



*Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca*  
*Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca*

## **SEGUNDA FASE DE EVALUACIÓN**

### **DOCUMENTO DE DECISIÓN**

**Soja genéticamente modificada DAS-44406-6 (OECD), que confiere tolerancia a los herbicidas 2,4-D, glufosinato de amonio y glifosato, presentado por la empresa Dow AgroSciences Argentina S.A.**

Sobre la base del análisis de la información presentada por el solicitante y del conocimiento científico disponible, los suscriptos, miembros de la Comisión Nacional Asesora de Biotecnología Agropecuaria (CONABIA) y de la Dirección de Biotecnología recomiendan dar por completada la Segunda Fase de Evaluación de la soja genéticamente modificada DAS-44406-6, concluyendo que los riesgos derivados de la liberación de este organismo vegetal genéticamente modificado (OVGM) en el agroecosistema, en cultivo a gran escala, no son significativamente diferentes de los inherentes al cultivo de soja no GM.

La soja GM DAS-44406-6 ha sido ensayada a campo en Argentina desde 2010 hasta 2012 y para tal fin fueron solicitados y evaluados por la CONABIA nueve (9) permisos para experimentación y/o liberación confinada al medio agropecuario que han cumplido con la normativa vigente para los OVGM, y han sido autorizados por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca (SAGyP).

El presente Documento de Decisión se aplica a la soja GM DAS-44406-6 y a toda la progenie derivada de los cruzamientos de este material con cualquier soja no GM obtenidos en forma convencional.

#### **I. ORGANISMO VEGETAL GENÉTICAMENTE MODIFICADO (OVGM)**

**1. Nombres común y científico:** Soja, *Glycine max L.*

**2. Denominación del evento:** DAS-44406-6

**3. Modificaciones introducidas:** tolerancia a los herbicidas 2,4-D, glufosinato de amonio y glifosato conferida por los genes *aad-12*, *pat* y *2mepsps* respectivamente.



Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca  
Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca

### 3.1. Secuencias introducidas en el evento DAS-44406-6

El evento DAS-44406-6 ha sido obtenido por transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

#### 3.1.1. Genes principales: *aad-12*, *pat* y *2mepsps*

El gen *aad-12* de *Deftia acidovorans*, codifica para la proteína AAD-12 (ariloxialcanoato dioxigenasa 12) y confiere tolerancia al herbicida 2,4-D. Dicho gen fue modificado para optimizar su expresión en plantas, por lo que la secuencia nativa y la secuencia optimizada del gen *aad-12* son idénticas en un 79.7%.

El gen *pat* aislado de *Streptomyces viridochromogenes*, codifica para la proteína fosfinotricina-acetil transferasa (PAT) y confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio.

El gen *2mepsps* proveniente de *Zea mays*, está diseñado para expresar una doble mutación respecto del gen nativo que codifica para la proteína sintasa 5-enolpiruvilshikimato-3 fosfato (2mEPSPS), otorgando así, tolerancia al herbicida glifosato.

#### 3.1.2. Otros elementos:

La expresión del gen *aad-12* está bajo la regulación del promotor AtUbi10 de *Arabidopsis thaliana* conteniendo la región 5' no traducida e intrón del gen de poliubiquitina 10, permitiendo la expresión constitutiva del gen *aad-12*. La terminación de la transcripción está regulada por la secuencia AtuORF23 3'UTR, que comprende el terminador transcripcional y el sitio de poliadenilación del marco abierto de lectura 23 (ORF23) del plásmido pTi15955 de *A. tumefaciens*

La expresión del gen *pat* es controlado por el promotor del virus del mosaico de la mandioca (CsVMV) y por la secuencia AtuORF1 UTR 3' proveniente del plásmido pTi15955 de *A. tumefaciens*, regula la



*Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca*  
*Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca*

terminación de la transcripción. El promotor de CsVMV conduce la expresión constitutiva del gen.

El gen *2mepsps* se encuentra controlado por el promotor de la histona H4A748 (incluye la región 5' sin traducir), combinada con el primer intrón de la histona 3, ambas provenientes de *A. thaliana*. En el extremo 5' del gen *2mepsps* se encuentra la secuencia TPotp C derivada del gen que codifica para RuBisCO de maíz (*Z. mays*) y de girasol (*Helianthus annuus*), la cual codifica para un péptido de tránsito cuya función es dirigir la proteína madura hacia los plástidos, mientras que en el extremo 3' del gen, el elemento H4A748 3'UTR correspondiente a la región 3' no traducida del gen de la histona H4A748 de *A. thaliana* es utilizado en la construcción como señal de terminación de la transcripción y dirige la poliadenilación del ARN mensajero.

La región de unión a la matriz nuclear (MAR) de RB7 de *Nicotiana tabacum* se encuentra presente en la terminación 5' del T-DNA para facilitar potencialmente la expresión de los transgenes en la planta.

### 3.1.3. Bordes

Los bordes del inserto corresponden a secuencias de ADN del borde derecho e izquierdo del plásmido Ti de *A. tumefaciens* utilizadas en la transformación y remanentes luego de la integración.

Estudios bioinformáticos revelaron que luego de la integración del T-DNA en la soja GM DAS-44406-6, se originó una inserción de 3 pb en el extremo 5' de la unión del inserto, al mismo tiempo que se produjo la delección de 4383 pb en el locus parental. De todas maneras, la comparación de secuencias entre el inserto y el plásmido pDAB8264 confirmó que el T-DNA integrado en la soja GM DAS-44406-6, es idéntico al del plásmido mencionado. La evaluación a través de las herramientas bioinformáticas indicó que de acuerdo a la información de secuencias disponibles, no existe una disrupción de los genes endógenos ni de elementos regulatorios presentes en el sitio de integración.



*Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca*  
*Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca*

#### 3.1.4. Integridad del inserto y número de copias.

Los genes principales y sus secuencias regulatorias, así como los elementos adicionales detallados más arriba, se encuentran formando parte de un único inserto, el cual se comporta como un locus único.

El inserto se encuentra en una sola copia y su integridad ha sido verificada experimentalmente mediante análisis de Southern blot, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación de ADN.

#### 3.1.5. Detección del evento.

La presencia de este evento puede ser determinada experimentalmente de manera específica mediante técnicas moleculares como PCR, o bien, a través del test de ELISA detectando simultáneamente las proteínas AAD-12, PAT y 2mEPSPS.

## **II. EVALUACIÓN DE RIESGO**

### **1. Capacidad de supervivencia, establecimiento y diseminación**

Comparada con la soja convencional, la soja GM DAS-444Ø6-6 no tiene mayor capacidad que sus homólogos convencionales de sobrevivir sin asistencia humana y/o de adquirir características de maleza. La presencia de los genes cuyas expresiones determinan el fenotipo de tolerancia a los herbicidas 2,4-D, glufosinato de amonio y glifosato confiere una ventaja selectiva a la soja GM DAS-444Ø6-6 cuando se la expone a estos herbicidas, pero ello no es suficiente para que la planta adquiera características de maleza.

### **2. Potencial para la transferencia horizontal o intercambio de genes del OVG con otros organismos**



*Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca*  
*Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca*

2.1. La biología reproductiva de la soja GM DAS-444Ø6-6 no es diferente a la de la soja que no ha sido modificada genéticamente; además no existen en el país especies cultivables ni silvestres sexualmente compatibles con la soja.

2.2. De la literatura científica disponible hasta el momento no surge la existencia de fenómenos de transferencia horizontal de genes desde la soja hacia microorganismos, vectores virales o insectos. Por lo tanto, se considera que no existen razones para suponer que esta característica haya cambiado en la soja GM DAS-444Ø6-6.

2.3. Las características de la soja GM DAS-444Ø6-6, al igual que cualquier otra soja no GM, determinan que es muy poco probable que, como consecuencia de su consumo, puedan transferirse genes desde alimentos que contengan ácidos nucleicos derivados de esta soja, hacia microorganismos presentes en el tracto digestivo. Entre las razones para realizar esta afirmación pueden mencionarse: la acción degradadora de las enzimas digestivas sobre los ácidos nucleicos ingeridos con los alimentos y la ausencia, en los insertos, de elementos de conjugación, transposición u otras formas de movilización que favorezcan la transferencia de genes desde los materiales involucrados hacia microorganismos.

### **3. Productos de la expresión de los genes introducidos**

Durante el año 2010 se llevaron a cabo ensayos a campo para un estudio de expresión, en 10 localidades de EEUU las cuales representan regiones con diversas condiciones ambientales y prácticas agronómicas.

Niveles de expresión de las proteínas codificadas por los genes introducidos fueron analizados bajo distintos tratamientos de herbicidas. Se muestrearon varios tejidos de soja conteniendo el evento DAS-444Ø6-6 y el control convencional (hoja, grano, raíz y forraje) en diversos estadios de desarrollo.

Los genes introducidos se expresan en todos los tejidos de la planta bajo la regulación de promotores constitutivos.

**Tabla 1: Niveles de expresión de AAD-12 en tejidos de soja DAS-444Ø6-6.**



Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca  
Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca

Tejido/estadio	Descripción	Promedio	Ng AAD-12/mg peso seco	
			D. E. (n=10)	Rango Min/Max
Foliar V5	Control	ND	NA	ND - ND
Foliar V5	DAS-444Ø6-6	112.61	34.05	42.00 – 179.50
Foliar V5	DAS-444Ø6-6 w/ 2,4-D	111.32	27.48	58.62 – 190.50
Foliar V5	DAS-444Ø6-6 w/ Gluf	107.75	29.91	60.00 – 179.50
Foliar V5	DAS-444Ø6-6 w/ Glyp	101.93	29.54	36.58 – 179.50
Foliar V5	DAS-444Ø6-6 w/ All	103.67	34.25	52.50 – 196.50
	Promedio general	107.46		
Foliar V10	Control	ND	NA	ND - ND
Foliar V10	DAS-444Ø6-6	118.57	36.34	68.00 – 312.00
Foliar V10	DAS-444Ø6-6 w/ 2,4-D	121.22	36.61	58.40 – 279.00
Foliar V10	DAS-444Ø6-6 w/ Gluf	109.29	25.94	64.50 – 170.00
Foliar V10	DAS-444Ø6-6 w/ Glyp	114.73	27.75	62.82 – 193.50
Foliar V10	DAS-444Ø6-6 w/ All	119.83	46.45	54.00 – 240.00
	Promedio general	116.73		
Forraje R3	Control	ND	NA	ND - ND
Forraje R3	DAS-444Ø6-6	73.47	20.77	35.00 – 122.00
Forraje R3	DAS-444Ø6-6 w/ 2,4-D	72.53	22.59	37.00 – 117.50
Forraje R3	DAS-444Ø6-6 w/ Gluf	73.75	20.39	37.00 – 123.50
Forraje R3	DAS-444Ø6-6 w/ Glyp	76.04	19.36	40.00 – 121.00
Forraje R3	DAS-444Ø6-6 w/ All	70.73	21.88	38.50 – 118.00
	Promedio general	73.30		
Radicular R3	Control	ND	NA	ND - ND
Radicular R3	DAS-444Ø6-6	23.52	10.81	0.77 – 52.80
Radicular R3	DAS-444Ø6-6 w/ 2,4-D	24.62	10.16	0.67 – 67.60
Radicular R3	DAS-444Ø6-6 w/ Gluf	24.35	11.12	ND – 67.60
Radicular R3	DAS-444Ø6-6 w/ Glyp	29.03	7.86	2.19 – 67.40
Radicular R3	DAS-444Ø6-6 w/ All	27.21	9.44	6.00 – 50.60
	Promedio general	25.75		
Grano	Control	ND	NA	ND - ND
Grano	DAS-444Ø6-6	27.37	9.70	6.99 – 45.40
Grano	DAS-444Ø6-6 w/ 2,4-D	27.34	10.35	8.03 – 43.00
Grano	DAS-444Ø6-6 w/ Gluf	27.34	10.02	9.77 – 47.20
Grano	DAS-444Ø6-6 w/ Glyp	25.77	6.79	10.04 – 46.60
Grano	DAS-444Ø6-6 w/ All	25.83	6.51	12.60 – 42.00
	Promedio general	26.73		

Fuente: Dow AgroSciences Argentina S.A.

**Tabla 2: Niveles de expresión de 2mEPSPS en tejidos de soja DAS-444Ø6-6.**



*Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca*  
*Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca*

Tejido/estadio	Descripción	Promedio	Ng 2mEPSPS/mg peso seco D. E. (n=10)	Rango Min/Max
Foliar V5	Control	ND	NA	ND - ND
Foliar V5	DAS-444Ø6-6	2368.16	973.22	585.00 – 7250.00
Foliar V5	DAS-444Ø6-6 w/ 2,4-D	2261.10	1009.75	850.00 – 7400.00
Foliar V5	DAS-444Ø6-6 w/ Gluf	2062.07	962.71	262.00 – 5150.00
Foliar V5	DAS-444Ø6-6 w/ Glyp	1846.04	975.50	353.00 – 4715.00
Foliar V5	DAS-444Ø6-6 w/ All	2100.96	784.83	680.00 – 4860.00
	Promedio general	2127.67		
Foliar V10-12	Control	ND	NA	ND - ND
Foliar V10	DAS-444Ø6-6	2583.46	825.47	961.40 – 4999.85
Foliar V10	DAS-444Ø6-6 w/ 2,4-D	2203.83	584.92	256.57 – 3600.00
Foliar V10	DAS-444Ø6-6 w/ Gluf	2188.12	543.24	1335.25 – 3405.00
Foliar V10	DAS-444Ø6-6 w/ Glyp	2512.58	1259.06	511.74 – 8650.00
Foliar V10	DAS-444Ø6-6 w/ All	2131.73	726.92	412.94 – 3210.00
	Promedio general	2323.94		
Forraje R3	Control	ND	NA	ND - ND
Forraje R3	DAS-444Ø6-6	357.09	146.12	182.40 – 862.22
Forraje R3	DAS-444Ø6-6 w/ 2,4-D	330.02	109.78	189.20 – 680.15
Forraje R3	DAS-444Ø6-6 w/ Gluf	321.92	74.69	173.46 – 539.08
Forraje R3	DAS-444Ø6-6 w/ Glyp	400.47	140.66	167.21 – 1150.00
Forraje R3	DAS-444Ø6-6 w/ All	367.32	125.39	154.04 – 1196.00
	Promedio general	355.36		
Radicular R3	Control	ND	NA	ND - ND
Radicular R3	DAS-444Ø6-6	89.71	32.33	ND – 200.4
Radicular R3	DAS-444Ø6-6 w/ 2,4-D	93.54	20.51	4.96 – 174.40
Radicular R3	DAS-444Ø6-6 w/ Gluf	103.48	47.88	ND – 200.40
Radicular R3	DAS-444Ø6-6 w/ Glyp	112.27	30.26	7.10 – 233.60
Radicular R3	DAS-444Ø6-6 w/ All	104.97	43.24	16.59 – 195.60
	Promedio general	100.79		
Grano	Control	ND	NA	ND - ND
Grano	DAS-444Ø6-6	21.97	6.28	8.68 – 35.80
Grano	DAS-444Ø6-6 w/ 2,4-D	22.17	6.95	8.94 – 34.90
Grano	DAS-444Ø6-6 w/ Gluf	22.22	7.43	8.52 – 35.02
Grano	DAS-444Ø6-6 w/ Glyp	22.80	6.87	8.24 – 46.80
Grano	DAS-444Ø6-6 w/ All	21.86	6.81	8.66 – 39.85
	Promedio general	22.20		

Fuente: Dow AgroSciences Argentina S.A.

**Tabla 3: Niveles de expresión de PAT en tejidos de soja DAS-444Ø6-6.**



*Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca*  
*Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca*

Tejido/estadio	Descripción	Promedio	Ng PAT/ mg peso seco	
			D. E. (n=10)	Rango Min/Max
Foliar V5	Control	ND	NA	ND - ND
Foliar V5	DAS-44406-6	8.98	4.03	3.00 – 19.70
Foliar V5	DAS-44406-6 w/ 2,4-D	9.20	3.24	4.07 – 15.80
Foliar V5	DAS-44406-6 w/ Gluf	8.46	4.01	0.42 – 21.10
Foliar V5	DAS-44406-6 w/ Glyp	8.14	3.58	0.44 – 17.60
Foliar V5	DAS-44406-6 w/ All	8.47	3.23	4.29 – 17.60
	Promedio general	8.65		
Foliar V10-12	Control	ND	NA	ND - ND
Foliar V10-12	DAS-44406-6	10.59	2.86	5.80 – 17.23
Foliar V10-12	DAS-44406-6 w/ 2,4-D	9.95	3.75	2.18 – 21.20
Foliar V10-12	DAS-44406-6 w/ Gluf	10.42	2.74	3.10 – 17.60
Foliar V10-12	DAS-44406-6 w/ Glyp	9.64	3.16	0.59 – 19.40
Foliar V10-12	DAS-44406-6 w/ All	10.49	3.09	3.88 – 16.80
	Promedio general	10.22		
Forraje R3	Control	ND	NA	ND - ND
Forraje R3	DAS-44406-6	6.19	1.79	3.55 – 10.45
Forraje R3	DAS-44406-6 w/ 2,4-D	5.90	1.40	3.50 – 9.65
Forraje R3	DAS-44406-6 w/ Gluf	6.72	1.67	2.90 – 11.20
Forraje R3	DAS-44406-6 w/ Glyp	6.48	1.87	3.65 – 10.35
Forraje R3	DAS-44406-6 w/ All	6.33	1.54	4.25 – 9.55
	Promedio general	6.32		
Radicular R3	Control	ND	NA	ND - ND
Radicular R3	DAS-44406-6	1.56	0.68	ND – 3.04
Radicular R3	DAS-44406-6 w/ 2,4-D	1.71	0.67	0.37 – 3.34
Radicular R3	DAS-44406-6 w/ Gluf	1.77	0.77	ND – 3.10
Radicular R3	DAS-44406-6 w/ Glyp	1.80	0.45	0.10 – 2.94
Radicular R3	DAS-44406-6 w/ All	1.86	0.60	0.62 – 3.60
	Promedio general	1.74		
Grano	Control	ND	NA	ND - ND
Grano	DAS-44406-6	2.12	0.49	1.36 – 3.19
Grano	DAS-44406-6 w/ 2,4-D	2.13	0.36	1.38 – 2.82
Grano	DAS-44406-6 w/ Gluf	2.11	0.44	1.21 – 3.23
Grano	DAS-44406-6 w/ Glyp	2.15	0.39	1.30 – 3.05
Grano	DAS-44406-6 w/ All	2.11	0.38	1.26 – 3.04
	Promedio general	2.12		

Fuente: Dow AgroSciences Argentina S.A.

#### 4. Estabilidad fenotípica y genética



*Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca*  
*Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca*

Los estudios de segregación del evento mostraron que la heredabilidad y estabilidad del mismo sigue un patrón mendeliano simple, comportándose como un locus cromosómico único.

La integridad del inserto ha sido verificada experimentalmente a través de sucesivas generaciones.

## **5. Patogenicidad para otros organismos**

5.1. La soja es reconocida como una planta no patógena para otros organismos, y esta característica no se encuentra alterada en la soja GM comprendida en este documento.

5.2. Si bien algunos de los elementos genéticos contenidos en la soja GM DAS-444Ø6-6 provienen de fitopatógenos, tales como la secuencia promotora del virus CsVMV del gen *pat* y las secuencias de los bordes de la región T del vector de transformación originarios de *A. tumefaciens*, no se encuentran presentes en el evento secuencias que confieran las correspondientes características patogénicas de los organismos de los que provienen, careciendo por lo tanto este evento de riesgos de patogenicidad producidos por dichos elementos.

## **6. Potencial para producir impactos en el agroecosistema**

Estudios a campo de evaluación agronómica la soja objeto de la presente solicitud en forma comparativa con la isolínea de soja convencional, muestran que su comportamiento agronómico no se ha modificado más allá de las características intencionalmente introducidas.

## **7. Potencial tóxico o alergénico**

La caracterización de las nuevas proteínas expresadas en la soja GM DAS-444Ø6-6 y las comparaciones de las secuencias de aminoácidos de éstas con las secuencias de proteínas tóxicas o alergénicas conocidas, no muestran niveles de identidad que permitan indicar posibles efectos tóxicos o alergénicos.



*Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca*  
*Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca*

Estudios de digestibilidad de las nuevas proteínas producidas en *Pseudomonas fluorescens* para el caso de las proteínas 2mEPSPS y AAD-12, y en *Escherichia coli* para el caso de la proteína PAT, mostraron que se digieren rápidamente en fluidos gástricos simulados. Además, los estudios de toxicidad oral aguda en ratones de las nuevas proteínas mostraron ausencia de efectos tóxicos de las mismas.

### **8. Composición centesimal del OVGM**

Las comparaciones de la composición centesimal, tanto en forraje como en grano de la soja GM DAS-444Ø6-6 con la isolínea de soja convencional, indicaron que este evento presenta composiciones centesimales equivalentes.

### **9. Recomendación**

En función de las características de la soja GM DAS-444Ø6-6, y subsecuente a la eventual obtención de la autorización para su comercialización, se recomienda que se implemente un plan de prevención y manejo de la generación de resistencia en malezas.

En el momento de la comercialización de la soja GM DAS-444Ø6-6, con respecto a la característica que le confiere tolerancia al herbicida 2,4 D, las formulaciones de los principios activos que se recomienden deben tener el correspondiente registro para su aplicación en soja tolerante a herbicidas de este grupo.