

DOCUMENTO DE DECISIÓN

EVALUACIÓN DE RIESGO SOBRE EL AGROECOSISTEMA

Maíz (*Zea mays L.*) genéticamente modificado (GM) MON-948Ø4-4, que presenta una reducción de los niveles bioactivos de ácido giberélico/giberelina (GA) en la caña, lo que conduce a una reducción de la longitud del entrenudo y, en consecuencia, a una reducción de la altura total de la planta. La solicitud fue presentada por Monsanto Argentina SRL. El presente Documento de Decisión incluye al maíz GM MON-948Ø4-4, 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 actualmente disponible, los suscritos, personas que integran la Comisión Nacional Asesora de Biotecnología Agropecuaria (CONABIA) y la Coordinación de Innovación y Biotecnología acuerdan en dar por finalizada la evaluación de riesgo para el agroecosistema para la autorización comercial del maíz MON-948Ø4-4.

El presente Documento de Decisión incluye al maíz GM MON-948Ø4-4, y a toda la progenie derivada de los cruzamientos de este material con cualquier maíz no GM.

I. CARACTERIZACIÓN DEL ORGANISMO VEGETAL GENÉTICAMENTE MODIFICADO

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

2. Denominación del evento: MON-948Ø4-4

3. Fenotipo aportado por las modificaciones genéticas introducidas

La acción de las secuencias de ARN generadas a partir del evento MON-948Ø4-4 provocan en el cultivo una reducción de los niveles bioactivos de ácido giberélico/giberelina (GA) en la caña, lo que conduce a una reducción de la longitud del entrenudo y, en consecuencia, a una reducción de la altura total de la planta en comparación con el maíz de control.

3.1 Mecanismo de acción de los productos de expresión

La biosíntesis de GA es catalizada por múltiples enzimas. El proceso se divide en tres etapas que conducen a GA bioactivos. La principal forma bioactiva de GA que controla

la elongación de los entrenudos en el maíz es GA1 y se ha demostrado que una reducción del nivel de GA1 reduce la altura total de la planta.

La enzima GA20ox es clave en los últimos pasos de la ruta de síntesis de GA bioactivos. En maíz se han identificado cinco genes ZmGA20ox más cuatro genes putativos adicionales. De estos nueve genes, ZmGA20ox3 y ZmGA20ox5 mostraron niveles de expresión relativamente más altos en tejidos vegetativos y niveles de expresión más bajos en tejidos reproductivos. Además, comparten una alta homología de secuencia con el gen semi-enano del arroz, OsGA20ox2, conocido como el gen de la “Revolución Verde”. De acuerdo a estas consideraciones fueron seleccionados como genes blanco para la supresión de la expresión génica en el desarrollo de MON-948Ø4-4.

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

El miARN GA20ox_SUP tiene 21 nucleótidos (nt) de longitud y 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.

4. Modificaciones genéticas introducidas

4.1. Método de obtención del OGM vegetal

El maíz MON-948Ø4-4 se obtuvo por transformación mediada por *Agrobacterium* de embriones inmaduros de maíz HCL301 utilizando el vector de transformación PVZMAP527892. Este vector contiene un solo ADN de transferencia (ADN-T), limitado por las regiones de borde derecho e izquierdo. El ADN-T contiene el *cassette* de supresión GA20ox_SUP.

4.2. Secuencias introducidas

Elemento genético	Descripción / Función en el OGM VEGETAL
-------------------	---

Secuencia de la Región Flanqueante 5'	Secuencia de ADN flanqueante al extremo 5' del inserto.
Región del borde izquierdo	Región de ADN que contiene la secuencia del borde izquierdo utilizado para la transferencia del ADN-T.
<i>loxP</i>	Secuencia del sitio de recombinación <i>loxP</i> reconocido por la recombinasa Cre.
<i>RTBV-1</i>	Promotor y líder que dirige la transcripción en células vegetales.
<i>Hsp70</i>	Intrón y secuencia de exón flanqueante del gen <i>hsp70</i> que codifica la proteína de choque térmico 70 (HSP70) que está involucrada en la regulación de la expresión génica.
<i>GA20ox_SUP</i>	Secuencia compuesta por una repetición invertida derivada de la secuencia codificante de los genes <i>GA20ox3</i> y <i>GA20ox5</i> de maíz, flanqueada y separada por tres fragmentos Osa-miR1425 de arroz que juntos forman parte del <i>cassette</i> de supresión.
<i>GST43</i>	3' UTR que se ha desarrollado a partir de múltiples secuencias 3' UTR de maíz que dirige la poliadenilación del ARNm.
Secuencia de la Región Flanqueante 3'	Secuencia de ADN flanqueante al extremo 3' del inserto

4.3. Número de copias, integridad y/o rearrreglos dentro de los insertos y sus regiones flanqueantes

El número de secuencias de ADN insertadas de PV-ZMAP527892 en el genoma del maíz MON-948Ø4-4 (generación F4) se determinó a partir del conjunto de lecturas generadas por secuenciación NGS (Secuenciación de Nueva Generación, siglas en inglés) del ADN genómico del maíz MON-948Ø4-4 y del control, y su posterior comparación con las secuencias del vector de transformación mediante un análisis bioinformático de las secuencias de unión (JSA).

El número de uniones únicas determinadas por este análisis fue de dos uniones para MON-948Ø4-4 (en la generación F4) y de cero uniones para el control sin transformar. Ambas uniones contienen la secuencia del borde del ADN-T unida a la secuencia genómica flanqueante, indicando que representan las secuencias de uniones del inserto de ADN-T y el genoma del maíz.

Considerados en conjunto, la ausencia de secuencias correspondientes al esqueleto del vector de transformación y la presencia de dos secuencias de unión, indican la inserción de una única copia de ADN-T. Ambas uniones se originan en el mismo locus del genoma del maíz MON-948Ø4-4 puesto que están unidos por una secuencia de ADN contigua.

4.4. Regiones flanqueantes a los insertos

El proceso de selección basado en la identificación de caracteres agronómicos deseados y no deseados es una parte integral del proceso de mejoramiento tanto para cultivos convencionales como aquellos modificados por biotecnología moderna, y actúa como un mecanismo para reducir o eliminar plantas y eventos indeseables del proceso de desarrollo.

Asimismo, las observaciones muestran que las plantas de maíz MON-948Ø4-4 no presentaron diferencias inesperadas con respecto al maíz control en relación con las características fenotípicas y la interacción con factores de estrés biótico y abiótico analizadas, con la excepción del cambio intencional de reducción de la altura de la planta. Además, no se observan efectos no intencionales derivados de la transformación genética que representen posibilidad de efecto adverso en el agroecosistema.

Esta respuesta se ampara en la Circular 1/2021 de la Dirección Nacional de Bioeconomía del Ex-Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, “Documento sobre efectos no intencionales de la inserción del transgén o la construcción”.

5. Métodos de detección

El evento de maíz MON-948Ø4-4 puede ser detectado por PCR utilizando semilla, grano, forraje y todo subproducto que contenga ADN de maíz con un mínimo grado de integridad que permita su amplificación.

II. EVALUACIÓN DE RIESGO

1. Estabilidad genética

La estabilidad genética del inserto de ADN-T presente en el evento de maíz MON-948Ø4 fue analizada mediante la técnica de NGS/JSA a lo largo de cinco generaciones.

El alineamiento de las secuencias flanqueantes con las secuencias del inserto obtenidas por secuenciación dirigida, permitió detectar en MON-948Ø4 (en la generación F4) la presencia de un único par conservado de secuencias de unión relacionadas a secuencias de ADN contiguas y esperadas. Dos clases de secuencias de unión idénticas se encontraron en cada una de las cuatro generaciones analizadas, confirmando la inserción de una única copia del ADN-T de PV-ZMAP527892 en un único locus en el genoma del maíz MON-948Ø4; y la consistencia en el mapeo de estas secuencias de unión en todas las generaciones analizadas demuestra que este locus único se mantiene de manera estable durante todo el proceso de mejoramiento del maíz MON 948Ø4-4-4. Estos resultados demuestran que el locus único de integración caracterizado en la generación F4 del maíz MON 948Ø4-4-4 se encuentra en cinco generaciones de cruzamiento, confirmando la estabilidad del inserto.

2. Productos de expresión de las secuencias introducidas

Evento	Elemento genético	Producto de expresión	Fenotipo aportado
MON-948Ø4-4	Cassette de supresión (GA20ox_SUP)	Transcripto de secuencia repetida e invertida (miARN GA20ox_SUP)	Rasgo de baja estatura ocasionado por una reducción de la longitud de los entrenudos, que conduce a una reducción de la altura total de la planta en comparación con el maíz control.

--	--	--	--

3. Análisis del potencial tóxico o alergénico

3.1 Productos de expresión

El transcrito de ARN expresado en el maíz MON 948Ø4-4-4 no codifica para proteínas heterólogas. Los ácidos nucleicos, como el miARN expresado en MON 948Ø4-4-4, son considerados GRAS (del inglés *Generally Recognized as Safe*) por lo que no representan un riesgo alimentario y no hay evidencia que indique que el consumo de ARN en la dieta se encuentre asociado con efectos tóxicos o alergénicos.

3.2. Nuevos péptidos hipotéticos

El análisis de los nuevos péptidos hipotéticos se abordó de la misma manera que el análisis de las secuencias flanqueantes (punto 4.4). Por lo tanto, se responde teniendo en cuenta las consideraciones de la Circular 1/2021 de la Dirección Nacional de Bioeconomía del Ex-Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, “Documento sobre efectos no intencionales de la inserción del transgén o la construcción”.

El proceso de selección basado en la identificación de caracteres agronómicos deseados y no deseados es una parte integral del proceso de mejoramiento tanto para cultivos convencionales como aquellos modificados por biotecnología moderna, y actúa como un mecanismo para reducir o eliminar plantas y eventos indeseables del proceso de desarrollo.

Asimismo, las observaciones muestran que las plantas de maíz MON 948Ø4-4-4 no presentaron diferencias inesperadas con respecto al maíz control en relación con las características fenotípicas y la interacción con factores de estrés biótico y abiótico analizadas, con la excepción del cambio intencional de reducción de la altura de la planta. Además, no se observan efectos no intencionales derivados de la transformación genética que representen posibilidad de efecto adverso en el agroecosistema.

4. Análisis de potenciales efectos adversos sobre el agroecosistema

4.1. Comportamiento agrofenotípico

Se realizaron estudios agrofenotípicos comparativos entre el evento MON-948Ø4-4 y su contraparte convencional. Los datos fueron obtenidos de ensayos a campo realizados durante la campaña 2020 en 8 sitios de la región de producción maicera de los Estados Unidos. Los sitios fueron Shelby, Jefferson, (Iowa); Warren, Shelby, Stark,

(Illinois); Clinton, (Indiana); York, (Nebraska); y Miami, (Ohio) bajo diversas condiciones ambientales. Los parámetros evaluados fueron: recuento inicial de plantas, días a floración, altura de inserción de la espiga, altura de la planta, días a madurez, caída de espigas, vuelco, recuento final de plantas, humedad de grano, peso de 100 semillas (g), rendimiento (t/ha). Además, con el objeto de analizar los resultados en el contexto de la variabilidad natural del cultivo de maíz, el evento MON-948Ø4-4 se comparó con 19 híbridos comerciales de maíz con fondo genético similar utilizados como materiales no GM de referencia.

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el análisis de sitio combinado entre el maíz MON 948Ø4-4 y el control para 6 de las 11 características: recuento inicial de plantas, días a madurez, vuelco, recuento final de plantas, peso de semilla y rendimiento. El maíz MON-948Ø4-4 presentó valores más altos de días a floración días después de la siembra y humedad en comparación con el control. Sin embargo, los valores medios del maíz MON-948Ø4-4 para días a floración y humedad estuvieron dentro de los respectivos rangos de referencia.

Por lo tanto, las diferencias se encuentran dentro de la variabilidad observada para el cultivo de maíz y no representan un riesgo nuevo o incrementado para el agroecosistema. Por lo expuesto, se concluye que el evento MON-948Ø4-4 presenta un comportamiento agro fenotípico similar al de su contraparte convencional y, por lo tanto, no hay evidencias que sugieran la existencia de efectos no intencionales que puedan resultar en un riesgo para el agroecosistema.

4.2. Capacidad de supervivencia, establecimiento y diseminación

Se llevó a cabo un estudio de poder germinativo y dormición sobre las semillas del evento MON-948Ø4-4. El ensayo para cada régimen de temperatura se realizó utilizando un diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones. Se determinaron los valores medios mínimos y máximos para los materiales de referencia que proveen valores representativos para los híbridos de maíz comercial. Se evaluaron las siguientes características: semillas germinadas, muertas, hidratadas firmes y viables y duras viables (AOSA).

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($\alpha = 0.05$) entre el maíz MON-948Ø4-4 y el maíz control convencional en los regímenes de temperatura óptimos (25°C) o subóptimos (10/25°C) para todas las características evaluadas.

Por lo expuesto, se concluye que el evento MON-948Ø4-4 posee un comportamiento equivalente en relación a germinación y dormancia respecto a su contraparte

convencional. Por lo tanto, no se evidencian riesgos nuevos o incrementados para que la planta adquiriera características de maleza.

4.3. Potencial para la transferencia horizontal o intercambio de genes del OGM vegetal con otros organismos

La biología reproductiva del evento MON-948Ø4-4 no es diferente a la del maíz no GM; además, hasta el momento no se han reportado en Argentina especies cultivadas ni silvestres sexualmente compatibles.

A partir de la literatura científica disponible hasta el momento, se sabe que no existen casos de transferencia horizontal de genes desde el maíz hacia microorganismos, vectores virales o insectos y no existen razones para suponer que esta característica haya cambiado en el evento MON-948Ø4-4.

4.4. Patogenicidad para otros organismos

El maíz es reconocido como una especie no patógena para otros organismos, y esta característica no se encuentra alterada en el maíz GM objeto de esta evaluación.

Por otro lado, no hay evidencias de patogenicidad para las personas o los animales de parte de ninguno de los organismos donantes de los elementos genéticos (codificantes y no codificantes) que se encuentran presentes en la construcción utilizada para la obtención del maíz MON-948Ø4-4.

Por todo lo expuesto en el punto 4, no hay evidencias que sugieran la existencia de efectos no intencionales derivados de la expresión de los genes del evento analizado que puedan resultar en un impacto adverso sobre el agroecosistema.

5. Composición centesimal del OGM vegetal

Históricamente, la evaluación de la seguridad de los cultivos derivados de la biotecnología sigue un enfoque de evaluación comparativo en el cual la composición del grano y el forraje de dicho cultivo son comparados con el control apropiado que presenta una historia de uso seguro. A través de los años, publicaciones científicas han documentado la extensa variación en la concentración de nutrientes, antinutrientes y metabolitos secundarios que reflejan la influencia del medioambiente y los factores genéticos, así como los esfuerzos, producto del mejoramiento convencional para incrementar el valor nutritivo, agronómico y el rendimiento de los cultivos. Por otro lado, más de veinte años de análisis composicionales comparativos de cultivos genéticamente modificados como maíz, soja, algodón, canola, trigo, papa, alfalfa,

indican que no se han observado efectos composicionales inesperados resultantes de las modificaciones genéticas introducidas.

Es improbable que la modificación genética y los productos de expresión resultantes tengan efectos biológicamente relevantes en la composición centesimal de MON-948Ø4-4 respecto al maíz convencional y que éstos presenten un riesgo para el agroecosistema.

CONCLUSIÓN

Del análisis de la información presentada en relación al evento MON-948Ø4-4, 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 evaluación de riesgo para el agroecosistema del evento MON-948Ø4-4, sin perjuicio del cumplimiento de otras normativas que correspondan.