

## SEGUNDA FASE DE EVALUACIÓN DOCUMENTO DE DECISIÓN

**Maíz genéticamente modificado MON-89034-3xMON-88017-3 (MON 89034 x MON 88017) que contiene la acumulación de eventos MON 89034 y MON 88017 los cuales confieren resistencia a insectos Lepidópteros, insectos Coleópteros 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 gestión de la Segunda Fase de Evaluación del maíz genéticamente modificado (GM) MON 89034 x MON 88017, atendiendo a que los riesgos de bioseguridad derivados de la liberación del organismo vegetal genéticamente modificado (OVGM) en el agroecosistema, en cultivo a gran escala, no son significativamente diferentes de los inherentes al cultivo de maíz no GM.

Este maíz GM contiene la acumulación de los eventos de transformación individualmente denominados MON 89034 y MON 88017 y fue obtenido mediante cruzamiento convencional de los parentales conteniendo cada uno de los eventos de transformación en forma separada. Dichos parentales fueron obtenidos por transformación con *Agrobacterium tumefaciens* cepa ABI. El maíz GM MON 89034 x MON 88017 ha sido ensayado desde 2004 hasta 2009 a campo en Argentina y para tal fin fueron solicitados y evaluados por la CONABIA 27 (veintisiete) 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 actual Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca (SAGyP).

El presente Documento de Decisión incluye al maíz GM MON 89034 x MON 88017 conteniendo solamente la acumulación de eventos MON 89034 y MON 88017 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: MON-89034-3xMON-88017-3 (MON 89034 x MON 88017).

### 3. Modificaciones introducidas:

Resistencia a insectos Lepidópteros (*cry1A.105* y *cry2Ab2*), resistencia a insectos Coleópteros (*cry3Bb1* modificado) y tolerancia al herbicida glifosato (*CP4-epsps*).

#### 3.1. Genes expresados en el evento MON 89034:

3.1.1. El gen *cry1A.105* codifica para una proteína quimérica denominada Cry1A.105 de tipo Cry1A la cual fue obtenida por intercambio de dominios con las proteínas Cry1Ac (*subsp. kurstaki*), Cry1Ab (*subsp. kurstaki*) y Cry1F (*subsp. aizawai*) provenientes de *Bacillus thuringiensis*. Esta proteína confiere resistencia a insectos Lepidópteros. La expresión del gen *cry1A.105* está controlada por el promotor modificado del transcripto 35S del Virus del Mosaico del Coliflor (CaMV).

3.1.2. El gen *cry2Ab2* codifica para la proteína Cry2Ab2 derivada de *Bacillus thuringiensis* (*subsp. kurstaki*). Esta proteína confiere resistencia a insectos Lepidópteros. La expresión del gen *cry2Ab2* está controlada por el promotor del transcripto 35S del Virus del Mosaico del *Figwort*.

3.1.3. Estos genes se encuentran formando parte de un solo inserto, el cual se comporta como un locus único.

#### 3.1.4. Otros elementos introducidos en el evento MON 89034:

3.1.4.1. El gen *cry1A.105* se encuentra río arriba del primer intrón *Ract 1* derivado del gen de la actina de arroz y de la secuencia 5' no traducida del líder de la proteína de unión a la clorofila a/b de trigo. La región 3' del gen que codifica para la proteína de golpe de calor (Hsp 17.3) de trigo fue utilizada como señal de terminación de la transcripción del gen y dirige la poliadenilación del ARN mensajero.

3.1.4.2. El gen *cry2Ab2* se encuentra río arriba del primer intrón del gen de la proteína de golpe de calor (Hsp70) de maíz y las secuencias del primer intrón y del péptido de tránsito al cloroplasto del gen de la subunidad menor de la enzima RUBISCO de *Zea mays*. La región 3' derivada del gen *nos* que codifica para la nopalina sintetasa es utilizada como señal de terminación de la transcripción del gen y dirige la poliadenilación del ARN mensajero.

3.1.4.3. El inserto del maíz GM MON 89034 posee un borde izquierdo en cada uno de sus extremos de inserción adyacentes a las secuencias flanqueantes del maíz.

#### 3.1.5. Integridad del inserto y número de copias del evento MON 89034:

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*.

#### 3.1.6. Detección del evento MON 89034:

La presencia de este evento puede ser determinada experimentalmente mediante técnicas moleculares de dominio corriente como ser la reacción en cadena de la polimerasa (PCR de sus siglas en inglés).

#### 3.2. Genes expresados en el evento MON 88017:

3.2.1. El gen *cp4 epsps* codifica para la proteína CP4 EPSPS derivada de *Agrobacterium* sp. cepa CP4 que confiere tolerancia al herbicida glifosato. La expresión del gen está controlada por el promotor de actina de arroz.

3.2.2. El gen *cry3Bb1* modificado que codifica para una variante sintética de proteína Cry3Bb1 derivada de *Bacillus thuringiensis* (*subsp. kumamotoensis*) que confiere resistencia a ciertos insectos Coleópteros plagas. La expresión del gen se encuentra regulada por el promotor del transcrito 35S del Virus del Mosaico del Coliflor (CaMV) conteniendo la región potenciadora duplicada (p-e35S).

3.2.3. Ambos genes *cp4 epsps* y *cry3Bb1* modificado se encuentran formando parte de un solo inserto, el cual se comporta como un locus único.

#### 3.2.4. Otros elementos del evento MON 88017:

3.2.4.1. El gen *cp4 epsps* se encuentra río arriba del promotor y el primer intrón *Ract 1* derivado del gen de la actina de arroz y de la secuencia codificante de la región N terminal del péptido de tránsito al cloroplasto (CTP2) derivado de *Arabidopsis thaliana*. La señal de poliadenilación del gen esta dada por la región 3' no traducida del gen *nos* de la nopalina sintetasa de *Agrobacterium tumefaciens* la cual actúa como señal de poliadenilación del ARN mensajero.

3.2.4.2. La secuencia codificante del gen *cry3Bb1* modificado se encuentra río arriba de la región 5' no traducida del líder de la proteína de unión a la clorofila a/b de trigo (L-Cab) y el primer intron *Ract 1* derivado del gen de la actina de arroz. La región 3' no traducida derivada de la proteína de golpe de calor (Hsp 17.3) de trigo es utilizada como señal de terminación de la transcripción del gen y dirige la poliadenilación del ARN mensajero.

3.2.4.3. El inserto del maíz GM MON 88017 posee un borde derecho y un borde izquierdo en sendos extremos de inserción adyacentes a las secuencias flanqueantes del maíz.

### 3.2.5. Integridad del inserto y número de copias del evento MON 88017:

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*.

### 3.2.6. Detección del evento MON 88017:

La presencia de este evento puede ser determinada experimentalmente mediante técnicas moleculares de dominio corriente como ser la reacción en cadena de la polimerasa (PCR de sus siglas en inglés).

## II. EVALUACIÓN DE RIESGO

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

Comparado con el maíz convencional, el maíz GM MON 89034 x MON 88017 no tiene mayor capacidad que sus homólogos convencionales de sobrevivir como maleza sin asistencia humana. La presencia de los genes cuya expresión determinan los fenotipos de resistencia a insectos Lepidópteros, insectos Coleópteros y de tolerancia al herbicida glifosato, confieren una ventaja selectiva al maíz GM MON 89034 x MON 88017 cuando se lo expone al herbicida arriba mencionado, y 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 OVGM con otros organismos

2.1. En el maíz GM MON 89034 x MON 88017, 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.

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 MON 89034 x MON 88017.

2.3. Las características del maíz GM MON 89034 x MON 88017, al igual que cualquier otro maíz no GM, determinan que es muy poco probable que puedan transferirse genes hacia microorganismos desde alimentos que contengan ácidos nucleicos y que sean derivados de este maíz. 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



**Niveles de expresión de la proteína Cry1A.105 en muestras de maíz GM MON 89034 X MON 88017 y maíz GM MON 89034 tomados de ensayos de campo en EEUU durante el año 2005**

Tipo de tejido <sup>1</sup>	MON 89034 x MON 88017		MON 89034	
	Rango <sup>3</sup> Medio (SD) <sup>2</sup> (µg/g fwt) <sup>4</sup>	Rango Medio (SD) (µg/g dwt) <sup>5</sup>	Rango <sup>3</sup> Medio (SD) <sup>2</sup> (µg/g fwt) <sup>4</sup>	Rango Medio (SD) (µg/g dwt) <sup>5</sup>
OSL-1	70 (8.3) 58 – 87	430 (71) 310 - 550	62 (13) 49 – 91	380 (93) 250 - 600
OSR-1	9.4 (1.4) 7.7 – 13	83 (18) 57 – 130	8.4 (0.89) 7.1 – 10	75 (16) 49 – 99
OSR5-FR	2.5 (0.36) 1.9 – 3.3	13 (3.5) 8.1 – 18	2.1 (0.33) 1.4 – 2.6	12 (3.2) 6.0 – 17
OSWP-3	15 (2.8) 9.8 – 20	140 (28) 89 – 180	11 (2.6) 7.0 – 16	110 (27) 58 – 170
Forage	16 (3.9) 10 – 24	48 (13) 31 – 84	13 (3.8) 7.6 – 25	39 (9.5) 20 – 60
Pollen	8.6 (1.7) 6.2 – 11	16 (1.7) 14 – 20	6.5 (1.6) 4.0 – 9.1	12 (1.6) 8.9 – 15
Grain	4.9 (1.1) 1.6 – 6.5	5.6 (1.3) 1.9 – 7.5	5.0 (0.69) 3.8 – 5.9	5.8 (0.79) 4.5 – 6.8

1. Tejidos tomados en los siguientes estadíos de crecimiento (Ritchie et al., 1997):

a. OSL-1 y OSR-1: V2 – V4 c. OSWP-3: V10 – V12 e. Polen: A polinización

b. OSR5-FR: Dentado temprano d. Forraje: Dentado temprano f. Grano: A madurez fisiológica

2. Media y desviación standard fueron calculadas a través de las localidades (n=15, excepto MON 89034 x MON 88017 OSL-1, n=18 y forraje en todas las líneas, n=30).

3. Mínimos y máximos fueron determinados para cada tejido a través de las localidades.

4. Niveles de Proteínas expresados en microgramos (µg) de proteína por gramo (g) de tejido en base peso fresco (fwt).

5. Niveles de Proteínas expresados en µg/g en base peso seco (dwt). Los valores de peso seco fueron calculados dividiendo el fwt por el factor de conversión de peso seco obtenido de análisis de humedad.

**FUENTE:** Información remitida por el solicitante en el Expediente S01:350313/07

**Niveles de expresión de la proteína Cry2Bb2 en muestras de maíz GM MON 89034 X MON 88017 y maíz GM MON 89034 tomados de ensayos de campo en EEUU durante el año 2005**

Tipo de tejido <sup>1</sup>	MON 89034 x MON 88017		MON 89034	
	Rango <sup>3</sup> Medio (SD) <sup>2</sup> ( $\mu\text{g/g}$ fwt) <sup>4</sup>	Rango Medio (SD) ( $\mu\text{g/g}$ dwt) <sup>5</sup>	Rango Medio (SD) ( $\mu\text{g/g}$ fwt)	Rango Medio (SD) ( $\mu\text{g/g}$ dwt)
OSL-1	27 (9.6) 16 – 43	170 (69) 78 – 280	29 (8.1) 19 – 47	180 (65) 93 – 300
OSR-1	6.0 (2.7) 2.8 – 12	53 (27) 27 – 110	5.9 (1.4) 4.0 – 9.5	53 (16) 31 – 95
OSR5-FR	4.4 (1.4) 2.6 – 7.6	24 (9.3) 12 – 40	4.1 (1.4) 2.3 – 6.6	21 (5.8) 14 – 33
OSWP-3	5.6 (1.7) 3.6 – 8.4	54 (15) 30 – 76	5.8 (1.1) 3.8 – 7.5	55 (12) 35 – 82
Forraje	14 (2.4) 10 – 19	44 (7.4) 30 – 57	12 (3.9) 6.4 – 18	38 (13) 15 – 54
Polen	0.33 (0.053) 0.25 – 0.43	0.62 (0.13) 0.50 – 0.96	0.35 (0.081) 0.22 – 0.47	0.65 (0.087) 0.51 – 0.85
Grano	1.2 (0.23) 0.71 – 1.6	1.3 (0.26) 0.82 – 1.9	1.1 (0.27) 0.71 – 1.6	1.3 (0.31) 0.82 – 1.9

1. Tejidos tomados en los siguientes estadios de crecimiento (Ritchie et al., 1997):

a. OSL-1 y OSR-1: V2 – V4 c. OSWP-3: V10 – V12 e. Polen: A polinización

b.OSR5-FR: Dentado temprano d. Forraje: Dentado temprano f. Grano: A madurez fisiológica

2. Media y desviación standard fueron calculadas a través de las localidades (n=15).

3. Mínimos y máximos fueron determinados para cada tejido a través de las localidades

4. Niveles de Proteínas expresados en microgramos ( $\mu\text{g}$ ) de proteína por gramo (g) de tejido en base peso fresco (fwt).

5. Niveles de Proteínas expresados en  $\mu\text{g/g}$  en base peso seco (dwt). Los valores de peso seco fueron calculados dividiendo el fwt por el factor de conversión de peso seco obtenido de análisis de humedad.

Fuente: Información remitida por el solicitante en el Expediente S01:350313/07

**Niveles de expresión de la proteína Cry3Bb1 en muestras de maíz GM MON 89034 X MON 88017 y maíz GM MON 88017 tomados de ensayos de campo en EEUU durante el año 2005**

Tipo de tejido <sup>1</sup>	MON 89034 x MON 88017		MON 88017	
	Rango <sup>3</sup> Medio (SD) <sup>2</sup> (µg/g fwt) <sup>4</sup>	Rango Medio (SD) (µg/g dwt) <sup>5</sup>	Rango Medio (SD) (µg/g fwt)	Rango Medio (SD) (µg/g dwt)
OSL-1	36 (8.5) 23 – 57	220 (66) 120 – 360	38 (6.9) 26 – 52	230 (56) 150 – 330
OSR-1	23 (7.1) 16 – 42 <sup>6</sup>	200 (83) 120 – 420	18 (5.6) 12 – 35	160 (64) 98 – 350
OSR5-FR	13 (2.6) 9.6 – 17	69 (21) 32 – 110	16 (3.6) 11 – 23	82 (23) 42 – 120
OSWP-3	17 (2.8) 11 – 24	160 (29) 110 – 240	16 (3.6) 6.4 – 21	150 (35) 58 – 210
Forraje	16 (3.0) 12 – 22	50 (9.1) 37 – 70	18 (2.6) 13 – 21	54 (9.5) 35 – 70
Polen	8.0 (1.3) 6.3 – 11	15 (3.4) 11 – 24	6.8 (1.8) 4.3 – 9.7	13 (3.0) 8.9 – 19
Grano	3.5 (2.0) 1.2 – 8.3	4.1 (2.3) 1.3 – 9.7	3.8 (0.71) 2.5 – 5.6	4.4 (0.82) 2.9 – 6.5

1. Tejidos tomados en los siguientes estadios de crecimiento (Ritchie et al., 1997):

a. OSL-1 y OSR-1: V2 – V4 c. OSWP-3: V10 – V12 e. Polen: A polinización

a. OSR5-FR: Dentado temprano d. Forraje: Dentado temprano f. Grano: A madurez fisiológica

2. Media y desviación standard fueron calculadas a través de las localidades (n=15, excepto MON 89034 x MON 88017 OSWP-3 y grano en todas las líneas, n=30).

3. Mínimos y máximos fueron determinados para cada tejido a través de las localidades

4. Niveles de Proteínas expresados en microgramos (µg) de proteína por gramo (g) de tejido en base peso fresco (fwt).

5. Niveles de Proteínas expresados en µg/g en base peso seco (dwt). Los valores de peso seco fueron calculados dividiendo el fwt por el factor de conversión de peso seco obtenido de análisis de humedad.

6. Una muestra de MON 89034 x MON 88017 en la localidad IL-1 estuvo debajo de LOD para raíz. Esta muestra no se incluye en cálculos de promedio ni de rangos.

Fuente: Información remitida por el solicitante en el Expediente S01:350313/07



**Niveles de expresión de la proteína CP4 EPSPS en muestras de maíz GM MON 89034 X MON 88017 y maíz GM MON 88017 tomados de ensayos de campo en EEUU durante el año 2005**

Tipo de tejido <sup>1</sup>	MON 89034 x MON 88017		MON 88017	
	Rango <sup>3</sup> Medio (SD) <sup>2</sup> (µg/g fwt) <sup>4</sup>	Rango Medio (SD) (µg/g dwt) <sup>5</sup>	Rango Medio (SD) (µg/g fwt)	Rango Medio (SD) (µg/g dwt)
OSL-1 <sup>6</sup>	35 (6.6) 23 – 45	200 (32) 150 – 250	31 (3.6) 24 – 35	180 (29) 120 – 220
OSR-1 <sup>7</sup>	8.3 (3.4) 4.9 – 16	75 (38) 36 – 160	6.4 (1.6) 3.9 – 9.4	57 (16) 31 – 86
OSR5-FR	5.5 (1.4) 4.0 – 9.7	30 (11) 14 – 51	4.5 (0.73) 3.5 – 6.3	24 (5.7) 13 – 33
OSWP-3	16 (2.9) 11 – 22	150 (26) 100 – 190	14 (2.3) 7.6 – 17	130 (23) 69 – 160
Forraje	18 (2.1) 14 – 21	55 (8.9) 38 – 69	18 (3.4) 12 – 25	56 (11) 39 – 73
Polen	170 (47) 120 – 270	320 (89) 200 – 550	150 (39) 77 – 220	270 (66) 180 – 400
Grano	3.0 (0.60) 1.9 – 4.1	3.4 (0.68) 2.2 – 4.7	2.8 (0.71) 1.6 – 4.2	3.3 (0.81) 1.8 – 4.8

1. Tejidos tomados en los siguientes estadios de crecimiento (Ritchie et al., 1997):

a. OSL-1 y OSR-1: V2 – V4 c. OSWP-3: V10 – V12 e. Polen: A polinización

b. OSR5-FR: Dentado temprano d. Forraje: Dentado temprano f. Grano: A madurez fisiológica

2. Media y desviación standard fueron calculadas a través de las localidades (n=15, excepto MON 89034 x MON 88017 grano, n=17).

3. Mínimos y máximos fueron determinados para cada tejido a través de las localidades

4. Niveles de Proteínas expresados en microgramos (µg) de proteína por gramo (g) de tejido en base peso fresco (fwt).

5. Niveles de Proteínas expresados en µg/g en base peso seco (dwt). Los valores de peso seco fueron calculados dividiendo el fwt por el factor de conversión de peso seco obtenido de análisis de humedad.

6. Resultados en OSL-1 reportados de cuatro localidades, resultando en n=12.

6. Una muestra de MON 89034 x MON 88017 en la localidad IL-1 estuvo debajo de LOD para raíz. Esta muestra no se incluye en cálculos de promedio ni de rangos.

Fuente: Información remitida por el solicitante en el Expediente S01:350313/07

#### 4. Estabilidad fenotípica y genética

4.1. Los estudios de segregación del maíz GM MON 89034 x MON 88017 muestran que las características fenotípicas que se expresan debido a la introducción de los genes principales segregan de acuerdo a las leyes mendelianas como dos *loci* no ligados.

4.2. En base al conocimiento que se tiene del comportamiento de los parentales y a la información de la que se dispone sobre la acumulación de estos eventos no se espera una diferencia en el comportamiento a campo del maíz conteniendo esta acumulación de eventos con respecto a los parentales y su contraparte no GM, más allá de las características que confieren los genes introducidos. Los mecanismos de acción de cada uno de los genes son independientes por lo tanto no se esperan interacciones entre ellos. La estabilidad de los eventos, los niveles de expresión de las proteínas, la especificidad de las proteínas insecticidas y el comportamiento agronómico de los parentales MON 89034 y MON 88017, no revelan que pueda haber una interacción entre los mecanismos de acción de los dos eventos.

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

5.1. El maíz es reconocido como una planta no patógena, y esta característica no se encuentra alterada en el maíz GM MON 89034 x MON 88017.

5.2. Si bien algunos de los elementos genéticos contenidos en el maíz que contiene la acumulación de eventos MON 89034 y MON 88017 provienen de fitopatógenos (el promotor y la señal de poliadenilación del transcripto 35S del CaMV y la señal de terminación de transcripción del gen *nos* originario de *Agrobacterium tumefaciens*), no se encuentran presentes en dichos eventos los genes que confieren las correspondientes características patogénicas en los organismos de los que provienen, careciendo por lo tanto esta acumulación de eventos de riesgos de patogenicidad producidos por estos elementos.

5.3. No son esperables efectos de toxicidad de las proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry3Bb1 y CP4EPSPS en mamíferos. Estas proteínas son rápidamente degradadas en el fluido gástrico simulado y no presentan identidad de secuencias de aminoácidos con proteínas tóxicas o alergénicas conocidas. Los estudios de toxicidad aguda en ratones muestran ausencia de efectos tóxicos de estas proteínas.

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

Observaciones de las respuestas a factores bióticos y abióticos del maíz GM MON 89034 x MON 88017 en forma comparativa con el maíz isogénico convencional y con maíces híbridos comerciales de referencia mostraron que las características acumuladas en el maíz GM MON 89034 x MON 88017 no alteraron la susceptibilidad a enfermedades y factores abióticos en comparación con el maíz convencional.

Tampoco se observaron efectos adversos sobre los insectos no blanco en los ensayos a campo realizados para tal fin.

## **7. Potencial para producir efectos negativos sobre humanos**

La comparación de las secuencias de aminoácidos de las proteínas nuevas expresadas en el maíz GM MON 89034 x MON 88017, con las secuencias conocidas de proteínas tóxicas o alergénicas, no muestra identidad que permita indicar posibles similitudes con las mismas. Por lo tanto, no son esperables efectos tóxicos o alergénicos producidos por el contacto y/o consumo de materiales vegetales que contienen el maíz GM MON 89034 x MON 88017.

## **8. Composición centesimal del OVG**

La comparación de la composición tanto en forraje como en grano del maíz GM MON 89034 x MON 88017, del MON 89034, del MON 88017, el control de maíz convencional y varios híbridos de referencia sembrados en los ensayos realizados en múltiples áreas geográficas y durante múltiples campañas, indicaron que el forraje y el grano provenientes del maíz GM MON 89034 x MON 88017 son composicionalmente equivalentes al forraje y al grano de los eventos individuales y al proveniente del maíz no GM.

## **9. Recomendación**

En función de las características del evento, se recomienda que se implemente un plan de prevención y manejo de resistencias.