

SEGUNDA FASE DE EVALUACIÓN DOCUMENTO DE DECISIÓN

Maíz genéticamente modificado Bt11xGA21xMIR162 que contiene la acumulación de eventos Bt11, GA21 y MIR162, los cuales confieren resistencia a insectos Lepidópteros (MIR162), resistencia a insectos Lepidópteros y tolerancia a glufosinato de amonio (Bt11) y tolerancia al herbicida glifosato (GA21), presentado por la empresa Syngenta Agro 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) recomiendan dar por concluida satisfactoriamente la gestión de la segunda fase de evaluación del maíz genéticamente modificado (GM) Bt11xGA21xMIR162, atendiendo a que los riesgos de bioseguridad derivados de la liberación del OVGm en el agroecosistema, en cultivo a gran escala, no son significativamente diferentes de los inherentes al cultivo de maíz no genéticamente modificado.

Este maíz GM contiene la acumulación de los tres eventos de transformación individualmente denominados Bt11, GA21 y MIR162 fue obtenido mediante cruzamiento convencional de los parentales conteniendo cada uno de los eventos de transformación en forma separada. Estos eventos individuales tienen autorización comercial en el país desde los años 2001, 2005 y 2011 respectivamente. Este maíz ha sido ensayado a campo en Argentina desde el 2006 y para tal fin fueron solicitados ante la SAGPyA y evaluados por la CONABIA 8 (ocho) permisos para experimentación y/o liberación al medio agropecuario que han cumplido con la normativa vigente para los organismos genéticamente modificados (OGM), los que contaron con las correspondientes autorizaciones. Las liberaciones realizadas corresponden a los expedientes N° expedientes N° S01-398914/08, S01-307141/07, S01-46245/08, S01-217621/08, S01-539952/08, S01-5908/10 y sus ampliaciones, 5908-1/10, 5908-2/10 y 5908-3/10.

El presente Documento de Decisión incluye al maíz GM Bt11xGA21xMIR162 conteniendo la acumulación de eventos Bt11, GA21 y MIR162 y a toda la progenie derivada de los cruzamientos de este material con cualquier maíz no GM obtenido en forma convencional

I. ORGANISMO VEGETAL GENÉTICAMENTE MODIFICADO (OVGM)

1. Nombres común y científico: Maíz, *Zea mays* L.

2. Denominación del evento: Bt11xGA21xMIR162

3. Modificaciones introducidas: Resistencia a insectos Lepidópteros plaga tales como el barrenador del tallo (*Diatraea saccharalis*), el gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) y

la isoca de la espiga (*Heliothis zea* ó *Helicoverpa zea*) conferida por los genes *cry1Ab* y *vip3Aa20* aportados por el evento Bt11 y MIR162 respectivamente, y tolerancia al herbicida glifosato conferida por el gen *mepsps*, aportado por el evento GA21 y glufosinato de amonio conferida por el gen *pat* aportado por el evento Bt11.

3.1. Secuencias introducidas en el evento Bt11:

El evento Bt11 fue obtenido por biobalística.

3.1.1. Genes principales: *cry1Ab* y *pat*

3.1.1.1. El gen *cry1Ab* codifica para la versión truncada de la proteína insecticida Cry1Ab proveniente de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* cepa HD-1, que confiere resistencia a insectos Lepidópteros plaga.

3.1.1.2. El gen *pat* proveniente de la bacteria *Streptomyces viridochromogenes* cepa Tu494, que codifica para la enzima fosfotricina-acetil transferasa (proteína Pat), la cual confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio.

3.1.2 Otros elementos:

Estos genes se encuentran formando parte de un solo inserto, el cual se comporta como un único locus. La expresión de cada uno de estos genes está controlada por sendos promotores derivados del promotor del transcripto 35S del Virus del Mosaico del Coliflor (CaMV). Una secuencia *nos*, que codifica para la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* es utilizada por cada uno de los genes como señal de terminación de la transcripción.

3.1.3. Bordes

El inserto del maíz GM Bt11 posee una secuencia de 1100 bases, del plásmido pUC19 utilizado en la transformación, incluyendo su origen de replicación pero que no incluye regiones codificantes.

3.1.4 Integridad del inserto y número de copias del evento Bt11

El inserto se encuentra en una sola copia y su integridad ha sido verificada experimentalmente a través de sucesivas generaciones mediante análisis de Southern blot.

3.2. Secuencias introducidas en el evento GA21

El evento GA21 fue obtenido por biobalística.

3.2.1. Genes principales: *mepsps*

El gen aquí denominado *mepsps* que codifica para la enzima 5-enolpiruvil-3-fosfo-shiquimato sintasa (EPSPS) de maíz mutado para proveer la tolerancia a glifosato.

3.2.2. Otros elementos:

Este gen mutado *mepsps* se encuentra controlado por la secuencia promotora del gen de actina 1 de arroz el cual contiene el primer exón e intrón del gen de la actina. En el extremo 5' del gen *mepsps* se encuentra el péptido señal optimizado (CTP) proveniente de la Ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa oxigenasa (RuBisCo) aislada de *Helianthus annuus* (girasol) que dirige la proteína a cloroplasto. En el extremo 3' del gen *mepsps* se encuentra la señal de terminación de transcripción y poliadenilación del ARN mensajero del gen *nos* de *A. tumefaciens*.

3.2.3 Bordes

El inserto no posee ninguna otra secuencia adyacente a los sitios de inserción en el genoma del maíz diferentes a las indicadas anteriormente.

3.2.4. Integridad del inserto y número de copias del evento GA21

El inserto se encuentra en una sola copia y su integridad ha sido verificada experimentalmente a través de sucesivas generaciones mediante análisis de Southern blot.

3.3. Secuencias introducidas en el evento MIR162

El evento MIR162 fue obtenido por transformación con *A. tumefaciens*.

3.3.1. Gen principal:

El gen *vip3Aa20* codifica para una proteína denominada Vip3Aa20, la cual es una variante de la proteína insecticida Vip3Aa proveniente de *B. thuringiensis* cepa AB88, que confiere resistencia a insectos Lepidópteros plaga. Este gen se encuentra controlado por la secuencia promotora del gen de poliubiquitina de *Z. mays* el cuál contiene su primer intrón (*ZmUbilnt*). En el extremo 3' del gen *vip3Aa20* se encuentra el intrón 9 del gen de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (*iPEPC9*), seguido de la secuencia terminadora del transcripto 35S de (CaMV) que provee la señal de poliadenilación.

3.3.2. Gen acompañante:

El gen *pmi*, también llamado *manA*, codifica para la enzima fosfomanosa isomerasa proveniente de *Escherichia coli* cepa K-12 la cual cataliza la isomerización de manosa-6-fosfato en fructosa-6-fosfato y permite utilizar manosa como fuente de carbono alternativa, y fue utilizado como marcador de selección durante la transformación. Este gen se encuentra controlado por la secuencia

promotora del gen de poliubiquitina de *Z. mays* el cual contiene el primer intrón (*ZmUbilnt*). La secuencia de terminación corresponde al gen *nos* de la nopalina sintasa de *A. tumefaciens* la cual provee la señal de poliadenilación.

3.3.3. Bordes

El inserto del maíz GM MIR162 posee los bordes izquierdo y derecho de la región T del plásmido Ti de *A. tumefaciens* en los extremos correspondientes del inserto.

3.3.4. Integridad del inserto y número de copias del evento MIR162

Los genes principales y sus secuencias regulatorias 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 a través de sucesivas generaciones mediante análisis de Southern blot.

3.4. Detección de la acumulación de eventos Bt11xGA21xMIR162

La presencia de este evento puede ser determinada experimentalmente mediante técnicas moleculares de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El método se basa en la detección de la presencia simultánea de cada uno de los tres eventos parentales a partir de ADN extraído de una única muestra biológica.

II. EVALUACIÓN DE RIESGO

1. Capacidad de supervivencia, establecimiento y diseminación

Comparado con el maíz convencional, el maíz GM Bt11xGA21xMIR162 no tiene mayor capacidad que sus homólogos convencionales de sobrevivir sin asistencia humana y/o adquirir características de maleza. La presencia de los genes cuya expresión determina el fenotipo de resistencia a insectos Lepidópteros plaga confiere una ventaja selectiva al maíz GM Bt11xGA21xMIR162 en presencia de los insectos objetivo, pero ello no es suficiente para que adquiera características de maleza.

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

2.1. En el maíz GM Bt11xGA21xMIR162, la producción de polen y su viabilidad no son diferentes a las del maíz que no ha sido modificado genéticamente. No existen en el país otras especies sexualmente compatibles con maíz.

2.2. De la literatura científica disponible hasta el momento no surge la existencia de fenómenos de transferencia horizontal de genes desde el maíz hacia microorganismos,

vectores virales o insectos. Por lo tanto se considera que no existen razones para suponer que esta característica haya cambiado en el maíz GM Bt11xGA21xMIR162.

2.3. Las características del maíz GM Bt11xGA21xMIR162, al igual que cualquier otro maíz 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 este maíz, hacia microorganismos. 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

Niveles de expresión de las proteínas codificadas por los genes introducidos:

Los niveles de expresión de los genes introducidos en esta acumulación de eventos no son diferentes a los niveles de expresión que esos genes tienen en sus líneas parentales derivadas de los eventos Bt11, GA21 y MIR162. Las determinaciones de los niveles de expresión se han realizado en diferentes tejidos y estadios de crecimiento del ciclo del cultivo.

Tabla 1: Concentración de las proteínas Cry1Ab, Pat, Vip3Aa20, Pmi y mEPSPS en los eventos Bt11, MIR162, GA21 y Bt11x MIR162 x GA21 (µg/g de peso seco)

| Tipo de Tejido (Estadio) | Híbrido | Cry1Ab ^a | PAT ^a | Vip3Aa20 ^b | Pmi ^b | mEPSPS ^c |
|---|------------------------|-------------------------|------------------|-----------------------|------------------|---------------------|
| Hojas (Estadio previo a emergencia de panoja) | Evento | 117.26—180.55 | N/A | 172.10—202.72 | 5.64—10.13 | N/A |
| | Acumulado ^d | 123.06—173.32 | N/A | 159.34—213.99 | 6.76—10.49 | N/A |
| Hojas (Antesis) | Evento | 30.22—40.12 | 0.51—0.81 | 112.36—154.79 | 6.03—7.41 | 30.39—40.44 |
| | Acumulado | 21.86—40.39 | 0.48—0.97 | 116.71—187.47 | 6.39—8.76 | 28.86—39.59 |
| Hojas (Madurez fisiológica) | Evento | 4.38—34.78 | N/A | N/A | 0.028—5.32 | N/A |
| | Acumulado | 15.04—33.13 | N/A | N/A | 0.68—5.33 | N/A |
| Raíz (Estadio previo a emergencia de panoja) | Evento | N/A | 0.48—0.93 | N/A | N/A | N/A |
| | Acumulado | N/A | 0.46—1.10 | N/A | N/A | N/A |
| Raíces (Antesis) | Evento | 10.33—15.53 | 0.35—0.79 | 9.54—51.60 | 1.45—3.65 | 11.81—18.98 |
| | Acumulado | 9.17—14.45 | 0.31—0.47 | 19.07—38.45 | 1.54—3.18 | 10.68—15.44 |
| Raíces (Madurez fisiológica) | Evento | N/A | 0.32—1.21 | N/A | N/A | N/A |
| | Acumulado | N/A | 0.428—1.50 | N/A | N/A | N/A |
| Polen (Antesis) | Evento | 0.06—0.07 | <LOQ—LOD | 103.72—111.18 | 4.25—5.30 | 65.79—116.33 |
| | Acumulado | 0.05—0.15 | <LOQ—LOD | 138.53—173.94 | 4.41—5.30 | 103.15—144.19 |
| Granos (Madurez fisiológica) | Evento | 4.35—10.67 | <LOQ—LOQ | 56.41—108.27 | 1.11—2.58 | 5.35—8.76 |
| | Acumulado | 4.85—10.64 | <LOQ—LOQ | 59.18—102.10 | 1.21—2.61 | 3.53—8.57 |
| Planta entera (Antesis) | Evento | 16.15—22.72 | 0.66—1.08 | 64.92—102.64 | 3.56—4.42 | 35.65—62.96 |
| | Acumulado | 13.91—20.42 | 0.65—0.86 | 67.56—86.51 | 3.52—4.22 | 36.64—54.73 |
| Plantas enteras (Madurez fisiológica) | Evento | 8.80—18.26 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| | Acumulado | 5.17—17.49 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Plantas enteras (Senescencia) | Evento | 4.41—13.36 ^e | N/A | N/A | N/A | N/A |
| | Acumulado | 2.88—7.64 ^e | N/A | N/A | N/A | N/A |

^a Cry1Ab y Pat son expresadas en el evento Bt11.

^b Vip3Aa20 y Pmi son expresadas en el evento MIR162.

^c La proteína mEPSPS es expresada en el evento GA21.

^d Stack = Bt11 x MIR162 x GA21; son expresadas las cinco proteínas transgénicas.

N/A: indica los casos en que las proteínas no se analizaron.

LOQ: Límite de cuantificación

LOD: Límite de detección.

N = 10 a menos que se indique lo contrario (2 muestras por bloque de réplica, 5 bloques)

^eN = 9; una muestra de réplica de planta no se utilizó en su análisis.

Fuente: Syngenta Agro S.A.

Tabla 2: Concentración de las proteínas Cry1Ab, Pat, Vip3Aa20, Pmi y mEPSPS en los eventos Bt11, MIR162, GA21 y Bt11x MIR162 x GA21 (µg/g de peso fresco)

| Tipo de Tejido (Estradio) | Hibrido | Cry1Ab ^a | PAT ^a | Vip3Aa20 ^b | PmI ^b | mEPSPS ^c |
|--|------------------------|------------------------|------------------|-----------------------|------------------|---------------------|
| Hojas (Estradio previo a emergencia de panoja) | Evento | 20.52—29.75 | N/A | 28.33—36.00 | 0.89—1.89 | N/A |
| | Acumulado ^d | 20.74—31.97 | N/A | 26.85—40.02 | 1.11—1.87 | N/A |
| Hojas (Antesis) | Evento | 6.45—9.09 | 0.12—0.18 | 24.67—34.17 | 1.30—1.76 | 7.39—9.36 |
| | Acumulado | 4.89—10.73 | 0.11—0.25 | 27.37—42.70 | 1.52—2.16 | 6.75—9.23 |
| Hojas (Madurez fisiológica) | Evento | 1.86—11.98 | N/A | N/A | 0.011—1.98 | N/A |
| | Acumulado | 5.29—13.32 | N/A | N/A | 0.28—1.99 | N/A |
| Raíz (Estradio previo a emergencia de panoja) | Evento | N/A | 0.07—0.17 | N/A | N/A | N/A |
| | Acumulado | N/A | 0.06—0.20 | N/A | N/A | N/A |
| Raíces (Antesis) | Evento | 1.37—2.00 | 0.05—0.12 | 2.04—6.31 | 0.23—0.44 | 1.51—2.53 |
| | Acumulado | 1.26—1.73 | 0.04—0.08 | 2.68—5.10 | 0.20—0.42 | 1.33—2.02 |
| Raíces (Madurez fisiológica) | Evento | N/A | 0.05—0.20 | N/A | N/A | N/A |
| | Acumulado | N/A | 0.065—0.27 | N/A | N/A | N/A |
| Polen (Antesis) | Evento | 0.05—0.06 | <LOQ—LOD | 89.14—96.52 | 3.76—4.57 | 57.75—101.28 |
| | Acumulado | 0.04—0.13 | <LOQ—LOD | 113.66—141.84 | 3.73—4.38 | 84.12—119.41 |
| Granos (Madurez fisiológica) | Evento | 2.90—7.11 | <LOQ—LOQ | 40.99—72.75 | 0.78—1.73 | 3.64—5.83 |
| | Acumulado | 3.29—6.78 | <LOQ—LOQ | 39.42—68.63 | 0.90—1.78 | 2.35—5.85 |
| Planta entera (Antesis) | Evento | 2.56—3.75 | 0.11—0.16 | 10.79—15.62 | 0.59—0.71 | 5.81—9.24 |
| | Acumulado | 2.45—3.42 | 0.11—0.13 | 10.37—13.80 | 0.58—0.74 | 5.97—8.40 |
| Plantas enteras (Madurez fisiológica) | Evento | 2.34—5.44 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| | Acumulado | 2.35—5.52 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Plantas enteras (Senescencia) | Evento | 2.13—4.18 ^e | N/A | N/A | N/A | N/A |
| | Acumulado | 1.43—3.08 ^e | N/A | N/A | N/A | N/A |

^a Cry1Ab y Pat son expresadas en el evento Bt11.

^b Vip3Aa20 y Pmi son expresadas en el evento MIR162.

^c La proteína mEPSPS es expresada en el evento GA21.

^d Stack = Bt11 x MIR162 x GA21; son expresadas las cinco proteínas transgénicas.

N/A: indica los casos en que las proteínas no se analizaron.

LOQ: Límite de cuantificación

LOD: Límite de detección.

N = 10 a menos que se indique lo contrario (2 muestras por bloque de réplica, 5 bloques)

^e N = 9; una muestra de réplica de planta no se utilizó en su análisis.

Fuente: Syngenta Agro S.A.

4. Estabilidad fenotípica y genética

En el maíz GM Bt11xGA21xMIR162 cada uno de los loci se transfiere a la progenie segregando independientemente unos de otros y siguiendo en cada caso un patrón mendeliano simple.

5. Patogenicidad para otros organismos

5.1. El maíz es reconocido como una planta no patógena para otros organismos, y esta característica no se encuentra alterada en el maíz GM Bt11xGA21xMIR162.

5.2. Si bien algunos de los elementos genéticos contenidos en el maíz GM Bt11xGA21xMIR162 provienen de fitopatógenos (promotor 35S proveniente del CaMV, terminador *nos* proveniente de *A. tumefaciens*, la señal de poliadenilación del transcrito

35S del CaMV, y las secuencias de los bordes de la región T, 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 del maíz GM Bt11xGA21xMIR162 en forma comparativa con el maíz isogénico convencional, demuestran que su comportamiento no se ha modificado más allá de las características intencionalmente introducidas, tolerancia a herbicidas glifosato y glufosinato de amonio y resistencia a insectos Lepidópteros.

Ensayos locales a campo no mostraron efectos adversos sobre los insectos no blancos ni diferencias significativas en la susceptibilidad a patógenos y plagas, que no sean objetivos de las proteínas introducidas.

Ensayos de laboratorio sobre especies de Lepidópteros blanco realizados con las proteínas insecticidas no mostraron ni antagonismo ni sinergismo entre ellas. Tampoco se observaron interacciones en estudios de tolerancia a los herbicidas.

7. Potencial tóxico o alergénico

Las comparaciones de las secuencias de aminoácidos de las proteínas nuevas expresadas en el maíz Bt11xGA21xMIR162, con las secuencias de proteínas tóxicas o alergénicas conocidas, no muestran niveles de identidad que permitan indicar posibles efectos tóxicos o alergénicos.

No son esperables efectos de toxicidad en mamíferos de las proteínas Cry1Ab, Pat, mEPSPS, Vip3Aa20 y Pmi en mamíferos.

Estas proteínas son rápidamente degradadas en el fluido gástrico simulado y no presentan identidad de secuencias de aminoácidos con proteínas tóxicas conocidas. Los estudios de toxicidad aguda en ratones muestran ausencia de efectos tóxicos de estas proteínas.

8. Composición centesimal del OVG

Las comparaciones de la composición, tanto en forraje como en grano, del maíz GM Bt11xGA21xMIR162, con el control de maíz convencional y con varios híbridos de referencia, indicaron que el forraje y el grano provenientes del maíz GM Bt11xGA21xMIR162 presentan composiciones equivalentes al forraje y al grano provenientes del maíz no GM.

9. Recomendación

En función de las características del evento Bt11xGA21xMIR162, 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 e insectos.