

**NOTIFICAÇÃO APRESENTADA AO ABRIGO DO ARTIGO 5.º DO
DECRETO-LEI N.º 72/2003, DE 10 DE ABRIL**

**PEDIDO PARA LIBERTAÇÃO DELIBERADA NO
AMBIENTE DO MILHO GENETICAMENTE
MODIFICADO 59122 x NK603
(Programa para quatro anos)**

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



ÍNDICE

INTRODUÇÃO.....	5
B. INFORMAÇÃO RELACIONADA COM (A) A PLANTA TRANSFORMADA OU (B) (QUANDO APROPRIADO) AS LINHAS PARENTAIS	7
C. INFORMAÇÃO RELACIONADA COM A MODIFICAÇÃO GENÉTICA ...	9
D. INFORMAÇÃO RELACIONADA COM A PLANTA GENETICAMENTE MODIFICADA.....	10
E. INFORMAÇÃO RELACIONADA COM O LOCAL DE ENSAIO	10
F. INFORMAÇÃO RELACIONADA COM O ENSAIO	11
G. INFORMAÇÃO SOBRE O CONTROLO, MONITORIZAÇÃO PÓS-LIBERTAÇÃO E PLANOS DE TRATAMENTO DOS RESÍDUOS.....	13
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15
ANEXO 1 Análise molecular das inserções (CONFIDENCIAL)	Erreur ! Signet non défini.
ANEXO 2 Protocolo de Ensaio para 2006 (CONFIDENCIAL).....	Erreur ! Signet non défini.
ANNEXO 3 Identificação do responsável (CONFIDENCIAL)	Erreur ! Signet non défini.
AVALIAÇÃO DO RISCO AMBIENTAL PARA A LIBERTAÇÃO DELIBERADA DO MILHO 59122xNK603.....	45
INTRODUÇÃO.....	52
INFORMAÇÃO RELACIONADA COM A CODIFICAÇÃO GENÉTICA	Erreur ! Signet non défini.
INFORMAÇÃO RELACIONADA COM A PLANTA GENETICAMENTE MODIFICADA.....	54

SUMÁRIO

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

Título: Programa de ensaios de campo para testar o milho geneticamente modificado 59122xNK603.

Objectivo da transformação:

O milho 59122xNK603 foi obtido por métodos tradicionais de melhoramento nas descendências dos milhos geneticamente modificados DAS-59122-7, sendo referido como milho 59122, pela Mycogen/Dow AgroSciences e a Pioneer e o milho MON-ØØ6Ø3-6, referido como NK603, pela Monsanto. No milho 59122xNK603 não foi introduzida qualquer nova modificação genética. O milho 59122xNK603 é resistente a alguns insectos coleópteros e tolerante aos herbicidas glufosinato de amónio e glifosato.

O identificador da OECD associado ao milho 59122xNK603 é DAS-59122-7xMON – ØØ6Ø3-6).

Espécie receptora:

Zea mays L.

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

- gene *cry34Ab1*, promotor UBIZM1(2), terminador PINII.
- gene *cry35Ab1*, promotor Peroxidase, terminador PINII.
- 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 2006, os locais de experimentação serão na Freguesia de Vila Nova de Muia, Concelho de Ponte da Barca e Freguesia do Paço, Concelho de Arcos de Valdevez

Precauções:

O fluxo de pólen das plantas geneticamente modificadas será controlado por uma distância de isolamento de 400m, a outros campos de milho não-experimental, como é exigido pelas autoridades portuguesas. 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. Todas as plantas que não forem colhidas para análise serão destruídas por trituração e incorporadas no solo.

Resumo de antecedentes (factores relevantes):

A Pioneer começou a testar o híbrido 59122xNK603 em 2003. Estas variedades de milho geneticamente modificadas têm estado a ser sujeitas a ensaios de campo conduzido nas principais regiões produtoras de milho da América do Norte e da América do Sul em 2003. Na Europa têm sido conduzidos ensaios de campo desde

2004. Um processo de notificação com o pedido de autorização do milho 59122xNK603 para alimentação humana e animal, assim como importação e processamento deste milho na Europa, foi submetido à EFSA, no Reino Unido, em Agosto de 2005 (EFSA/GMO/UK-2005/20).

Objectivo do ensaio:

O objectivo do ensaio é avaliar o efeito do herbicida glifosato no milho 59122xNK603. Para que este objectivo seja cumprido, terão de ser retiradas amostras de milho, assim como a observação das mesmas.

Número e superfície dos ensaios:

Realizar-se-ão até 2 ensaios por ano. A disseminação do milho 59122xNK603 geneticamente modificado, irá cobrir até 500m² em cada campo de ensaio. Esta disseminação será incluída num campo de ensaio de milho não geneticamente modificado e outras variedades de milho geneticamente modificadas descritas noutros processo de notificação.

Em 2006, a superfície total do ensaio (incluindo todas as variedades e bordaduras) pode atingir 5.000m² por local.

INTRODUÇÃO

Esta notificação diz respeito ao campo de ensaio do milho geneticamente modificado 59122xNK603 resistente a certas pragas de insectos coleópteros, tais como *Diabrotica virgifera virgifera* e *Diabrotica barberi* e tolerante ao herbicida glifosato (tolerância ao herbicida glufosinato de amónio foi introduzida como marcador seleccionável).

Os insectos Coleópteros tais como *Diabrotica virgifera virgifera* e *Diabrotica barberi*, representam pragas importantes na cultura do milho. Alimentando-se nas raízes do milho, as larvas de *Diabrotica* spp. causam danos importantes na planta, resultando em importantes perdas de rendimento. Os meios de combate correntemente disponíveis contra estas larvas incluem o uso de insecticidas químicos bem como a rotação de culturas. Estes meios somente permitem que as populações de *Diabrotica*, reduzam os danos na cultura do milho, mas não eliminam as pragas. Sendo assim, a existência de pequenas 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 59122xNK603, foi obtido por métodos tradicionais de melhoramento nas descendências dos milhos geneticamente modificados 59122 e NK603, que contém genes: *cry34Ab1*, *cry35Ab1* e *pat* como o milho 59122 e o gene *cp4epsps* do milho NK603. Os 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.

O gene *pat* gene, isolado do *Streptomyces viridochromogenes*, que confere resistência ao herbicida glufosinato de amónio tem sido introduzido como marcador no processo de selecção. O gene *cp4 epsps* de *Agrobacterium* sp. Confere resistência ao herbicida glifosato.

Deste modo o milho 59122xNK603 pode combater algumas pragas de insectos coleópteros, tais como as *Diabrotica virgifera virgifera*, *Diabrotica barberi*, e permitir a aplicação de glifosato, herbicida sistémico para o controlo de infestantes na cultura do milho.

O objectivo deste ensaio é a avaliação do comportamento do milho 59122xNK603 quando submetido a aplicações do herbicida glifosato.

A. INFORMAÇÃO GERAL

1. Nome e morada do proponente

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

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

Cada ensaio será acompanhado por um Engenheiro Agrónomo, Investigador Principal

3. Título do Projecto

Pedido de autorização para testar a variedade de milho 59122XNK603 geneticamente modificada.

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

1. Descrição:

- a) Família: Gramineae
- b) Género: *Zea*
- c) Espécie: *mays* ($2n = 20$)
- d) Subespécie: none
- 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, Helmintosporiose, Fusariose, Morrão, Crazy top) e a pragas (*Atomaria lineari*), milípedes (*Blaniulus guttulatus*), miriápodes (*Scutigera immaculata*), *Tipula paludosa*, lagarta rocha (*Agrotis ipsilon*), brocas do milho (*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 interage 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 2006, os locais de experimentação serão na Freguesia de Vila Nova de Muia, Concelho de Ponte da Barca e Freguesia do Paço, Concelho de Arcos de Valdevez

A disseminação do milho geneticamente modificado 59122XNK603 ocupará uma área não superior a 500 m² em cada local de ensaio. Esta disseminação será incluída num campo de ensaio que conterà também milho não modificado e outros milhos geneticamente modificados descritos noutros processos de notificação. Em 2006, a área total do ensaio (todas as variedades e bordaduras incluídas) poderá ocupar 5.000 m² em cada local.

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 biotipos oficialmente reconhecidos ou áreas protegidas que possam ser afectadas

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

F. INFORMAÇÃO RELACIONADA COM O ENSAIO

1. Objectivo do ensaio

O objectivo do ensaio é avaliar os efeitos do herbicida glifosato no milho 59122xNK603.

Para 2006 estão planeados dois tipos de ensaios:

- Ensaio para analisar os resíduos do herbicida

Estes ensaios serão instalados com vista a colher tecidos de forragem e grão do milho 59122xNK603, para avaliar os resíduos do herbicida glifosato no milho 59122xNK603.

As amostras serão analisadas noutra país.

- Ensaio para avaliar a selectividade do herbicida glifosato

Estes ensaios serão instalados para recolher informação sobre produção de forragem e/ou grão, assim como observação visual no milho 59122xNK603 para avaliar a selectividade do herbicida glifosato em comparação com parcelas testemunha.

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

O ensaio com milho 59122xNK603 está planeado para 4 campanhas do milho (quadro 4).

Quadro 5: Datas e duração previstas para o ensaio

CAMPANHA	Duração da Libertação
2006	Início de Abril – Fins de Dezembro
2007	Início de Abril – Fins de Dezembro
2008	Início de Abril – Fins de Dezembro
2009	Início de Abril – Fins 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 manejo do local de ensaio, antes, durante e após o ensaio, incluindo praticas 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, algumas amostras serão colhidas. No final, toda a biomassa que não for colhida para análises será destruída por trituração e incorporada no solo.

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

A densidade de plantas será de aproximadamente de 80 000 plantas/ha.

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

1. Precauções tomadas:

a) Distância(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)

De acordo com as exigências das autoridades portuguesas será mantida uma distância de 400m 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 colhida 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 estranhos, devidos a fenómenos externos, como por exemplo, condições climáticas desfavoráveis.

No caso de acontecer alguma emergência, a pessoa de contacto (ver anexo 3) será directamente informada, activando o plano de emergência. Esta pessoa informará de imediato o Ministério do Ambiente.

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.

6 Protecção do local do ensaio

Os locais de ensaio serão envolvidos por 4 linhas de bordadura com milho convencional de ciclo vegetativo similar que será igualmente destruído no fim do ensaio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- An, G., Mitra, A., Choi, H.K., Costa, M.A., An, K., Thornburg, R.W., Ryan, C.A. (1989) Functional analysis of the 3' control region of the potato wound-inducible proteinase inhibitor II gene. *Plant Cell*, 1, pp. 115-122
- Barker, R.F., Idler, K.B., Thompson, D.V. and Kemp, J.D. (1983) Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Mol. Biol.* 2, pp. 335-350
- Christensen, A.H., Sharrock, R. A., Quail, P.H. (1992) Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol. Biol.*, 18, pp. 675-689
- Commission Decision of 19 July 2004 concerning the placing on the market, in accordance with Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council, of a maize product (*Zea mays* L. line NK603) genetically modified for glyphosate tolerance. (2004/643/EC). Official Journal of the European Union, L 295: 35-37. <http://europa.eu.int/eur-lex/>
- Commission Decision of 3 March 2005 authorizing the placing on the market of foods and food ingredients derived from genetically modified maize line NK 603 as novel foods or novel food ingredients under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council. (2005/448/EC). Official Journal of the European Union, L 158: 20-22. <http://europa.eu.int/eur-lex/>
- 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 (2003a). 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. Opinion adopted on 25 November, 2003. <http://www.efsa.eu.int>
- EFSA (2003b). 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. Opinion adopted on 25 November, 2003. <http://www.efsa.eu.int>

EFSA (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). Opinion adopted on 24 September 2004.

EFSA (2005a) Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on an application for the placing on the market of insect-tolerant genetically modified maize 1507, for food use, under Regulation (EC) No 1829/2003 from Pioneer Hi-Bred International/Mycogen Seeds (Application No EFSA-GMO-NL-2004-02) Opinion adopted on 19 January 2005.

EFSA (2005b) Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on a request from the Commission related to the notification (Reference C/ES/01/01) for the placing on the market of insect-tolerant genetically modified maize 1507, for import, feed and industrial processing and cultivation, under Part C of Directive 2001/18/EC from Pioneer Hi-Bred International/Mycogen Seeds (Question No EFSA-Q-2004-015) Opinion adopted on 19 January 2005.

Ellis, T.R., Stockhoff, B.A., Stamp, L., Schnepf, E.H., Schwab, G.E., Knuth, M., Russel, J., Cardineau, G.A., Narva, K.E. (2002) Novel *Bacillus thuringiensis* binary insecticidal crystal proteins active on western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte. *Appl. Environm. Microbiol.*, 68, pp. 1137-1145

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.

Hertig, C., Rebmann, G., Bull, J., Mauch, F., Dudler, R. (1991) Sequence and tissue-specific expression of a putative peroxidase gene from wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Mol. Biol.*, 16, pp. 171-174

Hoekstra, F.A., Crowe, L.M. and Crow J.H. (1989) Differential dessication sensitivity of corn and *Pennisetum* pollen linked to their sucrose contents. *Plant, Cell and Environment*, 12:83-91.

Hohn, T., Richards, K., Lebourier, G. (1982) Cauliflower mosaic virus on its way to becoming a useful plant vector. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 96, pp. 194-236

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.

McClintock, J.T., Schaffer, C.R. and Sjoblad, R.D. (1995) A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. *Pestic. Sci.*, 45:95-105.

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., Czapl, 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.

Rossmann, E.C. (1949) Freezing injury of inbred and hybrid maize 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.

**AVALIAÇÃO DO RISCO AMBIENTAL PARA O
REGISTO SEGURO DO MILHO 59122xNK603**

AVALIAÇÃO DO RISCO AMBIENTAL PARA A LIBERTAÇÃO DELIBERADA DO MILHO 59122XNK603

Esta notificação serve para consentir o registo seguro do milho 59122xNK603 que expressa as proteínas Cry34Ab1, Cry35Ab1, PAT e CP4 EPSPS que conferem resistência a alguns insectos Coleópteros e tolerância aos herbicidas glufosinato de amónio e glifosato.

O milho 59122xNK603 deriva, por processos tradicionais de melhoramento, do cruzamento entre os milhos geneticamente modificados 59122 e NK603; sendo o milho 59122 resistente a alguns insectos Coleópteros e tolerante ao glufosinato de amónio e o milho NK603, tolerante ao herbicida glifosato.

O objectivo do ensaio é avaliar, nas condições europeias, os efeitos do herbicida glifosato no milho 59122xNK603.

O objectivo desta avaliação do risco ambiental (e.r.a.) é, numa base caso a caso, identificar e avaliar potenciais efeitos adversos do milho 59122xNK603, directos e indirectos, imediatos ou a longo prazo na saúde humana ou no ambiente. A e.r.a. para o registo seguro do milho 59122xNK603, tem sido conduzida tendo em vista a identificação da necessidade de manejo do risco e se isso acontecer, quais os métodos mais apropriados a usar.

A e.r.a. para o registo seguro do milho 59122xNK603, 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 59122xNK603 são apresentadas em seguida.

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 59122xNK603 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, PAT e CP4 EPSPS no milho 59122xNK603 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. 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 59122xNK603, poderão ser aplicadas práticas agronómicas correntes, tais como o uso de herbicidas (com excepção do glufosinato 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, PAT e CP4 EPSPS no milho 59122xNK603, confere vantagens específicas aos ambientes agrícolas: resistência a alguns insectos Coleópteros, tais como *Diabrotica virgifera virgifera* 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 59122xNK603 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, que confere resistência a alguns insectos Coleópteros não pode ser considerada uma vantagem selectiva fora do ambiente agrícola.

Além disso, a expressão das proteínas PAT e CP4 EPSPS, no milho 59122x1NK603, também não conferem, 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 400 metros de isolamento, de acordo com as autoridades portuguesas, entre o milho experimental 59122xNK603 e qualquer outro campo de milho não experimental. Adicionalmente, o local de ensaio será rodeado de 4 linhas de bordadura de milho comercial com data de maturação similar que serão destruídas no final do ensaio.

Conforme discutido no Ponto 2., a modificação genética do milho 59122xNK603, 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 59122x1NK603 permite aos agricultores beneficiar de um mecanismo, altamente efectivo e ambientalmente seguro, que permite controlar certos insectos Coleópteros, tais como *Diabrotica virgifera virgifera*. No entanto, a eficácia do milho poderia ser reduzida se as pragas referidas desenvolvessem resistência às proteínas Cry34Ab1, Cry35Ab1, tal como a expressa no milho 59122xNK603 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.

No entanto, quando a cultura comercial for planeada uma proposta detalhada para o manejo da resistência aos insectos (IRM) será desenvolvida, no contexto do produto disponível, e aplicado quando o milho 59122xNK603 entrar no mercado da UE. Por exemplo a implementação de refúgios (zonas cultivadas com milhos não resistentes aos insectos lepidópteros) será implementada para assegurar que os raros insectos que se possam tornar resistentes às toxinas Cry34Ab1 e Cry35Ab1, e sobreviver, podem cruzar-se com insectos sensíveis. Desta forma, as suas descendências manter-se-ão sensíveis e serão controladas pelas culturas de milho Bt.

Nenhum outro impacto ambiental de curto ou longo prazo resultante das interacções directas e indirectas do milho 59122xNK603 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, simbioses (quando aplicável), parasitas e patógenos

O registo do milho 59122xNK603 resultará em impactos ambientais reduzidos de caracter imediato ou a longo prazo resultante das interacções directas e indirectas do milho 59122xNK603 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, PAT e CP4 EPSPS, confirma que não haverá efeitos adversos, nesses organismos, provocados pelo milho 59122xNK603.

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 59122xNK603 não introduz nenhum componente que possa causar, ou esperar que cause, efeitos imediatos ou de longo prazo na saúde humana resultante de possíveis interações directas e indirectas do milho 59122xNK603, 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 59122xNK603.

Além disso, o milho 59122xNK603, 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 59122xNK603, foi obtido por processos tradicionais de melhoramento através do cruzamento entre as linhas geneticamente modificadas 59122 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, PAT e CP4 EPSPS no milho 59122xNK603, não causará nenhum possível efeito imediato ou de longo prazo nos processos bio-geo-químicos resultante de potenciais interações directas e indirectas do milho 59122xNK603 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 para o milho 59122xNK603, são idênticas aquelas que se usam para os milhos não geneticamente modificados, com excepção do regime de herbicida e plano de monitorização proposto para a cultura comercial do milho 59122xNK603.

Por necessidade de estudo, algumas amostras são recolhidas. 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 impacto ambiental (e.r.a.) não identificou riscos para a saúde humana e animal ou do ambiente resultantes dos ensaios de campo com o milho 59122xNK603. Esta afirmação baseia-se em informação contida nesta notificação e nas seguintes notas de conclusão:

- Existe uma muito reduzida probabilidade do milho 59122xNK603 se tornar ambientalmente persistente ou invasor em forma de infestante;
- A expressão das proteínas Cry34Ab1, Cry35Ab1, PAT e CP4 EPSPS, no milho 59122xNK603, 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 59122xNK603 não introduz nenhuma vantagem selectiva às plantas de milho fora dos ambientes fortemente manuseados em agricultura;
- A libertação deliberada do milho 59122xNK603 resulta em impactos reduzidos no ambiente quer imediatos quer de longo prazo resultantes de interacções directas e indirectas do milho 59122xNK603 com organismos diferentes dos organismos alvo;
- A modificação genética do milho não introduz 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 59122xNK603 não causará nenhum efeito imediato ou de longo prazo nos processos biogeoquímicos;
- As práticas específicas de cultura, manejo e colheita, usadas para o milho 59122x1NK603, são idênticas aquelas que se usam para milho não geneticamente modificado;
- A potencial redução no controlo de alguns insectos Coleópteros, se os insectos alvo desenvolverem resistência à proteína Cry34Ab1, Cry35Ab1 que o milho 59122xNK603 expressa, tem sido identificado o único potencial risco resultante da interacção do milho 59122xNK603 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 IRM será desenvolvida em contexto de colocação no mercado do milho 59122xNK603.

**INFORMAÇÃO ADICIONAL
RELACIONADA COM O MILHO 59122**

INFORMAÇÃO ADICIONAL RELACIONADA COM O MILHO 59122

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, 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. Assim, é importante desenvolver meios eficientes de controlo com vista a proteger as culturas do milho, destas pragas.

O milho geneticamente modificado 59122 foi modificado pela inserção dos genes *cry34Ab1* e *cry35Ab1*, provenientes do *Bacillus thuringiensis* estirpe PS149B1, e o gene *pat* (phosphinothricin acetyltransferase gene), isolado de *Streptomyces viridochromogenes* introduzido como marcador.

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. O milho geneticamente modificado 59122 é uma importante ferramenta com vista a contrariar eficientemente os danos causados por alguns insectos Coleópteros na cultura do milho, tais como *Diabrotica virgifera virgifera* e *Diabrotica barberi*.

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.