
PARECER TÉCNICO Nº 4865/2015

Processo: 01200.001761/2013-18

Assunto: Liberação Comercial de Organismo Geneticamente Modificado

Data de Protocolo: 30/04/2013

Requerente: Du Pont do Brasil SA – Divisão Pioneer Sementes;

CNPJ: 61.064.929/0043-28

Endereço: SH/Sul Quadra 06, Conjunto A, Bloco A - Sala 605, Centro Empresarial Brasil 21, Brasília, DF.

CQB: 013/97

Presidente da CIBio: Goran Kuhar

Extrato Prévio: 3602/2013 publicado em 20/05/2013

Reunião: 188ª Reunião ordinária, ocorrida em 10 de dezembro de 2015.

Decisão: Deferido

Proposta: Liberação comercial do milho geneticamente modificado denominado Evento DP-32138-1 expressando a característica de restauração da fertilidade em linhagens de milho naturalmente macho-estéreis.

Classificação de Risco: classe de Risco I, conforme classificação apresentada pela requerente.

Descrição do OGM: O evento DP-32138-1 (“mantenedor SPT 32138”) foi gerado por meio de transformação mediada por *Agrobacterium* em uma linhagem de milho naturalmente macho-estéril utilizando um plasmídeo contendo três cassetes de expressão: *Ms45*, *zm-aa1*, e *DsRed2(Alt1)*.

1) O *Ms45* é um gene do milho que codifica a proteína MS45 expressa na antera e necessária à produção de pólen fértil. A mutação no gene *Ms45* resulta em plantas macho-estéreis quando em estado de homozigose recessiva (*ms45/ms45*). Uma única cópia do gene *Ms45* pode restaurar a fertilidade em macho-estéreis homozigotos recessivos *ms45/ms45*.

2) O *zm-aa1* é um gene do milho que codifica a proteína ZM-AA1 α -amilase com a função de catalisar hidrólises de ligações de glicosídicas-(1-4)- α -D resultando em moléculas de polissacarídeos, tais como o amido. A expressão da ZM-AA1 α -amilase no desenvolvimento do pólen resulta na hidrólise do amido e o esgotamento das reservas do mesmo, deixando o pólen inviável.

3) O gene *DsRed2(Alt1)* é um gene marcador que codifica uma variante da proteína fluorescente vermelha (DsRed2) que produz uma coloração vermelho-rosada na camada de aleurona das sementes de milho. A proteína DsRed2 apresenta uma fluorescência de alta intensidade e emite um vermelho fluorescente forte sob a iluminação adequada, permitindo que as sementes contendo a inserção SPT sejam prontamente detectadas e separadas das sementes que não contém a inserção do evento SPT 32138.

Uso Proposto pela Requerente: A requerente solicita emissão de parecer técnico referente à segurança da utilização de linhagens de milho contendo o evento DP-32138-1 (mantenedor SPT 32138) para uso exclusivo nas operações internas de produção de sementes da empresa nos termos da Resolução Normativa nº 5 de 12 de Março de 2008.

PARECER TÉCNICO:

A requerente, empresa Du Pont do Brasil S.A., solicita através do processo nº 01200.001761/2013-18 a liberação comercial do milho geneticamente modificado Evento DP-32138-1, expressando a característica de restauração da fertilidade em linhagens de milho naturalmente macho-estéreis. O processo desenvolvido pela requerente é denominado de “Seed Production Technology (SPT)” – Tecnologia de Produção de Sementes e tem o objetivo de facilitar a produção interna em grande escala de linhagens de milho macho-estéreis que são utilizados como genitores femininos na produção de sementes de milho híbridas, o que requer o cruzamento de duas linhagens parentais, sendo que a linhagem parental feminina deve ser impedida de produzir e liberar pólen, a fim de evitar a autopolinização, o que reduz a qualidade da semente híbrida. A tecnologia SPT, segundo a requerente, apresenta uma série de vantagens comparada com outras abordagens para controlar a macho-fertilidade em linhagens parentais femininas, tais como o despendoamento (remoção física dos pendões produtores de pólen) ou a macho-esterilidade citoplasmática (MEC). O processo de SPT não requer despendoamento, funciona em todos os tipos de germoplasma, aumenta a produtividade e a qualidade das sementes híbridas e produz plantas híbridas F1 totalmente férteis.

O processo SPT faz o uso transitório do evento DP-32138-1, doravante denominado SPT 32138, no início do processo de multiplicação das sementes básicas. O SPT 32138 é usado como polinizador para propagar sementes de linhagens femininas macho-estéreis. As sementes da linhagem feminina produzidas dessa maneira não contêm a inserção do evento SPT 32138 e, conseqüentemente, as sementes híbridas F1 produzidas com a utilização destas linhagens parentais fêmeas macho-estéreis como também os grãos comerciais produzidos nos campos não contêm inserto derivado do SPT 32138 e, portanto, não são transgênicos para SPT. A tecnologia SPT utiliza a transgenia em parte do processo, sem que as moléculas de DNA recombinante estejam presentes nos híbridos comerciais e nos grãos de milho, produzindo os chamados “segregantes nulos ou negativos” (null segregant/negative segregant).

De acordo com a requerente, não há previsão de lançamento do mantenedor SPT 32138 transgênico como produto comercial. Ainda assim, a requerente entrou com uma petição junto ao Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) em dezembro de 2008 para a desregulamentação da linhagem transgênica SPT 32138, dispensando a necessidade de solicitação anual de permissões nos EUA para o uso do mantenedor SPT 32138 em operações internas de produção de sementes. Com base na avaliação dos dados fornecidos pela DuPont Pioneer, na análise dos dados científicos realizada pelo USDA, nos comentários do público e nas informações analisadas no Parecer Ambiental (PA) que não apresentaram impacto significativa, o USDA decidiu em junho de 2011 que a linhagem do mantenedor SPT 32138 não era mais um produto que exigisse regulamentação em território norte-americano. O mantenedor DuPont Pioneer Mantenedor SPT 32138 foi aprovado nos EUA pelo USDA em 28 de Junho de 2011 (Diário Oficial dos EUA: www.aphis.usda.gov/brs/fedregister/BRS_20110628a.pdf).

O SPT 32138 foi gerado por meio de transformação mediada por *Agrobacterium* em uma linhagem de milho genética e naturalmente macho-estéril (*ms45/ms45*) com um plasmídeo contendo três cassetes de expressão essenciais ao funcionamento do sistema SPT: o *Ms45*, o *zm-aa1*, e o *DsRed2(Alt1)1*. A expressão da proteína MS45 restaura a fertilidade em materiais macho-estéreis do mantenedor SPT 32138, possibilitando a produção de pólen. Entretanto, o gene *Ms45* no mantenedor SPT 32138 é hemizigoto (*Ms45/-*) e, como consequência, apenas metade do pólen produzido contém o gene *Ms45*. Essa metade do pólen também contém o gene *zm-aa1* que codifica a enzima α -amilase que destrói o amido, deixando o pólen transgênico (*Ms45/zm-aa1/DsRed2(Alt1)*) inviável. A metade restante do pólen é não-transgênica para a inserção do SPT 32138, permanecendo então, viável, e carrega o gene endógeno recessivo *ms45*. Quando o SPT 32138 é usado como polinizador para propagar as sementes de linhagens fêmeas macho-estéreis que não são transgênicas para o SPT 32138, as progênies resultantes retêm seu genótipo macho-estéril (*ms45/ms45*) e não contém a inserção do SPT 32138, sendo, portanto, não transgênica. Dessa forma, os híbridos comerciais F1 produzidos utilizando essa progênie macho-estéril e seus respectivos grãos, não contêm a inserção do SPT 32138 sendo, também,

não transgênicos. O gene marcador colorido fluorescente (*DsRed2(Alt1)*) confere o fenótipo vermelho rosado a qualquer semente expressando a inserção do SPT 32138, o que possibilita que, sob iluminação adequada, as sementes contendo a inserção do SPT 32138 possam ser prontamente detectadas e separadas das sementes que não contém a inserção, usando separação mecânica por cores.

Considerando o mecanismo utilizado na tecnologia SPT para evitar a presença do transgene na progênie, a CIBio da requerente foi consultada pela Coordenação Geral da CTNBio (Carta Pio. Reg. 302/2013) sobre a tecnologia utilizada no SPT 32138 e se esta se enquadraria como “tecnologia de restrição de uso (GURT)”, de acordo com a definição apresentada no Art. 6º da Lei 11.105/2005 e apresentou a seguinte resposta: “*O evento SPT 32138 tem como objetivo restaurar a fertilidade de estruturas florais masculinas (pendões) em linhagens já naturalmente macho-estéreis, por conta de uma mutação identificada no genoma do milho. Assim, o mantenedor SPT é fértil e não requer um indutor químico para sua ativação.*” Dessa forma, considerando que o milho transformado é **naturalmente macho-estéril**, que a transformação tem como objetivo justamente **restaurar a fertilidade** nesse milho macho-estéril e **que a planta transformada é capaz de se multiplicar e deixar descendentes férteis**, não entendemos, na análise da avaliação de risco baseada nas informações apresentadas pela requerente, que esta tecnologia seja considerada uma tecnologia de restrição de uso de acordo com a definição apresentada na citada Lei.

O processo foi colocado em diligência na 164ª Reunião Conjunta das Subcomissões Setoriais Permanentes das Áreas Vegetal e Ambiental realizada em 07/05/2014 para que a requerente esclarecesse os seguintes itens:

- (i) reavaliar o uso proposto para liberação comercial do SPT 32138 e as demais informações que julgar necessárias, a fim de adequá-lo às informações apresentadas na proposta;
- (ii) esclarecer a relação entre a concentração da proteína ZM-AA1 no pólen e a eficiência genética em termos de uma maior ou menor fertilidade conferida ao pólen;
- (iii) esclarecer se a precisão do classificador mecânico independe do nível de concentração da proteína DsRed2 nas sementes, considerando os níveis apresentados;
- (iv) discutir se processos metabólicos como a fotossíntese poderiam ser influenciados pela expressão da proteína DsRed2 nas folhas do milho;
- (v) esclarecer sobre a existência de material de referência para validação do método de detecção evento-específico citado na proposta;
- (vi) apresentar resultados de estudos sobre avaliações agrônomicas e fenotípicas do SPT 32138 em linhagens de milho utilizadas no Brasil em liberação planejada no meio ambiente realizada em região representativa do cultivo.

A requerente apresentou a Carta Pio. Reg. 385/2014, datada de 02/10/2014, contendo todas as informações solicitadas, complementando os dados necessários à análise da avaliação de risco, conforme previsto no Art. 14º, inciso IV, da Lei 11.105/2005.

Além disso, consta na proposta o Parecer da CIBio da requerente que declara que “*recebeu o pedido de avaliação da proposta de liberação do evento DP-32138-1 para ser utilizado em operações internas de produção de sementes da empresa*” e que “*considerando os dados da análise molecular do evento, bem como os testes de segurança para a saúde humana e animal, a CIBio não encontrou nenhuma evidência que implique a necessidade de mais análises de risco e recomenda a apresentação dessa solicitação à Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio.*”

Dessa forma, a fim de emitir parecer técnico que embase a decisão técnica da CTNBio, passaremos à análise das informações, **a fim de verificar se a segurança do SPT 32138 pode ser demonstrada pelos dados aportados na avaliação de risco apresentada pela requerente, no contexto de que “o Mantenedor SPT 32138 é uma linhagem de uso interno da empresa, não sendo uma tecnologia de**

uso comercial ou parte de um produto comercial. Por ser utilizado nas fases iniciais de produção de sementes parentais, a área total de uso do Mantenedor SPT 32138 será limitada e contida nas operações de produção de sementes parentais da empresa”.

A requerente afirma que o processo SPT é confinado genética, reprodutiva e mecanicamente e apresenta ao longo de sua proposta uma série de controles adotados a fim de garantir a ausência do inserto SPT 32138 na progênie, essas medidas incluem: cuidados no plantio, isolamento dos campos de produção de sementes, roguing (remoção de plantas atípicas no campo), cuidados na colheita, classificação, secagem e debulha, separação por cor com classificadores óticos calibrados, cuidados no acondicionamento, tratamento e embalagem das sementes. **O objetivo da presente análise é verificar se os dados apresentados permitem corroborar a afirmativa da requerente de que “a progênie produzida no processo SPT é consistentemente e confiavelmente não transgênica para a inserção 32138 SPT”** e analisar a avaliação de risco apresentada pela requerente para cultivo do evento SPT 32138 nos campos de produção de sementes da empresa. A Comissão concluiu que as características do produto não contrariam ao disposto no Art. 6º da Lei 11.105/2005

1) DESCRIÇÃO DO EVENTO SPT 32138

1.1. Base para o Desenvolvimento do Sistema de Tecnologia de Produção de Sementes (SPT)

A macho-esterilidade no milho refere-se à impossibilidade de a planta produzir pólen viável, fazendo com que as plantas macho-estéreis não possam se autopolinizar nem polinizar outras plantas vizinhas. O fenótipo da esterilidade é determinado por um único gene e o alelo da macho-esterilidade é recessivo (*ms*), embora um número pequeno de alelos macho-estéreis dominantes tenha sido descrito. No milho, a característica da macho-esterilidade é expressa apenas pela permanência de uma condição homocigótica recessiva (*ms/ms*) para o gene da fertilidade. A multiplicação de linhagens parentais macho-estéreis (*ms/ms*) não é possível por meio da autopolinização, uma vez que o caráter homocigótico do gene recessivo (*ms*) irá resultar em macho-esterilidade. Uma forma de multiplicar linhagens parentais macho-estéreis é realizar a polinização cruzada de plantas macho-estéreis (*ms/ms*) com plantas macho-férteis que sejam heterocigotos para o gene da macho-esterilidade (*Ms/ms*). A progênie oriunda dessa polinização cruzada é aproximadamente cinquenta por cento (50%) macho-estéril (*ms/ms*) e cinquenta por cento macho-fértil (*Ms/ms*). A recuperação e manutenção das populações de linhagens macho-estéreis puras (*ms/ms*) empregando métodos tradicionais de reprodução requer: a) linhagens de milho extras para a manutenção da característica macho-estéril; e b) vários métodos de seleção e cruzamentos intermediários que demandam tempo, não sendo assim, uma forma prática para a produção comercial de milho híbrido.

Se todo o pólen contendo o gene da restauração da fertilidade (*Ms*) pudesse ser eliminado do parental heterocigoto masculino (*Ms/ms*) assegurando, assim, a polinização do parental macho-estéril (*ms/ms*) apenas com pólen contendo o alelo recessivo *ms*, a progênie macho-estéril iria reter sua condição homocigótica (*ms/ms*) e poderia ser utilizada como linhagem parental feminina macho-estéril na produção de sementes híbridas. Essa é a base do processo de Tecnologia de Produção de Sementes (SPT) da DuPont Pioneer utilizando o mantenedor transgênico SPT 32138.

A construção genética do SPT 32138 contendo três cassetes de genes [*Ms45*, *zm-aa1*, e *DsRed2(Alt1)*] foi inserida por *Agrobacterium* em uma linhagem de milho Hi-II macho-estéril homocigótica recessiva para o *ms45* (*ms45/ms45*). A inserção do SPT 32138 foi integrada ao genoma em um *locus* que segrega independentemente do *locus* endógeno *ms45*, o mantenedor SPT 32138 é, portanto, homocigótico para o alelo recessivo *ms45* e hemizigótico para o gene recombinante *Ms45* da inserção do evento SPT. Além do gene *Ms45* para restaurar a fertilidade, o SPT 32138 possui os genes:

- *zm-aa1*: codifica a proteína ZM-AA1 α -amilase que resulta no esgotamento do amido privando o pólen das reservas de energia necessárias à germinação e fertilização
- *DsRed2(Alt1)*: gene marcador colorido fluorescente que confere o fenótipo vermelho rosado a qualquer semente expressando a inserção SPT 32138

O mantenedor SPT 32138 libera, portanto, dois tipos diferentes de pólen numa razão de 1:1:

- pólen não-transgênico viável que não contém a inserção SPT 32138
- pólen transgênico inviável que contém a inserção SPT 32138

1.2. Descrição dos Genes Presentes no SPT 32138

1.2.1. O Cassete do Gene *Ms45*

O gene *Ms45* é um dos muitos genes de fertilidade nucleares que foram identificados e isolados no milho usando o ativador marcador de *transposon* e mutações no gene *Ms45* demonstraram serem causadoras da macho-esterilidade. A expressão do gene *Ms45* está localizada no *tapetum* das anteras e mutações recessivas do gene *Ms45* resultam em macho-esterilidade devido à ausência, ou não conclusão, da formação da exina sobre os microesporos. Como consequência, os microesporos dos mutantes *ms45* se rompem pouco depois do início dos estágios de desenvolvimento uninucleares médios e o pólen não é produzido.

O gene *Ms45* possui quatro éxons com três íntrons removidos por *splicing*. A expressão do gene *Ms45* é controlada pelo promotor específico *5126* da antera. O terminador para o gene *Ms45* é a sequência 3' não-codificada da região endógena do *Ms45* do genoma do milho, que está incluída na sequência genômica do *Ms45*. O tamanho total da proteína MS45 é composto de 412 aminoácidos e tem peso molecular aproximado de 47 kDa.

1.2.2. O Cassete do Gene *zm-aa1*

O gene *zm-aa1* da amilase do milho no mantenedor SPT 32138 foi isolado de uma biblioteca de cDNA do embrião e do endosperma do milho em desenvolvimento aos dez dias após a polinização. O gene endógeno *zm-aa1* é predominantemente expresso nos tecidos do escutelo da semente em germinação. As alfa-amilases pertencem à família das glicosil-hidrolases catalisadoras de hidrólises das ligações (1-4)- α -D-glucosídicas em moléculas de polissacarídeos, tais como o amido.

O cassete do gene *zm-aa1* contém o gene truncado da α -amilase do milho (*zm-aa1*) que codifica a proteína ZM-AA1. A sequência genética do *zm-aa1* foi truncada para remover a sequência natural do peptídeo de trânsito N-terminal e substituí-la pela sequência do gene *zm-bt1* (*brittle-1*) codificando o peptídeo de trânsito Brittle-1 para direcionar a proteína ZM-AA1 aos amiloplastos. A proteína ZM-AA1 impede o acúmulo de amido no grão de pólen recém-formado, impedindo, portanto, seu desenvolvimento e germinação normal. A expressão do gene *zm-aa1* e do peptídeo de trânsito ligado é controlada pelo promotor *Pg47*, que é a região reguladora 5' do gene do milho poligalacturonase (*Pg47*). O terminador do gene *zm-aa1* é a sequência terminadora 3' do gene do milho *In2-1*. Após o processamento do peptídeo de trânsito Brittle-1 a proteína ZM-AA1 primária observada é de 445 aminoácidos de comprimento e peso molecular aproximado de 49 kDa.

1.2.3. O Cassete do Gene *DsRed2(ALT1)*

O gene *DsRed2(Alt1)* é a única sequência genética não pertencente ao milho empregada na geração do evento mantenedor SPT 32138. A proteína DsRed2 codificada pelo gene *DsRed2(Alt1)* é uma variante da Clontech (www.clontech.com) trata-se de proteína de “cor viva” vermelho fluorescente (DsRed), isolada de um coral marinho, o *Discosoma* sp. O sufixo *Alt1* denota que essa versão inclui uma simples substituição de um par de base, feita com o propósito de construir um vetor que não altera a sequência da proteína. A proteína DsRed2 pertence a uma família de proteínas vermelho-fluorescentes que são usadas como marcadores de cor com diversas aplicações em sistemas biológicos.

O gene *DsRed2(Alt1)* no cassete de expressão está sob controle do promotor *Ltp2*, oriundo da cevada, que fornece ao gene uma transcrição preferencial da aleurona, e possui na região 5' do promotor *Ltp2* a região promotora do vírus mosaico da couve-flor (promotor CaMV 35S). O terminador do gene *DsRed2(Alt1)* é a sequência terminadora 3' do gene inibidor de proteinase II de *Solanum tuberosum* (terminador *pinII*). A proteína DsRed2, com cerca de 225 aminoácidos e peso molecular de

aproximadamente 26 kDa, faz com que as sementes contendo a inserção SPT apresentem uma coloração rosada, visível a olho nu. Quando as sementes expressando a proteína DsRed2 recebem iluminação adequada, a DsRed2 é eficazmente estimulada e emite uma cor vermelha brilhante e fluorescente.

2) DESCRIÇÃO DO USO PROPOSTO PELA REQUERENTE

As plantas do milho possuem tanto flores masculinas (localizadas no pendão) e femininas (localizadas na espiga), logo o milho pode ser tanto autopolinizado como pode receber polinização cruzada. A produção de sementes híbridas de milho requer polinização cruzada de duas linhagens parentais puras para produzir a semente híbrida F1 vendida aos produtores. No campo de produção da semente híbrida, a linhagem parental feminina deve ser impedida de emitir/liberar pólen, a fim de evitar a autopolinização ou polinização de plantas irmãs, o que reduz a qualidade das sementes e compromete o potencial produtivo. A prática mais comum para obter esse resultado é eliminar os pendões contendo pólen (despendoamento) da linhagem parental feminina. Os métodos menos comuns ou experimentais incluem a aplicação de esterilizantes químicos, o uso de sistemas biológicos com base na macho-esterilidade citoplasmática e sistemas de controle da fertilidade feminina usando a biotecnologia.

O despendoamento pode ser realizado de forma manual ou mecânica, no entanto, o processo de despendoamento não é totalmente confiável, e ocasionalmente, uma planta feminina pode não ser despendoada por completo resultando na sua autopolinização. Quando isso ocorre, a semente da linhagem parental feminina é colhida junto com as sementes híbridas, com a consequente queda de qualidade da semente, redução da pureza dos traços genéticos e perda de potencial produtivo. O despendoamento mecânico é mais rápido que o manual, mas causa maior dano às plantas com redução de até 40% na produtividade de sementes, na prática se utiliza atualmente uma combinação de despendoamento manual e mecânico, sendo que nenhuma das formas é inteiramente satisfatória. Dessa forma, visando suprir as limitações dos métodos disponíveis e garantir a qualidade das sementes do milho híbrido disponibilizados aos agricultores, a requerente desenvolveu a Tecnologia SPT.

Segundo a requerente, “o mantenedor SPT 32138 não é um produto comercial ou parte de um produto comercial. Ele será cultivado em uma área limitada, para as necessidades internas de produção de sementes da empresa, e não existe o intuito de introduzir sementes do mantenedor SPT 32138 em escala comercial”. De acordo com as informações apresentadas na proposta, o SPT 32138 deverá ser empregado nas seguintes fases do processo de produção de sementes:

- Etapa I: Multiplicação de Sementes do Mantenedor SPT 32138

A semente do mantenedor SPT 32138 é multiplicada por autopolinização. Na autopolinização, o mantenedor SPT 32138 produz dois tipos diferentes de sementes (amarelas e vermelhas rosada) em uma razão de 1:1. A semente amarela é não-transgênica para SPT (não contém a inserção SPT 32138). A semente vermelha rosada que apresenta um brilho vermelho fluorescente sob iluminação adequada é transgênica para SPT (contém a inserção SPT 32138).

- Etapa II: O cultivo da semente da Linhagem Parental Feminina Pura e Macho-estéril

Para multiplicar a linhagem parental feminina pura macho-estéril (*ms45/ms45*), o mantenedor SPT 32138 deverá ser plantado em padrões de fileiras 2:2, 4:4 ou 4:2 (fileiras de milho feminino macho-estéril: fileiras de milho contendo o evento 32138). O pólen fértil (que não contém a inserção do SPT 32138 e carrega o alelo recessivo *ms45*) das plantas do mantenedor SPT 32138 fará a polinização cruzada e fertilizará as plantas femininas de linhagens quase-isogênicas macho-estéreis (*ms45/ms45*). A semente da linhagem produzida nas plantas femininas macho-estéreis irá manter seu estado homocigótico recessivo (*ms45/ms45*) e a pureza genética. Todas as sementes das progênes macho-estéreis colhidas serão amarelas e não terão a inserção SPT 32138.

As etapas seguintes, de produção comercial da semente de milho híbrido e produção comercial de grãos de milho, não utilizam o SPT 32138, ou seja, todo o milho híbrido cultivado nas lavouras dos

produtores e os grãos produzidos nessas lavouras serão não-geneticamente modificados para a inserção do evento SPT 32138.

3) ESTUDOS DE BIOSSEGURANÇA APRESENTADOS PELA REQUERENTE

3.1. Caracterização Molecular:

Para caracterizar a inserção de DNA no evento SPT 32138 foi realizada a análise por *Southern blot* utilizando sondas para detecção dos diferentes elementos genéticos presentes nas construções gênicas. A análise mostrou a presença uma cópia única e intacta do T-DNA do plasmídeo PHP24597, contendo os três cassetes gênicos. A estabilidade da inserção SPT 32138 foi verificada através da análise de três gerações, confirmando o padrão de hibridização que demonstrou a estabilidade da inserção no evento SPT 32138 através de múltiplas gerações. Diferentes gerações contendo o evento SPT 32138 também foram analisadas por *Southern blot* para a presença de sequências do plasmídeo PHP24597 não designadas para a transformação, sendo demonstrada a ausência de sequências *backbone* do plasmídeo PHP24597.

A estabilidade e herança da inserção no evento 32138 foram avaliadas utilizando-se análises fenotípicas e genotípicas de sementes produzidas em três diferentes gerações, obtidas através de autopolinização e polinização cruzada. A análise fenotípica foi feita através da classificação visual das sementes de acordo com a sua cor (vermelho ou amarelo) usando uma fonte de luz fria halógena, o fenótipo vermelho das sementes é fornecido pela expressão do gene *DsRed2(Alt1)* e o fenótipo amarelo confirma a ausência da expressão do gene *DsRed2(Alt1)*. As sementes classificadas por cor foram plantadas separadamente, em seguida todas as plantas que nasceram foram analisadas com relação à presença da inserção SPT 32138 (classificado como positivo) ou a ausência da inserção (classificado como negativo) usando PCR evento-específica. Para confirmar que a inserção no evento SPT 32138 segregou de acordo com as leis de Mendel, foi realizada a análise das segregações observadas e esperadas, com base nos resultados das avaliações fenotípica e genotípica. Os valores obtidos não indicaram diferenças estatisticamente significativas entre as frequências observadas e esperadas, confirmando a herança mendeliana da característica introduzida.

As sequências flanqueadoras, 2091 nt da região 5' e 2002 nt da região 3', da inserção SPT 32138 foram determinadas quanto ao seu potencial de transcrição ou tradução de sequências não desejadas e todas as sequências de leitura (*reading frames*) criadas pela inserção do SPT 32138 foram avaliadas quanto à similaridade com relação à alérgenos e toxinas conhecidos ou putativos. A análise de bioinformática do potencial alérgenicidade/toxicidade de cada fase *stop-to stop* dentro da inserção SPT 32138 mostrou que, independentemente do potencial de transcrição/tradução não desejada de qualquer região que compõe a inserção, os produtos resultantes não apresentam potencial de serem alérgenos ou tóxicos.

A expressão da proteína Ms45 foi analisada usando a técnica de *Western Blot* devido à solubilidade marginal da proteína nas soluções tampão compatíveis com a técnica de ELISA. A transcrição do gene *Ms45* está sob o controle do promotor 5126 específico da antera, dessa forma, além de outros tecidos, amostras de antera em desenvolvimento foram coletadas nos seguintes estádios de desenvolvimento: célula mãe de pólen, meiose, tétrade para uninucleado inicial, uninucleado médio e uninucleado de médio a tardio, binucleado (2ª mitose) e preenchimento de amido. A proteína MS45 foi detectada no evento 32138 e na linha pura macho-fértil 705 (referência), durante o estádio tardio da meiose-tétrade, até o estádio inicial uninucleado do desenvolvimento do microsporo. A proteína MS45 expressa na antera migrou com peso molecular um pouco maior que a proteína produzida por bactérias, devido à glicosilação observada da proteína MS45 endógena. A proteína MS45 não foi detectada em qualquer uma das amostras vindas das linhagens fêmeas macho-estéreis (controle negativo; *ms45/ms45*). Segundo o requerente, a proteína MS45 não foi consistentemente observada em todos os materiais do mantenedor 32138 e nos materiais macho-férteis 705 amostrados devido a uma janela reduzida de expressão da proteína MS45, e também devido ao rápido progresso no desenvolvimento do

microsporo de um estágio para o próximo (dentro de horas), dificultando a obtenção de um estágio exato de desenvolvimento. As concentrações das proteínas ZM-AA1 e DsRed2 também foram medidas nas amostras coletadas em estudos conduzidos em três locais (Passo Fundo/RS, Itumbiara/GO e Palmas/TO) no Brasil durante a safra 2011/2012 utilizando testes de ELISA e fluorométricos. Os dados mostram que a concentração de proteína ZM-AA1 no SPT 32138 foi maior no pólen, sendo encontrados baixos níveis em tecidos da folha, planta inteira, da forragem e da semente. As concentrações de proteína DsRed2 foram maiores nas sementes do SPT 32138, sendo também detectada nos tecidos da folha da planta inteira e de forragem. A proteína DsRed2 estava abaixo do limite de quantificação no tecido do pólen. Todos os valores encontrados estão apresentados na proposta. Segundo a requerente o padrão de expressão nos diferentes tecidos pode ocorrer devido à presença do elemento CaMV35S *enhancer* localizado nos cassetes gênicos.

3.2. Análise da Composição:

O objetivo do estudo foi comparar a composição nutricional das sementes de milho coletadas em experimentos nos EUA e em experimentos a campo em dois locais no Brasil. As amostras coletadas foram analisadas para os principais componentes nutricionais, incluindo proteína, gordura, fibras, cinza, carboidratos, ácidos graxos, aminoácidos, vitaminas, minerais, metabólitos secundários chave e antinutrientes chave, de acordo com o documento publicado pela OECD - Organisation for Economic Cooperation and Development.

Amostras de sementes também foram coletadas de duas linhagens puras de milho não transgênica autopolinizado (linhagens puras de referência) cultivadas em 2007 nos mesmos seis locais de campo, da mesma maneira que o mantenedor 32138. Segundo a requerente, a análise composicional das linhagens puras de referência foi usada para ajudar a determinar a variação normal dos analitos medidos nas sementes. Utilizando os dados obtidos das linhagens puras de referência, um intervalo de tolerância estatística foi calculado para abranger, com 95% de confiança, 99% dos valores contidos na população de linhagem pura e esse intervalo de tolerância forneceu contexto adicional para a interpretação dos resultados da composição do SPT 32138. As faixas de analitos no mantenedor 32138 que ficaram dentro do intervalo de tolerância foram consideradas dentro da faixa de variabilidade normal de linhagens puras de milho.

A conclusão apresentada no relatório é de que a composição nutricional da semente do milho SPT 32138 é comparável às linhagens não transgênicas utilizadas no estudo. Segundo a requerente, as diferenças estatísticas detectadas entre o SPT 32138 e a linhagem de milho controle quase-isolinha reflete a variabilidade natural dos componentes nas linhagens puras, uma vez que os níveis de todos os componentes individuais analisados no evento SPT 32138 estavam dentro dos intervalos de tolerância.

3.3. Avaliações Agronômicas e Fenotípicas:

Nos EUA o evento SPT 32138 vem sendo testado a campo desde 2005 e no Brasil os estudos a campo foram realizados na safra 2011/12 e na safra 2012/13, nas principais regiões onde a requerente possui campos de produção de sementes. As características agronômicas avaliadas incluíram: germinação, dormência, população inicial, vigor de plântulas, tempo até a liberação de estilo-estigma, tempo até a liberação de pólen, viabilidade de pólen, altura de planta, altura de inserção da primeira espiga, incidência de doenças, danos causados por insetos, quebra de colmos, acamamento, e população final.

O desempenho agronômico das linhagens puras de referência foi usado para ajudar a determinar a variação normal das características agronômicas medidas nas linhagens SPT 32138. Utilizando os dados obtidos das linhagens puras de referência, um intervalo de tolerância estatística foi calculado para conter, com 95% de confiança, 99% dos valores contidos na população da linhagem pura. As medições agronômicas no SPT 32138 que ficaram dentro do intervalo de tolerância foram consideradas dentro da faixa de variabilidade normal das linhagens puras de milho. A análise dos dados coletados não evidenciou quaisquer diferenças biológicas relevantes entre o SPT 32138 e os controles não transgênicos.

3.4. Disponibilidade de Técnicas de Detecção Gerais e Específicas:

Segundo a requerente o método de PCR evento-específico para o mantenedor SPT DP-32138-1 está disponível e foi validado tanto internamente (Brink et al., 2012) quanto externamente (pela GeneScan), mas não existe material de referência disponível para o evento SPT 32138 uma vez que o mesmo não estará presente em nenhum produto comercial. Além disso, a requerente afirma que a semente do SPT 32138 tem uma coloração vermelho-rosada devido à expressão da proteína DsRed2 (marcador de coloração), que pode ser identificada de maneira confiável por classificação de cor.

4) AVALIAÇÃO DE RISCO AMBIENTAL

Conforme consta na proposta apresentada, a requerente utilizará o processo SPT para a geração de linhagens parentais fêmeas, de maneira gradual. Nas informações da requerente, se todas as linhagens fêmeas parentais para a produção de sementes híbridas da empresa fossem eventualmente produzidas usando a SPT 32138, o evento seria cultivado em uma área menor que 450 hectares por ano no Brasil (que representaria cerca de 0,003% da área total de milho comercial do Brasil). Ainda segundo informações da requerente, se o sistema SPT fosse adotado em toda a indústria de produção de sementes híbridas do Brasil (cenário de uso máximo da indústria), o total de hectares anuais plantados no Brasil com o evento 32138 ainda não superaria 1.000 ha (cerca de 0,007% da área total de milho comercial no Brasil). Nesse cenário de exposição limitada os pontos principais da avaliação de risco ambiental apresentada pela requerente incluíram:

- **Fluxo gênico:** considerando que o SPT 32138 não produz pólen transgênico fértil e, portanto, não é capaz de disseminar a inserção SPT, o risco de que o transgene possa fertilizar outros cultivos de milho próximos aos campos de produção de sementes ou quaisquer outras cultivares de milho compatíveis com o milho transgênico é extremamente baixo. Mesmo no caso raro de que outra variedade de milho ou outras espécies tenham sido polinizadas com êxito pelo pólen do SPT 32138, as plantas resultantes não conseguiriam passar os genes do evento, já que qualquer pólen transgênico produzido seria infértil. Ressalta-se ainda que, por serem utilizados em campos de produção de sementes, o SPT 32138 deve ser cultivado de acordo com as regras de isolamento específicas para produção de sementes.

- **Persistência e Potencial de Invasão:** os dados dos estudos que caracterizaram o fenótipo e as características agrônômicas não evidenciaram qualquer diferença entre os SPT 32138 e o milho não transgênico, incluindo características como germinação da semente, emergência, vigor, susceptibilidade a doenças e insetos, bem como a sobrevivência e persistência do SPT 32138 nos locais dos testes de campo.

- **Impacto em Organismos do Agroecossistema:** A proteína MS45 está normalmente presente nas anteras de milho em desenvolvimento e o milho tem uma história estabelecida de exposição e uso seguro, portanto, não há nova exposição ambiental à proteína MS45, já que a expressão é direcionada para a antera no SPT 32138. O gene *zm-aal1* é expresso em grãos de pólen em desenvolvimento e expresso em pequenos níveis nas sementes, nas folhas e na planta inteira, devido à especificidade incompleta para expressão nestes tecidos no promotor usado. Esses tecidos poderiam representar rotas novas de exposição ambiental da ZM-AA1 à vida selvagem, no entanto, os resultados das análises de expressão da proteína mostram que essa exposição ocorreria em níveis muito baixos. Outros organismos não-pragas também poderiam consumir material da planta, como por exemplo, pólen ou resíduo de cultura. No entanto, a expressão da ZM-AA1 na planta inteira e no tecido da folha diminui consideravelmente quando a planta atinge o estágio R6 de desenvolvimento e, portanto, a exposição aos organismos decompositores à proteína ZM-AA1 no resíduo da cultura seria também muito baixa. Insetos polívoros que habitam os campos de produção de sementes com o SPT 32138 poderiam estar expostos a níveis maiores da proteína ZM-AA1. No entanto, as α -amilases são enzimas ubíquas e estão presentes em muitos organismos, incluindo plantas e insetos. A proteína DsRed2 é a única

proteína não derivada de uma sequência de genes do milho usada no SPT 32138, os dados e informações da avaliação de segurança da proteína DsRed2 fornecidos pela requerente evidenciam que a proteína DsRed2 não tem probabilidade de ser alergênica ou tóxica para os humanos ou de provocar efeitos adversos em outros organismos que possam, possivelmente, estar expostos a essa proteína no campo.

- **Impacto à Biodiversidade:** o evento 32138 não evidencia potencial para se tornar uma planta daninha ou polinizar outras plantas sexualmente, já que o SPT 32138 não produz pólen transgênico viável. Também não existe evidência de impacto em outros organismos que tenham contato com o pólen inviável do SPT 32138, considerando que os dados demonstram que as proteínas expressas não são tóxicas.

Considerando que o contexto da avaliação de risco é de um evento de modificação genética utilizado apenas nos campos de produção de sementes e que sementes comerciais do milho híbrido ou os grãos consumidos não serão geneticamente modificados, a análise dessa avaliação de risco mostra que os mecanismos que garantem a eficiência do processo em termos da ausência da inserção SPT 32138 na progênie são importantes. Dessa forma possíveis cenários, nos quais os componentes genéticos do sistema SPT poderiam ser separados, foram apresentados pela requerente e devem ser também considerados.

CENÁRIOS DE RISCO

A avaliação de risco apresentada foi realizada de acordo com o contexto do uso proposto - de que a tecnologia SPT seja utilizada nas operações internas da empresa para produção de sementes. A requerente apresenta e discute detalhadamente em sua avaliação de risco alguns cenários que poderiam reduzir a eficiência do processo SPT, em termos de garantir a ausência do transgene na progênie (Na proposta: Apêndice 7 – Cenários potenciais para quebra da ligação entre os cassetes genéticos da inserção 32138 SPT e consequências para o processo SPT). Esses cenários consideram a possibilidade de que os componentes genéticos do sistema SPT sejam separados através de mecanismos de recombinação genética. Segundo a discussão apresentada pela requerente, baseada nas taxas de crossing-over, localização no genoma e estado hemizigótico da inserção, essa quebra da ligação entre os cassetes de genes da inserção SPT 32138 seriam eventos raros e, caso ocorram, poderiam ser detectados e as sementes eliminadas sem comprometer a eficiência do processo SPT. Os cenários apresentados com a supressão de um ou dois dos três genes da inserção SPT 32138 provenientes de uma única quebra originária sementes de cor diferente, que seria removida durante a classificação, ou originária plantas com fenótipos opostos àqueles esperados (isto é, macho-fértil ou macho-estéril) que seriam reconhecidas como plantas “*off-type*” (diferente) e eliminadas durante a inspeção de rotina, como parte de práticas de controle de qualidade. Na ocorrência extremamente rara de duas quebras entre os cassetes a eliminação do *zm-aa1*, a proporção de semente observada em cada espiga no processo de classificação poderia indicar um genótipo anormal e a planta seria removida e não mais utilizada. No caso da supressão dos genes *Ms45* e *DsRed2(Alt1)*, o gene *zm-aa1* da inserção SPT provavelmente passaria para a próxima geração, no entanto, a progênie seria estéril e não mais propagada.

5) AVALIAÇÃO DE RISCO À SAÚDE HUMANA E ANIMAL

O uso proposto para o evento SPT 32138 é a produção de sementes, dessa forma todos os dados aportados na proposta apresentada pela requerente indicam que os grãos de milho do SPT 32138 não deverão ser utilizados para consumo humano ou animal. Para o caso de uma introdução não intencional do SPT 32138 na cadeia alimentar humana e animal, a requerente apresenta dados na proposta a fim de corroborar a afirmativa de que as proteínas MS45, ZM-AA1 e DsRed2 não apresentam potencial de causar toxicidade ou alergenicidade. A discussão sobre segurança alimentar apresentada aborda os seguintes pontos principais:

- As proteínas MS45 e ZM-AA1 são codificadas por sequências de genes endógenas do milho e não têm nenhuma homologia biologicamente significativa com toxinas conhecidas ou alergênicas, conforme análise *in silico*;
- As α -amilases são enzimas ubíquas presentes em muitos organismos, incluindo plantas e insetos. As α -amilases de várias fontes, incluindo plantas, fungos e bactérias, têm histórico de consumo seguro em alimentos. As α -amilases microbianas purificadas são comumente usadas na indústria de processamento de alimentos;
- A proteína DsRed2 é a única não derivada de uma sequência genética do milho, no entanto as análises de bioinformática não revelaram nenhuma homologia biologicamente significativa com toxinas conhecidas ou alergênicas. A proteína DsRed2 não é glicosilada e é rapidamente hidrolisada, em 30 segundos, em simulação com fluido gástrico. Não foi encontrada nenhuma evidência de intoxicação aguda em camundongos para a proteína DsRed2 após administrar doses de até 1860 mg de proteína por kg de peso corporal;
- A análise composicional demonstra que o SPT 32138 é comparável às linhagens de milho de referência e linhagens quase-isolinha, incluindo os principais antinutrientes (rafinose, ácido fítico, inibidor de tripsina);
- Consulta ao FDA (Departamento de Controle de Alimentos e Remédios nos EUA) sobre as proteínas DsRed2 e α -amilase, que confirmou as conclusões da requerente sobre a segurança alimentar dessas proteínas.

A Setorial Humana e Animal da CTNBio já analisou o evento SPT 32138 e concluiu que “o parecer Técnico sugere deferimento do evento DP-32138-1 para operações de produção de sementes de caráter interno da empresa”.

6) CONTROLES PARA UTILIZAÇÃO DO EVENTO SPT 32138

Segundo apresentado pela requerente a eficiência do processo de SPT em produzir progênies que não contêm a inserção SPT 32138 deve-se a três características principais:

- o status hemizigótico da inserção SPT que permite que o mantenedor SPT 32138 produza tanto pólen viável (que não contém a inserção SPT 32138) como inviável (que contém a inserção SPT 32138);
- a eficiência da amilase em tornar inviável os grãos de pólen contendo a inserção SPT 32138;
- a expressão da proteína DsRed2 que confere a coloração vermelho fluorescente à semente, funcionando como um marcador que indica a presença da inserção SPT, possibilitando a separação por cores.

Visando corroborar a afirmativa da requerente de que todo o milho híbrido cultivado nas lavouras dos produtores e os grãos produzidos nessas lavouras serão não-geneticamente modificados para a inserção do evento SPT 32138, a requerente apresenta em sua proposta dados sobre a eficiência e a estabilidade genética do processo SPT, informações detalhadas sobre a precisão da separação mecânica por cores do evento SPT 32138, a análise molecular que permite confirmar a ausência da inserção SPT 32138 nas progênies produzidas através do processo SPT e informações sobre o sistema de qualidade da empresa, que inclui práticas de manejo com a semente SPT e de produção das sementes parentais. Para garantir que o milho evento SPT 32138 somente terá o uso proposto avaliado no presente Parecer, as medidas apresentadas incluem:

- Comprovação da eficiência e estabilidade genética do processo SPT

Para confirmar a eficiência genética do sistema SPT, a requerente conduziu um estudo para medir a eficiência e a estabilidade do sistema SPT através de diversas gerações e em diferentes perfis genéticos, sob condições de polinização artificial (Estudo 1) e sob condições naturais de polinização a campo (Estudo 2). No primeiro experimento o processo SPT foi eficiente e estável por seis gerações e

em cinco diferentes perfis genéticos. No segundo experimento, cinco das 380.005 sementes apresentaram o vermelho fluorescente, indicando que a eficiência genética do processo SPT foi de 99,999% em campo.

- Comprovação da eficiência da separação mecânica por cores

A expressão da proteína DsRed2 no mantenedor SPT 32138 é controlada por um promotor forte para expressão em sementes e a construção SPT contém o elemento 35S. Segundo a requerente, isto proporciona níveis de expressão consistentemente altos e robustos da proteína DsRed2 permitindo assim uma detecção de forma confiável por classificadores de cores, oriundas de diferentes fontes de sementes do mantenedor SPT, o que permitiria uma detecção eficiente e a consequente eliminação das sementes de milho que expressassem a proteína DsRed2. Nos controles adotados pela requerente, cada lote de semente parental feminina macho-estéril é passado pelo separador de cores no mínimo quatro vezes, a fim de assegurar que nenhuma semente do mantenedor SPT 32138 seja plantada nos campos de semente híbrida F1 nos quais são multiplicadas as sementes vendidas aos produtores. Com as configurações ideais identificadas, a precisão dos classificadores por cor em detectar e separar sementes transgênicas fluorescentes foi determinada em >99,95% pelo requerente.

- Análise molecular para confirmar ausência da inserção SPT 32138 na progênie

Sementes (amarelas) não fluorescentes (15.000 sementes) foram selecionadas aleatoriamente a partir uma população variada de progênies e plantadas em uma estufa e submetidas a análise por PCR em tempo real para detecção dos três genes da construção SPT. Em resumo, 14.998 plantas tiveram resultados negativos para as três análises da presença dos genes via PCR. Duas das plantas testadas apresentaram resultados inesperados e foram submetidas a investigações suplementares. Os resultados finais mostraram que essas duas plantas não continham genes clonados derivados do plasmídeo usado na transformação não havendo, portanto, transmissão da inserção 32138 SPT à progênie macho-estéril.

A eficiência geral do sistema SPT, em termos da ausência do transgene na progênie, deve então considerar a eficiência genética e a precisão da classificação mecânica. A eficiência genética pode ser definida como a habilidade do SPT 32138 em impedir a transmissão do inserto à semente produzida quando o SPT 32138 for usado como fonte de pólen (>99,999%). A precisão da classificação por cor é definida como a habilidade dos classificadores mecânicos de identificar precisamente e separar as sementes vermelho fluorescentes transgênicas das sementes amarelas não transgênicas (>99,95%). Portanto, a eficiência geral do processo SPT é 100% - (0,001% × 0,05%) ou >99,9999995%, de acordo com os dados apresentados pela requerente.

Ainda segundo a requerente, medidas extras de manejo e inspeção deverão ser adotadas com o objetivo de prover uma checagem adicional a fim de garantir a condição “não-transgênica” das sementes híbridas comerciais produzidas a partir da tecnologia SPT. As principais medidas encontram-se detalhadas abaixo:

(i) **Roguing (remoção de plantas atípicas no campo):** os campos de produção de sementes da linhagem parental de milho deverão ser submetidos a inspeções visuais periodicamente, todas as inspeções e ocorrência deverão ser registradas. Qualquer planta fértil detectada nas fileiras macho-estéreis deverá ser destruída e qualquer planta estéril detectada nas fileiras do mantenedor será destruída.

(ii) **Calibração do classificador ótico de sementes:** A calibração e a precisão do classificador de sementes deve ser verificada diariamente antes do uso, de acordo com as instruções do fabricante, a fim de manter o equipamento, e as especificações descritas nos procedimentos operacionais padrão da requerente.

(iii) Acondicionamento, tratamento e embalagem das sementes:

- Sementes do SPT 32138: As sementes do SPT 32138 deverão ser acondicionadas em um armazém dedicado exclusivamente ao armazenamento/estocagem das linhagens mantenedoras SPT. Todas as

sementes do SPT 32138 deverão ser classificadas por cor usando duas etapas sequenciais (duas passagens pelo classificador) e os registros de cada execução de produção devem ser registrados e arquivados. Após o segundo processo de classificação por cor de materiais SPT, amostras serão coletadas para uma verificação de pureza. O que for rejeitado do SPT 32138 deve ser descartada usando os procedimentos regulamentares, não devendo ser usada para nenhum outro propósito. Depois da classificação por cores, a semente do SPT 32138 deverá ser tingida de cor azul, para distingui-la de qualquer outra semente de milho, e acondicionadas em sacos claramente marcados como "Mantenedor".

- Progênie macho-estéril: Todas as sementes de progênies macho-estéreis deverão ser classificadas por cor, no mínimo quatro vezes para remover as sementes do SPT 32138 (vermelho fluorescente). Após a classificação por cor, uma amostra será coletada para verificação de pureza. Se uma semente do mantenedor 32138 SPT for detectada, todo o lote de sementes deverá ser classificado por cor novamente até que sementes vermelho fluorescentes não sejam mais detectadas/observadas.

(iv) Descarte de sementes do SPT 32138: Quaisquer sementes de linhagem pura do SPT 32138 não utilizadas ou sementes descartadas pela classificação de cores deverão ser eliminadas, utilizando os procedimentos estabelecidos pela requerente, de forma a garantir que esse material seja inviabilizado e não possa ter qualquer utilização por terceiros. Da mesma forma inventários de sementes do SPT 32138 ultrapassados/antigos (por exemplo, linhagens que não mais serão usadas como parentais na produção de sementes híbridas comerciais) deverão ser eliminados utilizando os mesmos procedimentos, que incluem enterro, compostagem ou incineração. Para monitorar a eficiência do processo SPT, amostras de sementes descartadas devem ser coletadas e analisadas para detectar a presença de qualquer semente do SPT 32138.

(v) Manutenção de controles e registros: todos os controles executados devem ser registrados, incluindo plantas atípicas nas inspeções para roguing, calibração e precisão do classificador de cor, controles na classificação por cor do SPT 32138 e da progênie macho-estéril, quantidade de sementes descartadas, resultados das análises das amostras coletadas para detectar a eficiência do processo. Todos os registros devem ser mantidos por 5 anos, no mínimo, e disponibilizados para fiscalização.

Restrições ao uso do OGM e seus derivados

Conforme estabelecido no art. 1º da Lei 11.460, de 21 de março de 2007, “ficam vedados a pesquisa e o cultivo de organismos geneticamente modificados nas terras indígenas e áreas de unidades de conservação”.

Conclusão:

Considerando que a variedade de milho (*Zea mays*) evento DP-32138-1 (SPT 32138) pertence à espécie bem caracterizada e com sólido histórico de segurança para consumo humano;

Considerando que os dados relacionados à caracterização molecular, a análise da expressão das proteínas, a análise de composição, a análise de segurança alimentar e as avaliações agrônomicas e fenotípicas não demonstraram evidências de riscos à saúde humana, animal ou ao meio ambiente;

Considerando o Parecer da CIBio, bem como os dados aportados na avaliação de risco da requerente que descrevem que o evento DP-32138-1 deve “*ser utilizado em operações internas de produção de sementes da empresa*”;

Considerando que a solicitação da Empresa Du Pont do Brasil SA – Divisão Pioneer Sementes, processo nº: 01200.001761/2013-18 para liberação comercial do milho geneticamente modificado evento DP-32138-1 (“SPT 32138”) atende às normas e à legislação pertinente que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal, com a exigência de que sejam adotadas as medidas extras de manejo e inspeção descritas no item 6 do presente Parecer a fim de garantir as condições de biossegurança para o evento DP-32138-1, em consonância com a solicitação

da requerente, e com a exigência de que em seu plano de monitoramento a requerente inclua a apresentação de informações que comprovem a contínua eficiência e estabilidade genética do processo SPT;

Considerando que a requerente apresentou solicitação para adequação aos preceitos do Artigo 4º-A da Resolução Normativa no 5/2008 e que o citado artigo determina que “A decisão favorável à liberação comercial de Organismo Geneticamente Modificado - OGM que contenha mais de um evento, combinados através de melhoramento genético clássico, cujos eventos individuais tenham sido previamente aprovados para liberação comercial pela CTNBio, aplicar-se-á às combinações possíveis dos eventos individuais, conforme solicitado pela requerente”;

Considerando que, para o plantio de milho geneticamente modificado deverá ser observada ainda a Resolução Normativa CTNBio Nº 4/2007 que dispõe sobre as distâncias mínimas entre cultivos comerciais de milho geneticamente modificado e não geneticamente modificado.

Parecer Final:

A CTNBio, após apreciação do pedido de parecer para liberação comercial de milho geneticamente modificado, concluiu pelo seu DEFERIMENTO, nos termos deste parecer técnico. A requerente solicitou à CTNBio parecer técnico para a liberação comercial do milho geneticamente modificado denominado Evento DP-32138-1 expressando a característica de restauração da fertilidade para uso exclusivo nas operações internas de produção de sementes da empresa nos termos da Resolução Normativa no 5 de 12 de Março de 2008. As sementes da linhagem feminina produzidas dessa maneira não contêm a inserção do evento SPT 32138 e, conseqüentemente, as sementes híbridas F1 produzidas com a utilização destas linhagens parentais fêmeas macho-estéreis como também os grãos comerciais produzidos nos campos não contêm inserto derivado do SPT 32138 e, portanto, não são transgênicos para SPT. O monitoramento deverá ser apresentado pela empresa de acordo com as normas contidas na Resolução Normativa Nº 9, de 02 de dezembro de 2011. A Comissão concluiu que as características do produto não contrariam ao disposto no Art. 6º da Lei 11.105/2005. A análise da CTNBio considerou os pareceres emitidos pelos membros da Comissão, documentos aportados na Secretaria Executiva da CTNBio pela requerente, resultados de liberações planejadas no meio ambiente e textos relacionados. Foram também considerados e consultados estudos e publicações científicas independentes da solicitante e realizados por terceiros.

Referências Bibliográficas Selecionadas:

Bedinger P (1992) The remarkable biology of pollen. *Plant Cell* 4: 879-887.

Bewley JD (1997) Seed germination and dormancy. *The Plant Cell* 9: 1055-1066.

Brink K, Crowgey E, Dietrich N, Hondred D, Young JK, Zhong CX, inventors. September 4, 2012. Plant Genomic DNA Flanking SPT Event and Methods of Identifying SPT Event. US Patent Application No. 12/371,800.

Cigan AM, Unger E, Xu R, Kendall T, Fox TW (2001) Phenotypic complementation of ms45 maize requires tapetal expression of MS45. *Sexual Plant Reproduction*. 14: 135-142.

Codex Alimentarius Commission, Alinorm 03/34 (2003) Joint FAO/WHO Food Standard Programme, Codex Alimentarius Commission, Twenty-Fifth Session, Rome, Italy, June 30 – July 5, 2003. Appendix III, Guideline for the conduct of food safety assessment of foods derived.

Dietrich C, Maiss E (2002) Red fluorescent protein DsRed from *Discosoma* sp. as a reporter protein in higher plants. *Biotechniques* 32(2): 286-293.

Jach G, Binot E, Frings S, Luxa K, Schell J (2001) Use of red fluorescent protein from *Discosoma* sp. (DsRed) as a reporter for plant gene expression. *Plant Journal* 28(4): 483-491.

- Kaul MLH (1988) Male sterility in higher plants. *Theoretical and Applied Genetics* 10:169.
- OECD. Organisation for Economic Co operation and Development. Consensus document on compositional considerations for new varieties of maize (*Zea mays*): key food and feed nutrients, anti nutrients and secondary plant metabolites. ENV/JM/MONO/(2002)25.
- OECD. (Organization for Economic Co-operation and Development). Consensus document on the biology of maize (*Zea mays* subsp. *mays*) ENV/JM/(2003)11.
- Raimbaud E, Buleon A, Perez S, Henrissat B (1989) Hydrophobic cluster analysis of the primary sequences of α -amylases. *International Journal of Biological Macromolecules* 11: 217-225.
- Silva C, Terra W, Xavier-Filho J, Grossi-de-Sa M, Lopes A, Pontes E (1999) Digestion in larvae of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera:Bruchidae) with emphasis on α -amylases and oligosaccharidases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29: 355-366.
- Yongzhong W, Fox TW, Trimmell MR, Wang L, Xu R, Cigan MA, Huffman GA, Garnaat CW, Hershey H, Albertsen MC (2015) Development of a novel recessive genetic male sterility system for hybrid seed production in maize and other cross-pollinating crops. *Plant Biotechnology Journal* 1–9.
- Wenck A, Pugieux C, Turner M, Dunn M, Stacy C, Tiozzo A, Dunder E, van Grinsven E, Khan R, Sigareva M, Wang WC, Reed J, Drayton P, Oliver D, Trafford H, Legris G, Rushton H, Tayab S, Launis K, Chang YF, Chen DF, Melchers L (2003) Reef-coral proteins as visual, non-destructive reporters for plant transformation. *Plant Cell Reports* 22: 244-251.
- Zhao Z, Gu W, Cai T, Tagliani L, Hondred D, Bond D, Schroeder S, Rudert M, Pierce D (2001) High throughput genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in maize. *Molecular Biology* 8: 323-333.

Deliberação

A CTNBio decidiu por 17 (dezesete) votos favoráveis pela aprovação, 02 (dois) votos contrários: Dr. Paulo Kageyama e Dr. Rogério Magalhães.

Data: 10/12/2015

Edivaldo Domingues Velini
Presidente da CTNBio

Assessor: Orlando Cardoso