

**MONSANTO**



**Notificação para Ensaio de Plantas Superiores Geneticamente  
Modificadas, nos termos do Decreto-Lei n.º 72/2003**

**ANEXO III – B**

Notificação para um período de ensaios de 3 anos para registo de variedades do milho geneticamente modificado NK 603, tolerante a herbicidas que contêm glifosato

Dezembro 2009

## ÍNDICE

<b>Introdução .....</b>	<b>3</b>
<b>A. INFORMAÇÕES GERAIS.....</b>	<b>4</b>
<b>B. INFORMAÇÕES RELATIVAS AO RECEPTOR OU ÀS PLANTAS PARENTAIS.....</b>	<b>4</b>
<b>C. INFORMAÇÕES RELATIVAS À MODIFICAÇÃO GENÉTICA .....</b>	<b>9</b>
<b>D. INFORMAÇÕES RELATIVAS À PLANTA GENÉTICAMENTE MODIFICADA .....</b>	<b>15</b>
<b>E.. INFORMAÇÕES RELATIVAS AO LOCAL DE LIBERTAÇÃO .....</b>	<b>39</b>
<b>F.. INFORMAÇÕES RELATIVAS À LIBERTAÇÃO .....</b>	<b>41</b>
<b>G.. INFORMAÇÕES SOBRE PLANOS DE MONITORIZAÇÃO, CONTROLO, TRATAMENTO PÓS-LIBERTAÇÃO E TRATAMENTO DE RESÍDUOS .....</b>	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>47</b>
<b>AVALIAÇÃO DE RISCO AMBIENTAL .....</b>	<b>52</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>61</b>

## **ANEXO III-B de acordo com a Directiva 2001/18/EC: Informação Solicitada em Notificações para Ensaio de Plantas Superiores Geneticamente Modificadas (PSGM)**

### **INTRODUÇÃO**

O milho NK603 e a progenia derivada de cruzamentos tradicionais com outras variedades de milho, foram autorizados para importação e consumo na União Europeia, de acordo com a Directiva 2001/18/CE, na Decisão da Comissão de 19 de Julho de 2004.

Os usos do milho NK603 e suas fracções foram também autorizados pela Comissão Europeia, de acordo com o Regulamento de novos alimentos CE/258/97 em 26 de Outubro de 2004.

O milho é uma planta de grande importância na alimentação humana e animal, pelo que consideramos de grande interesse aumentar a eficiência da produção nacional, uma vez que o nosso país importa anualmente grandes quantidades de grão deste cereal. A produção portuguesa está em desvantagem relativamente a outros países como os EUA, cujos agricultores dispõem de variedades autorizadas tolerantes ao glifosato desde 1998, e esta desvantagem será ainda mais importante a partir de 2008, devido à retirada obrigatória do mercado da União Europeia de matérias activas herbicidas que desempenharam um papel fundamental no controlo de infestantes do milho, como a atrazina ou o alacloro, por não terem sido incluídas na Lista Positiva Comunitária (Anexo I da Directiva CE 91/414).

O milho NK603 contém uma modificação genética que permite ao agricultor adoptar uma técnica de eliminação de ervas daninhas simples e eficaz, pulverizando herbicidas à base de glifosato com a cultura em desenvolvimento. O glifosato que, desde há muitos anos, está autorizado para aplicações antes da sementeira ou entre as linhas com campânula protectora, foi incluído no Anexo I da Directiva CE 91/414, o que implica um reconhecimento europeu de que as aplicações propostas não irão comprometer a segurança das pessoas nem do meio ambiente. Entre os usos propostos para a inclusão no Anexo I estão as aplicações sobre variedades de milho e outras culturas geneticamente tolerantes ao glifosato.

A disponibilidade de milhos derivados do NK603 oferecerá ao agricultor português: uma opção de controlo de um amplo espectro das plantas adventícias que infestam a cultura do milho, incluindo ervas vivazes difíceis de eliminar; um novo modo de acção para o controlo de infestantes durante o cultivo do milho, com um herbicida que apresenta um perfil ecotoxicológico muito favorável; maior flexibilidade para eleger o estado de desenvolvimento das ervas daninhas no momento da aplicação e maiores possibilidades para adoptar técnicas de agricultura de conservação, que reduzam a erosão dos solos e melhorem a sua fertilidade.

## A. INFORMAÇÕES GERAIS

### 1. Nome, endereço do notificador e outros contactos

Monsanto Agricultura España, S.L  
Avda. de Burgos, 17, 10<sup>a</sup>  
28036 Madrid  
Tel (0034)91 3432712. Fax (0034)91 3432727.  
[www.monsanto.es](http://www.monsanto.es)

### 2. Nome, qualificações e experiência do(s) cientista(s) responsável(eis)

Anexo I

### 3. Título do projecto

**Notificação para um período de ensaios de 3 anos, para registo de variedades do milho geneticamente modificado NK 603, tolerante a herbicidas que contêm glifosato.**

## B. INFORMAÇÕES RELATIVAS AO RECEPTOR OU ÀS PLANTAS PARENTAIS

### 1. Nome completo

(a) **Família:** *Poaceae* (anteriormente *Gramineae*)

(b) **Género:** *Zea*

(c) **Espécie:** *Zea mays* ( $2n = 20$ )

(d) **Subespécie:** *mays*

(e) **Cultivar/linhagem:** NK603

(f) **Designação comum:** Milho

O milho é um membro da tribo *Maydeae*, que está incluída na subfamília *Panicoideae* da família *Gramineae*. Entre os géneros que integram a tribo *Maydeae* incluem-se *Zea* e *Tripsacum* no Hemisfério Ocidental e *Coix*, *Polytoca*, *Chionachne*, *Schlerachne*, e *Trilobachne* na Ásia.

**2.**

**(a) Informação relativa à reprodução**

**(i) Modo de reprodução**

O milho (*Zea mays* L.) reproduz-se sexualmente. O milho é uma espécie de polinização anemófila, monóica com flores estaminais (panícula ou bandeira) e pistiladas (sedas ou barbas) que favorecem o cruzamento natural entre plantas de milho. Como é habitual nas plantas polinizadas pela acção do vento, é produzida uma grande quantidade de pólen redundante para cada fertilização bem sucedida de um óvulo na espiga (Goss, 1968; Kiesselbach, 1949). O movimento provocado pelo vento ao longo do campo de milho origina a queda do pólen das panículas sobre as sedas da espiga da mesma planta ou adjacentes. A auto-polinização conduz à homogeneidade das características genéticas de uma única planta, enquanto a polinização cruzada combina traços genéticos de várias plantas. Este conceito congénito-híbrido e a resultante resposta na produção desta cultura estão na base da moderna indústria de sementes de milho.

**(ii) Factores específicos que afectem a reprodução**

A floração (das panículas e sedas) e a polinização são as fases mais críticas do desenvolvimento do milho e, conseqüentemente, a produção de grão pode eventualmente sofrer um significativo impacto com as condições de humidade e stress à fertilidade. Sob condições de elevada temperatura (Herrero and Johnson, 1980) e desidratação (Hoekstra *et al.*, 1989), a viabilidade do pólen do milho é medida em minutos; estas condições podem inclusivamente destruir a panícula antes de ser espalhado qualquer pólen viável (Lonnquist and Jugenheimer, 1943). Em condições mais moderadas, o tempo de vida do pólen no campo pode-se prolongar até horas (Jones and Newell, 1948).

**(iii) Tempo de geração**

O milho é uma cultura anual com um ciclo que varia entre um período curto de 60 a 70 dias e um período longo que se pode prolongar até às 43–48 semanas desde a emergência da plântula até à sua maturação (Shaw, 1988).

Em Portugal a sementeira do milho é feita em Abril e Maio e a colheita desde o princípio de Setembro, no caso do milho forrageiro, até Dezembro, no caso do milho de ciclo longo para a produção de grão.

**(b) Compatibilidade sexual com outras espécies de plantas cultivadas ou selvagens e distribuição na Europa das espécies compatíveis**

**(i) Cruzamento com variedades de *Zea* cultivadas**

O milho é polinizado pela acção do vento. As distâncias que o pólen viável pode percorrer dependem dos padrões de vento dominantes, humidade e temperatura. Todo o milho irá inter-polinizar-se, à excepção de certas variedades de milho para pipoca e híbridos que contêm um dos factores gametófitos (*GaS*, *Ga*, e séries alélicas *ga* no cromossoma 4). O pólen de um híbrido específico pode ser transportado pelo vento e polinizar outras zonas com milho híbrido, milho doce e milho para pipocas, caso esta última variedade não possua o factor gametófito de esterilidade (Hallauer, 1995). Assim, o pólen de milho movimenta-se livremente numa área, cai sobre as sedas da mesma variedade ou diferentes variedades, germina quase imediatamente após polinização e em 24 horas completa a fertilização.

**(ii) Cruzamento com espécies de *Zea* selvagem**

Não existem na Europa parentes selvagens relacionados com o milho. Deste modo, o risco de transferência genética a outras espécies é inexistente.

**3. Capacidade de sobrevivência**

**(a) Capacidade para formar estruturas de sobrevivência ou dormência**

O milho é uma cultura annual e as sementes são a única estrutura que sobrevive. Não se conhece a ocorrência de regeneração natural a partir de tecidos vegetativos.

**(b) factores específicos que afectem a capacidade de sobrevivência**

O milho não consegue sobreviver sem a assistência humana e não é capaz de sobreviver igualmente como infestante devido à selecção verificada ao longo da sua evolução. Não se encontra milho a crescer voluntariamente nas bordaduras, valas e bermas de estradas como infestante. Embora a semente de milho da cultura do ano precedente possa sobreviver a um Inverno moderado e germinar no ano seguinte, não consegue resistir enquanto infestante (Hallauer, 1995). O aparecimento de milho na rotação de campos após cultivo desta planta no ano anterior é raro sob condições Europeias. As plantas de milho que eventualmente cresçam voluntariamente são mortas pela geada na maioria das condições Europeias e facilmente controladas através de práticas agrícolas actuais incluindo a sacha e a utilização de herbicidas selectivos.

A sobrevivência do grão do milho depende da temperatura, humidade da semente, genótipo, protecção do invólucro e estado de desenvolvimento (Rossman, 1949). A temperatura de congelação tem um efeito adverso na germinação da semente do milho e foi identificado como

um dos principais riscos na produção de sementes de milho (Wych, 1988). Foi igualmente referenciado que temperaturas acima dos 45 °C poderão prejudicar a viabilidade das sementes de milho (Craig, 1977).

#### **4. Disseminação**

##### **(a) Forma e extensão da disseminação**

A disseminação pode ocorrer através do processo de dispersão de sementes e de pólen. A dispersão de grão de milho é altamente restringida no milho domesticado devido à estrutura de espiga que inclui uma camisa (folhas) de revestimento. No caso do pólen de milho, é na sua esmagadora maioria depositado no mesmo campo de origem devido à sua grande dimensão (90 a 100µm) com pequenas quantidades normalmente depositadas na direcção do vento.

Pela sua relativa grande massa, o pólen do milho não se desloca em quantidades significativas a mais de uns poucos metros da cultura. (Hansen, 1999) demonstrou que em folhas adjacentes a um campo de milho Bt, distanciadas a 0, 1 e 3 m, a deposição de pólen decresceu significativamente. Num estudo sobre o cruzamento da cultura de milho efectuado em França (AGPM, 1999), o fluxo do pólen, medido pelo grau de sucesso na fertilização de campos de milhos vizinhos, declinou para 1% a uma distância de 10 m do campo de origem. Outra investigação sobre a disseminação do pólen do milho mostrou que um total de 99% do pólen de milho foi medido a 50 m e 100% a 100 m da cultura de origem (Sears and Stanley-Horn, 2000).

##### **(b) Factores específicos que afectem a disseminação**

Em contraste com as plantas infestantes, o milho possui uma inflorescência feminina (espiga) com um núcleo central rígido (carolo) fechado com camisas (folhas modificadas). Consequentemente, a dispersão individual de sementes não ocorre naturalmente devido à estrutura das espigas onde estão incluídas. A disseminação de sementes é afectada pela colheita e transporte mecânicos bem como por insectos ou danos provocados pela acção do vento, podendo estes factores provocar a queda no solo de espigas amadurecidas, onde poderão permanecer sem serem colhidas.

O movimento de pólen pode originar a disseminação de material genético. A dispersão do pólen de milho é influenciada pelo seu grande tamanho e pela velocidade, direcção e turbulência do vento. O pólen do milho apresenta a maior dimensão entre os pólenes normalmente disseminados pela acção do vento a partir de um nível de altura comparável. A dispersão do pólen de milho é influenciada pelo seu grande tamanho e rápida taxa de sedimentação (Raynor *et al.*, 1972). Além do grau de disseminação, a viabilidade do pólen de

milho pode sofrer um impacto negativo em resultado de altas temperaturas frequentemente observadas na altura da antese.

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

O milho, devido aos seus muitos tipos diferentes, é cultivado numa larga faixa de condições climáticas. A maior parte do milho é produzida entre as latitudes 30° e 55°, com uma produção relativamente pequena em latitudes acima de 47° em qualquer parte do mundo (Shaw, 1988). A maior produção de milho ocorre nos locais em que a curva isotérmica dos meses mais quentes se situa entre os 21 e os 27 °C e em que a época sem gelo e/ou geada dura entre 120 a 180 dias. Uma precipitação estival de 150 mm é aproximadamente o limite mínimo para a cultura de milho sem irrigação, não existindo um limite máximo de precipitação para o seu desenvolvimento, embora um excesso de pluviosidade possa resultar num decréscimo de produção.

#### **6. No caso de espécies de plantas que não sejam normalmente cultivadas nos Estados-membros, descrição do habitat natural da planta, incluindo informação sobre os seus predadores, parasitas concorrentes naturais e simbioses**

O milho é largamente cultivado na União Europeia sendo esta responsável por uma quota significativa da produção global desta cultura. Entre as áreas com maior relevo na produção de milho na Europa incluem-se a Bacia do Danúbio, desde o Sudoeste da Alemanha ao Mar Negro, juntamente com o Sul de França até ao Vale do Pó no Norte da Itália.

#### **7. Outras potenciais interacções, pertinentes para o OGM, da planta com organismos que não sejam plantas e que existam no ecossistema onde é geralmente cultivada ou noutros locais, incluindo informação sobre eventuais efeitos tóxicos para o ser humano, para os animais e para outros organismos**

Como acontece com outras plantas, é conhecida a interacção no ambiente entre o milho cultivado e uma série de organismos, incluindo microorganismos, fauna selvagem e numerosos invertebrados que vivem no solo e nas folhas. Está também determinada a susceptibilidade do milho a várias doenças fúngicas e a pragas de nemátodos, insectos e ácaros. Por o milho constituir uma boa fonte de nutrição, são bem conhecidas as interacções com fauna selvagem vertebrada, nomeadamente pássaros e mamíferos que residam ou pastem no habitat agrícola, nas suas extremidades, bordaduras ou em valas dos campos (ver igualmente Seccção D.10).



## **C. INFORMAÇÕES RELATIVAS À MODIFICAÇÃO GENÉTICA**

Os métodos de modificação genética utilizados para criar o milho NK603 e a completa caracterização molecular do fragmento inserido foram já previamente descritos pela Monsanto no pedido efectuado em conformidade com o Regulamento (CE) n.º 258/97 e notificação C/ES/00/01 de acordo com a Directiva 2001/18/EC. Após a avaliação destes dados pelas autoridades reguladoras dos Estados Membros da U.E. e pelo Painel GMO da EFSA (EFSA, 2003a; EFSA, 2003b), foi aprovada em 2004 a importação, processamento e utilização na alimentação humana e animal do milho NK603 (Decisão da Comissão 2004/643/EC, 2004; Decisão da Comissão 2005/448/EC, 2005). Para complementar esta informação, serão sumariados os dados neste capítulo.

### **1. Descrição dos métodos utilizados para a modificação genética**

Um fragmento de restrição *MluI* isolado em gel de agarose do plasmídeo DNA, designado por PV-ZMGT32L, foi introduzido em células embriogénicas do milho utilizando o método de aceleração de partículas. Nas Figuras 1 e 2 é feita a referência e a descrição detalhada da construção do fragmento de restrição e o seu vector plasmídeo progenitor PV-ZMGT32.

Utilizando o método de aceleração de partículas, o DNA foi precipitado em partículas microscópicas de ouro utilizando cloreto de cálcio e espermidina. Uma gota das partículas revestidas foi então colocada num macrotransportador de plástico, que é acelerado a uma velocidade elevada através de um tubo pela descarga de gás hélio comprimido. O macrotransportador atinge uma rede em metal que pára o seu movimento mas que permite a continuidade do voo das partículas revestidas com o DNA. Essas partículas penetram as células alvo das plantas, onde o DNA é depositado e incorporado no seu cromossoma. O DNA introduzido contém um gene que codifica a tolerância ao glifosato (o gene *cp4 epsps*) e que quando expresso permite às células transformadas sobreviver e crescer num meio de cultura com a presença do glifosato, a substância activa dos herbicidas Roundup da Monsanto.

### **2. Natureza e origem do vector utilizado**

O NK603 foi criado utilizando um sistema de transformação por aceleração de partículas e um fragmento *MluI* isolado em gel, PV-ZMGT32L (Figura 1), contendo um gene 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (*epsps*) da cadeia CP4 do *Agrobacterium* sp. (CP4 EPSPS). O gene *cp4 epsps* codifica uma forma tolerante do EPSPS, que confere à planta tolerância ao glifosato.

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

#### Sequências codificadoras *cp4 epsps*

Os genes *cp4 epsps* contidos em cada uma das duas cassetes adjacentes de expressão genética da planta do vector plasmídeo PV-ZMGT32 codificam as proteínas CP4 EPSPS, que conferem tolerância ao herbicida glifosato.

#### Sequência reguladora de *cp4 epsps*

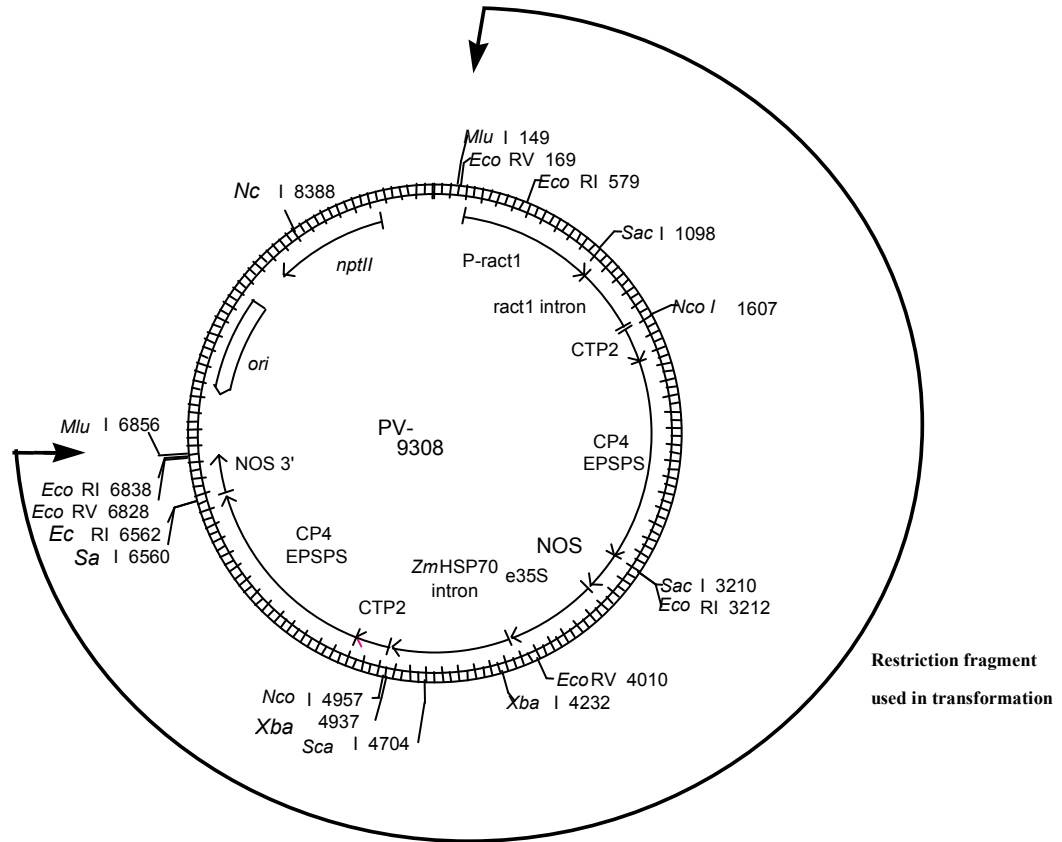
Em ambas as cassetes de expressão genética da planta, as sequências codificadoras de *cp4 epsps* são fundidas com as sequências do péptido de trânsito do cloroplasto (CTP), cuja sequência se baseia no CTP isolado de EPSPS de *Arabidopsis thaliana* (Klee *et al.*, 1987). Este CTP conduz as proteínas CP4 EPSPS para o cloroplasto, localização de EPSPS em plantas e igualmente o local da biossíntese de aminoácidos aromáticos (Kishore and Shah, 1988). Os CTP são normalmente separados da proteína “madura” após a sua transmissão ao plastídeo (Della-Cioppa *et al.*, 1986).

Na primeira cassette do gene, a sequência codificadora *ctp2-cp4 epsps* está sob o controlo da sequência *actin 1* do arroz (*ract1*), que contém o promotor e o primeiro intrão (McElroy *et al.*, 1990), introduzida a montante da sequência CTP. A segunda cassette contém a sequência codificadora *cp4 epsps* sob o controlo do promotor melhorado CaMV 35S (*e35S*) (Kay *et al.*, 1987; Odell *et al.*, 1985), com um tamanho aproximado de 0,6 kb. Localizado entre o promotor *e35S* e a sequência *cp4 epsps* encontra-se o intrão do milho *hsp70* com 0.8 kb (proteína de choque térmico), presente para aumentar os níveis de transcrição genética (Rochester *et al.*, 1986). Em cada cassette, a sequência *cp4 epsps* é ligada à sequência não traduzida de nopalina sintase 3' com 0.3 kb, *NOS 3'* (Fralely *et al.*, 1983), que fornece o sinal de poliadenilação do mRNA.

Esteve presente no plasmídeo PV-ZMGT32 uma sequência da origem da replicação (*ori*) para permitir a sua replicação em *E. coli* (Vieira and Messing, 1987). No seguimento da região *ori* está a sequência para a enzima neomicina fosfotransferase tipo II (*nptII*). Esta enzima confere resistência a certos antibióticos aminoglicósidos (ex. canamicina e neomicina) e foi utilizada para selecção de bactérias durante a construção do plasmídeo. A sequência codificadora para o gene *nptII* derivou do transposição procariótico Tn5 e está presente sob o seu próprio promotor bacteriano (Beck *et al.*, 1982). O plasmídeo resultante foi designado PV-ZMGT32 (Figura 1).

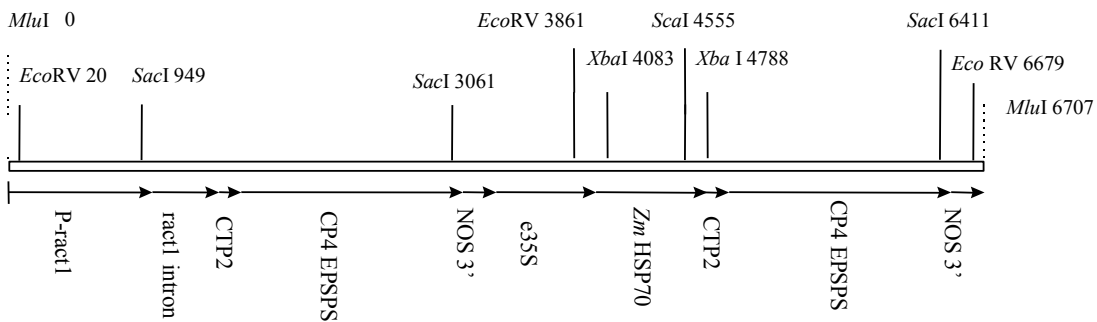
Os componentes individuais e a função das sequências de DNA utilizadas no plasmídeo, bem como detalhes adicionais sobre os organismos dadores, são fornecidos na Tabela 1.

O plasmídeo PV-ZMGT32 foi amplificado em *E. coli* e purificado de lisatos bacteriais. O fragmento linear de DNA da expressão do gene *cp4 epsps* foi isolado do plasmídeo antes das experiências de transformação do milho pela digestão do PV-ZMGT32 com a enzima de restrição *MluI*. O plasmídeo de suporte e as cassetes de expressão de CP4 EPSPS foram separados por electroforese em gel e o fragmento da casete de expressão foi electropurificado a partir de uma porção de gel. O fragmento de restrição *MluI* isolado em gel de agarose utilizado na transformação do NK603 foi designado PV-ZMGT32L, que contém apenas as cassetes de expressão do gene *cp4 epsps* na planta e não contém o gene marcador e de selecção *nptII* ou origem da replicação (Figura 2).



**Figura 1. Mapa plasmídeo do vector PV-ZMGT32**

Mapa circular do vector plasmídeo PV-ZMGT32 utilizado para preparar o fragmento *Mlu*I PV-ZMGT32L através de excisão e supressão da origem de replicação (*ori*) e sequências de marcadores (*nptII*) de resistência a antibióticos, como apresentado.



**Figura 2. Mapa linear do PV-ZMGT32L**

O fragmento de DNA PV-ZMGT32L foi utilizado para gerar o NK603 através da tecnologia de aceleração de partículas. As linhas a tracejado representam os segmentos *Mlu*I remanescentes após digestão de PV-ZMGT32.

Embora confirmada a sua presença, o segmento *Xba*I 4083 não está integrado na inserção, provavelmente devido à sua modificação (por exemplo através de metilação) ou por estar estruturalmente constringido.

**Tabela 1. Sumário dos componentes de DNA do plasmídeo PV-ZMGT32**

<b>Elemento Genético</b>	<b>Fonte</b>	<b>Tamanho (kb)</b>	<b>Função</b>
<b>Elementos genéticos presentes no fragmento de restrição <i>Mlu</i>I, designado PV-ZMGT32L, utilizado para transformação:</b>			
<b><u>Primeira cassette do gene <i>cp4 epsps</i></u></b>			
Intrão <i>P-ract1/ ract1</i>	<i>Oryza sativa</i>	1.4	Região 5' do gene do arroz <i>actin 1</i> contendo o promotor, o segmento de início da transcrição e o primeiro intrão (McElroy <i>et al.</i> , 1990).
<i>ctp2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.2	Sequência de DNA para o péptido de trânsito do cloroplasto, isolada da EPSPS de <i>Arabidopsis thaliana</i> , presente para direccionar a proteína CP4 EPSPS para o cloroplasto, o local de síntese do aminoácido aromático (Klee <i>et al.</i> , 1987).
<i>cp4 epsps</i>	<i>Agrobacterium</i> sp. estirpe CP4	1.4	A sequência de DNA para CP4 EPSPS, isolada da estirpe CP4 de <i>Agrobacterium</i> sp. que confere tolerância ao glifosato (Padgett <i>et al.</i> , 1996).
NOS 3'	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	0.3	Região 3' não traduzida do gene da nopalina sintase de T-DNA do <i>Agrobacterium tumefaciens</i> que termina a transcrição e dirige a poliadenilação do mRNA (Fraley <i>et al.</i> , 1983).
<b><u>Segunda cassette do gene <i>cp4 epsps</i></u></b>			
<i>e35S</i>	<i>Cauliflower mosaic vírus</i>	0.6	O promotor do vírus do mosaico da couve-flor - CaMV (Odell <i>et al.</i> , 1985) com a região intensificadora duplicada (Kay <i>et al.</i> , 1987).
<i>Zmhsp70</i>	<i>Zea mays L.</i>	0.8	Intrão do gene do milho <i>hsp70</i> (proteína choque-calor) presente para estabilizar o nível de transcrição do gene (Rochester <i>et al.</i> , 1986).
<i>ctp2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.2	Sequência de DNA para o péptido de trânsito do cloroplasto, isolado da EPSPS de <i>Arabidopsis thaliana</i> , presente para direccionar a proteína CP4 EPSPS para o cloroplasto, o local de síntese do aminoácido aromático (Klee <i>et al.</i> , 1987).
<i>cp4 epsps</i>	<i>Agrobacterium</i> sp. estirpe CP4	1.4	Sequência de DNA para CP4 EPSPS, isolada da estirpe CP4 de <i>Agrobacterium</i> sp. que concede tolerância ao glifosato (Padgett <i>et al.</i> , 1996).
NOS 3'	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	0.3	Região 3' não traduzida do gene nopalina sintase de T-DNA de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> que termina a transcrição e conduz à poliadenilação do mRNA (Fraley <i>et al.</i> , 1983).

**Tabela 1. (continuação) Sumário dos componentes de DNA do plasmídeo PV-ZMGT32**

<b>Elemento Genético</b>	<b>Fonte</b>	<b>Tamanho (kb)</b>	<b>Função</b>
<b>Elementos genéticos presentes no plasmídeo de suporte PV-ZMGT32, mas <u>não</u> presentes no fragmento de restrição <i>Mlu</i>I (PV-ZGMT32L) utilizado para transformação:</b>			
<i>ori</i>	<i>Escherichia coli</i>	0.65	A origem de replicação da cópia principal do plasmídeo de <i>E. coli</i> pUC119 (Vieira and Messing, 1987).
<i>nptII</i>	<i>Transposon Tn5</i>	0.8	O gene para a enzima neomicina fosfotransferase tipo II. Esta enzima confere resistência a certos antibióticos aminoglicósidos, permitindo assim a selecção de bactérias contendo o plasmídeo (Beck <i>et al.</i> , 1982).

## **D. INFORMAÇÕES RELATIVAS À PLANTA GENETICAMENTE MODIFICADA**

A informação relativa às características e segurança do NK603 foram anteriormente descritas pela Monsanto no pedido efectuado em conformidade com o Regulamento (CE) n.º 258/97 e notificação C/ES/00/01 de acordo com a Directiva 2001/18/EC. Após a avaliação destes dados pelas autoridades reguladoras dos Estados Membros da E.U. e pela EFSA (EFSA, 2003a; EFSA, 2003b), foi aprovada em 2004 a importação, processamento e utilização na alimentação humana e animal do NK603 (Decisão da Comissão, 2004; Decisão da Comissão, 2005).

### **1. Descrição da(s) característica(s) introduzida(s) ou modificada(s)**

O milho NK603 apresenta tolerância ao herbicida agrícola de largo espectro Roundup (que contém a substância activa glifosato) através das enzimas tolerantes ao glifosato 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) derivadas de *Agrobacterium* sp., estirpe CP4 (CP4 EPSPS). A enzima EPSPS cataliza o penúltimo passo da via do ácido shiquímico para a biossíntese de aminoácidos aromáticos, que está presente em todas as plantas verdes. A inibição desta enzima pelo glifosato conduz à redução de aminoácidos aromáticos, interferindo com o crescimento da planta e, finalmente, provoca a sua morte. Assim, o Roundup apresenta excelentes capacidades no controlo alargado de infestantes. No entanto, a sensibilidade do milho convencional ao glifosato tem impedido a utilização deste herbicida nesta cultura durante o seu ciclo vegetativo. Com a presença de CP4 EPSPS tolerante ao glifosato no milho NK603, é garantida na cultura a função continuada da via do aminoácido aromático, mesmo na presença de herbicida. O alargamento da utilização do herbicida Roundup, permitindo uma aplicação durante o ciclo vegetativo em culturas importantes como o milho, oferece uma nova opção de controlo de infestantes para muitos agricultores. Além disso, o uso de Roundup no milho é significativo pois permite ao agricultor tirar vantagem das bem conhecidas características de segurança e respeito pelo ambiente deste herbicida.

### **2. Informação sobre as sequências realmente inseridas/suprimidas**

#### **(a) Dimensão e estrutura da sequência inserida e métodos utilizados para a sua caracterização, incluindo informação sobre quaisquer partes do vector introduzido na PSGM ou sobre qualquer vector de DNA alienígena residualmente presente na PSGM**

O NK603 foi produzido através de tecnologia de aceleração de partículas utilizando um fragmento linear de DNA, PV-ZMGT32L, que contém duas cassetes do gene *cp4 epsps* ligadas em série (Figura 2).

Foi realizada uma análise molecular para caracterizar o DNA inserido no NK603. Foi analisado o DNA genómico utilizando uma análise de *Southern blot* para determinar o número sequências inseridas (número de locais de inserção no genoma do milho), o número de cópias (o número de fragmentos lineares de DNA integrados utilizados para a transformação num único local de inserção), a integridade dos promotores inseridos, regiões de codificação, e sequências de poliadenilação, e a presença ou ausência de sequências no plasmídeo de suporte. Os resultados da análise de *Southern blot* são apresentados nas Figuras 3 a 9.

Além disso, foi efectuada a reacção em cadeia da polimerase (PCR) para verificar as sequências nos limites 5' e 3' da inserção. Foram igualmente realizadas análises de PCR adicionais e a subsequente sequenciação de DNA de 4 produtos sobrepostos abrangendo o comprimento da sequência em NK603 para confirmar a caracterização do DNA inserido no NK603.

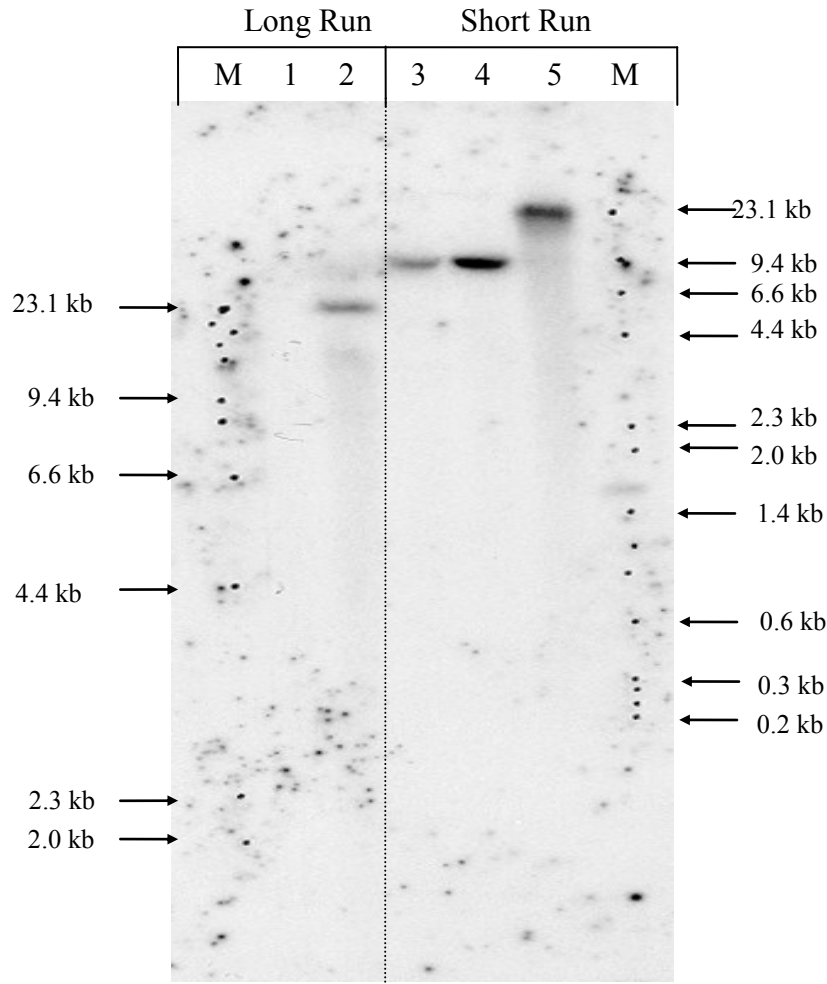
No global, os dados recolhidos das análises moleculares suportam as seguintes conclusões:

1. o genoma de NK603 contém uma sequência inserida de DNA localizada no fragmento de restrição *StuI* de 23 kb.
2. no interior de uma inserção simples existe uma cópia única e completa do fragmento de DNA, PV-ZMGT32L, utilizado para a transformação; a sequência inserção inclui igualmente um fragmento 217 bp inversamente ligado da região de melhoramento do promotor da actina do arroz no limite 3'. Este fragmento 217 bp não contém os elementos necessários para actuar como promotor e não faz parte de qualquer produto de transcrição detectável.
3. adjacente ao fragmento promotor da actina do arroz 217 bp estão 305 bp com homologia ao DNA do cloroplasto mas sem homologia a toxinas ou substâncias alergénicas conhecidas.
4. ambas as cassetes do gene *cp4 epsps* dentro da inserção simples estão intactas. A sequência do gene *cp4 epsps* da primeira cassette é idêntica na inserção e no plasmídeo. Na segunda cassette do gene, a sequência do gene *cp4 epsp I214p* difere em dois nucleótidos do gene *cp4 epsps* do plasmídeo. Uma das diferenças de nucleótidos é silenciada e a outra resulta na mudança de um único aminoácido na proteína expressa. Ambas as modificações de nucleótidos estiveram presentes no NK603 desde a sua transformação inicial.



5. o genoma de NK603 não contém qualquer DNA detectável do plasmídeo de suporte.
6. os limites 3' e 5' da sequência inserida de NK603 foram verificados através de PCR e sequenciação de DNA e as sequências adjacentes à sequência inserida foram confirmadas como nativas do genoma do milho.

Os dados da análise molecular estabelecem que apenas são codificadas na totalidade as proteínas CTP2-CP4 EPSPS e CTP2-CP4 EPSPS L214P pela sequência inserida no NK603, confirmada através de análise *Western blot*. O CP4 EPSPS L214P é estrutural e funcionalmente equivalente à CP4 EPSPS, mas a sua sequência difere num aminoácido. O aminoácido na posição 214 é uma leucina em CP4 EPSPS e uma prolina em CP4 EPSPS L214P.

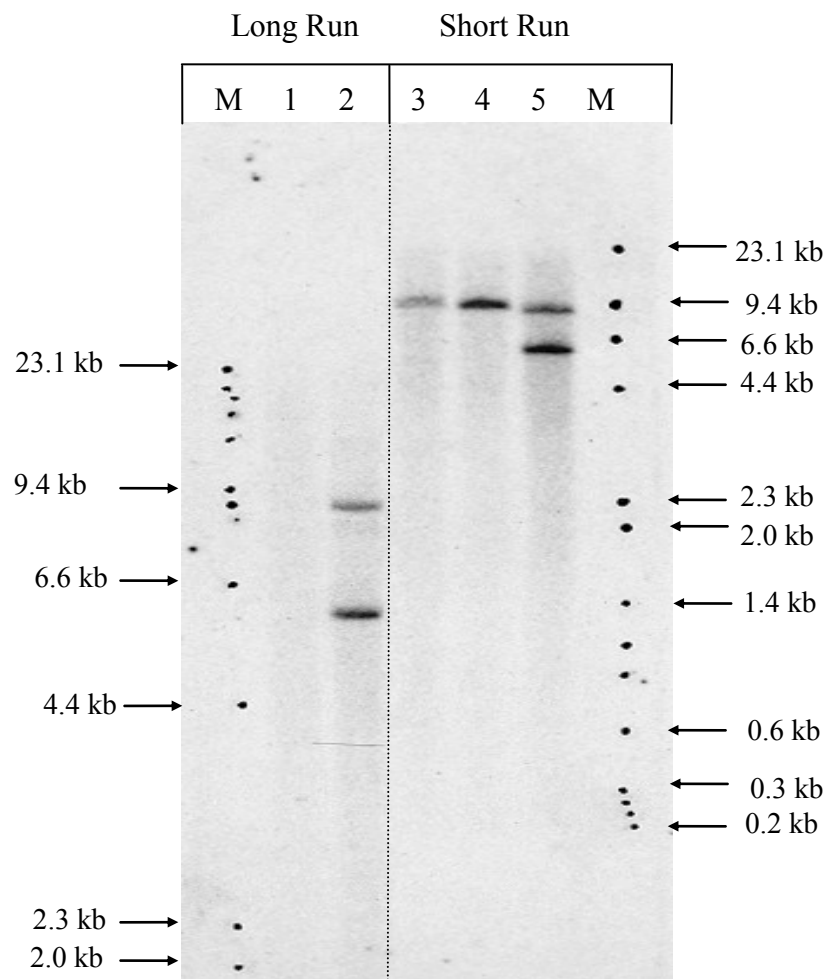


**Figura 3. Análise de Southern blot de NK603: determinação do número de inserções**

Dez microgramas de B73 (substância de controlo) e DNA genómico NK603 extraído de tecidos de folhas foram digeridos com *Stul*. O DNA do plasmídeo PV-ZMGT32 misturado com DNA B73 foram digeridos com *Stul* e *Scal*. As amostras de DNA foram separadas através de electroforese em gel, marcadas e depois detectadas com o plasmídeo marcado  $^{32}\text{P}$  PV-ZMGT32. As designações das faixas são as seguintes:

- Linha
- 1: DNA B73 (Long Run)
  - 2: DNA de NK603 (Long Run)
  - 3: DNA B73 injectado com 14.5 pg PV-ZMGT32 (Short Run)
  - 4: B73 DNA injectado com 29 pg PV-ZMGT32 (Short Run)
  - 5: DNA de NK603 (Short Run)

→ Símbolo que indica os tamanhos obtidos através de marcadores MW em gel marcado com brometo de etídio. M indica as faixas do marcador MW.

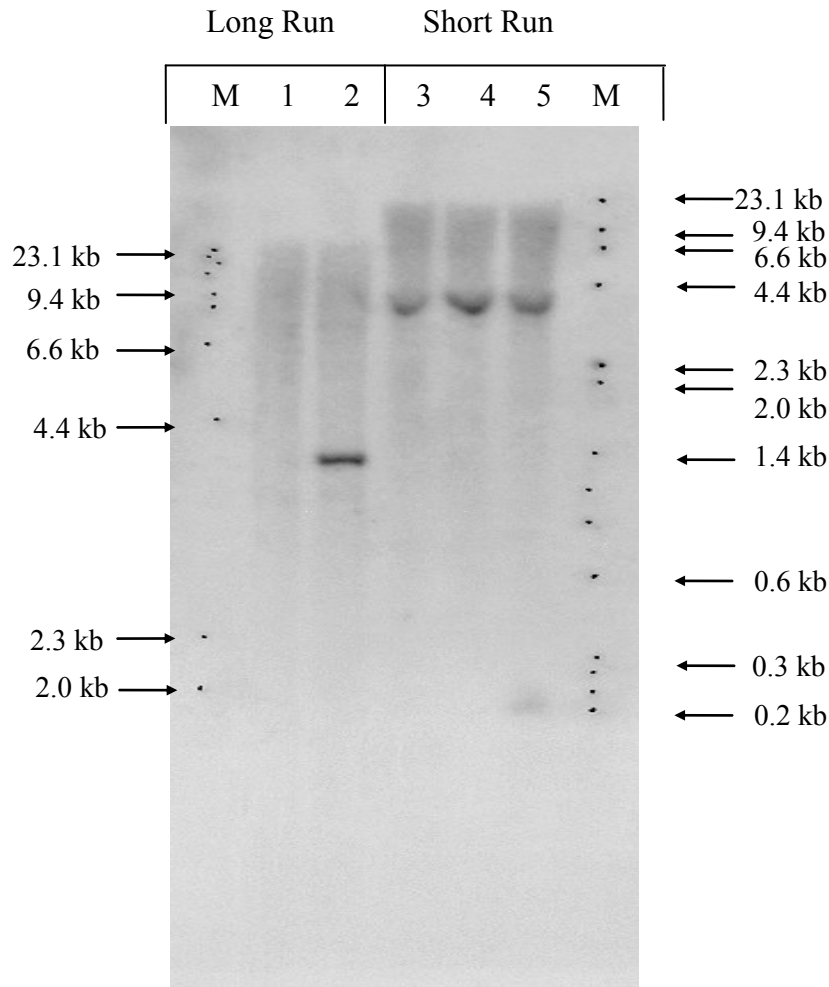


**Figura 4. Análise de Southern blot de NK603: determinação do número de cópia**

Dez microgramas de B73 (substância de controlo) e DNA genómico de NK603 extraído de tecidos de folhas foram digeridos com *Xba*I. As amostras de DNA foram separadas através de electroforese em gel, marcadas e depois detectadas com o plasmídeo marcado <sup>32</sup>P PV-ZMGT32. As designações das faixas são as seguintes:

- |       |    |   |
|-------|----|---|
| Linha | 1: | DNA B73 (Long Run)                                  |
|       | 2: | DNA de NK603 (Long Run)                             |
|       | 3: | DNA B73 injectado com 14.5 pg PV-ZMGT32 (Short Run) |
|       | 4: | DNA B73 injectado com 29 pg PV-ZMGT32 (Short Run)   |
|       | 5: | DNA de NK603 (Short Run)                            |

→ Símbolo que indica os tamanhos obtidos através de marcadores MW em gel marcado com brometo de etídio. M indica as faixas do marcador MW.



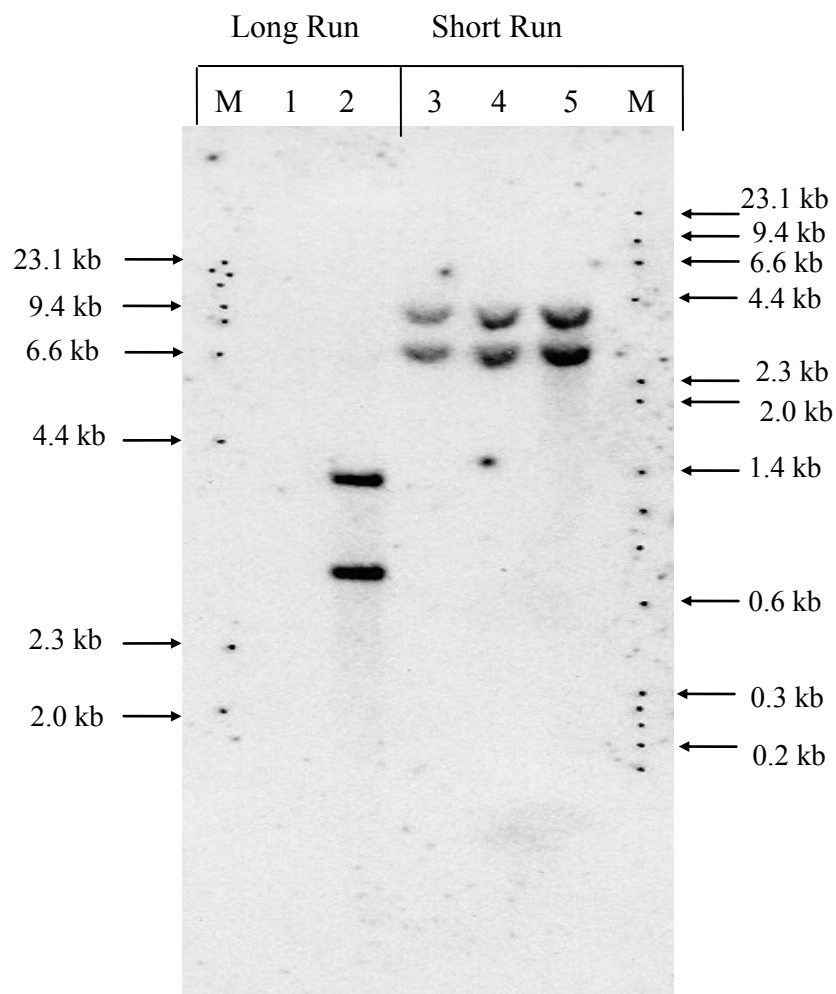
**Figura 5. Análise de Southern blot de NK603: intrão P-ract1/ract1**

Dez microgramas de B73 (substância de controlo) e DNA genómico de K603 extraído de tecidos de folhas foram digeridos com *EcoRV*. As amostras de DNA foram separadas através de electroforese em gel, marcadas e depois detectadas com uma mistura de duas sondas: o intrão completo *P-ract1/ract1* marcado com  $^{32}\text{P}$ -dCTP e um fragmento 175 bp do intrão *P-ract1/ract1* marcado com  $^{32}\text{P}$ -dATP.

As designações das faixas são as seguintes

- |       |    |   |
|-------|----|---|
| Linha | 1: | DNA B73 (Long Run)                                  |
|       | 2: | DNA de NK603 (Long Run)                             |
|       | 3: | DNA B73 injectado com 14.5 pg PV-ZMGT32 (Short Run) |
|       | 4: | DNA B73 injectado com 29 pg PV-ZMGT32 (Short Run)   |
|       | 5: | DNA de NK603 (Short Run)                            |

→ Símbolo que indica os tamanhos obtidos através de marcadores MW em gel marcado com brometo de etídio. M indica as faixas do marcador MW.

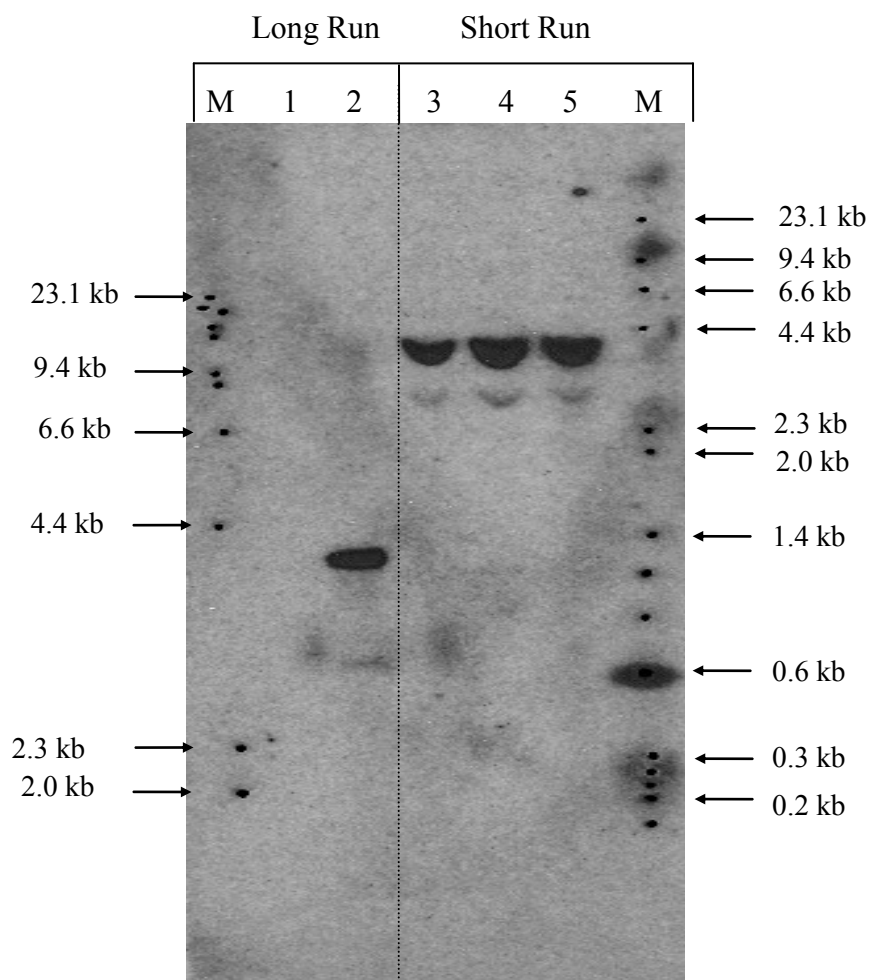


**Figura 6. Análise de *Southern blot* de NK603: sequência *ctp2-cp4 epsps***

Dez microgramas de B73 (substância de controlo) e DNA genómico de NK603 extraído de tecidos de folhas foram digeridos com *EcoRV*. As amostras de DNA foram separadas através de electroforese em gel, marcadas e depois detectadas com o fragmento marcado  $^{32}\text{P}$  *ctp2-cp4 epsps*. As designações das faixas são as seguintes:

- Linha            1:        DNA B73 (Long Run)  
                   2:        DNA de NK603 (Long Run)  
                   3:        DNA B73 injectado com 14.5 pg PV-ZMGT32 (Short Run)  
                   4:        DNA B73 injectado com 29 pg PV-ZMGT32 (Short Run)  
                   5:        DNA de NK603 (Short Run)

→ Símbolo que indica os tamanhos obtidos através de marcadores MW em gel marcado com brometo de etídio. M indica as faixas do marcador MW.

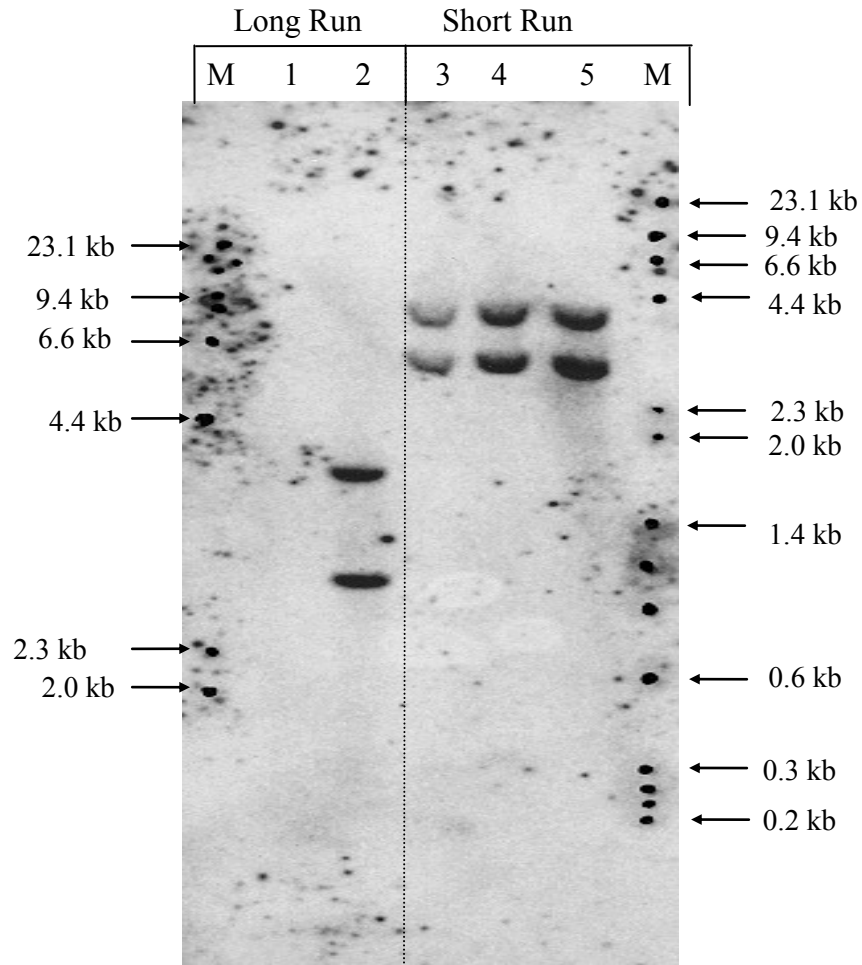


**Figura 7. Análise de Southern blot de NK603: promotor e35S**

Dez microgramas de B73 (substância de controlo) e DNA genómico de NK603 extraído de tecidos de folhas foram digeridos com *EcoRV*. As amostras de DNA foram separadas através de electroforese em gel, marcadas e depois detectadas com o fragmento marcado  $^{32}\text{P}$  e35S. As designações das faixas são as seguintes:

- |        |    |   |
|--------|----|---|
| Linhas | 1: | DNA B73 (Long Run)                                  |
|        | 2: | DNA de NK603 (Long Run)                             |
|        | 3: | DNA B73 injectado com 14.5 pg PV-ZMGT32 (Short Run) |
|        | 4: | DNA B73 injectado com 29 pg PV-ZMGT32 (Short Run)   |
|        | 5: | DNA de NK603 (Short Run)                            |

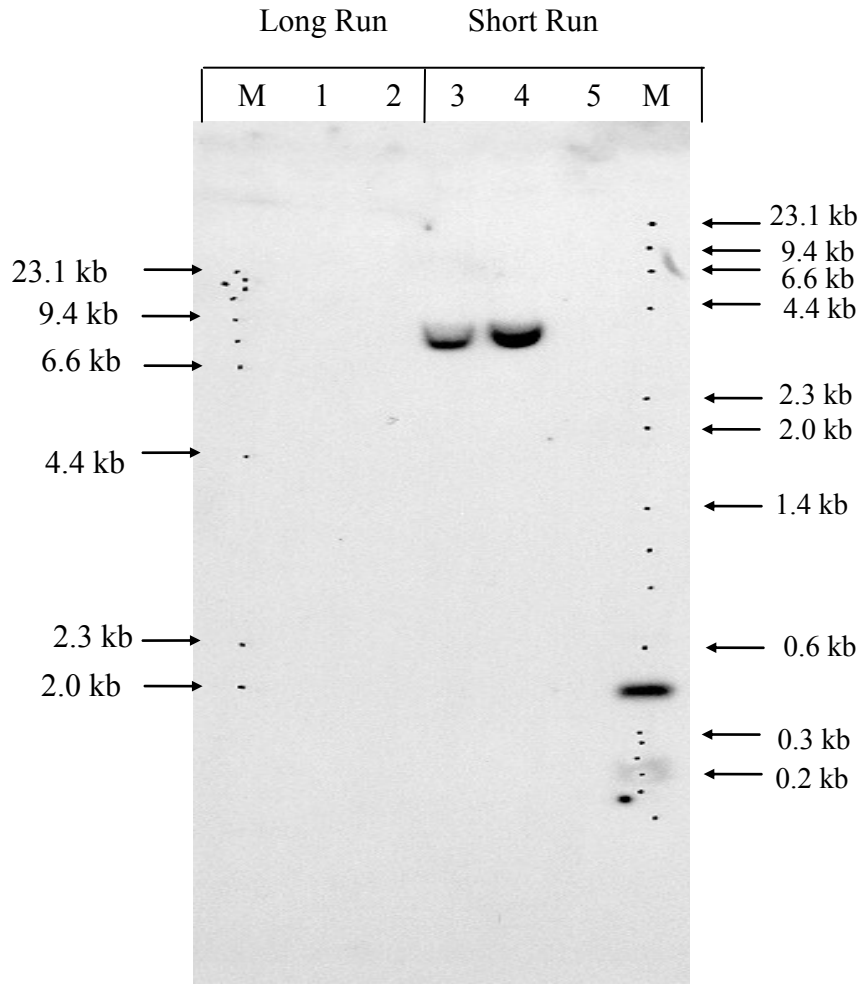
→ Símbolo que indica os tamanhos obtidos através de marcadores MW em gel marcado com brometo de etídio. M indica as faixas do marcador MW.



**Figura 8. Análise de *Southern blot* de NK603: sequência NOS 3' de poliadenilação**  
 Dez microgramas de B73 (substância de controlo) e DNA genómico de NK603 extraído de tecidos de folhas foram digeridos com *EcoRV*. As amostras de DNA foram separadas através de electroforese em gel, marcadas e depois detectadas com o fragmento da sequência de poliadenilação NOS 3' marcado com  $^{32}\text{P}$ . As designações das faixas são as seguintes:

- Linhas
- 1: DNA B73 (Long Run)
  - 2: DNA de NK603 (Long Run)
  - 3: DNA B73 injectado com 14.5 pg PV-ZMGT32 (Short Run)
  - 4: DNA B73 injectado com 29 pg PV-ZMGT32 (Short Run)
  - 5: DNA de NK603 (Short Run)

→ Símbolo que indica os tamanhos obtidos através de marcadores MW em gel marcado com brometo de etídio. M indica as faixas do marcador MW.



**Figura 9. Análise de *Southern blot* de NK603: análise de suporte**

Dez microgramas de B73 (substância de controlo) e DNA genómico K603 extraído de tecidos de folhas foram digeridos com *SacI*. As amostras de DNA foram separadas através de electroforese em gel, marcadas e depois detectadas com a sequência inteira de suporte marcada com  $^{32}\text{P}$  consistindo nas regiões codificadoras *ori* e *nptII*. As designações das faixas são as seguintes:

- Linha            1:        DNA B73 (Long Run)  
                   2:        DNA de NK603 (Long Run)  
                   3:        DNA B73 injectado com 14.5 pg PV-ZMGT32 (Short Run)  
                   4:        DNA B73 injectado com 29 pg PV-ZMGT32 (Short Run)  
                   5:        DNA de NK603 (Short Run)

→ Símbolo que indica os tamanhos obtidos através de marcadores MW em gel marcado com brometo de etídio. M indica as faixas do marcador MW.



**(b) Em caso de deleção, dimensão e função da região suprimida**

Não aplicável.

**(c) Número de cópias da sequência inserida**

NK603 contém uma única inserção de DNA com uma única cópia do fragmento de DNA introduzido (ver D.2.a).

**(d) Localização da sequência inserida nas células da planta (integrada nos cromossomas, cloroplastos, mitocôndria, ou mantida numa forma não integrada) e método para a sua determinação:**

NK603 contém uma única sequência inserida no genoma, segregada de acordo com a genética Mendeliana. A análise do Chi quadrado dos dados segregados de NK603 é consistente com um único local activo de inserção dos genes *cp4 epsps* (ligados em série) no DNA genómico nuclear.

**3. Informação sobre a expressão da sequência inserida**

**(a) Informação sobre a expressão evolucionária da sequência inserida durante o ciclo de vida da planta e métodos utilizados para a sua caracterização**

Os níveis de expressão das proteínas CP4 EPSPS inseridas foram medidos em tecidos de NK603, produzidos em condições de campo durante a época de cultivo de 1999 na U.E. e a época de 2002 nos E.U.A., utilizando a técnica de ensaio ELISA. Os campos experimentais localizavam-se em regiões importantes de cultivo de milho e ofereciam uma alargada variedade de condições ambientais. O cultivo dos campos foi realizado com o recurso a práticas agrícolas próprias da cultura comercial do milho.

Em 1999, foram estimados os níveis de proteína CP4 EPSPS em forragem e grão, recolhidos de quatro locais em França e Itália. Foram utilizadas quatro replicações em cada um dos quatro locais de ensaio.

Em 2002, foram produzidas amostras de teste e de controlo em ensaios de campo nos E.U.A. Em quatro locais foram plantados três campos de ensaio duplicados utilizando blocos casualizados. Foram recolhidas folhas “overseason” (OSL), raízes “overseason” (OSR), pólen, forragem, raízes de forragem e tecidos de grão de cada um dos campos duplicados em todos os locais de ensaio, e calculados os níveis de proteína CP4 EPSPS.

A substância de teste utilizada nestes estudos foi o milho NK603. A substância de controlo foi milho convencional com um historial genético semelhante ao da substância testada mas não contendo a sequência inserida em NK603. Foram confirmadas as identidades das substâncias de teste e de controlo através da verificação da documentação de certificação antes da análise. Para reforçar a confirmação das identidades das substâncias de teste e de controlo, foram conduzidas análises de reacção em cadeia da polimerase (PCR) para a sequência específica em amostras de sementes e de grão.

Foram calculados os níveis de proteínas para todos os tipos de tecidos numa base de microgramas ( $\mu\text{g}$ ) por gramas (g) de peso fresco (fw). Foi então medido o teor de humidade em todos os tipos de tecidos, tendo os níveis de proteínas sido convertidos e expressos numa base de peso seco (dw). Os resultados são sumariados nas Tabelas 2 e 3.

**Tabela 2. Sumário dos níveis<sup>1</sup> de proteína CP4 EPSPS medidos pela técnica ELISA em tecidos de plantas NK603 de ensaios de campo realizados na E.U. em 1999**

Tipo de tecido	Média ( $\mu\text{g/g fw}$ ) <sup>2</sup> (SD)	Intervalo ( $\mu\text{g/g fw}$ ) <sup>3</sup>
<b>FORAGEM</b> <sup>(a,c)</sup>	48.6 (8.3)	43.6 – 60.9
<b>GRÃO</b> <sup>(b,c)</sup>	8.4 (5.4)	2.2 – 13.2

1. Os níveis de proteína são apresentados em microgramas ( $\mu\text{g}$ ) de proteína por grama de peso fresco (fw) dos tecidos para os quatro locais.
2. Foram calculados os desvios médio e padrão através de análises de amostras de tecido de NK603 dos quatro locais (n=16).
3. Valores mínimos e máximos das análises de amostras dos quatro locais.
  - a. Tecidos de forragem: LOD = 0.39  $\mu\text{g/g fw}$ .
  - b. Tecidos de grão: LOD = 0.16  $\mu\text{g/g fw}$ .
  - c. Os valores de todas as amostras de controlo convencionais estavam abaixo do LOD específico para esse tipo de tecido (n=16).

**Tabela 3. Sumário dos níveis de proteína CP4 EPSPS medidos pela técnica ELISA em tecidos de plantas NK603 de ensaios de campo realizados nos E.U.A. em 2002**

<b>Tipo de tecido<sup>1</sup></b>	<b>Média (µg/g fw)<sup>2</sup> (SD)</b>	<b>Intervalo (µg/g fw)<sup>3</sup></b>	<b>Média (µg/g dw)<sup>4</sup> (SD)</b>	<b>Intervalo (µg/g dw)</b>
<b>OSL-1</b>	60 (7.2)	49 – 73	410 (78)	310 – 560
<b>OSL-3</b>	63 (6.1)	54 – 76	300 (49)	220 – 400
<b>OSL-4</b>	96 (29)	71 – 160	430 (170)	290 – 890
<b>OSL-5</b>	113 (26)	72 – 150	400 (96)	280 – 560
<b>OSR-1</b>	21 (6.7)	13 – 31	160 (54)	86 – 250
<b>OSR-3</b>	13 (3.5)	5.8 – 19	76 (24)	37 – 120
<b>OSR-4</b>	15 (2.6)	11 – 20	100 (20)	71 – 140
<b>OSR-5</b>	17 (3.9)	11 – 25	99 (32)	60 – 170
<b>Forragem</b>	32 (12)	15 – 52	100 (56)	32 – 200
<b>Raízes de forragem</b>	23 (6.8)	12 – 33	140 (53)	75 – 220
<b>Pólen</b>	340 (85)	250 – 460	650 (150)	450 – 1000
<b>Grão</b>	12 (2.8)	7.5 – 16	14 (3.2)	8.5 – 18

1. Foram analisadas 12 amostras contendo a proteína CP4 EPSPS (n=12) para cada tipo de tecido.
2. Os níveis de proteína são apresentados em (µg) de proteína por grama (g) de tecido numa base de peso fresco (fw). Foram calculados os desvios médio e padrão (SD) para cada tipo de tecido nos vários locais de ensaio.
3. Foram determinados os valores mínimos e máximos para cada tipo de tecido de cada local de ensaio.
4. Os níveis de proteína são apresentados em µg/g de tecido numa base de peso seco (dw). Os valores dw foram calculados pela divisão dos valores fw pelos factores de conversão do peso seco, obtidos através dos dados das análises de humidade.

**(b) Partes da planta onde a sequência inserida se exprime (por exemplo, raízes, haste, pólen, etc.)**

Como a forragem e o grão são os tecidos mais relevantes na avaliação da segurança, foram calculados os níveis de proteína nesses tecidos em ambas as épocas de cultivo. Além disso, foram igualmente calculados os níveis de proteína no pólen, raízes de forragem, OSL e OSR na época de cultivo de 2002, como apresentado na Tabela 3.

**4. Informação sobre o modo como a planta geneticamente modificada difere da planta receptora em termos de: (a) Modo e/ou taxa de reprodução, (b) Disseminação, (c) Capacidade de sobrevivência**

Com base em séculos de experiência com milho convencional na U.E., considera-se existir apenas um potencial negligenciável do milho para invadir habitats naturais ou persistir no ambiente agrícola sem qualquer intervenção humana. A planta do milho é conhecida como um pobre competidor, que fora de condições de cultivo não apresenta qualquer impacto significativo no ambiente.

Foram realizados ensaios comparativos das características fenotípicas e agronómicas do NK603 e milho convencional em ensaios de campo, em nove locais na Alemanha e França entre 2000 e 2002, utilizando diferentes variedades de NK603.

No geral, as comparações em cada local de ensaio (por zona de cultivo) não indicaram diferenças entre o NK603 e o milho convencional. Nos locais em que se detectaram diferenças significativas ( $p < 0.05$ ), estas foram numericamente pequenas e não permitiram traçar qualquer tendência consistente entre os campos de ensaio ou híbridos testados. Nenhuma das diferenças estatisticamente significativas detectadas foi considerada biologicamente expressiva em termos de potencial de infestação ou crescimento e desenvolvimento adverso.

Em conjunto, os dados de campo dos nove ensaios realizados na Alemanha e França demonstram que o NK603 e o milho convencional não são diferentes em termos de características de crescimento, desenvolvimento e morfologia, características de vigor e saúde das plantas, susceptibilidade a pragas, doenças e aplicação de pesticidas, e parâmetros agronómicos, incluindo o potencial de produção.

A ausência de diferenças significativas na morfologia reprodutiva (ex. deformações da espiga, incidência de plantas estéreis), bem como a ausência de modificações nos parâmetros de maturidade reprodutiva (ex. altura de dispersão do pólen ou crescimento das barbas) e os indicadores do potencial de disseminação (ex. número de sementes medido como produção

de grão) indicam que o modo de reprodução da planta e as suas características reprodutivas não foram afectadas pela modificação genética. Pode-se assim concluir que o NK603 não difere do milho convencional no que se refere ao seu comportamento reprodutivo e ao potencial de disseminação no ambiente.

A ausência de diferenças significativas observada nestes ensaios no que diz respeito à morfologia, vigor e saúde da planta e à sua susceptibilidade a pragas indicam que o vigor biológico geral e as características de sobrevivência do milho NK603 não foram alteradas pela modificação genética. É assim altamente improvável que o NK603 seja mais persistente dentro ou fora do campo ou que tenha aumentado a sua capacidade de sobrevivência, potencial infestante ou de invasão de habitats natural do que o milho convencional. Além disso, a tolerância introduzida ao glifosato é uma característica com relevância agronómica em campos de milho comerciais cultivados com NK603, quando tratados com o herbicida agrícola Roundup ou com qualquer outro herbicida contendo glifosato, e as suas consequências para o ambiente são consideradas negligenciáveis.

É especialmente importante o facto de não existir qualquer informação derivada destes ensaios que indique a presença de um potencial do NK603 para se estabelecer, persistir e dispersar numa área superior à do milho convencional. Em casos onde ocorra a libertação accidental e se estabeleçam plantas de NK603, estas podem ser facilmente controladas por herbicidas selectivos actualmente disponíveis (excepto glifosato) e por meios mecânicos. Assim, o NK603 não possui características reprodutivas ou de disseminação diferentes dos do milho convencional, e não possui potencial significativo de sobrevivência, dispersão, persistência ou invasão de áreas não agrícolas, sem intervenção humana.

## **5. Estabilidade genética da sequência inserida e estabilidade fenotípica da PSGM**

### Estabilidade fenotípica

Os dados de segregação para nove gerações de descendência de NK603 são apresentados na Tabela 4 e demonstram a estabilidade fenotípica do DNA inserido através de seis gerações de cruzamento e três gerações de auto polinização. Os dados são apresentados para a geração  $BC_0F_1$  (derivada do cruzamento de  $R_0$  com a linha "B73"), para a geração  $BC_1F_1$  (derivada do cruzamento de plantas  $BC_0F_1$  com B73), para as gerações  $BC_2F_1$ ,  $BC_3F_1$ ,  $BC_4F_1$ ,  $BC_5F_1$ ,  $BC_2F_2$  (derivadas de plantas individuais de  $BC_2F_1$ ), para a geração  $BC_2F_3$  (derivada de plantas individuais de  $BC_2F_2$ ) e para a geração  $BC_4F_3$ .

Os valores estatisticamente significativos para os dados de segregação foram determinados utilizando a análise do Chi quadrado. Para estas análises foi determinado um valor Chi quadrado ( $\chi^2$ ) utilizando a seguinte fórmula:

$$\chi^2 = \sum [ (|o - e| - 0.5)^2 / e ]$$

onde **o** é a frequência observada do genótipo, **e** a frequência esperada do genótipo, e 0.5 o factor de correcção Yates para análises com um grau de liberdade (Little and Hills, 1978).

Todas as gerações segregaram da forma esperada para um único local de inserção, excepto a geração BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>. O número mais elevado do que o previsto de plantas positivas (contendo o gene *cp4 epsps*) na geração BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> pode ser explicado pela selecção de gâmetas, resultado de taxas elevadas de aplicação de glifosato na geração anterior a BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> (i.e., BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>). Foi documentada em plantas a selecção preferencial para gâmetas positivos quando foram aplicados agentes selectivos como herbicidas (Sari-Gorla *et al.*, 1994; Touraev *et al.*, 1995).

A análise do Chi quadrado dos resultados de segregação para a característica de tolerância ao glifosato na descendência é consistente com um único local activo de inserção das cassetes em série de *cp4 epsps* no DNA nuclear genómico de NK603 de acordo com a genética Mendeliana. Estes resultados são consistentes com as conclusões da análise molecular descrita na Secção D.2.(a).

**Tabela 4. Dados de segregação e análises de descendência de NK603**

Geração	Observado <sup>1</sup>			Esperado			Chi quadrado
	Positivo	Negativo	Segregação	Positivo	Negativo	Segregação	
BC <sub>0</sub> F <sub>1</sub>	14	15		14.5	14.5		0.00 <sup>ns</sup>
BC <sub>1</sub> F <sub>1</sub>	32	23		27.5	27.5		1.16 <sup>ns</sup>
BC <sub>2</sub> F <sub>1</sub>	135	81		108.0	108.0		13.00 <sup>**</sup>
BC <sub>2</sub> F <sub>2</sub>	86	26		84.0	28.0		0.12 <sup>ns</sup>
BC <sub>2</sub> F <sub>3</sub>	9	16	24	12.3	12.3	24.5	2.02 <sup>#</sup>
BC <sub>3</sub> F <sub>1</sub>	44	45		44.5	44.5		0.00 <sup>ns</sup>
BC <sub>4</sub> F <sub>1</sub>	127	103		115.0	115.0		2.30 <sup>ns</sup>
BC <sub>4</sub> F <sub>3</sub>	12	5	17	8.5	8.5	17.0	2.88 <sup>#</sup>
BC <sub>5</sub> F <sub>1</sub>	26	35		30.5	30.5		1.05 <sup>ns</sup>

<sup>1</sup> Os dados são apresentados em número de plantas positivas e negativas com base nas pulverizações de glifosato, à excepção das gerações BC<sub>2</sub>F<sub>3</sub> and BC<sub>4</sub>F<sub>3</sub> onde os dados são o número de homozigóticos positivos nas linhas das espigas, número de homozigóticos negativos nas linhas das espigas e número de linhas das espigas segregadas com base em pulverizações de glifosato.

<sup>ns</sup> não significativa a p = 0.05 (chi quadrado = 3.84, 1 df).

<sup>#</sup> não significativa a p = 0.05 (chi quadrado = 5.99, 2 df).

<sup>\*\*</sup> significativa a p = 0.01 (chi quadrado = 6.63, 1 df).

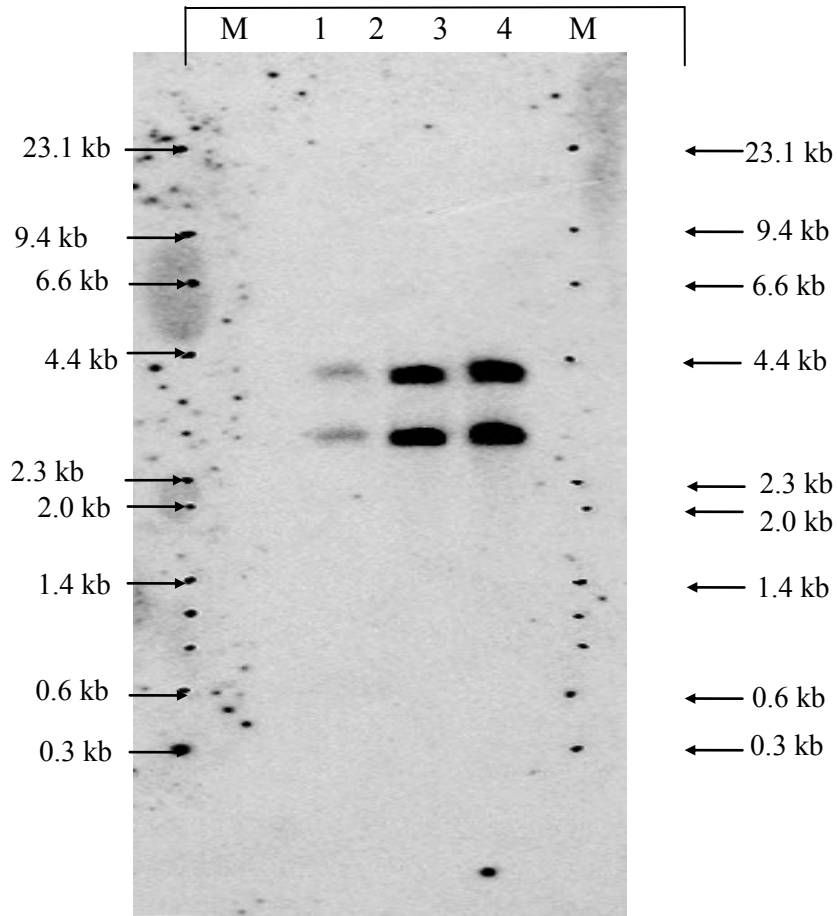
### Estabilidade genética

Foram realizadas análises de *Southern blot* para confirmar a estabilidade estrutural do DNA inserido em NK603. O DNA genómico extraído de tecidos de folhas da geração F<sub>1</sub> (a descendência do retrocruzamento de R<sub>0</sub>) e da quinta geração de cruzamento (BC<sub>5</sub>F<sub>1</sub>) de NK603 foram digeridos com *EcoRV*, marcados e detectados com o fragmento *ctp2-cp4 epsps*.

Os resultados das análises de *Southern blot* são apresentados na Figura 10. O DNA convencional de controlo (faixa 1) não apresentou quaisquer sinais de hibridação. O DNA do plasmídeo PV-ZMGT32 misturado com o DNA convencional de controlo (faixa 2), o DNA de NK603 F<sub>1</sub> (faixa 3) e DNA de NK603 BC<sub>5</sub>F<sub>1</sub> (faixa 4), todos produziram as bandas esperadas de ~3.8 kb e ~2.8 kb, cada uma contendo a sequência de *ctp2-cp4 epsps*.

Não se observaram diferenças significativas no padrão das bandas entre o DNA extraído da geração F<sub>1</sub> e o da geração BC<sub>5</sub>F<sub>1</sub> de NK603, demonstrando a estabilidade do DNA inserido em amostras que abrangeram cinco gerações.





**Figura 10 Análise de Southern blot de NK603: estabilidade do DNA inserido**

Dez microgramas de B73 (Controlo) e DNA genómico de NK603 extraído de tecidos de folhas foram digeridos com *EcoRV*. As amostras de DNA foram separadas através de electroforese em gel, marcadas e depois detectadas com o fragmento de *ctp2-cp4 epsps* marcado com  $^{32}\text{P}$ . As designações das faixas são as seguintes:

Linha 1: DNA B73

2: DNA B73 injectado com 29 pg PV-ZMGT32

3: DNA de NK603 F1

4: DNA de NK603 BC5F1

→ Símbolo que indica os tamanhos obtidos através de marcadores MW em gel com brometo de etídio. M representa as faixas do marcador MW. [Marcador MW II (1  $\mu\text{g}$ ) misturado com Marcador MW IX (1  $\mu\text{g}$ )].

## **6. Qualquer alteração da capacidade de transferência do material genético das PSGM para outros organismos**

Em comparação com milho convencional, não são de esperar mudanças na capacidade das plantas geneticamente modificadas em trocar material genético com bactérias pois não foram utilizados na inserção em NK603 quaisquer elementos conhecidos envolvidos na transferência de genes.

Como se concluiu na secção D.4, a morfologia reprodutiva do NK603 mantém-se inalterada em comparação com milho convencional. Assim, não se espera que a produção e viabilidade de pólen sejam afectadas pela modificação genética e que a frequência de cruzamento com outro milho ou parentes selvagens (que não estão presentes na U.E.) seja diferente no NK603 quando comparada com o milho convencional.

## **7. Informação sobre quaisquer efeitos tóxicos, alergénicos ou quaisquer outros efeitos prejudiciais para a saúde humana resultantes da modificação genética**

As proteínas CP4 EPSPS inseridas estão presentes em baixos níveis na planta e foi previamente demonstrada a sua segurança para a saúde animal e humana.

A conclusão da segurança humana e animal das proteínas CP4 EPSPS foi demonstrada com base em a) uma caracterização exaustiva das proteínas CP4 EPSPS, b) comparação destas proteínas com proteínas e alergénicos conhecidos, c) a sua digestão em fluidos gástricos e intestinais simulados, e d) ensaios com proteínas CP4 EPSPS na procura de sinais de qualquer toxicidade aguda em estudos de alimentação por sonda em roedores. No pedido efectuado em conformidade com o Regulamento (CE) n.º 258/97 e notificação para NK603 de acordo com a Directiva 2001/18/EC (C/ES/00/01), foram relatados em detalhe estes ensaios de segurança. Após a avaliação destes dados pelas autoridades reguladoras dos Estados Membros da U.E. e pelo grupo EFSA OGM (EFSA, 2003a; EFSA, 2003b), foi aprovada em 2004 a importação, processamento, utilização em alimentação humana e animal de NK603 (Decisão da Comissão, 2004; Decisão da Comissão, 2005).

Além disso, foram realizados estudos exaustivos para comparar a composição do grão e forragem do NK603 com controlos convencionais e híbridos comerciais, em 1998 nos E.U.A. e na U.E. em 1999. As análises da composição foram realizadas para avaliar a sua similaridade (proteína, gordura, cinzas, carboidratos, humidade), fibra de detergente ácido (FDA), fibra de detergente neutra (FDN), aminoácidos, ácidos gordos, vitamina E, minerais (cálcio, cobre, ferro, magnésio, manganésio, fósforo, potássio, sódio e zinco), ácido fítico e teor de inibidor de

tripsina do grão, bem como a similaridade no teor de ADF e NDF na forragem. Estes dados analíticos para o NK603 semeado em múltiplas localizações nos E.U.A. e na U.E. durante duas épocas demonstraram que o milho NK603 apresenta uma composição equivalente ao milho de controlo e a outras variedades de milho cultivadas comercialmente, com a excepção das proteínas CP4 EPSPS inseridas.

A segurança alimentar das proteínas CP4 EPSPS na matriz de milho foi reforçada através de estudos de alimentação animal de dose repetida em ratos e em frangos utilizando dietas contendo NK603. Estes estudos confirmaram a ausência de efeitos tóxicos associados às proteínas introduzidas e a ausência de efeitos pleiotrópicos não antecipados ligados à modificação genética. Não se observaram sinais de quaisquer efeitos adversos para a saúde humana ou animal. Estes estudos de alimentação foram previamente avaliados pela EFSA, e o NK603 foi declarado como seguro (EFSA, 2003a; EFSA, 2003b). Consequentemente, o milho NK603 foi autorizado para a importação, processamento e utilização em alimentação humana e animal na União Europeia (Decisão da Comissão, 2004; Decisão da Comissão, 2005).

As proteínas CP4 EPSPS têm um historial de utilização segura através do consumo de sementes Roundup Ready como o milho NK603 (individualmente ou em misturas de grão) e soja Roundup Ready. Todos estes produtos e seus derivados têm sido manuseados e consumidos sem qualquer notícia de efeitos adversos na saúde.

Em conclusão, a cuidadosa avaliação da segurança das proteínas CP4 EPSPS e os testes de segurança do NK603 demonstram que é altamente improvável que as proteínas inseridas possam causar quaisquer efeitos adversos na saúde humana e animal. A ausência de quaisquer efeitos adversos para a saúde após o consumo durante vários anos de diversas plantas geneticamente modificadas que contém a proteína CP4 EPSPS confirma a segurança de NK603.

**8. Informações sobre a segurança da PSGM para a saúde animal, especialmente no que se refere a quaisquer efeitos tóxicos, alergénicos ou a quaisquer outros efeitos prejudiciais resultantes da modificação genética, quando a PSGM for utilizada em alimentos para animais**

A segurança para a saúde animal do NK603 e das proteínas CP4 EPSPS expressas foi incluída na avaliação da segurança humana efectuada na secção D.7.

**9. Mecanismo de interacção das plantas geneticamente modificadas com os organismos-alvo (se pertinente)**

Não aplicável. O NK603 é tolerante a herbicidas e não possui quaisquer organismos-alvo.

## **10. Potenciais alterações das interacções da PSGM com organismos não alvo resultantes da modificação genética**

Como qualquer outra planta, é conhecida a interacção no ambiente entre o milho cultivado e uma série de organismos, incluindo microorganismos, fauna selvagem e numerosos invertebrados que vivem no solo e nas folhas. É igualmente conhecida a susceptibilidade do milho a várias doenças fúngicas e a pragas como nemátodos, insectos e ácaros, que o agricultor tem tentado tradicionalmente controlar através da aplicação de produtos de protecção das plantas ou com outras práticas agrícolas como a rotação de culturas. Por o milho constituir uma boa fonte de nutrição, são bem conhecidas as interacções com fauna selvagem vertebrada, nomeadamente aves e mamíferos que residam ou se alimentem no habitat agrícola criado pela cultura e nas suas extremidades, bordaduras ou valas.

Demonstrada a equivalência entre o NK603 e o milho convencional, não se considera diferente o padrão de interacção do NK603 com outros organismos no ambiente em relação ao milho convencional, excepto para a exposição directa adicional de pragas herbívoras do milho às novas proteínas CP4 EPSPS expressas na planta. Através de transferência trófica e processos de decomposição, outros organismos como predadores das pragas do milho poderão ser expostos a alguns níveis muito baixos destas proteínas. A expressão das novas proteínas de NK603 expressas é assim uma característica de PSGM que pode causar efeitos adversos em organismos não alvo.

Teoricamente, o potencial de toxicidade das novas proteínas expressas para organismos não alvo pode afectar os seus níveis de população no ambiente de recepção. Contudo, a proteína EPSPS é comum no ambiente e não existe qualquer razão *a priori* para esperar que quaisquer efeitos adversos possam ocorrer sob as condições de utilização do produto recomendadas. Além disso, o potencial de exposição de organismos não alvo às proteínas CP4 EPSPS introduzidas expressas no NK603 não apresenta um mecanismo concebível para causar efeitos adversos, devido às suas propriedades.

Com base na ocorrência natural e no historial de exposição de organismos não alvo a CP4 EPSPS e enzimas EPSPS relacionadas, que são conhecidas como uma classe de proteínas seguras sem actividade biológica em relação a outros organismos, não existe razão *a priori* para suspeitar que a CP4 EPSPS possam ser nociva para organismos não alvo.

Em suma, os riscos ambientais resultantes de interacções ecológicas de organismos não alvo com NK603 são negligenciáveis, pois o seu contacto com as novas proteínas introduzidas apresenta um potencial negligenciável para causar nestes quaisquer efeitos tóxicos ou um impacto em cadeia nas suas interacções intra- ou inter-espécies. Consequentemente, também

as interacções tróficas entre organismos não alvo permanecerão inalteradas. Assim, quaisquer riscos de efeitos indirectos significativos nos níveis de população de organismos não alvo no ambiente receptor ou o seu funcionamento em ecossistemas sob e sobre o solo nas proximidades da cultura são igualmente negligenciáveis.

Finalmente, desde a primeira comercialização de NK603 na América do Norte em 2001, não foram apresentadas quaisquer provas de efeitos adversos no ambiente desta cultura em organismos não alvo.

### **11. Potenciais interacções com o ambiente abiótico**

Como acontece com outras plantas, é conhecida a interacção do milho cultivado com o ambiente abiótico (solo, água e ar), como por exemplo pelo estabelecimento de raízes no solo, absorção de água e nutrientes e trocas gasosas. A produção de milho é em geral conhecida como tendo impacto indirecto em processos biofísicos e bioquímicos no solo, através de mobilização do solo, aplicação de fertilizantes e estabelecimento de uma monocultura numa área definida. No entanto, todas as práticas agrícolas actualmente utilizadas para cultivar milho na U.E. permanecem aplicáveis para o NK603 e não são necessárias quaisquer técnicas específicas para o seu cultivo, controlo e colheita.

Demonstrada a equivalência substancial do NK603 com o milho convencional (com a excepção da característica introduzida de tolerância ao glifosato) no que diz respeito à sua composição, e a sua similaridade morfológica, de desenvolvimento, produção, reprodução, disseminação, susceptibilidade a pragas e características de saúde e sobrevivência da planta, não existem quaisquer provas de que este milho possa ser diferente do milho convencional, relativamente ao seu padrão de interacção com o ambiente abiótico.

Embora a CP4 EPSPS seja uma nova proteína expressa no NK603, não é uma proteína estranha ao ambiente. A proteína CP4 EPSPS em NK603 é inócua pois representa uma das muitas diferentes proteínas EPSPS encontradas na natureza. Não são conhecidas quaisquer interacções negativas com o ambiente abiótico na família de proteínas EPSPS.

Em conclusão, não é de esperar um impacto nocivo de NK603 no ambiente abiótico em resultado do uso deste produto na União Europeia.

## **12. Descrição das técnicas de detecção e identificação das plantas geneticamente modificadas**

A sequência inserida no NK603 é detectável utilizando o validado método quantitativo PCR, específico para a detecção do DNA introduzido presente no NK603. O protocolo deste método de detecção e o relatório de validação do mesmo, preparado pelo Laboratório de Referência Comunitário (CRL) em colaboração com a Rede Europeia de Laboratórios OGM (ENGL) encontram-se publicados no sítio na Internet do CRL (<http://gmo-crl.jrc.it/statusofdoss.htm>).

Em alternativa, as plantas podem igualmente ser pulverizadas com o herbicida Roundup para a detecção do fenótipo expresso de tolerância ao glifosato. Pode ser também utilizada a técnica ELISA para detecção de proteínas CP4 EPSPS, expressas no NK603.

## **13. Informações sobre anteriores libertações das plantas geneticamente modificadas, se pertinente**

O NK603 foi testado em condições de campo em diversas localizações geográficas desde 1997. Na União Europeia, o NK603 foi plantado para ensaios de campo em várias locais desde 1999 (*ver* notificações Monsanto números B/FR/99/04/06; B/IT/99/17; B/BE/00/WSP13; B/FR/00/03/05; B/DE/00/115; B/ES/00/06; B/FR/01/01/01; B/ES/01/05; B/ES/02/03; B/DE/03/148; B/FR/04/02/02; B/ES/04/17; B/ES/04/19; B/SE/05/9831; B/FR/06/01/01; B/FR/06/12/09; B/ES/06/06; B/ES/06/08; 26OA/OER/GMO/02 (República Checa); B/CZ/06/04; B/SK/06/01; BE/ES/07/05; B/ES/07/07; B/DK/07/01; B/DK/07/02; B/DK/07/03; B/DK/07/04).

Nos E.U.A., Canadá, Argentina e vários outros países por todo o mundo, o NK603 está legalmente colocado no mercado para a totalidade de utilizações dadas ao milho convencional, incluindo o cultivo de variedades. O NK603 tem sido cultivado comercialmente em milhões de hectares nos E.U.A. e Canadá desde 2001. Em 2004, foram comercializadas pela primeira vez variedades de NK603 na Argentina e desde 2005 estão igualmente a cultivar este milho outros países na América e Ásia.

## **E. INFORMAÇÕES RELATIVAS AO LOCAL DE LIBERTAÇÃO**

### **1. Localização e dimensão dos locais de libertação**

Os ensaios realizar-se-ão em parcelas localizadas no Norte e Sul do país. São 2 locais de libertação, um na região do Alentejo, Distrito de Portalegre (Monforte) e um na região do Minho, distrito de Viana do Castelo (Monção) (Anexo II)

Pretendem-se realizar ensaios para avançar com a caracterização agronómica de variedades contendo NK603, desenvolver e otimizar os programas de controlo de infestantes com herbicidas, mais apropriados para cada zona.

Os ensaios com herbicidas para otimizar programas de gestão de infestantes serão realizados nos dois locais de libertação propostos.

No Anexo III, apresentam-se as autorizações dos agricultores colaboradores confirmando a aceitação da realização dos ensaios com o evento NK603.

As áreas a utilizar para os ensaios em cada local de libertação nunca excederão 2.000m<sup>2</sup> (variedades com NK603) e 6000m<sup>2</sup> no total (incluindo bordaduras com milho convencional).

Apresenta-se em seguida uma breve descrição do esquema dos ensaios a realizar.

#### Ensaio com herbicidas

Estes ensaios serão efectuados em parcelas de maior tamanho, sem repetições, onde poderão ser avaliadas, em maior escala, as variedades e programas de herbicidas mais apropriados em cada zona.

A superfície máxima estimada para estes ensaios é de 6000m<sup>2</sup> em cada localização (incluindo plantas GM e bordaduras com milho convencional), sendo que a superfície máxima estimada de milho contendo NK603 é de 2000m<sup>2</sup>.

Serão utilizados neste ensaio apenas herbicidas autorizados em Portugal. No Anexo IV é apresentado um esquema do ensaio.

Os ensaios serão feitos em colaboração com uma empresa especializada na realização de ensaios de produtos fitossanitários.

## **2. Descrição do ecossistema nos locais de libertação, incluindo o respectivo clima, flora e fauna.**

A agricultura praticada nas regiões circundantes aos locais de libertação é variada, sendo o olival, cereais de Outono-Inverno e tomate predominantes nas áreas circundantes ao local de libertação situado no Alentejo (Monforte).

Na parcela localizada no Minho (Monção), existe para além de floresta (eucaliptos e pinheiros), pastagens.

No Anexo V, é feita uma breve caracterização dos locais de libertação no que diz respeito às condições climáticas verificadas, nomeadamente, precipitação, temperatura e insolação.

## **3. Presença de organismos selvagens aparentados ou de espécies cultivadas sexualmente compatíveis**

Em Portugal não existem outras espécies selvagens ou cultivadas compatíveis sexualmente. Em relação à própria espécie (milho), serão cumpridas as medidas de mitigação do risco de contaminação (distância mínima de 400m em relação a outros campos de milho, com um mínimo de 12 linhas de bordadura com milho convencional do mesmo ciclo FAO, não modificado geneticamente).

## **4. Proximidade de biótopos oficialmente reconhecidos ou de zonas protegidas que possam ser afectados**

Um dos locais de libertação localizado em Monforte, está inserido numa Zona de Protecção Especial, no entanto, e face aos resultados dos inúmeros ensaios realizados em vários países com este evento (NK603) torna-se claro que o seu comportamento é igual ao do milho convencional, excepto à sua tolerância ao herbicida glifosato. Por tudo isso se considera que a realização de ensaios nesta zona, não constitui um risco diferente ao do milho convencional, cujo cultivo é permitido nesta zona.

Relativamente ao outro local de libertação, Monção, não existem biótopos ou zonas protegidas oficialmente reconhecidas nas zonas agrícolas onde se insere o ensaio.



## **F. INFORMAÇÕES RELATIVAS À LIBERTAÇÃO**

### **1. Objectivo da libertação**

O objectivo desta libertação é realizar ensaios para avançar com a caracterização agronómica de variedades contendo NK603 e desenvolver e otimizar os programas de gestão de infestantes mais apropriados para cada zona, com herbicidas autorizados em Portugal.

#### Ensaios com herbicidas

O objectivo destes ensaios é avançar com a caracterização agronómica de variedades contendo NK603 e desenvolver e otimizar os programas de gestão de infestantes mais apropriados para cada zona.

Neste ensaios serão avaliados vários programas de gestão de infestantes, tendo como base herbicidas à base de glifosato e herbicidas habitualmente utilizados em Portugal para a cultura do milho.

A aplicação dos herbicidas à base de glifosato serão aplicados por uma empresa especializada na realização de ensaios de produtos fitossanitários.

### **2. Datas e duração previstas de libertação**

Os locais de libertação em questão serão semeados a partir da data de emissão da autorização por parte da Autoridade Competente, e quando as condições climáticas o permitirem. A data de destruição terá como máximo Fevereiro de 2010 ainda que tentar-se-á colher e destruir todos os ensaios antes do fim de 2010, se as condições climáticas o permitirem.

Nos anos seguintes (campanhas 2011/2012 e 2012/2013), a data prevista para sementeira será no início de Abril de cada ano e a data prevista para colheita e destruição dos ensaios será no fim de Fevereiro do ano seguinte.

### **3. Método de libertação das plantas geneticamente modificadas**

As PSGM serão plantadas como sementes, manualmente ou através de maquinaria específica (semeador pneumático monogrão).

As sementes serão transportadas no dia da sementeira, nas quantidades necessárias para o ensaio, em sacos fechados, devidamente identificados e a sua manipulação nos ensaios será

realizada por pessoal qualificado e advertido das medidas de prevenção que devem ser adoptadas para evitar riscos de disseminação.

No final da sementeira de cada um dos locais de libertação, quando efectuada por sementeiro proceder-se-á à limpeza deste, no local do ensaio, de forma a evitar contaminações.

Também no final da sementeira, as sementes que sobrem, serão recuperadas para assegurar uma perfeita traçabilidade de todo o material geneticamente modificado.

Durante a experimentação, a zona será vigiada regularmente para verificar o estado das margens e cumprimento das medidas de isolamento.

De forma análoga à sementeira, as máquinas utilizadas na colheita serão limpas no local do ensaio, sendo que as linhas de bordadura serão as últimas a serem colhidas.

Caso haja recolha manual de grãos para análise, durante e no fim da libertação, será recolhida a maçaroca inteira e os grãos que não forem utilizados serão destruídos.

No final da libertação, os grãos não utilizados para análise ou controlos posteriores, serão enterrados no solo no local do ensaio, incinerados ou destruídos mediante trituração mecânica (durante a colheita através de trituradora incorporada na máquina de colher ou imediatamente depois) e incorporação posterior das fracções não viáveis no solo em sulcos profundos.

As linhas de bordadura semeadas com milho convencional, serão também destruídas no fim da libertação do mesmo modo acima referido para o milho com evento NK603.

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

Antes da sementeira efectuar-se-á uma preparação clássica do solo. A zona experimental será tratada segundo as práticas agronómicas usuais para a cultura do milho, incluindo a fertilização, protecção fungicida e irrigação.

Quando as maçarocas alcançarem a maturação, serão colhidas de forma manual ou mecânica.

Depois da colheita, os grãos ou partes de plantas que não tenham sido colhidos para análise, serão destruídas por enterramento no solo no próprio local, incineração ou trituração mecânica, como referido no ponto anterior. Os resíduos vegetais serão destruídos com equipamento adequado e enterrados no solo em sulcos profundos.

As plantas de milho que possam crescer no ano seguinte na parcela de ensaio, serão destruídas até que o cultivo de NK603 seja autorizado.

Não será cultivado milho para fins comerciais no local utilizado para os ensaios no ano seguinte.

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

A densidade de sementeira será de 85.000 plantas por hectare.

**G. INFORMAÇÕES SOBRE PLANOS DE MONITORIZAÇÃO, CONTROLO, TRATAMENTO PÓS-LIBERTAÇÃO E TRATAMENTO DE RESÍDUOS**

**1. Precauções tomadas**

**a) Distância em relação a espécies sexualmente compatíveis, quer de organismos aparentados selvagens, quer de plantas cultivadas**

Na Europa não existem espécies selvagens sexualmente compatíveis com o milho, por isso, não se requer nenhuma precaução específica relativa a tais espécies vegetais.

Os ensaios estarão a mais de 400m de distância de outros milhos cultivados.

**b) Medidas para minimizar/impedir a dispersão de qualquer órgão reprodutor das PSGM (por exemplo, pólen, sementes, tubérculos)**

Segundo o que é referido nos pontos F3 e F4, as sementes dos ensaios serão manuseadas por pessoal autorizado, qualificado e advertido das medidas preventivas a adoptar para evitar riscos de disseminação.

Será levada a cabo uma traçabilidade escrupulosa das sementes, antes, durante e depois da sementeira.

As sementes serão transportadas no dia da sementeira, nas quantidades necessárias para o ensaio, em sacos fechados, devidamente identificados e a sua manipulação nos ensaios será realizada por pessoal qualificado e advertido das medidas de prevenção que devem ser adoptadas para evitar riscos de disseminação.

Para prevenir a dispersão através do pólen, a superfície semeada nestes ensaios, estará a mais de 400m de distância de outros milhos cultivados.

Para além disso, o local onde ocorrerá a libertação, estará rodeada no mínimo por 12 linhas de milho convencional, semeado no mesmo dia e com ciclo vegetativo semelhante ao das PSGM, e que será também destruído no fim do ensaio.

Em caso de colheita de amostras de tecido para estudo, estas serão colocadas em recipientes ou sacos fechados, devidamente identificados e enviados para análise. Todos estes procedimentos serão efectuados por pessoal autorizado qualificado.

## **2. Descrição dos métodos de tratamento do local pós libertação**

Em todos os casos, os produtos vegetais procedentes das parcelas de ensaios serão destinados exclusivamente a ensaios ou destruídos no final do mesmo.

No fim da libertação, os grãos colhidos para análise serão destruídos por enterramento no solo no próprio local, por incineração ou trituração mecânica.

Depois da colheita, os grãos ou partes de plantas que não tenham sido colhidos para análise, serão destruídas por enterramento no solo no próprio local, incineração ou trituração mecânica, como referido no ponto anterior. Os resíduos vegetais serão destruídos com equipamento adequado e enterrados no solo em sulcos profundos.

## **3. Descrição dos métodos de tratamento pós-libertação das plantas geneticamente modificadas, incluindo os seus resíduos**

Todos os produtos vegetais procedentes da descendência das plantas semeadas com a modificação genética NK603 serão destruídos como se indica no ponto anterior.

Em todos os casos, nenhum produto vegetal destes ensaios terminará na cadeia alimentar humana ou animal.

Não será cultivado milho para fins comerciais no local utilizado para os ensaios no ano seguinte. O milho convencional semeado como bordadura também será destruído no fim da libertação.

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

Serão efectuadas visitas regulares, pelo menos 1 vez em cada 4 semanas ou quando necessário, durante a libertação, a cada um dos locais de ensaio. Este controlo regular permitirá identificar rapidamente qualquer evento ou desenvolvimento indesejado. Serão feitas

visitas mais regulares entre a sementeira e a floração, para garantir que é respeitado o perímetro de isolamento e para averiguar a existência de algum efeito adverso.

No caso de algum efeito adverso ser observado durante o período de libertação, será comunicado imediatamente à Autoridade Competente.

No final dos ensaios de campo, será efectuada uma Informação para a Autoridade Competente, onde conste qualquer potencial efeito inesperado, para o meio ambiente directamente relacionado com as plantas de milho geneticamente modificado e as medidas implementadas de acordo com a situação.

Durante o ano seguinte à realização dos ensaios e até à floração do milho, os locais de libertação, serão visitados regularmente a fim de destruir eventuais rebrotes de milho.

Esta destruição não será necessária quando o cultivo de milho NK603 esteja autorizado na União Europeia.

## **5. Descrição dos eventuais planos de emergência**

A avaliação do risco ambiental, que se apresenta mais adiante, indica que este é desprezível, por conseguinte, não se efectuará uma estratégia de gestão de risco diferente da utilizada para o milho convencional.

No entanto, além das observações dos parâmetros agrónomicos, que são a base do ensaio planificado, será realizado um plano de vigilância regular durante todo o ensaio que permitirá identificar rapidamente todo e qualquer acontecimento ou desenvolvimento não desejado. Neste sentido, os ensaios podem ser interrompidos com os meios de destruição que se indicam a seguir:

- Destruição química; tratamento com um herbicida convencional não selectivo de milho (adaptado à destruição do OGM considerado)
- Destruição mecânica e incorporação no solo em sulcos profundos

Perante qualquer desenvolvimento indesejado, a Autoridade Competente será imediatamente informada pela pessoa de contacto (ver Anexo I).

No fim dos ensaios será efectuada uma Informação para a Autoridade Competente, onde conste qualquer efeito inesperado adverso, potencial, para o meio ambiente, directamente relacionado com as plantas de milho geneticamente modificado, que tenha se desenvolvido durante o ensaio, e as medidas implementadas de acordo com a situação.

## **6. Métodos e processos de protecção do local**

Como se trata de ensaios com plantas, não se contempla nenhum procedimento para proteger a zona de ensaios.

Não obstante, solicitamos o tratamento confidencial da informação dos dados de identificação das parcelas e dos proprietários das mesmas, assim como do esquema de ensaio e identidade dos técnicos responsáveis, garantindo a sua disponibilidade às Autoridades que o desejem.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGPM. (1999) Dispersion du pollen en production de maïs consommation. *Etude réalisée dans le cadre de comité de biovigilance*
- Alexander, M. (1961) Introduction to soil microbiology. *John Wiley and Sons*
- Beck, E., Ludwig, G., Auerswald, E.A., Reiss, B. and Schaller, H. (1982) Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene*, **19**, 327-36.
- Bodet, J.M., Straebler, M. and Broucqsault, L.M. (1994) Type de jachère et couvert. *Recueil des communications du colloque "Jachères 94"*, 19-41.
- Chevrier, A. and Barbier, S. (2002) Performances économiques et environnementales des techniques agricoles de conservation des sols: création d'un référentiel et premiers résultats (Mémoire de fin d'études). *Institut National de la Recherche Agronomique de Versailles-Grignon. Association pour la Promotion d'une Agriculture Durable*
- Commission Decision 2004/643/EC. (2004) Commission Decision of 19 July 2004 concerning the placing on the market, in accordance with Directive 2001/18/EC of the European Parliament and the Council, of a maize product (*Zea mays* L. line NK603) genetically modified for glyphosate tolerance. *Official Journal L 295 of 18/09/2004*, 0035-0037.
- Commission Decision 2005/448/EC. (2005) Commission Decision of 3 March 2005 authorising the placing on the market of foods and food ingredients derived from genetically modified maize line NK603 as novel foods or novel food ingredients under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council. *Official Journal L158 of 21/06/2005*, 0020-0022.
- Craig, W.F. (1977) Production of hybrid corn seed. *Corn and Corn Improvement*, 671-719.
- Della-Cioppa, G., Bauer, S.C., Klein, B.K., Shah, D.M., Frayley, R.T. and Kishore, G.M. (1986) Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 6873-6877.
- Devos, Y., Reheul, D. and De Schrijver, A. (2005) The co-existence between transgenic and non-transgenic maize in the European Union: a focus on pollen flow and cross fertilization. *Environ. Biosafety Res.*, **4**, 71-87.

- Dies Jambrino, J.I. and Fernandez-Anero. (1997) Resultados en la recuperacion de la biodiversidad en el Raco de l'Olla (Albufera de Valencia) tras la aplicacion selectiva de un herbicida de baja peligrosidad. *Bol. San. Veg. Plagas*, **23**, 27-37.
- Edwards, W.M., Norton, L.D. and Redmond, C.E. (1988) Characterizing macropores that affect infiltration into notilled soil. *J. Soil Sci.*, **52**, 483-487.
- EFSA. (2003a) 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. *The EFSA Journal*, **Question No EFSA-Q-2003-003**, 1-13.
- EFSA. (2003b) 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) No 258/97 by Monsanto. *The EFSA Journal*, **Question No EFSA-Q-2003-002**, 1-14.
- Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Sanders, P.R., Flick, J.S., Adams, S.P., Bittner, M.L., Brand, L.A., Fink, C.L., Fry, J.S., Galluppi, G.R., Goldberg, S.B., Hoffmann, N.L. and Woo, S.C. (1983) Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 4803-7.
- Goss, J.A. (1968) Development, physiology and chemistry of corn and wheat pollen. *The botanical review*, 333-358.
- Hallauer, A.R. (1995) Potential for outcrossing and weediness of genetically modified insect protected corn.
- Halsey, M.E., Remund, K.M., Davis, C.A., Qualls, M., Eppard, P.J. and Berberich, S.A. (2005) Isolation of maize from pollen-mediated gene flow by time and distance. *Crop Sci.*, **45**, 2172-2185.
- Hansen, L. (1999) Non-target effects of Bt corn pollen on the monarch butterfly (*Lepidoptera Danaidae*). *Abstracts from the 54th Annual meeting North Central Branch of the Entomological Society of America*
- Hebblethwaite, J.F. (1995) The contribution of no-till to sustainable and environmentally beneficial crop production: a global perspective. *Conservation technology information center*, 1-11.



- Herrero, M.P. and Johnson, R.R. (1980) High temperature stress and pollen viability of maize. *Crop Science*, **20**, 796-780.
- Hicks, D.A. and Thomison, P.R. (2004) Corn Management. *Corn: Origin, History, Technology, and Production*, **Chapter 3.2**, 481-522.
- Hoekstra, F.A., Crowe, L.M. and Crowe, J.H. (1989) Differential desiccation sensitivity of corn and *Pennisetum* pollen linked to their sucrose contents. *Plant. cell and environment*, **12**, 83-91.
- Hough-Goldstein, J., VanGessel, M. and Witmar, J. (2002) Manipulation of weed communities to enhance ground-dwelling predator populations in corn. *Poster presentation at 2002 National meeting for the Entomological Society of America, Ft. Lauderdale, FL*.
- Jones, M.D. and Newell, L.C. (1948) Longevity of pollen and stigmas of grasses: buffalo grass, *Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm, and corn, *zea mays* L. *Journal of Am. Soc. of Agronomy*, **40**, 195-204.
- Kay, R., Chan, A., Daly, M. and McPherson, J. (1987) Duplication of CaMV 35S Promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science*, **236**, 1299-1302.
- Kiesselbach, T.A. (1949) The structure and reproduction of corn. *Nebraska agricultural experiment station bulletin*, **161**, 1-66.
- Kishore, G.M. and Shah, D.M. (1988) Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Annu. Rev. Biochem.*, **57**, 627-63.
- Klee, H.J., Muskopf, Y.M. and Gasser, C.S. (1987) Cloning of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate- 3-phosphate synthase: sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. *Mol. Gen. Genet.*, **210**, 437-42.
- Little, T.M. and Hills, F.J. (1978) Analysis of counts. In: Little, T.M. (ed.) *Agricultural Experimentation*. Wiley, J. and Sons, New York, pp. 268-282.
- Lonnquist, J.H. and Jugenheimer, R.W. (1943) Factors affecting the success of pollination in corn. *Journal of the American society of agronomy*, 923-933.
- Luna, V., Figueroa, J.M., Baltazar, B.M., Gomez, R.L., Townsend, R. and Schoper, J.B. (2001) Maize pollen longevity and distance isolation requirement for effective pollen control. *Crop Sci.*, **41**, 1551-1557.

- Ma, B.L., Subedi, K.D. and Reid, L.M. (2004) Crop ecology, management & quality - extent of cross-fertilization in maize by pollen from neighboring transgenic hybrids. *Crop Sci*, **44**, 1273-1282.
- Mamarot, J. and Rodriguez, A. (1994) Etude du salissement des sols par la jachère en région Midi-Pyrénées. *Recueil des communications du colloque "Jachères"*, 107-111.
- McElroy, D., Zhang, W., Cao, J. and Wu, R. (1990) Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. *Plant Cell*, **2**, 163-171.
- Messeguer, J. (2003) Gene flow assessment in transgenic plants. *Review of Plant Biotechnology and Applied Genetics*, **73**, 201-212.
- Odell, J.T., Nagy, F. and Chua, N.H. (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*, **313**, 810-812.
- OECD. (2003) Consensus Document on the Biology of Zea Mays Subsp. Mays (Maize). <http://www.oecd.org/>
- Padgett, S.R., Re, D.B., Barry, G.F., Eichholtz, D.E., Delannay, X., Fuchs, R.L., Kishore, G.M. and Fraley, R.T. (1996) New weed control opportunities: development of soybeans with a Roundup Ready gene. *CRC Handbook*, **4**, 53-84.
- Pleasant, J.M., Hellmich, R.L., Dively, G.P., Sears, M.K., Stanley-Horn, D.E., Mattila, H.R., Foster, J.E., Clark, T.L. and Jones, G.D. (2001) Corn pollen deposition on milkweeds in and near cornfields. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 11919-11924.
- Raynor, G.S., Ogden, E.C. and Hayes, J.V. (1972) Dispersion and deposition of corn pollen from experimental sources. *Agronomy Journal*, **64**, 420-427.
- Reicosky, D.C., Kemper, W.D., Langdale, G.W., Douglas, C.L. and Rasmussen, P.E. (1995) Soil organic matter changes resulting from tillage and biomass production. *J. Soil and Water Cons.*, **50**, 253-261.
- Rochester, D.A., Winer, J.A. and Shah, D.M. (1986) The structure and expression of maize genes encoding the major heat shock protein, *hsp70*. *The EMBO Journal*, **5**, 451-458.
- Rossmann, E.C. (1949) Freezing injury of inbred and hybrid maize seed. *Agronomy Journal*, 574-583.
- Ruiz, P., Novillo, C., Fernandez-Anero, J. and Campos, M. (2001) Soil arthropods in glyphosate tolerant and isogenic maize lines under different soil/weed management practices. *1st World Congress on Conservation Agriculture*

- Sari-Gorla, M., Ferrario, S., Frascaroli, E., Frova, C., Landi, P. and Villa, M. (1994) Sporophytic response to pollen selection for Alachlor tolerance in maize. *Theor. Appl. Genet.*, **88**, 812-817.
- Sears, M. and Stanley-Horn, D. (2000) Impact of *Bt* corn pollen on monarch butterfly populations. *6th International Symposium on the Biosafety of Genetically Modified Organisms*
- Shaw, R.H. (1988) Climate requirement. *Corn and Corn Improvement*, 609-638.
- Tiedje, J.M., Asuming-Brempong, S., Nusslein, K., Marsh, T.L. and Flynn, S.J. (1999) Opening the black box of soil microbial diversity. *Appl. Soil Ecol.*, **13**, 109-122.
- Touraev, A., Fink, C.S., Ströger, E. and Heberle-Bors, E. (1995) Pollen selection: a transgenic reconstruction approach. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **92**, 12165-12169.
- Vieira, J. and Messing, J. (1987) Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol*, **153**, 3-11.
- Warburton, D.B. and Klimstra, W.D. (1984) Wildlife use of no-till and conventionally tilled corn fields. *J. Soil and Water Cons.*, **39**, 327-330.
- Wych, R.D. (1988) Production of hybrid seed corn. *Corn and Corn Improvement: Agronomy Monograph*, **18**, 565-607.

## **Avaliação de Risco Ambiental de acordo com o Anexo II da Directiva 2001/18/EC**

### **CONCLUSÕES SOBRE O POTENCIAL IMPACTO AMBIENTAL DA LIBERTAÇÃO OU COLOCAÇÃO NO MERCADO DO OGM**

#### **Plantas Superiores Geneticamente Modificadas (GMHP)**

No Anexo II da Directiva 2001/18/EC, apresentam-se nove possíveis efeitos médio ambientais que poderão ocorrer, pelo menos em teoria, quando uma PSGM é utilizada em libertações voluntárias na Europa.

Estes efeitos teóricos são avaliados para o milho NK603 de acordo com o processo de avaliação gradual de risco, incluindo:

- a) Identificação das possíveis características perigosas da PSGM
- b) Consequências possíveis dos efeitos adversos teóricos (assumindo a sua realização total)
- c) Probabilidade de que ocorra algum efeito adverso teórico para este produto, incluindo a caracterização do actual risco potencial da PSGM
- d) Estimativa do risco
- e) Medidas necessárias de mitigação do risco, se aplicável.

#### **1. Probabilidade de as PSGM se tornarem mais persistentes nos *habitats* agrícolas e mais invasivas nos *habitats* naturais que as plantas receptoras ou parentais.**

O milho tradicional, introduzido na Europa há mais de 500 anos, é uma cultura anual não persistente. Não está presente no meio ambiente sem intervenção humana e, devido à selecção realizada através dos séculos, não está apta a sobreviver como erva infestante.

O milho não se multiplica de forma natural por via vegetativa. Além do grão de pólen, a principal estrutura de sobrevivência é a semente. As sementes de milho não se libertam de forma natural; no entanto, podem se disseminadas pelos meios mecânicos utilizados na colheita, por insectos, pelo vento ou por animais selvagens que atravessem a cultura. Cada um destes acontecimentos pode provocar a queda de espigas maduras ou de sementes no solo, que permanecem depois da colheita.

Devido à sua natureza, as sementes de milho não expressam dormência e são extremamente sensíveis ao frio. De modo geral, as sementes que caem no solo germinarão e perecerão sob o efeito das geadas no Outono ou no início do Inverno do mesmo ano.

Por isso, nas condições europeias, as possibilidades de conservação nos solos das sementes de milho e, conseqüentemente, os riscos de aparição de rebrotes na rotação são muito baixos. Se estas sementes chegassem a invernar, os rebrotes nas rotações seriam rapidamente erradicados pelas práticas agronómicas actuais, em particular pelas mobilizações mecânicas e a aplicação de diversos herbicidas selectivos. Além disso, o milho cultivado não apresenta a mesma capacidade de adaptação e de sobrevivência das ervas daninhas (Hallauer, A.R., 1995).

Além das sementes, o pólen do milho pode também ser considerado como uma estrutura de sobrevivência. Não obstante, a sua capacidade de sobrevivência é relativamente limitada em função das condições climáticas. De maneira geral, o pólen do milho pode dispersar-se a distâncias curtas e ao fim de 24 horas ter terminado a fecundação. A temperaturas elevadas, a capacidade de sobrevivência do pólen de milho é, muitas vezes, de apenas alguns minutos (Herrero, M.P. e Johnson, R.R., 1980) porque se seca rapidamente (Hoekstra, F.A. *et al*, 1989). Pelo contrário, condições atmosféricas mais suaves podem prolongar a viabilidade do pólen algumas horas (Jones, M.D. e Newel, 1948).

Estas observações, válidas para as culturas de milhos convencionais, aplicam-se também ao milho NK603. De facto, foi demonstrado que, com excepção da modificação introduzida, este milho geneticamente modificado é equivalente ao milho convencional. Determinados ensaios de campo permitiram validar que as suas características fenotípicas, agronómicas, de reprodução, sobrevivência e disseminação não são alteradas de nenhuma forma em comparação com as variedades de milho tradicional.

Em conclusão, como a modificação genética não arrasta diferenças biológicas significativas que alterem o vigor do milho NK603 em comparação com o milho tradicional, é improvável que este milho geneticamente modificado seja mais persistente no campo ou mais invasivo no meio ambiente natural do que o milho convencional. O carácter introduzido confere-lhe apenas uma vantagem selectiva limitada – tolerância ao herbicida glifosato – pouco difundida no espaço e de conseqüências depreciáveis sobre o meio ambiente.

## **2. Vantagens ou desvantagens selectivas adquiridas pela PSGM**

Estabelecemos que o milho NK603 se distingue dos híbridos convencionais apenas pela sua tolerância ao glifosato. O milho NK603 e o milho tradicional são perfeitamente comparáveis em termos de vigor vegetativo, modo de produção, fertilidade do pólen, ou período de floração. Por conseguinte, como conseqüência deste desenvolvimento, a avaliação de qualquer vantagem ou desvantagem selectiva relativamente ao milho NK603 será limitada à modificação introduzida – tolerância ao glifosato.

A proteína CP4 EPSPS, membro da família de proteínas EPSPS (5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase) omnipresentes na natureza, não possui qualquer toxicidade nem confere qualquer vantagem ou desvantagem selectiva sobre as plantas, as algas, os fungos e os microrganismos que as expressam. Assim, em ambientes onde a ausência de aplicação de herbicidas Roundup não induza uma pressão selectiva, a tolerância ao glifosato não conferirá nenhuma vantagem ou desvantagem selectiva e não terá importância competitiva directa sobre as plantas selvagens, nem indirecta para a fauna e as interacções da flora com estas plantas selvagens. Nos *habitats* agrícolas, o milho NK603 tem uma vantagem relativamente às plantas adventícias presentes, quando a cultura for tratada com um herbicida que contenha a matéria activa glifosato. Esta vantagem verifica-se, porém, sob certas condições e está limitada desde a sementeira até à colheita, já que a probabilidade de persistência no campo de uma planta de milho NK603 é negligenciável.

Em conclusão, as plantas de milho NK603 apresentarão uma vantagem de interesse agronómico perante as adventícias sensíveis ao glifosato dentro dos campos de milho, mas a probabilidade de que a modificação introduzida confira uma significativa vantagem ou desvantagem competitiva de importância para os ambientes naturais é depreciable.

**3. Potencial da PSGM para, nas condições em que é plantada, transmitir genes à mesma espécie ou a outras espécies vegetais com ela sexualmente compatíveis e vantagens ou inconvenientes selectivos assim adquiridos por estas espécies.**

O milho geneticamente modificado NK603, bem como o milho tradicional, não é sexualmente compatível com nenhuma outra espécie presente na Europa. Por conseguinte, o potencial de transferência genética está limitado à polinização cruzada com outras plantas cultivadas de milho. De maneira geral, todos os cultivos de milho produzidos no seio da União Europeia podem ser interpolinizados. Não obstante, o potencial de transferência de material genético entre as plantas de milho está limitado pela mobilidade do seu pólen. Com um diâmetro de cerca de 0,1 mm o pólen do milho é um dos pólenes mais volumosos transportados pelo vento. Devido ao seu peso relativamente elevado, dispersa-se em quantidades significativas apenas a uns metros da planta emissora.

É importante precisar que a probabilidade de interpolinização entre culturas de milho vizinhas depende da sincronização da floração, da distância entre ambas as culturas e da sua orientação.

No caso de alguma planta de milho atingir a maturidade, produzir pólen e polinizar uma cultura situada na proximidade, a modificação introduzida no milho NK603 poderia, teoricamente, transferir-se à cultura receptora.

Em tal situação, o carácter modificado poderia expressar-se na descendência da cultura receptora; no entanto, esta transferência teria, em todos os casos, efeitos negligenciáveis para o meio ambiente, conforme referido no capítulo anterior.

Em conclusão, a probabilidade de transferência de genes do milho NK603 a espécies de plantas selvagens é inexistente, porque as mesmas não existem na Europa e a milhos vizinhos está fortemente limitada a partir de 20 metros, podendo o risco de tal transferência ser considerado depreciável.

Ainda que a maioria do pólen de milho se dissemine a curtas distâncias da planta emissora e, conseqüentemente, a probabilidade de transferência da modificação introduzida a culturas próximas de milho através de polinização cruzada seja débil por natureza, as práticas propostas para realizar estes ensaios incluem separações físicas (400 metros) de outros campos de milho próximos e o uso de uma bordadura de milho convencional de pelo menos 12 linhas, para reduzir ainda mais a probabilidade de interpolinização.

**4. Potencial impacto ambiental a curto e/ou a longo prazo resultante das interacções directas e indirectas da PSGM com organismos-alvo, como por exemplo predadores, parasitóides e agentes patogénicos (se aplicável).**

O milho transgénico NK603 difere dos outros milhos tradicionais unicamente pela tolerância aos herbicidas à base da substância activa glifosato, como o Roundup. Como consequência, este milho geneticamente modificado não tem nenhuma interacção com organismos-alvo, nem directa nem indirectamente.

**5. Possível impacto ambiental a curto e/ou a longo prazo resultante das interacções directas e indirectas da PSGM com organismos não alvo (e entre estes considerando igualmente os que estabelecem interacções com os organismos alvo) e impacto sobre os níveis populacionais de organismos concorrentes, herbívoros, simbiotes (quando aplicável), parasitas e agentes patogénicos.**

Como o milho NK603 é equivalente ao milho tradicional, a sua interacção com organismos não-alvo no meio ambiente é a mesma. Os organismos não-alvo incluem todos os organismos animais e plantas, que possam ser afectados através de um mecanismo específico ou não específico por estas proteínas de expressão recente.

O milho transgénico NK603 apresenta tolerância ao glifosato como consequência da introdução de 2 genes *cp4 epsps* em sintonia. A expressão destas proteínas no milho NK603 é o único factor que difere em comparação com o milho convencional.

Ainda que a proteína CP4 EPSPS tenha sido recentemente expressa nas culturas ROUNDUP RREADY, esta não é uma nova proteína no meio ambiente: o gene *cp4 epsps* presente nos vectores utilizados para produzir a planta ROUNDUP RREADY deriva do genoma de uma bactéria comum no solo, o *Agrobacterium* sp. Trata-se de uma enzima implicada no ciclo do chiquimato que não possui toxicidade associada ao seu modo de acção. Esta proteína CP4 EPSPS é estrutural e funcionalmente idêntica a outras enzimas EPSPS endógenas de plantas e habitualmente consumidas ou presentes em fontes microbianas.

Além disso, os organismos não-alvo que interagem com o milho evoluíram e interactivam estreitamente com um amplo espectro de plantas e de microrganismos. Por conseguinte, estes organismos têm estado expostos historicamente a esta família de proteínas, podendo-se ainda tomar em conta uma longa experiência da proteína EPSPS sem impacto sobre os organismos não-alvo.

Considerando a sua omnipresença no meio ambiente e o seu registo histórico de segurança, não existe, *a priori*, nenhuma razão para suspeitar que a proteína EPSPS possua actividade biológica sobre organismos não-alvo.

Em conclusão, pelas razões anteriormente detalhadas, é pouco provável que as características hereditárias transgénicas produzam directa ou indirectamente efeitos sobre os organismos não-alvo que entrem em contacto com o milho transgénico. O risco de efeitos sobre o meio ambiente pode, assim, ser considerado negligenciável.

#### **6. Possíveis efeitos a curto e/ou a longo prazo sobre a saúde humana resultantes das potenciais interacções directas e indirectas da PSGM com os seres humanos que durante a libertação a manipulem, com ela tenham contacto ou dela se aproximem**

No âmbito da presente Notificação, o conjunto do material vegetal transgénico não utilizado ou colhido para análise laboratorial, será destruído no final e não chegará, em nenhum caso, a uma cadeia de alimentação humana ou animal. Por conseguinte, apenas se tomará em consideração o efeito sobre a saúde humana do pessoal de laboratório que possa manipular este material vegetal ou as sementes.

O milho NK603 é substancialmente equivalente ao milho tradicional nas suas características de composição, segurança, fenotípicas e agronómicas, à excepção da modificação introduzida que lhe confere tolerância ao glifosato, por expressão da proteína CP4 EPSPS. Nesta conformidade, apenas a expressão destas proteínas poderia, teoricamente, ter uma incidência imediata sobre a saúde humana.



Os efeitos potenciais de proteínas recentemente expressas no milho NK603 sobre a saúde humana já foram discutidos no capítulo D.7 desta notificação. A inocuidade destas proteínas sobre a saúde humana foi estabelecida nas seguintes bases:

- a) Caracterização detalhada das proteínas CP4 EPSPS
- b) Comparação destas proteínas com toxinas proteicas ou alergéneos conhecidos
- c) Sua digestibilidade em fluidos gástricos simulados
- d) Avaliação da toxicidade aguda destas proteínas num estudo em roedores

Nenhum efeito particular da proteína CP4 EPSPS sobre a saúde humana foi posto em evidência nestes estudos nem em 3 anos de utilização comercial nos Estados Unidos.

Em conclusão, a probabilidade de incidências sobre a saúde dos indivíduos que entram em contacto com este milho não apresenta diferença alguma da que se verifica com milho tradicional. De facto, a modificação introduzida de tolerância ao glifosato, transmitida pela expressão das proteínas CP4 EPSPS não apresenta qualquer risco tóxico ou alergénico significativo.

#### **7. Possíveis efeitos a curto e/ou a longo prazo sobre a saúde animal e consequências para a cadeia alimentar humana ou animal, resultantes do consumo do OGM e seus derivados destinados à alimentação animal**

Exceptuando a tolerância ao glifosato, o milho transgénico é substancialmente equivalente ao milho convencional. A inocuidade da proteína CP4 EPSPS, responsável pela tolerância à matéria activa glifosato, em relação ao homem e animais, foi amplamente documentada: os elementos detalhados no capítulo anterior aplicam-se à saúde animal, da mesma maneira que à saúde humana.

Em conclusão, a probabilidade de efeitos imediatos ou retardados sobre a saúde animal ou humana (por consumo destes animais) derivados da utilização do milho NK603 é depreciável. O risco inerente a este milho na cadeia alimentar humana ou animal é também negligenciável.

É, no entanto, importante voltar a salientar que esta petição se refere exclusivamente à realização no campo de ensaios experimentais e em nenhum caso a colheita chegará uma cadeia de alimentação animal.

## **8. Possíveis efeitos a curto e/ou a longo prazo sobre os processos biogeoquímicos resultantes das potenciais interacções directas e indirectas do OGM com outros organismos - alvo ou não – que dele se encontrem próximos ao ser libertado**

De maneira geral, a produção do milho é conhecida por ter impactos indirectos sobre os processos biogeoquímicos através da mobilização, da fertilização e da utilização de monocultura numa zona definida. Como o milho NK603 apresenta características de morfologia, desenvolvimento, rendimento, disseminação, fitossanidade e sobrevivência equivalentes às dos milhos tradicionais, não é também significativamente diferente do milho tradicional quanto à sua influência directa sobre os níveis de nutrientes no solo.

A única característica que pode, teoricamente, ter uma incidência sobre os organismos não-alvo implicados nos processos biogeoquímicos é a sua exposição potencial às proteínas CP4 EPSPS recentemente expressas no milho NK603.

Demonstrou-se, no entanto, estas proteínas apresentam um risco depreciável de provocar efeitos ecológicos adversos através das suas interacções directas ou indirectas com os organismos não-alvo, entre os quais se encontram os organismos implicados nos processos de decomposição no solo.

As populações bacterianas e fúngicas são também elementos chave da conservação do estado sanitário e da conservação do solo. As comunidades microbianas do solo que servem de intermediários nos processos biogeoquímicos são muito complexas e frequentemente caracterizadas por uma grande diversidade (Tiedje *et al.*,1999). A diversidade e a profusão destes organismos e, por conseguinte, os seus processos microbianos são afectadas significativamente por factores bióticos, abióticos e de utilização dos solos. As práticas agrícolas tais como a fertilização, a rega, ou as técnicas de mobilização podem também ter efeitos importantes sobre estas populações microbianas do solo, a composição das espécies, a colonização e os processos bioquímicos associados (Alexander, 1961). Em consequência, espera-se uma variação significativa das populações microbianas no meio ambiente agrícola.

Muito embora a proteína CP4 EPSPS presente no material do milho NK603 em decomposição seja considerada como nova neste milho, ela não constitui uma nova proteína no solo. Os genes *cp4 epsps* utilizados neste milho geneticamente modificado são derivados do genoma de uma bactéria comum no solo: *Agrobacterium* sp. A proteína CP4 EPSPS pertence a uma classe de proteínas EPSPS que está normalmente presente nas bactérias, fungos, algas e em todas as plantas superiores. A imensa maioria dos agentes de decomposição expressam, eles mesmos, uma proteína EPSPS.

Consequentemente, os agentes de decomposição de resíduos e de detritos que interactivam têm sido historicamente expostos a uma diversidade destas proteínas naturais EPSPS e não existe nenhuma razão *a priori* para suspeitar que tenham um efeito adverso sobre a função de decomposição.

Finalmente, a importante experiência derivada da comercialização de cultivos que expressam diferentes CP4 EPSPS (culturas ROUNDUP READY) durante os últimos 10 anos, não revelou qualquer efeito adverso ou indesejável sobre os processos biogeoquímicos e a fertilidade dos solos.

Em conclusão, é improvável que exista uma diferença entre o milho NK603 e o milho tradicional no que respeita à sua influência directa sobre os níveis de nutrientes do solo, ou que as interacções directas ou indirectas entre este milho e os agentes de decomposição de resíduos ou de detritos no meio ambiente receptivo, possam causar um efeito imediato ou retardado sobre as funções de decomposição ou de reciclagem dos nutrientes no solo.

O risco ecológico pelo impacto sobre os processos biogeoquímicos, em resposta às interacções do milho NK603 com os organismos alvo e não-alvo no solo é depreciável.

**9. Possíveis incidências ambientais a curto e/ou a longo prazo, directas e indirectas, das técnicas específicas de cultivo, gestão e colheita utilizadas para a PSGM, sempre que diferentes das utilizadas com plantas superiores não modificadas geneticamente**

Como o milho NK503 é equivalente ao milho tradicional, excepto na tolerância ao glifosato, todas as práticas agronómicas actualmente utilizadas para a produção de milho na União Europeia são aplicáveis para o milho NK603, não sendo necessária qualquer advertência ou especificação técnica de cultivo, de manejo ou para a colheita. A opção adicional de utilizar herbicidas com glifosato neste milho é um novo instrumento alternativo para uma operação já existente, ou seja, o controlo de infestantes.

Não se identificou nenhuma característica das plantas NK603 que possa causar efeitos ecológicos adversos, ou que requeira uma alteração das práticas agrícolas. Por conseguinte, o impacto ecológico das técnicas culturais, de gestão e de colheita aplicadas nestes ensaios é considerado idêntico ao cultivo de outro milho qualquer.

Espera-se que a comercialização do milho NK603 na Europa tenha um impacto positivo nas práticas agronómicas actuais nesta cultura, com benefícios para os agricultores e para o meio ambiente. A utilização de ROUNDUP em milho permitirá ao agricultor aproveitar vantagens como a baixa perigosidade para o meio ambiente e a segurança do herbicida.

O milho tolerante ao glifosato proporcionará ao agricultor: uma opção de amplo espectro para o controlo de adventícias; um novo modo de acção herbicida para eliminação das ervas daninhas que infestam o milho e uma maior flexibilidade para eleger a altura da aplicação.

Em conclusão, não se espera qualquer efeito negativo sobre o meio ambiente das técnicas utilizadas para o cultivo, exploração ou colheita do milho transgénico.

#### **10. Determinação do risco global do OGM**

A análise das características do milho NK603, especialmente em comparação com a experiência do cultivo de milho tradicional na União Europeia, mostrou que os riscos da aparição de efeitos potenciais adversos para a saúde humana e animal ou dos ensaios previstos no âmbito da experimentação de campo solicitada, são insignificantes.

Nesta conformidade, o risco ecológico global desta planta superior geneticamente modificada é depreciável e não requer qualquer estratégia específica para a gestão do risco.

#### **BIBLIOGRAFIA**

Alexander, M. (1961) - Introduction to soil microbiology. *John Wiley and Sons*.

Hallauer, A.R. (1995) - Potential for out crossing and weediness of genetically modified insect protected corn.

Herrero, M.P. and Johnson, R.R. (1980) - High temperature stress and pollen viability of maize. *Crop Science*, 20, 796-780.

Hoekstra, F.A., Crowe, L.M. and Crowe, 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: buffalo grass, *Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm, and corn, *Zea mays* L. *Journal of Am. Soc. of Agronomy*, 40, 195-204.

Tiedje, J.M., Asuming-Brempong, S., Nusslein, K., Marsh, T.L. and Flynn, S.J. (1999) - Opening the black box of soil microbial diversity. *Appl. Soil Ecol.*, 13, 109-122.

# ANEXOS