



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

SEGUNDA FASE DE EVALUACIÓN

DOCUMENTO DE DECISIÓN

Soja genéticamente modificada MON-87701-2xMON-89788-1 (OCDE), aquí denominado MON87701xMON89788, conteniendo la acumulación de eventos MON87701 y MON89788, que le confieren a la soja protección contra ciertos insectos Lepidópteros y tolerancia al herbicida glifosato, presentado por la empresa Monsanto Argentina S.A.I.C.

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 concluida satisfactoriamente la Segunda Fase de Evaluación de la soja genéticamente modificada (GM) MON87701xMON89788, 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 MON89788 ha sido ensayada a campo en Argentina desde 2006 hasta 2011, mientras que la soja GM MON87701 y la soja GM MON87701xMON89788 han sido ensayadas a campo en nuestro país desde 2007 y hasta 2011, y para tal fin fueron solicitados y evaluados por la CONABIA, respectivamente, treinta y uno (31), tres (3) y siete (7) 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 MON87701xMON89788, los eventos individuales y a toda la progenie derivada de los cruzamientos de estos materiales 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 de los eventos: MON87701xMON89788



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

3. Modificaciones introducidas: La acumulación de eventos MON87701xMON89788 aporta a la soja protección contra ciertos insectos Lepidópteros y tolerancia al herbicida glifosato.

3.1. Método de transformación:

Los eventos MON87701 y MON89788 han sido obtenidos individualmente por transformación de tejidos meristemáticos de soja mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. La acumulación de eventos MON87701xMON89788 es el resultado del cruzamiento tradicional de líneas conteniendo los eventos simples.

3.2. Secuencias introducidas en el evento MON87701:

3.2.1. Gen principal: *cry1Ac*

El gen *cry1Ac* de *Bacillus thuringiensis (Bt) subsp. kurstaki*, codifica para la proteína Cry1Ac que posee más del 99.1% de identidad con la secuencia de la proteína producida por *B. thuringiensis subsp. kurstaki* en la naturaleza, y con aquella presente en las formulaciones insecticidas comerciales de Bt usadas en agricultura; es activa específicamente contra insectos Lepidópteros y es eficaz en el control de plagas de Lepidópteros como *Anticarsia gemmatalis*, *Epinotia aporema*, y *Rachiplusia nu*.

3.2.2. Otros elementos

La expresión del gen *cry1Ac* está bajo la regulación del promotor, secuencia líder y la región 5' no-traducida del gen *RbcS4* de *Arabidopsis thaliana* que codifica para la subunidad pequeña 1A de la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa oxigenasa (RuBisCo); esta última secuencia incluye el péptido señal de tránsito al cloroplasto *CTP1*. La secuencia 3' no-traducida del gen *Sphas1* de *Glycine max*, que codifica para la proteína 7S α' , regula la terminación de la transcripción y dirige la poliadenilación del ARN mensajero.

3.2.3. Bordes



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

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.

Las regiones flanqueantes 5' y 3' del inserto corresponden a secuencias nativas de la soja. El análisis molecular mostró una delección de 32 pb y una inserción de 14 pb en el genoma de la planta en el extremo 5' del sitio de inserción de MON87701; sin embargo, la evaluación a través de las herramientas bioinformáticas indicó que es poco probable que algún marco de lectura abierto (ORF) endógeno se haya interrumpido por la inserción.

3.2.4. Integridad del inserto y número de copias del evento MON87701

El gen principal y sus secuencias regulatorias, así como los elementos adicionales detallados más arriba, se encuentran formando parte del 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 mediante análisis de *Southern blot*, reacción en cadena de la polimerasa (PCR de su sigla en inglés) y secuenciación de ADN; y confirmada por estudios de herencia del fenotipo introducido.

3.2.5. Detección del evento MON87701

La presencia de este evento puede ser determinada experimentalmente de manera específica mediante PCR en tiempo real.

3.3. Secuencias introducidas en el evento MON89788:

3.3.1. Gen principal: *cp4 epsps*

El gen *cp4 epsps* deriva del gen *aroA* de *Agrobacterium sp.* cepa CP4 que codifica para la proteína CP4 EPSPS con una estructura similar y funcionalmente idéntica a la enzima EPSPS endógena de la planta; sin embargo, la CP4 EPSPS posee una afinidad reducida por el glifosato por lo cual le confiere a la soja GM MON87701xMON89788 tolerancia a este herbicida.



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

3.3.2. Otros elementos

La expresión del gen *cp4 epsps* está bajo la regulación de un promotor transcripcional quimérico (*P-FMV/Tsf1*) que consiste en una secuencia potenciadora del promotor 35S del Virus del Mosaico del *Figwort* (FMV) y el promotor derivados del gen *Tsf1* de *A. thaliana*, el cual codifica para el factor de elongación EF-1 alfa. A continuación de este último se encuentra la secuencia líder y un intrón (*L-Tsf1* y *I-Tsf1* respectivamente) del gen *Tsf1* y la secuencia del péptido de tránsito al cloroplasto (*TS-CTP2*) derivada del gen *ShkG* de *A. thaliana*, el cual codifica para la proteína EPSPS. La secuencia 3' no traducida del gen *RbcS2* de la arveja (*Pisum sativum*) que codifica la subunidad pequeña de la ribulosa-1, 5-bisfosfato carboxilasa regula la terminación de la transcripción y dirige la poliadenilación del ARN mensajero.

3.3.3. Bordes

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

Las regiones flanqueantes 5' y 3' del inserto corresponden a secuencias nativas de la soja. El análisis molecular mostró una delección de 40 pb y una inserción de 10 pb en el genoma de la planta en el extremo 5' del sitio de inserción de MON89788; sin embargo, la evaluación a través de las herramientas bioinformáticas indicó que es poco probable que algún marco de lectura abierto (ORF) endógeno se haya interrumpido por la inserción.

3.3.4. Integridad del inserto y número de copias del evento MON89788

El gen principal y sus secuencias regulatorias, así como los elementos adicionales detallados más arriba, se encuentran formando parte del 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 mediante análisis de *Southern blot*, PCR



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

y secuenciación de ADN; y confirmada por estudios de herencia del fenotipo introducido.

3.3.5. Detección del evento MON89788

La presencia de este evento puede ser determinada experimentalmente de manera específica mediante PCR en tiempo real.

II. EVALUACIÓN DE RIESGO

1. Capacidad de supervivencia, establecimiento y diseminación.

Comparada con la soja convencional, la soja GM MON87701xMON89788 y sus parentales no tienen mayor capacidad que sus homólogos convencionales de sobrevivir sin asistencia humana y/o de adquirir características de maleza. La presencia del gen cuya expresión determina el fenotipo de tolerancia al glifosato confiere una ventaja selectiva a la soja GM MON 87701xMON 89788 cuando se la expone a este herbicida, 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.

La biología reproductiva de la soja GM MON87701xMON 89788 y la de sus parentales no es diferente a la de la soja que no ha sido modificada genéticamente, además no existen en el país especies sexualmente compatibles con la soja.

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 MON87701xMON89788.

Las características de la soja GM MON87701xMON89788 y la de sus parentales, 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



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

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.

El gen *cryAc* se expresa en los tejidos aéreos de la planta, bajo la regulación de un promotor que dirige la expresión a estos tejidos y el gen *cp4 epsps* se expresa en todos los tejidos de la planta bajo la regulación de un promotor constitutivo.

Los niveles de las proteínas expresadas en los eventos individuales parentales no difieren significativamente de aquellos encontrados en la soja GM MON 87701xMON 89788.



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

Tabla 1: Niveles de expresión de Cry1Ac en tejidos de soja de MON87701xMON89788 producidos en Argentina durante 2007-2008.

Tipo de Tejido ¹	MON 87701x MON 89788	
	Media (SD) ^{2,4} Rango ⁵ (µg/g fwt)	Media (SD) ³ Rango (µg/g dwt)
OSL-1	90 (37) 50 – 190	450 (170) 240 – 870
OSL-2	60 (21) 22 – 96	320 (92) 95 – 430
OSL-3	38 (21) 12 – 90	190 (100) 65 – 430
OSL-4	63 (26) 32 – 110	350 (130) 230 – 640
Raíz	<LOD	NA ⁶
Forraje	23 (13.7) 7.4 – 56	81 (55) 20 – 220
Semilla Cosechada	7.0 (2.0) 4.0 – 11	7.9 (2.3) 4.5 – 12

1. Los tejidos fueron recolectados en los siguientes estados de desarrollo:
OSL-1: V3 – V4 OSL-3: V10 – V12
OSL-2: V6 – V8 OSL-4: V14 – V16
Raíz: R6 Semilla: R8, cosechada a o seca a un ~10-15% de humedad
Forraje: R6

2. Los niveles de proteína están expresados en microgramos (µg) de proteína por su peso en gramos (g) de tejido fresco (fwt).

3. Los niveles de proteína están expresados en µg/g en base a peso de tejido seco (dwt). El valor de tejido seco fue calculado por división del peso del tejido fresco por un factor de conversión a tejido seco obtenido de los análisis de humedad del tejido.

4. La media y el desvío estándar fueron calculados a través de las localidades (n= 15 para los eventos acumulados MON 87701 x MON 89788). El valor de "n" para el cálculo de la media y el desvío estándar representan el número de análisis que se utilizaron para su cálculo.

5. Los valores mínimos y máximos para cada tejido fueron calculados para todas las localidades.

Fuente: Monsanto Argentina S.A.I.C.



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

Tabla 2: Niveles de expresión de CP4 EPSPS en tejidos de soja de MON87701xMON89788 producidos en Argentina durante 2007-2008.

Tipo de tejido ¹	MON 87701x MON 89788	
	Media (SD) ^{2,4} Rango ⁵ (µg/g fwt)	Media (SD) ³ Rango (µg/g dwt)
OSL-1	130 (23) 94 – 170	650 (110) 480 – 890
OSL-2	71 (16) 41 – 100	380 (78) 270 – 560
OSL-3	49 (38) 23 – 170	260 (220) 110 – 960
OSL-4	82 (16) 58 – 110	460 (85) 350 – 670
Raíz	16 (3.3) 12 – 21	52 (12) 38 – 71
Forraje	33 (6.2) 24 – 44	120 (31) 63 – 170
Semilla Cosechada	140 (73) 65 – 270	160 (82) 74 – 300

1. Los tejidos fueron recolectados en los siguientes estados de desarrollo:
OSL-1: V3 – V4 OSL-3: V10 – V12
OSL-2: V6 – V8 OSL-4: V14 – V16
Raíz: R6 Semilla: R8, cosechada a o seca a un ~10-15% de humedad
Forraje: R6

2. Los niveles de proteína están expresados en microgramos (µg) de proteína por su peso en gramos (g) de tejido fresco (fwt).

3. Los niveles de proteína están expresados en µg/g en base a peso de tejido seco (dwt). El valor de tejido seco fue calculado por división del peso del tejido fresco por un factor de conversión a tejido seco obtenido de los análisis de humedad del tejido.

4. La media y el desvío estándar fueron calculados a través de las localidades (n= 13 para los eventos acumulados MON 87701 x MON 89788). El valor de "n" para el cálculo de la media y el desvío estándar representan el número de análisis que se utilizaron para su cálculo.

5. Los valores mínimos y máximos para cada tejido fueron calculados para todas las localidades.

Fuente: Monsanto Argentina S.A.I.C.

4. Estabilidad fenotípica y genética.

Los estudios de segregación de cada evento individual parental mostraron que la heredabilidad y estabilidad de éstos sigue un patrón mendeliano simple, comportándose cada inserto como un locus cromosómico único. Teniendo en cuenta que el evento acumulado GM MON87701xMON89788 fue desarrollado mediante cruzamiento



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

convencional, se estima que éste seguiría también el patrón de segregación mendeliana observado en los eventos individuales.

5. Patogenicidad para otros organismos.

La soja es reconocida como una planta no patógena para otros organismos, y esta característica no se encuentra alterada en la soja GM MON87701xMON89788.

Si bien algunos de los elementos genéticos contenidos en la soja GM MON87701xMON89788 provienen de fitopatógenos, tales como la secuencia potenciadora del promotor quimérico del gen *cp4 epsps* derivada del promotor 35S proveniente del FMV 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 esta acumulación de eventos de riesgos de patogenicidad producidos por dichos elementos.

6. Potencial para producir impactos en el agroecosistema.

Observaciones de las respuestas a factores bióticos y abióticos de la soja GM MON87701xMON89788 en forma comparativa con la aislínea convencional mostraron que las nuevas características introducidas en la soja GM MON87701xMON89788 no alteraron la susceptibilidad a enfermedades y plagas y a factores de estreses abióticos en comparación con la soja convencional.

Ensayos a campo sobre la abundancia total de artrópodos y de insectos benéficos no anticipan que la soja GM MON87701xMON89788 presente un comportamiento en el agroecosistema diferente al de la soja convencional con respecto a estas características.

Por otro lado, estudios sobre las interacciones con *Bradyrhizobium japonicum* asociadas a la nodulación, la acumulación de nitrógeno total y al desarrollo vegetal, indicaron que la fijación de nitrógeno en la soja GM MON87701xMON89788 es equivalente a la aislínea convencional.

7. Potencial tóxico o alergénico.

La caracterización de las nuevas proteínas expresadas en la soja GM MON87701xMON89788 y las comparaciones de las secuencias de aminoácidos de éstas



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

con las secuencias de proteínas tóxicas o alergénicas conocidas, no muestran niveles de identidad que permitan indicar posibles efectos tóxicos o alergénicos.

Estudios de digestibilidad de las nuevas proteínas producidas en *Escherichia coli* mostraron que se digieren rápidamente en fluidos gástricos e intestinales simulados en el caso de Cry1Ac y en fluidos gástricos simulados en el caso de CP4 EPSPS. 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 OVG.

Las comparaciones de la composición centesimal, tanto en forraje como en grano de la soja GM MON87701xMON89788 con la isolínea de soja convencional y con sus parentales individuales, indicaron que la soja GM MON87701xMON89788 y también sus parentales individuales presentan composiciones equivalentes a los correspondientes productos provenientes de la soja no GM.

9. Recomendación.

En función de las características de la soja GM MON87701xMON89788, 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.