



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

SEGUNDA FASE DE EVALUACIÓN DOCUMENTO DE DECISIÓN

Maíz genéticamente modificado SYN-BTØ11-1xSYN-IR162-4xSYN-IR6Ø4-5xMON-ØØØ21-1 (OCDE), aquí denominado Bt11xMIR162xMIR604xGA21, que contiene la acumulación de eventos Bt11, MIR162, MIR604 y GA21 los cuales confieren resistencia a insectos Lepidópteros (Bt11, MIR162) y tolerancia a glufosinato de amonio (Bt11), resistencia a insectos Coleópteros (MIR604) 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 Segunda Fase de Evaluación del maíz genéticamente modificado (GM) Bt11xMIR162xMIR604xGA21, concluyendo 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 que contiene la acumulación de los cuatro eventos de transformación individualmente denominados Bt11, GA21, MIR162 y MIR604 fue obtenido mediante cruzamiento convencional de los parentales conteniendo cada uno de los eventos de transformación en forma separada. Los tres primeros eventos individuales mencionados tienen autorización comercial en el país desde los años 2001, 2005 y 2011, respectivamente. El maíz GM MIR604 ha sido ensayado a campo en Argentina desde 2003 hasta 2011, mientras que el maíz GM Bt11xMIR162xMIR604xGA21 ha sido ensayado a campo en nuestro país desde 2006 hasta 2011 y para tal fin fueron solicitados y evaluados por la CONABIA, respectivamente, seis (6) y diecisiete (17) 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 incluye al maíz GM Bt11xMIR162xMIR604xGA21, al evento individual MIR604, a los nuevos eventos acumulados intermedios que surjan de la



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

combinaciones de sus parentales, y a toda la progenie derivada de los cruzamientos de estos materiales 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 de los eventos: Bt11xMIR162xMIR604xGA21

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 los eventos Bt11 y MIR162 respectivamente; resistencia a insectos Coleópteros plaga, tal como la vaquita de San Antonio (*Diabrotica speciosa*), conferida por el gen *mcry3A* aportado por el evento MIR604 y tolerancia a los herbicidas 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 fosfinotricina-acetil transferasa (proteína Pat), la cual confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio.



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

3.1.2 Otros elementos:

3.1.2.1. La expresión del gen *cry1Ab* está controlada por el promotor del transcripto 35S del Virus del Mosaico del Coliflor (CaMV), seguido por la secuencia del intrón 6 (IVS6) del gen *adh* que codifica para la enzima alcohol deshidrogenasa de maíz. La secuencia *nos*, que codifica para la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* es utilizada como señal de terminación de la transcripción.

3.1.2.2. La expresión del gen *pat* está controlada por el promotor del transcripto 35S del Virus del Mosaico del Coliflor (CaMV), seguido por la secuencia del intrón 2 (IVS2) del gen *adh* que codifica para la enzima alcohol deshidrogenasa de maíz. La secuencia *nos*, que codifica para la nopalina sintasa de *A. tumefaciens* es utilizada como señal de terminación de la transcripción.

3.1.3. Bordes

El inserto Bt11 posee parte del origen de replicación (ColE1ori) del plásmido pUC19 utilizado en la transformación. Sin embargo no incluye regiones codificantes ni su presencia genera nuevos marcos de lectura.

3.1.4 Integridad del inserto y número de copias del evento Bt11

Los genes y sus secuencias regulatorias se encuentran formando parte de un solo inserto, el cuál se comporta como un único locus cromosómico. 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.



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

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, se encuentra 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, la 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) de *Helianthus annuus* (girasol) que dirige la proteína al 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 aparte de las indicadas anteriormente.

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

El gen y sus secuencias regulatorias se encuentran formando parte de un solo inserto, el cuál se comporta como un único locus cromosómico. 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: *vip3Aa20*



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

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* la cual 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, que 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* la 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 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 y sus secuencias regulatorias se encuentran formando parte de un solo inserto, el cual se comporta como un único locus cromosómico. 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. Secuencias introducidas en el evento MIR604.



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

El evento MIR604 fue obtenido por transformación con *A. tumefaciens*.

3.4.1. Gen principal: *mcry3A*

El gen *mcry3A* es una versión modificada del gen *cry3A* de *B.thuringiensis* subsp *tenebrionis* y codifica para la proteína mCry3A (versión modificada de la proteína nativa Cry3A), que confiere resistencia a insectos Coleópteros plaga. Este gen se encuentra controlado por la secuencia promotora del gen de la metalotioneína de *Z. mays*. En el extremo 3' del gen *mcry3A* se encuentra la secuencia terminadora de la nopalina sintasa (*nos*) de *A. tumefaciens*.

3.4.2. Gen acompañante:

El gen *pmi*, también llamado *manA*, codifica para la enzima fosfomanosa isomerasa proveniente de *E. 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* la 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.

3.4.3. Bordes

El inserto del maíz GM MIR604 posee los bordes izquierdo y derecho de la región T del plásmido Ti de *A. tumefaciens* en los extremos correspondientes del inserto.

3.4.4. Integridad del inserto y número de copias del evento MIR604

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



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

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 Bt11xMIR162xMIR604xGA21

La presencia de estos eventos 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 cuatro 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 Bt11xMIR162xMIR604xGA21 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 y Coleópteros plaga confiere una ventaja selectiva al maíz GM Bt11xMIR162xMIR604xGA21 en presencia de los insectos objetivo, pero ello no es suficiente para que adquiriera características de maleza.

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

En el maíz GM Bt11xMIR162xMIR604xGA21, 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 especies sexualmente compatibles con maíz.

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



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

vectores virales o insectos. Por lo tanto se considera que no existen razones para suponer que esta característica haya cambiado en el maíz GM Bt11xMIR162xMIR604xGA21.

Las características del maíz GM Bt11xMIR162xMIR604xGA21, 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.

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, MIR162, MIR604 y GA21. Las determinaciones de los niveles de expresión se han realizado en diferentes tejidos y estadios de crecimiento del ciclo del cultivo.



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

Tabla 1: Concentración de las proteínas Cry1Ab, PAT, Vip3Aa20, mCry3A y mEPSPS en los eventos Bt11, MIR162, MIR604, GA21 y Bt11xMIR162xMIR604xGA21 (ug/g, peso seco)

Tejido (estadio)	Hibrido	Cry1Ab ^a	PAT ^a	Vip3Aa20 ^b	mCry3A ^c	mEPSPS ^d
Hojas (verticilo)	Evento simple	78.25-112.86	N/A	144.00-250.71	N/A	N/A
	Acumulado ^e	71.82-101.42	N/A	143.37-183.57	N/A	N/A
Hojas (antesis)	Evento simple	25.78-35.16	0.50-0.82	139.91-279.52	30.72-46.44	40.33-59.68
	Acumulado ^e	22.00-38.64	0.46-0.76	132.81-259.25	24.37-47.44	26.52-57.66
Raíces (verticilo)	Evento simple	N/A	N/A	N/A	28.69-51.89	N/A
	Acumulado	N/A	N/A	N/A	28.37-40.12	N/A
Raíces (antesis)	Evento simple	9.56-13.27	0.50-1.14	36.03-65.91	16.40-25.40	10.63-23.5
	Acumulado	7.33-13.53	0.58-0.99	38.65-65.80	38.65-65.80	8.82-17.85
Polen (antesis)	Evento simple	0.07-0.09	<LD - <LD	82.19-117.58	<LC - <LC	64.01-113.66
	Acumulado	0.06-0.12	<LD - <LD	74.64-95.92	<LC - <LC	73.12-129.61
Granos (madurez fisiológica)	Evento simple	1.19-2.31	<LC - <LC	54.25-165.94	0.19-1.11 ^f	3.62-7.61 ^f
	Acumulado	1.15-2.52 ^g	<LC - <LC ^g	89.74-164-69 ^g	0.40-0.77 ^g	2.99-7.69 ^g
Planta entera(antesis)	Evento simple	13.63-18.42	0.71-1.26	56.66-87.55	14.54-21.54	19.58-25.64
	Acumulado	13.65-17.12	0.75-1.03	57.05-87.52	12.75-21.00	19.27-25.31

N=10, salvo que se indique lo contrario (2 muestras por bloque)
^a Cry1Ab y PAT se expresan en el evento Bt11
^b Vip3Aa20 y PMI se expresan en el evento MIR162. Las concentraciones de PMI se muestran en la Tabla IV.
^c mCry3A y PMI-MIR604 se expresan en el evento MIR604. Las concentraciones de PMI se muestran en la Tabla 19.
^d mEPSPS se expresa en el evento GA21.
^e Evento apilado o acumulado = Bt11xMIR162xMIR604xGA21. Se expresan las siete proteínas transgénicas.
^f N=9, una muestra con cantidad de tejido insuficiente para el análisis.
^g N=9, una planta sin granos
^h N=8, una planta sin granos y una muestra con cantidad de tejido insuficiente para el análisis.
N/A, no analizado; LD, límite de detección; LC, límite de cuantificación.

Fuente: Syngenta Agro S.A.



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

Tabla 2: Concentración de la proteína Pmi en los eventos MIR162, MIR604 y Bt11xMIR162xMIR604xGA21 (ug/g, peso seco)

Tejido (estadio)	Híbrido	Concentración media de PMI o PMI-MIR604 (µg/g) ¹ ± DS (Rango)	
		Medido con PMI como referencia	Medido con PMI-MIR604 como referencia
Hojas (antesis)	MIR162	7.72 ± 0.87 (6.54-9.20)	N/A
	MIR604	N/A	5.03 ± 0.99 (3.77-6.13)
	Bt11xMIR162xMIR604xGA21	5.03 ± 0.99 (3.77-6.13)	9.95 ± 2.04 (7.48-14.01)
Raíces (antesis)	MIR162	2.58 ± 0.429 (1.94-3.33)	N/A
	MIR604	N/A	2.41 ± 0.42 (1.71-3.08)
	Bt11xMIR162xMIR604xGA21	5.37 ± 0.77 (4.27-6.82)	4.08 ± 0.84 (2.98-5.67)
Polen (antesis)	MIR162	5.07±0.21 (4.72-5.24)	N/A
	MIR604	N/A	43.32 ± 3.78 (37.39-47.77)
	Bt11xMIR162xMIR604xGA21	48.07 ± 1.50 (46.14-49.76)	50.40 ± 7.23 (41.00-58.21)
Granos (madurez fisiológica)	MIR162	2.48 ± 0.64 (1.08-3.16)	N/A
	MIR604	N/A	2.33 ± 0.53 (1.55-2.99)
	Bt11xMIR162xMIR604xGA21	5.18± 1.27 (3.38-6.54)	1.74 ± 1.43 (1.19-5.94)
Planta entera(antesis)	MIR162	3.87 ± 0.51 (3.02-4.62)	N/A
	MIR604	N/A	4.37 ± 0.68 (3.51-5.54)
	Bt11xMIR162xMIR604xGA21	8.54 ± 0.69 (7.52-9.53)	7.20 ± 0.76 (6.16-8.78)

¹ PMI se expresa en el evento MIR162 y PMI-MIR604 en el evento MIR604. El evento Bt11xMIR162xMIR604xGA21 expresa las dos proteínas PMI. Los ensayos de ELISA para PMI y PMI-604 utilizan a las proteínas PMI y PMI-604 purificadas como estándar de referencia. Los ensayos para PMI y para PMI-604 se realizaron en distintos días. Los datos presentados para el evento Bt11xMIR162xMIR604xGA21 corresponden a la cantidad total de PMI (PMI + PMI-604). Cada proteína fue medida en distintos ensayos y en el mismo momento que se midió la cantidad de proteína para los eventos individuales con sus respectivos estándares de referencia. Las dos formas de PMI no se pueden distinguir en el evento Bt11xMIR162xMIR604xGA21, ya que los anticuerpos utilizados son capaces de reconocer a ambas proteínas. N/A, no analizado.

Fuente: Syngenta Agro S.A.

4. Estabilidad fenotípica y genética.

En el maíz GM Bt11xMIR162xMIR604xGA21 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.



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

El maíz es reconocido como una planta no patógena para otros organismos, y esta característica no se encuentra alterada en el maíz GM Bt11xMIR162xMIR604xGA21.

Si bien algunos de los elementos genéticos contenidos en el maíz GM Bt11xMIR162xMIR604xGA21 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 los eventos secuencias que confieran las correspondientes características patogénicas de los organismos de los que provienen, careciendo por lo tanto esta acumulación de eventos 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 Bt11xMIR162xMIR604xGA21 en forma comparativa con el maíz isogénico convencional, demuestran que su comportamiento no se ha modificado más allá de las características intencionalmente introducidas.

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

Ensayos de laboratorio sobre especies de Lepidópteros y Coleópteros no mostraron ni antagonismo ni sinergismo entre las proteínas insecticidas y 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 Bt11xMIR162xMIR604xGA21, 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 de las proteínas Cry1Ab, Pat, mEPSPS, Vip3Aa20, mCry3A y Pmi en mamíferos.



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

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 OVGM.

Las comparaciones de la composición, tanto en forraje como en grano, del maíz GM Bt11xMIR162xMIR604xGA21, con el control de maíz convencional y con varios híbridos de referencia, indicaron que presentan composiciones equivalentes.

9. Recomendación.

En función de las características del evento GM Bt11xMIR162xMIR604xGA21, y ante 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 las malezas e insectos.