

DOCUMENTO DE DECISIÓN EVALUACIÓN DE RIESGO SOBRE EL AGROECOSISTEMA

Maíz (*Zea mays*) genéticamente modificado (GM) MON-87427-7 x MON-948Ø4-4 x MON-95379-3 x SYN-IR162-4 x MON-88Ø17-3, que contiene la acumulación de los eventos MON-87427-7, MON-948Ø4-4, MON-95379-3, SYN-IR162-4, y MON-88Ø17-3. Presenta baja estatura (conferida por MON-948Ø4-4), tolerancia al herbicida glifosato (conferida por MON-87427-7 y MON-88Ø17-3), protección frente al ataque de ciertos insectos lepidópteros plaga (conferida por MON-95379-3 y SYN-IR162-4) y protección frente al ataque de ciertos insectos coleópteros plaga (conferida por MON-88Ø17-3). La solicitud fue presentada por Monsanto Argentina S.R.L. El presente Documento de Decisión incluye al maíz MON-87427-7 x MON-948Ø4-4 x MON-95379-3 x SYN-IR162-4 x MON-88Ø17-3, y a toda la progenie derivada de los cruzamientos de este material con cualquier maíz no GM.

INTRODUCCIÓN

A partir del análisis de la información presentada por el solicitante y del conocimiento científico disponible, los suscritos, miembros de la Comisión Nacional Asesora de Biotecnología Agropecuaria (CONABIA) y de la Coordinación de Innovación y Biotecnología (ClyB) acuerdan en dar por finalizada la evaluación de riesgo sobre el agroecosistema del maíz genéticamente modificado (GM) MON-87427-7 x MON-948Ø4-4 x MON-95379-3 x SYN-IR162-4 x MON-88Ø17-3.

El maíz GM MON-87427-7 x MON-948Ø4-4 x MON-95379-3 x SYN-IR162-4 x MON-88Ø17-3, que contiene la acumulación de los eventos de transformación MON-87427-7, MON-948Ø4-4, MON-95379-3, SYN-IR162-4 y MON-88Ø17-3, fue obtenido mediante cruzamiento convencional de los parentales que contienen los eventos correspondientes.

Los eventos individuales MON-87427-7, SYN-IR162-4 y MON-88Ø17-3 cuentan con autorización comercial mediante los siguientes actos administrativos RESOL-2018-61-APN-SAYBI#MA, Res. 266/2011, Res. 640/2010 respectivamente.

Cabe mencionar que la acumulación de los eventos MON-87427-7 x MON-88Ø17-3 fue autorizada comercialmente bajo el siguiente acto administrativo, RESOL-2018-61-APN-SAYBI#MA como parte de la acumulación MON-87427-7 x MON-89Ø34-3 x MON-88Ø17-3,

la acumulación de eventos MON-87427-7 x SYN-IR162-4 fue autorizada comercialmente bajo el siguiente acto administrativo, RESOL-2019-103-APN-SAYBI#MPYT como parte de la acumulación MON-87427-7 x MON-89Ø34-3 x SYN-IR162-4 x MON-ØØ603-6.

Los eventos MON-948Ø4-4 y MON-95379-3 cuentan con Documento de Decisión favorable.

El presente Documento de Decisión incluye al maíz MON-87427-7 x MON-948Ø4-4 x MON-95379-3 x SYN-IR162-4 x MON-88Ø17-3 y a toda la progenie derivada de los cruzamientos de este material con cualquier maíz no GM.

I. CARACTERIZACIÓN DEL ORGANISMO VEGETAL GENÉTICAMENTE MODIFICADO (OVGM)

1. Nombre común y científico: Maíz (*Zea mays*)

2. Denominación de la acumulación de eventos: MON-87427-7 x MON-948Ø4-4 x MON-95379-3 x SYN-IR162-4 x MON-88Ø17-3.

3. Fenotipo aportado por las modificaciones genéticas introducidas:

La acumulación de eventos MON-87427-7 x MON-948Ø4-4 x MON-95379-3 x SYN-IR162-4 x MON-88Ø17-3 presenta baja estatura otorgada por el producto de expresión miARN GA20ox_SUP. Además, confiere protección frente a ciertos insectos lepidópteros plaga otorgada por los productos de expresión Cry1Da_7, Cry1B.868 y Vip3Aa20, a ciertos insectos coleópteros plaga otorgada por el producto de expresión Cry3Bb, y tolerancia a herbicidas a base de glifosato otorgada por la proteína CP4 EPSPS.

Las actividades biológicas de todos los productos de expresión se comprobaron oportunamente en instancias del análisis de riesgo de los eventos parentales correspondientes.

3.1. Modo de acción del herbicida

El glifosato inhibe la enzima cloroplástica 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), la cual se encuentra involucrada en la ruta bioquímica del shikimato y compuestos derivados (aminoácidos aromáticos, entre otros). De esta manera, el tratamiento con glifosato priva a las plantas de aminoácidos esenciales y de metabolitos secundarios, como el tetrahidrofolato, la ubiquinona y la vitamina K, necesarios para el crecimiento y su normal desarrollo.

3.2. Mecanismo de acción de los productos de expresión

Los mecanismos de acción de cada uno de los productos de expresión responsables de conferir los fenotipos declarados, fueron analizados durante la evaluación de los eventos individuales, resultando en Documentos de Decisión favorables. A continuación se describen los mecanismos de acción de estos:

CP4 EPSPS confiere tolerancia al herbicida glifosato. Se expresa en los eventos MON-87427-7 y MON-88Ø17-3.

La proteína CP4 EPSPS, aportada por los eventos MON-87427-7 y MON-88Ø17-3, es una enzima homóloga a la EPSPS endógena del maíz (y otras plantas y microorganismos) pero a diferencia de ésta, posee mayor afinidad por su sustrato (fosfoenolpiruvato) que por el herbicida glifosato, permitiendo que la síntesis del corismato y de los aminoácidos aromáticos continúe del mismo modo en que lo haría en ausencia del glifosato, siendo ésta la base para la tolerancia al herbicida.

Mientras que la proteína CP4 EPSPS producida a partir del evento MON-88Ø17-3 se expresa constitutivamente en todos los tejidos de la planta, aquella generada por el evento MON-87427-7 se sintetiza en todo el vegetal a excepción de ciertos tejidos reproductivos masculinos claves para el desarrollo del polen en la planta de maíz. Como consecuencia de este patrón de expresión tejido-selectivo, en el evento individual se observa un fenotipo de androesterilidad al aplicar glifosato en estadios vegetativos tardíos (a partir de V8 y hasta V13). En la acumulación de eventos coexisten las 2 copias del gen *cp4 epsps* con ambos patrones de expresión, por lo que la proteína CP4 EPSPS sintetizada a partir de la copia de expresión constitutiva enmascara la de expresión selectiva de la otra copia. De esta forma, no se manifiesta el fenotipo de androesterilidad al aplicar el herbicida sobre dicha acumulación de eventos.

ARN miARN GA20ox_SUP

La biosíntesis de las giberelinas (GA), una clase de fitohormonas que regulan el crecimiento vegetal, está catalizada por varias enzimas y ocurre en tres etapas que producen GA bioactivos. La principal forma bioactiva en maíz, GA1, controla la elongación de los entrenudos; por lo tanto, una reducción de GA1 disminuye la altura de la planta. La enzima GA20ox es esencial en las últimas etapas de la síntesis de GA bioactivos. En maíz, se identificaron cinco genes *ZmGA20ox* y cuatro genes putativos adicionales, entre los cuales *ZmGA20ox3* y *ZmGA20ox5* presentan mayor expresión en tejidos vegetativos y menor en reproductivos. Estos genes fueron seleccionados para la supresión de expresión en MON-

94804-4, Se desarrolló el cassette de supresión GA20ox_SUP mediado por microARN (miARN) que funciona como ARN de interferencia (ARNi).

El miARN GA20ox_SUP, que tiene 21 nucleótidos (nt) de longitud, es perfectamente complementario a la secuencia del gen ZmGA20ox3 y posee una única diferencia con la secuencia del gen ZmGA20ox5 ubicada por fuera de la región semilla (“*seed-region*”) del sitio de reconocimiento del miARN, por lo que este miARN es capaz de suprimir ambos genes blanco. En cambio, existen múltiples diferencias entre la región de reconocimiento del miARN GA20ox_SUP con los restantes miembros de la familia ZmGA20ox.

Cry1B.868, Cry1Da_7 y Cry3Bb1

Las proteínas **Cry1B.868**, **Cry1Da_7** y **Cry3Bb1** pertenecen a la familia de proteínas Cry de tres dominios y comparten el mismo modo de acción.

La ingestión de las proteínas por insectos blanco expone las mismas a las condiciones alcalinas y a la acción de proteasas presentes en el intestino medio del insecto, lo que resulta en la escisión proteolítica del dominio de protoxina, solubilizando las inclusiones parasporales y convirtiendo la proteína en la toxina insecticida activa. Después de la activación, esta proteína núcleo resistente a la proteasa se compone de tres dominios estructurales distintos que funcionan en un mecanismo gradual de unión a receptores específicos presentes en la membrana, oligomerización en la interfaz de membrana, inserción dentro de la membrana plasmática y formación de poros que conducen a la pérdida de la integridad celular seguida de un retraso en el desarrollo o muerte del insecto.

Vip3Aa20

Vip3Aa20, es una variante de la proteína insecticida Vip3Aa proveniente de *B. thuringiensis* cepa AB88, que confiere protección frente a ciertos insectos Lepidópteros plaga.

Esta proteína se activa en el intestino medio del insecto al ser procesada por enzimas proteolíticas en un entorno alcalino, transformándose en un fragmento tóxico. Este fragmento se une a receptores específicos en el epitelio intestinal del insecto alterando la permeabilidad de la membrana celular epitelial al formar poros, lo que lleva a una pérdida de iones y al desbalance osmótico, provocando la lisis celular y la eventual muerte del insecto.

PMI

La enzima **PMI** (fosfomanosa isomerasa) proveniente de *Escherichia coli* cepa K-12, cataliza la isomerización de manosa-6-fosfato en fructosa-6-fosfato permitiendo utilizar manosa como fuente de carbono alternativa. Así, PMI fue utilizado como marcador de selección durante la transformación.

4. Modificaciones genéticas introducidas

4.1. Método de obtención del OVGM

El maíz MON-87427-7 x MON-948Ø4-4 x MON-95379-3 x SYN-IR162-4 x MON-88Ø17-3 es el resultado del cruzamiento convencional del maíz conteniendo los eventos parentales individuales MON-87427-7, MON-948Ø4-4, MON-95379-3, SYN-IR162-4 y MON-88Ø17-3.

4.2. Secuencias introducidas

La información referente a todos los eventos parentales fue evaluada en instancias del análisis de riesgo sobre el agroecosistema de los eventos individuales, resultando en cada caso en Documentos de Decisión favorables.

5. Métodos de detección

La presencia de cada uno de los eventos parentales puede ser determinada molecularmente mediante PCR utilizando secuencias de oligonucleótidos específicos para cada evento. En este caso, el método se basa en la detección de la presencia simultánea de cada uno de los eventos parentales a partir de ADN extraído de una única muestra biológica.

II. EVALUACIÓN DE RIESGO

1. Productos de expresión de las secuencias introducidas

En el contexto de la evaluación y según consta en el documento de decisión favorable correspondiente a la acumulación MON-87427-7 x MON-948Ø4-4 x MON-95379-3 x SYN-IR162-4 x MON-88Ø17-3, acumulaciones intermedias y eventos individuales, la proteína CP4 EPSPS producida a partir del evento MON-88Ø17-3 se expresa constitutivamente en todos los tejidos de la planta, y la generada por el evento MON-87427-7 se sintetiza en toda la planta a excepción de ciertos tejidos reproductivos masculinos claves para el desarrollo del polen en el maíz .

Para la acumulación de eventos, el nivel de expresión observado de la proteína CP4 EPSPS en grano de polen se corresponde con el observado para el evento MON-88Ø17-3. Para el

resto de los tejidos, el nivel de expresión de la proteína CP4 EPSPS observado, es mayor que para los eventos individuales. Por lo que la proteína CP4 EPSPS sintetizada a partir de la copia de expresión constitutiva enmascara la de expresión selectiva de la otra copia.

Estos resultados confirman que la presencia simultánea de los productos de expresión introducidos en la acumulación de eventos, no modificó los niveles y patrones de expresión de cada uno de ellos respecto de los eventos parentales.

El transcripto de ARN miARN GA20ox_SUP, expresado en el maíz MON-948Ø4-4, no codifica para proteínas heterólogas.

Dado que la acumulación de eventos MON-87427-7 x MON-948Ø4-4 x MON-95379-3 x SYN-IR162-4 x MON-88Ø17-3 ha sido obtenida por cruzamiento convencional, no se espera que los niveles de expresión de las proteínas antes mencionadas difieran de los rangos reportados en los eventos parentales.

2. Análisis de interacción de los productos de expresión

Se analizó la posibilidad de interacción entre las proteínas CP4 EPSPS, Vip3Aa20, PMI, Cry1B.868, Cry3Bb1, Cry1Da_7, miARN GA20ox_SUP presentes en la acumulación de eventos MON-87427-7 x MON-948Ø4-4 x MON-95379-3 x SYN-IR162-4 x MON-88Ø17-3 considerando los mecanismos de acción.

La localización subcelular y el modo de acción de las proteínas que confieren tolerancia a los herbicidas, como la proteína CP4 EPSPS son notablemente diferentes de los de las proteínas que confieren protección contra las plagas de insectos (Cry1B.868, Cry1Da_7, Cry3Bb1 y Vip3Aa20) y, por lo tanto, es muy poco probable que interactúen.

Cabe destacar que las 4 proteínas insecticidas tienen sitios de unión específicos y diferentes entre sí. No existe evidencia que demuestre que las proteínas Cry1B.868, Cry1Da_7, Cry3Bb1 y Vip3Aa20 interactúen y provoquen efectos adversos sobre el agroecosistema.

La ausencia de interacción entre las proteínas CP4 EPSPS, PMI y las proteínas insecticidas Cry1B.868, Cry1Da_7, Cry3Bb1 y Vip3Aa20, ha sido analizada por CONABIA en las evaluaciones de eventos que cuentan con aprobación comercial en Argentina.

Por último, el transcripto de ARN miARN GA20ox_SUP, expresado en el maíz MON-948Ø4-4 no codifica para proteínas heterólogas, por tal motivo no se espera interacción con respecto a las proteínas expresadas por los otros eventos que forman parte de la acumulación.

De lo detallado previamente, se puede inferir que no existe interacción entre los productos de expresión presentes en la acumulación de eventos.

3. Formulación de posibles hipótesis de riesgo sobre el agroecosistema

Cada uno de los eventos parentales y/o acumulaciones de eventos intermedias fueron evaluados en instancia de solicitudes previas concluyendo en todos los casos que:

- a) son estables genética y fenotípicamente a lo largo de las generaciones;
- b) se transfieren a la progenie siguiendo un patrón de herencia mendeliano simple;
- c) no presentan riesgo de transferencia horizontal o intercambio de genes con otros organismos;
- d) expresan productos que carecen de potencial tóxico o alergénico;
- e) no han generado nuevos marcos abiertos de lectura que representen un riesgo para el agroecosistema;
- f) no presentan diferencias biológicamente relevantes en comparación a sus contraparte convencionales salvo por las características introducidas.
- g) no presentan patogenicidad para otros organismos.

En conclusión de estas evaluaciones, la CONABIA emitió Documentos de Decisión favorables para cada uno de los eventos parentales o acumulaciones intermedias.

A su vez, para la presente evaluación de la acumulación de eventos MON-87427-7 x MON-948Ø4-4 x MON-95379-3 x SYN-IR162-4 x MON-88Ø17-3, se formuló la hipótesis de riesgo de posible interacción entre los productos de expresión. De acuerdo a la evaluación de las rutas metabólicas y modos de acción de los productos de expresión CP4 EPSPS, miARN GA20ox_SUP, Cry1Da_7 y Cry1B.868 ,Vip3Aa20, Cry3Bb1 y PMI, se descartó la hipótesis de riesgo.

4. Plan de Manejo de Resistencia de Insectos (PMRI)

De acuerdo a lo establecido en la Resolución N° 49/2021 de la Secretaría de Alimentos, Bioeconomía y Desarrollo Regional del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, el PMRI se deberá presentar para su evaluación por la ClyB y la CONABIA previamente a la inscripción de cultivares de maíz que contengan a la acumulación de los eventos MON-87427-7 x MON-948Ø4-4 x MON-95379-3 x SYN-IR162-4 x MON-88Ø17-3 en el Registro Nacional de Cultivares (RNC) del Instituto Nacional de Semillas (INASE). De acuerdo a lo establecido

en dicha resolución, la inscripción de los mencionados cultivares quedará supeditada a la evaluación favorable del PMRI por parte de la CiyB y la CONABIA.

CONCLUSIÓN

Del análisis de la información presentada en relación a la acumulación de eventos MON-87427-7 x MON-948Ø4-4 x MON-95379-3 x SYN-IR162-4 x MON-88Ø17-3, se evidencia que este maíz GM no presenta nuevos riesgos o riesgos incrementados respecto del cultivo de otros maíces y, por lo tanto, se concluye que su liberación al agroecosistema es tan segura como la de cualquier maíz comercial.

Esta conclusión de la CONABIA es sobre la bioseguridad de la acumulación de eventos MON-87427-7 x MON-948Ø4-4 x MON-95379-3 x SYN-IR162-4 x MON-88Ø17-3 en el agroecosistema, sin perjuicio del cumplimiento de normativas y del buen manejo de la tecnología para la prevención de resistencia en las malezas blanco de los herbicidas vinculados a la tolerancia conferida por la acumulación de eventos.