[®] e Roundup WeatherMax[®] para o milho 59122x1507xNK603.

2. Data(s) e duração prevista para os ensaios

O plano é conduzir o ensaio durante 4 campanhas do milho:

Quadro 4:

CAMPANHA	ESTAÇÃO DE CRESCIMENTO
2005	Início de Abril – meados de Dezembro
2006	Início de Abril – meados de Dezembro
2007	Início de Abril – meados de Dezembro
2008	Início de Abril – meados de Dezembro

3. Métodos de ensaio das plantas geneticamente modificadas

A sementeira será realizada grão a grão, em linhas separadas de 70 a 80cm. Cada linha terá um comprimento aproximado de 20m e o espaço entre sementes será de aproximadamente 25cm. Na extremidade de cada linha ficará um espaço livre para facilitar o acesso.

O protocolo do ensaio é descrito no Anexo 2.

4. Método para preparação e maneiio do local de ensaio, antes, durante e após o ensaio, incluindo práticas culturais e métodos de colheita

Serão utilizados os métodos usuais de preparação do solo e práticas culturais de modo a assegurar o desenvolvimento adequado do milho.

Nas condições deste estudo, todas as amostras serão colhidas manualmente. No final, toda a biomassa que não for recolhida para análises será destruída por trituração e incorporada no solo.

¹ Liberty[®] é a marca comercial registada da Bayer CropScience

² Roundup Weather Max[®] é a marca comercial registada da Monsanto Company

5. Número de plantas aproximado (ou plantas por m²)

A densidade de plantas será de aproximadamente de 60 000 plantas/ha.

G. INFORMAÇÃO SOBRE O CONTROLO, MONITORIZAÇÃO PÓS-COLHEITA E PLANOS DE TRATAMENTO DOS RESÍDUOS

1. Precauções tomadas:

a)Distancia(s) de espécies sexualmente compatíveis, quer selvagens quer cultivadas

Não existem, na Europa, espécies sexualmente compatíveis com o milho.

b)Medidas para minimizar/prevenir a dispersão de qualquer órgão reprodutivo da planta geneticamente modificada (por exemplo, pólen, sementes, tubérculos)

Será mantida uma distância de 200m de isolamento entre o milho transgénico e outros campos de milho não –experimentais. Adicionalmente, o ensaio será rodeado de 4 linhas de bordadura de milho convencional de ciclo vegetativo semelhante que será igualmente destruído no final.

A dispersão de sementes individuais não ocorre, pois estão fixas à maçaroca e cobertas. Estão por isso, protegidas do contacto com o exterior.

Para este ensaio, os grãos são colhidos para efeitos de análise. Este processo será realizado por amostragem da espiga completa. Os grãos não utilizados em análise serão destruídos, não entrando por isso na cadeia de alimentação humana ou animal.

2. Descrição dos métodos do tratamento do local post-ensaio

No final do ensaio, toda a biomassa que não for recolhida para análises será destruída por trituração e incorporação no solo. Plantas de milho que possam emergir após o ensaio serão destruídas por aplicação de um herbicida adequado (outro que não seja o glufosinato de amónio ou glifosato).

3. Descrição dos métodos de tratamento post-ensaio para as plantas geneticamente modificadas incluindo os resíduos

O material recolhido para análise será enviado para França.

Os resíduos produzidos pelas plantas geneticamente modificadas serão destruídos e incorporados no solo.

Depois do ensaio a parcela será visitada regularmente durante o ano seguinte, para controlar possíveis plantas de milho que eventualmente apareçam. A próxima utilização do solo com culturas diferentes do milho, será conduzida na forma usual, particularmente com o uso de herbicidas diferentes de glufosinato de amónio ou glifosato.

4. Descrição dos planos e técnicas de monitorização

Os locais serão visitados regularmente para acompanhamento das necessidades agronómicas e experimentais.

Essas visitas serão também utilizadas para controlar o desenvolvimento das plantas e a dispersão de material.

5. Descrição dos planos de emergência

A regular monitorização dos campos permitirá a imediata identificação de acontecimentos estranho.

No caso de acontecer alguma emergência o ensaio poderá ser imediatamente destruído pela aplicação de herbicidas diferentes de glufosinato de amónio ou glifosato ou por destruição mecânica e incorporação no solo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

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.

EFSA opinion (November 25, 2003). Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on a request from the Commission related to the safety of foods and food ingredients derived from herbicide-tolerant genetically modified maize NK603, for which a request for placing on the market was submitted under Article 4 of the Novel Food Regulation (EC) N°258/97 by Monsanto (Question N°ESFA-Q-2003-002). *The EFSA Journal*, 9: 1-14. <http://www.efsa.eu.int>

EFSA opinion (November 25, 2003). Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on a request from the Commission related to the Notification (Reference CE/ES/00/01) for the placing on the market of herbicide-tolerant genetically modified maize NK603, for import and processing, under Part C of Directive 2001/18/EC from Monsanto (Question N°ESFA-Q-2003-003). *The EFSA Journal*, 10: 1-13. <http://www.efsa.eu.int>

EFSA opinion (September 24, 2004). Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on a request from the Commission related to the Notification (Reference C/NL/00/10) for the placing on the market of insect-tolerant genetically modified maize 1507, for import and processing, under Part C of Directive 2001/18/EC from Pioneer Hi-Bred International/Mycogen Seeds (Question No EFSA-Q-2004-011). *The EFSA Journal*, 124: 1-18. <http://www.efsa.eu.int>.

Evans, S.L. (1998) Equivalency of microbial and maize expressed Cry1F protein; characterization of test substances for biochemical and toxicological studies. Study number MYCO98-001. Unpublished technical report. Mycogen c/o Dow AgroSciences LCC.

FDA (1992). Statement of policy: Foods derived from new plant varieties. *Fed Reg.*, 57, 104, pp22984-23005.

Herrero, M.P. and Johnson, R.R. (1980) High temperature stress and pollen viability of maize. *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.

Moellenbeck, D.J., Peters, M.L., Bing, J.W., Rouse, J.R., Higgins, L.S, Sims, L., Nevshemal, T., Marshall, L., Ellis, R.T., Bystrak, P.G., Lang, B.A., Stewart, J.L., Kouba, K., Sondag, V., Gustafson, V., Nour, K., Xu, D., Swenson, J., Zhang, J., Czaplá, T., Schwab, G., Jayne, S., Stockhoff, B.A., Narva, K., Schnepf, H.E., Stelman, S.J., Poutre, C., Koziel, M. and Duck, N. (2001). Insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* protect corn from corn rootworms. Nat Biotechnol.,19 (7): 668-72.

Rossmán, E.C. (1949) Freezing injury of inbred and hybrid maize seed. Agronomy Journal, 41:574-583.

SCP (1998) Opinion of the Scientific Committee on Plants regarding “submission for deliberate release of glufosinate tolerant corns (*Zea mays*) transformation event T25” by the AgrEvo Company (Notification C/F/95/12/07).

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.

Wolfersberger, M.G., Hofmann, C. and Luthy, P. (1986) Interaction of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin with membrane vesicles isolated from lepidopteran larval mid-gut. *In*: Bacterial protein toxins, Falmagne, P., Fehrenbech, F.J., Jeljaszewics, J. and Thelestam, M. (eds). Gustav Fischer, New York, pp.237-238.

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.

**AVALIAÇÃO DO RISCO AMBIENTAL PARA O
REGISTO SEGURO DO MILHO 59122x1507xNK603**

AValiação DO RISCO AMBIENTAL PARA O REGISTO SEGURO DO MILHO 59122X1507XNK603

Esta notificação serve para consentir o registo seguro do milho 59122x1507xNK603 que expressa as proteínas Cry34Ab1, Cry35Ab1, Cry1F, PAT e CP4 EPSPS que conferem resistência a alguns insectos Coleópteros e Lepidópteros e tolerância aos herbicidas glufosinato de amónio e glifosato. O milho 59122x1507xNK603 deriva, por processos tradicionais de melhoramento, do cruzamento entre os milhos geneticamente modificados 59122, 1507 e NK603.

O objectivo dos ensaios em 2005, é avaliar o comportamento residual do glufosinato e glifosato do milho 59122x1507xNK603, após aplicações do herbicida Liberty^{®11} e Roundup WeatherMax^{®22} em doses máximas, por avaliação da mgnitude dos residuos. O objectivo do ensaio é suportar o registo dos herbicidas Liberty[®] e Roundup WeatherMax[®] para o milho 59122x1507xNK603.

O objectivo desta avaliação do risco ambiental é, numa base caso a caso, identificar e avaliar potenciais efeitos adversos do milho 59122x1507xNK603, directos e indirectos, imediatos ou a longo prazo na saúde humana ou no ambiente. A avaliação do risco ambiental para o registo seguro do milho 59122x1507xNK603, tem sido conduzida tendo em vista a identificação da necessidade de maneio do risco e se isso acontecer, quais os métodos mais apropriados a usar.

A avaliação do risco ambiental para o registo seguro do milho 59122x1507xNK603, foi realizada comparando características identificadas neste milho, as quais podem ter potencial para causar efeitos adversos em relação às mesmas características nos indivíduos equivalentes não modificados.

As conclusões do potencial impacto ambiental que possam resultar do registo do milho 59122x1507xNK603 são apresentadas em seguida.

¹ Liberty[®] é a marca comercial registada da Bayer CropScience

² Roundup Weather Max[®] é a marca comercial registada da Monsanto Company

CONCLUSÕES SOBRE O POTENCIAL IMPACTO AMBIENTAL QUE RESULTE DO REGISTO DE PLANTAS SUPERIORES GENETICAMENTE MODIFICADAS (GMHPs)

1. Probabilidade das GMHP se tornarem mais persistentes do que as plantas receptoras ou plantas progenitoras nos habitats agrícolas ou mais invasoras nos habitats naturais

Existe uma probabilidade desprezível do milho 59122x1507xNK603 se tornar ambientalmente persistente ou invasor sob a forma de infestante. O milho não possui nenhum atributo que lhe permita transformar-se em infestante e a expressão das proteínas Cry34Ab1, Cry35Ab1, Cry1F, PAT e CP4 EPSPS no milho 59122x1507xNK603 não levam ao aparecimento dessas características.

As características que conduzem à evolução para infestante, podem descrever-se de uma forma geral como: 1) capacidade da semente germinar em distintos ambientes; 2) germinação descontínua e elevada longevidade da semente; 3) rápido desenvolvimento vegetativo (fase vegetativa – fase reprodutiva); 4) produção contínua de semente desde que as condições de crescimento o permitam; 5) auto-compatibilidade parcialmente autogâmicas e apomíticas; 6) capacidade para ter fecundação cruzada por insectos não especializados ou pelo vento; 7) grande capacidade de produção de semente em ambientes favoráveis e alguma produção de semente numa vasta gama de ambientes; 8) adaptação à dispersão de curta e larga distância; 9) reprodução vegetativa ou regeneração através de fragmentos frágeis (difíceis de remover do solo); e 10) capacidade para competir interespecificamente por meios especiais.

O milho não exhibe as tendências referidas e sendo assim, é uma planta não invasora nos ecossistemas naturais. Algumas espécies do género *Zea* são selvagens na América Central, mas mesmo assim, não apresentam a tendência de se tornarem invasoras. O milho tem sido domesticado até ao limite das sementes não se poderem separar da maçaroca. Não se podem disseminar sem a intervenção humana. As plantas são anuais pelo que não sobrevivem, na Europa, de uma estação de crescimento para a outra, devido por um lado, à fraca dormência e por outro lado a uma grande sensibilidade às temperaturas baixas. Apesar da ausência de dormência, a semente do milho pode, ocasionalmente, persistir de uma campanha de crescimento para a outra. Quando as condições de temperatura e humidade são adequadas a semente pode germinar. Isto acontece em condições favoráveis, as quais não se verificam na Hungria onde os Invernos são bastante rigorosos. Em todo o caso, essas plantas espontâneas podem facilmente ser identificadas e controladas através de meios manuais ou químicos.

Em caso de aparecimento não desejado do milho 59122x1507xNK603, poderão ser aplicadas práticas agronómicas correntes, tais como o uso de herbicidas (com excepção do glifosinato de amónio e do glifosato) ou remoção manual ou mecânica.

2. Vantagens ou desvantagens selectivas conferidas à GMHP

Como pretendido e quando cultivado, a expressão das proteínas Cry34Ab1, Cry35Ab1, Cry1F, PAT e CP4 EPSPS no milho 59122x1507xNK603, confere vantagens específicas aos ambientes agrícolas: resistência a alguns insectos Coleópteros, tais como *Diabrotica virgifera virgifera* e resistência a certos insectos Lepidópteros, tais como *Ostrinia nubilalis* e *Sesamia sp.*, e tolerância aos herbicidas glufosinato de amónio e glifosato.

Contudo, o milho é uma espécie em elevado grau de domesticação, ao limite de não poder tornar-se uma espécie perigosa fora do ambiente agrícola devido à sua fraca capacidade de sobrevivência nas condições europeias. As vantagens específicas presentes no milho 59122x1507xNK603 não lhe conferem nenhuma vantagem selectiva em relação a outras plantas no ambiente natural, i.e. fora do ambiente agrícola. Os ataques de insectos são um dos múltiplos factores bióticos e abióticos que impedem o crescimento do milho fora do ambiente agrícola. Assim, a expressão das proteínas Cry34Ab1, Cry35Ab1, Cry1F que confere resistência a alguns insectos Coleópteros e Lepidópteros não pode ser considerada uma vantagem selectiva fora do ambiente agrícola.

Além disso, a expressão das proteínas PAT e CP4 EPSPS, no milho 59122x1507xNK603, também não confere, vantagens selectivas fora do ambiente agrícola.

3. Potencialidade para transferência de genes para a mesma ou outras espécies sexualmente compatíveis nas condições de crescimento da GMHP e vantagens e desvantagens selectivas conferidas a essas espécies

Não existem na Europa, espécies selvagens sexualmente compatíveis com *Zea mays*, facto elimina qualquer possibilidade de transferência de genes para essas espécies. O potencial para a transferência de genes a outras plantas de milho em cultura é, por conseguinte, limitado. Este potencial será contudo, consideravelmente reduzido nas condições do ensaio, onde são guardados 200 metros de isolamento entre o milho experimental 59122x1507xNK603 e qualquer outro campo de milho não experimental.

Conforme discutido no Ponto 2., a modificação genética do milho 59122x1507xNK603, não introduz nenhuma entrega selectiva nas plantas de milho fora dos ambientes agrícolas.

4. Potencial impacto ambiental a curto ou médio prazo resultante de interacções directas ou indirectas da GMHP e os organismos alvo, tais como predadores, parasitoides e patógenos (se aplicável)

A modificação genética no milho 59122x1507xNK603 permite aos agricultores beneficiar de um mecanismo, altamente efectivo e ambientalmente seguro, que permite controlar certos insectos Coleópteros, tais como *Diabrotica virgifera virgifera* e insectos Lepidópteros, tais como *Ostrinia nubilalis* e *Sesamia spp.* Este beneficio poderia, no entanto, ser reduzido se as pragas referidas desenvolvessem

resistência a proteínas Cry34Ab1, Cry35Ab1, Cry1F tal como a expressa no milho 59122x1507xNK603 durante a fase de crescimento. A ocorrência desse fenómeno, ou seja, a resistência dos insectos, é reduzida no caso dos ensaios uma vez que se restringem a áreas pouco significativas. O risco da resistência dos insectos é pois, reduzido.

A luz do pensamento corrente e da experiência adquirida com os milhos Bt, uma proposta detalhada para o manejo da resistência dos insectos (IRM) será desenvolvida, no contexto do produto disponível, e aplicado quando o milho 59122x1507xNK603 entrar no mercado.

Nenhum outro impacto ambiental de curto ou longo prazo resultante das interacções directas e indirectas do milho 59122x1507xNK603 com os organismos alvo é esperado no ambiente em que vai ser experimentado.

5. Possíveis impactos ambientais de caracter imediato ou longo prazo, resultantes das interacções directas e indirectas das GMHP com outros organismos (tendo em conta organismos que interactuem com organismos alvo), incluindo o impacto na população dos níveis de competidores, herbívoros, simbiotes (quando aplicável), parasitas e patógenos

O registo do milho 59122x1507xNK603 resultará em impactos ambientais reduzidos de caracter imediato ou a longo prazo resultante das interacções directas e indirectas do milho 59122x1507xNK603 com outros organismos diferentes dos organismos alvo, mesmo tendo em conta organismos que interactuem com os organismos alvo, incluindo impacto nos níveis populacionais dos outros organismos. A especificidade da actividade biológica e a ausência de toxicidade para os outros organismos das proteínas Cry34Ab1, Cry35Ab1, Cry1F, PAT e CP4 EPSPS, confirma que não haverá efeitos adversos, nesses organismos, provocados pelo milho 59122x1507xNK603.

6. Possíveis efeitos imediatos ou de longo prazo na saúde humana resultantes de potenciais interacções directas e indirectas das GMHP e as pessoas que trabalhem com essas plantas, venham a estar em contacto ou na sua vizinhança

O milho não é considerado perigoso para a saúde humana. Adicionalmente, é conhecida a longa história do uso seguro desta planta na alimentação humana e animal. O milho 59122x1507xNK603 não introduz nenhum componente que possa causar, ou esperar que cause, efeitos imediatos ou de longo prazo na saúde humana resultante de possíveis interacções directas e indirectas do milho 59122x1507xNK603, com as pessoas que trabalhem directamente com esse milho, que venham a estar em contacto ou estão na proximidade dos ensaios que envolvam o híbrido 59122x1507xNK603.

Além disso, o milho 59122x1507xNK603, sujeito a ensaios não entrará na cadeia alimentar.

7. Possíveis efeitos imediatos ou de longo prazo na saúde animal e consequências para a cadeia alimentar humana ou animal resultantes do consumo

de GMO e outros produtos derivados de GMO, se se pretender usar para alimentação animal

Não se pretende que as plantas de milho sujeitas a estes ensaios sejam usadas na alimentação animal.

Além disso, o milho 59122x1507xNK603, foi obtido por processos tradicionais de melhoramento através do cruzamento entre as linhas geneticamente modificadas 59122, 1507 e NK603, não sendo conhecidos componentes que causem ou venham a causar, possíveis efeitos imediatos ou de longo prazo na saúde animal.

8. Possíveis efeitos imediatos ou de longo prazo nos processos biogeoquímicos resultantes de potenciais interações directas e indirectas do GMO com os organismos alvo e outros organismos na vizinhança dos ensaios com GMO

Conforme discutido nos **Pontos 4 e 5**, a expressão das proteínas Cry34Ab1, Cry35Ab1, Cry1F, PAT e CP4 EPSPS no milho 59122x1507xNK603, não causará nenhum possível efeito imediato ou de longo prazo nos processos biogeoquímicos resultante de potenciais interações directas e indirectas do milho 59122x1507xNK603 e os organismos alvo e outros organismos na sua vizinhança.

9. Possíveis impactos ambientais imediatos ou de longo prazo, directos ou indirectos na cultura, manejo e técnicas de colheita usadas com GMHP quando estas forem diferentes de plantas não-GMHPs

As técnicas usadas, na cultura, manejo e colheita usadas para o milho 59122x1507xNK603, são idênticas aquelas que se usam para os milhos não geneticamente modificados.

Por necessidade de estudo, algumas amostras são recolhidas manualmente. No final do ensaio, a biomassa que sobrar das amostras para análise, será triturada e incorporada no solo. Depois do ensaio, a parcela será visitada regularmente durante o ano seguinte, de maneira a acompanhar a possível emergência de alguma planta. A próxima cultura diferente de um milho comercial, será conduzida seguindo os métodos usuais, particularmente usando herbicidas diferentes do glufosinato de amónio e glifosato.

Conclusões

A avaliação do risco ambiental não identificou riscos para a saúde humana e animal ou do ambiente resultantes dos ensaios de campo com o milho 59122x1507xNK603. Esta afirmação baseia-se em informação contida nesta notificação e nas seguintes notas de conclusão:

- Existe uma reduzida probabilidade do milho 59122x1507xNK603 se tornar ambientalmente persistente ou invasor em forma de infestante;
- A expressão das proteínas Cry34Ab1, Cry35Ab1, Cry1F, PAT e CP4 EPSPS, no milho 59122x1507xNK603, não lhe confere nenhuma vantagem selectiva fora do ambiente agrícola;
- Não existem na EU espécies geneticamente relacionadas com o milho. A modificação genética no híbrido 59122x1507xNK603 não introduz nenhuma vantagem selectiva às plantas de milho fora dos ambientes fortemente manuseados em agricultura;
- A libertação deliberada do milho 59122x1507xNK603 resulta em impactos reduzidos no ambiente quer imediatos quer de longo prazo resultantes de interações directas e indirectas do milho 59122x1507xNK603 com organismos diferentes dos organismos alvo;
- As modificações genéticas do milho não introduzem nenhum componente novo conhecido por causar ou esperar que cause, potenciais efeitos imediatos ou de longo prazo na saúde humana. Além disso, o grão obtido nos ensaios não será introduzido na cadeia alimentar;
- As modificações genéticas do milho não introduzem nenhum componente novo conhecido por causar ou esperar que cause, potenciais efeitos imediatos ou de longo prazo na saúde animal. Além disso, o grão obtido nos ensaios não será introduzido na cadeia alimentar animal;
- O milho 59122x1507xNK603 não causará nenhum efeito imediato ou de longo prazo nos processos biogeoquímicos;
- As práticas específicas de cultura, manejo e colheita, usadas para o milho 59122x1507xNK603, são idênticas aquelas que se usam para milho não geneticamente modificado;
- A potencial redução no controlo de alguns insectos Coleópteros e Lepidópteros, se os insectos alvo desenvolverem resistência à proteína Cry34Ab1, Cry35Ab1, Cry1F que o milho 59122x1507xNK603 expressa, tem sido identificado o único potencial risco resultante da interacção do milho 59122x1507xNK603 com os organismos alvo. No caso dos ensaios, a probabilidade de ocorrência desta possibilidade é reduzida. O risco de desenvolvimento de resistência por parte dos organismos alvo é pois, reduzido. No entanto, uma estratégia Prevenção de Resistência aos Insectos será desenvolvida em contexto de colocação no mercado do milho 59122x1507xNK603.

**INFORMAÇÃO ADICIONAL
RELACIONADA COM O MILHO 59122**

INFORMAÇÃO ADICIONAL RELACIONADA COM O MILHO 59122

INTRODUÇÃO

Os insectos Coleópteros, tais como a *Diabrotica virgifera virgifera* e *Diabrotica barberi*, constituem importantes pragas nas culturas do milho. Alimentando-se nas raízes do milho, escavando cavidades e túneis, as larvas causam importantes danos nas raízes que resultam em redução nas produções. Os meios de prevenção correntemente disponíveis incluem a rotação de culturas e o uso de insecticidas químicos. Estes meios permitem somente limitar as populações de *Diabrotica*, reduzindo os danos na cultura mas não eliminam a praga. Além disso um importante número de Coleópteros pode sobreviver porque o campo não é tratado no seu todo, só as zonas cerca das raízes principais são tratadas. Por outro lado, a existência de pequenas áreas com monocultura de milho é suficiente para manter altas populações de *Diabrotica*, e assim permitir a sua reprodução e o aumento das zonas infestadas. A melhor forma de combater estas pragas é através de híbridos de milho geneticamente resistentes a estas pragas.

O milho geneticamente modificado que será testado foi modificado pela inserção de 2 genes provenientes do *Bacillus thuringiensis* estirpe 149B1, *cry34Ab1* e *cry35Ab1*, e um gene *pat* (phosphinothricin acetyltransferase gene), isolado de *Streptomyces viridochromogenes* para o marcador seleccionado.

Os genes *cry34Ab1* e *cry35Ab1* codificam para proteínas individuais com propriedades insecticida, respectivamente de 14kDa (*Cry34Ab1*) e 44kDa (*Cry35Ab1*). Em combinação estas proteínas actuam especificamente em espécies alvo que se alimentam no milho. Graças ao uso destes híbridos de milho, geneticamente modificados, o aparecimento de novas zonas de infestação será evitado. Assim, estes híbridos geneticamente modificados constituem uma importante ferramenta à disposição da agricultura com vista a contrariar eficientemente os danos causados por alguns insectos Coleópteros na cultura do milho, tais como *Diabrotica virgifera virgifera* e *Diabrotica barberi*.

Além disso, estes híbridos permitem controlo de infestantes com glufosinato de amónio, um herbicida de largo espectro, não selectivo e não-sistémico. O gene *pat*, inserido como marcador seleccionado, codifica a proteína PAT (phosphinothricin acetyltransferase), que acetila a fosfotricina, o ingrediente activo do herbicida glufosinato de amónio. Essa acetilação converte a fosfotricina numa forma inactiva que não é tóxica para as plantas transgénicas, conferindo-lhe tolerância ao herbicida.

INFORMAÇÃO RELACIONADA COM A CODIFICAÇÃO GENÉTICA

Esta secção está protegida como Confidencial

**INFORMAÇÃO RELACIONADA COM A PLANTA GENETICAMENTE
MODIFICADA**

Esta secção está protegida como Confidencial