

SEGUNDA FASE DE EVALUACIÓN

DOCUMENTO DE DECISIÓN

ANÁLISIS DE RIESGO SOBRE EL AGROECOSISTEMA

Maíz (*Zea mays* ssp. *mays* L) genéticamente modificado (GM) DAS-Ø1131-3, que confiere protección frente a ciertos insectos lepidópteros y tolerancia a glifosato. La solicitud fue presentada por Corteva Agriscience Argentina S.R.L.

A partir del análisis de la información presentada por el solicitante y del conocimiento científico disponible, quienes suscriben, integrantes de la Comisión Nacional Asesora de Biotecnología Agropecuaria (CONABIA) y la Coordinación de Innovación y Biotecnología, acuerdan en dar por finalizado el Análisis de Riesgo (Segunda Fase de Evaluación) del maíz DAS-Ø1131-3.

El presente Documento de Decisión incluye al maíz DAS-Ø1131-3 y a toda la progenie derivada de los cruzamientos de este material con cualquier maíz no GM.

Sección I. CARACTERIZACIÓN DEL ORGANISMO GENÉTICAMENTE MODIFICADO VEGETAL

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

2. Denominación del evento: DAS-Ø1131-3

3. Fenotipo aportado por las modificaciones genéticas introducidas

El evento DAS-Ø1131-3 confiere protección frente a ciertos insectos lepidópteros otorgada por el producto de expresión del gen *Cry1Da2* y tolerancia al herbicida glifosato, otorgada por el producto de expresión del gen *dgt-28 epsps* .

3.1. Mecanismo de acción del producto de expresión

La proteína Cry1Da2 pertenece a la familia de proteínas Cry (cristal) con una estructura de tres dominios completamente conservada que demuestran una toxicidad específica para los insectos. Una vez ingeridos, estos cristales se solubilizan en el intestino medio, las toxinas se activan proteolíticamente y se unen a receptores específicos ubicados en la membrana de la célula intestinal del insecto, lo que conduce a la ruptura de las células y posterior muerte. La superficie epitelial del tracto gastrointestinal de los mamíferos, incluidos los humanos, carecen de receptores específicos de proteínas Cry.

La proteína DGT-28 EPSPS está codificada por el *gen dgt-28 epsps* (5 enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa) derivado de *Streptomyces sviveus*, fusionada con un péptido de tránsito de cloroplastos quimérico, TraP8, de *Brassica napus* y *Brassica rapa*. La enzima DGT-28 EPSPS cataliza la misma reacción específica que otras enzimas EPSPS.

La enzima EPSPS está involucrada en la vía metabólica de síntesis de aminoácidos aromáticos y está comúnmente presente en plantas, hongos y bacterias. La proteína CP4 EPSPS, derivada de *Agrobacterium tumefaciens*, posee una estructura similar y es funcionalmente idéntica a las enzimas EPSPS endógenas de las plantas. Sin embargo, a diferencia de éstas, posee una afinidad reducida por el glifosato, por lo que es capaz de conservar su actividad en presencia del herbicida. De esta forma, ante la aplicación del herbicida, la enzima EPSPS endógena resulta bloqueada pero, la enzima CP4 EPSPS permite que la planta continúe sintetizando aminoácidos aromáticos.

4. Modificaciones genéticas introducidas

4.1. Método de obtención del OGM VEGETAL

El evento DAS-Ø1131-3 ha sido obtenido por transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (cepa DAt13192).

4.2. Secuencias introducidas

A continuación, se detallan los elementos presentes en el inserto según su disposición en el evento DAS-Ø1131-3:

Elemento genético	Descripción / Función en el OGM VEGETAL
Región del plásmido Ti	Secuencia del plásmido Ti tipo octopina de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Secuencia intermedia	Secuencia de ADN utilizada para clonación
attB1 Invitrogen	Sitio de recombinación de la integrasa del bacteriófago <i>lambda</i>
Secuencia intermedia	Secuencia de ADN utilizada para clonación
Promotor ubiZM1	Región promotora del gen <i>ubiquitina 1</i> de <i>Zea mays</i> (Christensen et al., 1992)
ubiZM1 5' UTR	Región no traducida 5' del gen de ubiquitina 1 de <i>Zea mays</i>
Intrón ubiZM1	Región del Intrón región del gen de ubiquitina 1 de <i>Zea mays</i>

Secuencia intermedia	Secuencia de ADN utilizada para clonación
<i>cry1Da2</i>	Gen quimérico compuesto de secuencias del gen <i>cry1Da2</i> que codifica una toxina núcleo insecticida y un derivado del gen <i>cry1ab</i> , ambos derivados de <i>Bacillus thuringiensis</i>
Secuencia intermedia	Secuencia de ADN utilizada para clonación
Terminador ubiZM1	Región del terminador del gen 1 ubiquitina de <i>Zea mays</i>
Secuencia intermedia	Secuencia de ADN utilizada para clonación
attB2	Sitio de recombinación de la integrasa del bacteriófago <i>lambda</i>
Secuencia intermedia	Secuencia de ADN utilizada para clonación
Región 1 ELP1	"Plataforma de aterrizaje (landing pad)" diseñada
ZFN	Sitio de reconocimiento de las nucleasas con dedos de Zinc
ZFN	Sitio de reconocimiento de las nucleasas con dedos de Zinc
ELP1 Región 2	"Plataforma de aterrizaje (landing pad)" diseñada
Secuencia intermedia	Secuencia de ADN utilizada para clonación
ZFN	Sitio de reconocimiento de las nucleasas con dedos de Zinc
Secuencia intermedia	Secuencia de ADN utilizada para clonación
Promotor ubiZM1	Región promotora del gen <i>ubiquitina 1</i> de <i>Zea mays</i>
5' UTR ubiZM1	Región no traducida 5' del gen de <i>ubiquitina 1</i> de <i>Zea mays</i>
Intrón ubiZM1	Región del Intrón región del gen de <i>ubiquitina 1</i> de <i>Zea mays</i>
Secuencia intermedia	Secuencia de ADN utilizada para clonación
<i>dgt-28 epsps</i>	Gen <i>5-enolpyruvylshikimato-3- fosfato sintasa (epsps)</i> derivado de <i>Streptomyces sviveus</i> , fusionado a un péptido de tránsito a cloroplasto quimérico, TraP8, de <i>Brassica napus</i> y <i>Brassica rapa</i>
Secuencia intermedia	Secuencia de ADN utilizada para clonación

Terminador ubiZM1	Región del terminador del gen <i>ubiquitina 1</i> de <i>Zea mays</i>
Secuencia intermedia	Secuencia de ADN utilizada para clonación
ZFN	Sitio de reconocimiento de las nucleasas con dedos de Zinc
Secuencia intermedia	Secuencia de ADN utilizada para clonación

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

La caracterización molecular confirmó que los genes y sus secuencias regulatorias, así como los elementos adicionales detallados anteriormente (Sección I, punto 4.2.), se encuentran formando parte de un único inserto, que consiste en una sola copia de ADN-T. Su inserción e integridad fueron verificadas a través de una secuenciación de nueva generación (NGS, del inglés *Next Generation Sequencing*).

4.4. Regiones flanqueantes a los insertos

La inserción de la construcción podría generar efectos no intencionales, incluyendo la posible interrupción de genes o elementos regulatorios del genoma vegetal y la posible expresión a partir de nuevos marcos de lectura abiertos (ORF). Estos efectos se van descartando durante el proceso de mejoramiento, mediante la selección de los diferentes eventos. La ausencia de efectos no intencionales que pudieran suponer un riesgo para el agroecosistema, finalmente se confirma en los estudios de caracterización agrofenotípica.

Del análisis de riesgo realizado, no se espera que la presencia del inserto tenga consecuencias biológicas adversas para el mencionado cultivo.

5. Métodos de detección

La presencia del evento DAS-Ø1131-3 puede ser determinada experimentalmente de manera específica mediante la técnica molecular de PCR, utilizando secuencias de oligonucleótidos específicos. De esta forma se puede analizar cualquier tipo de muestra que contenga ADN de este maíz GM con un mínimo grado de integridad que permita su amplificación.

Sección II. EVALUACIÓN DE RIESGO

1. Estabilidad genética

Se realizó un análisis de segregación en cinco generaciones de maíz DAS-Ø1131-3 (BC1F1 [B104/PH184C], BC1F1 [B104/PH1V5T], T2, T4 y T6) para confirmar el patrón de herencia mendeliana del ADN insertado.

Los resultados del análisis de segregación multigeneracional demostraron que el ADN insertado segregó como un solo locus de acuerdo con las reglas mendelianas de

herencia para un solo locus genético, lo que indica una integración estable del inserto en el genoma del maíz y un patrón de herencia genética estable a través de las generaciones.

2. Niveles de expresión de las secuencias introducidas

Se evaluaron los niveles de expresión de las proteínas Cry1Da2 y DGT-28 EPSPS en el maíz DAS1131. Se recolectaron muestras de tejido durante la campaña 2020 en seis sitios en las regiones comerciales de cultivo de maíz de los Estados Unidos y Canadá. Se utilizó un diseño de bloques completos al azar con cuatro bloques en cada sitio. Se recolectaron las siguientes muestras de tejido: hoja (etapas de crecimiento V6, V9, R1 y R4), raíz (etapas de crecimiento V9, R1 y R4), polen (etapa de crecimiento R1), tallo (etapa de crecimiento R1), forraje (etapa de crecimiento R4 etapa de crecimiento) y grano (etapa de crecimiento R6). Se determinaron las concentraciones de las proteínas Cry1Da2 y DGT-28 EPSPS utilizando ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas cuantitativos (ELISA).

Para la proteína Cry1Da2, los niveles de expresión se mantuvieron en rangos estadísticamente similares en todos los órganos y estadios evaluados, a excepción del grano, en cuyo caso el nivel de expresión fue significativamente menor.

Para DGT-28 EPSPS los niveles de expresión fueron mayores en hoja durante el estadio reproductivo. En algunas muestras de raíz y polen los niveles de expresión quedaron por debajo del límite de detección.

3. Análisis del potencial tóxico o alergénico

3.1. Productos de expresión:

Se aplicó un enfoque de peso de la evidencia para determinar el potencial alergénico y tóxico de la proteína Cry1Da2 expresada en maíz DAS1131, incluida una evaluación de lo siguiente: una comparación bioinformática de la secuencia de aminoácidos de la proteína Cry1Da2 con alérgenos proteicos conocidos o putativos y secuencias de toxinas. Se llevó a cabo una evaluación bioinformática de la secuencia de la proteína Cry1Da2 para detectar potenciales reactividades cruzadas con alérgenos conocidos o putativos de acuerdo con las directrices pertinentes. Se realizaron dos búsquedas independientes de la secuencia de la proteína Cry1Da2 utilizando la base de datos Comprehensive Protein Allergen Resource (COMPARE) 2021 (enero de 2021) disponible en <http://comparedatabase.org>. La búsqueda se realizó utilizando parámetros predeterminados, excepto que el umbral de puntuación E se estableció en 10^{-4} . Los resultados de la búsqueda de la secuencia de la proteína Cry1Da2 en la base de datos indicaron que no se encontraron alineaciones de 80 residuos o más con una identidad de secuencia superior al 35%. En la segunda búsqueda no se identificaron coincidencias de 8 residuos contiguos entre la secuencia de la proteína Cry1Da2 y las

secuencias de alérgenos. En conjunto, estos datos indican que no surgió ningún indicio de alergenicidad a partir de la evaluación bioinformática de la proteína Cry1Da2.

Se evaluó la toxicidad potencial de la proteína Cry1Da2 comparando su secuencia con las secuencias de una base de datos interna de toxinas. La base de datos interna de toxinas es un subconjunto de secuencias que se encuentran en UniProtKB/Swiss-Prot (<https://www.uniprot.org/>). La búsqueda entre la secuencia de proteína Cry1Da2 y las secuencias de proteína en la base de datos interna de toxinas se realizó con BLASTP. No se devolvieron alineaciones con un valor $E \leq 10^{-4}$ entre la secuencia de proteína Cry1Da2 y ninguna secuencia de proteína en la base de datos interna de toxinas. Por lo tanto, no surgió ningún indicio de toxicidad a partir de la evaluación bioinformática de la proteína Cry1Da2.

Se aplicó un enfoque de peso de la evidencia para determinar el potencial alergénico y tóxico de la proteína DGT-28 EPSPS expresada en maíz DAS1131. Se llevó a cabo una evaluación bioinformática de la secuencia de la proteína DGT-28 EPSPS para la posible reactividad cruzada con alérgenos conocidos o supuestos de acuerdo con las directrices pertinentes. Se realizaron dos búsquedas separadas de la secuencia de la proteína DGT-28 EPSPS utilizando la base de datos Comprehensive Protein Allergen Resource (COMPARE) 2021 disponible en <http://comparedatabase.org>. La primera búsqueda utilizó la secuencia de proteína DGT-28 EPSPS como consulta en una búsqueda FASTA v35.4.4 contra las secuencias de alérgenos. La búsqueda se realizó utilizando parámetros predeterminados, excepto que el umbral de puntuación E se estableció en 10^{-4} . La segunda búsqueda utilizó el programa FUZZPRO (Emboss Package v6.4.0) para identificar cualquier coincidencia idéntica de 8 residuos contiguos entre la secuencia de la proteína DGT-28 EPSPS y las secuencias de alérgenos. Los resultados de la búsqueda de la secuencia de la proteína DGT-28 EPSPS en la base de datos COMPARE de alérgenos conocidos y putativos no encontraron alineaciones de 80 residuos o más con una identidad de secuencia superior al 35%. En la segunda búsqueda no se identificaron coincidencias de 8 residuos contiguos entre la secuencia de la proteína DGT-28 EPSPS y las secuencias de alérgenos. En conjunto, estos datos indican que no surgió ningún indicio de alergenicidad a partir de la evaluación bioinformática de la proteína DGT-28 EPSPS.

Se evaluó la toxicidad potencial de la proteína 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (DGT-28 EPSPS) comparando su secuencia con las secuencias en una base de datos interna de toxinas UniProtKB/Swiss-Prot (<https://www.uniprot.org/>). La búsqueda realizada con BLASTP utilizando parámetros predeterminados, no arrojó alineaciones con un valor $E \leq 10^{-4}$ entre la secuencia de proteína DGT-28 EPSPS y ninguna secuencia de proteína en la base de datos interna de toxinas. Por lo tanto, no surgieron indicios de toxicidad a partir de la evaluación bioinformática de la proteína DGT-28 EPSPS.

3.2. Nuevos péptidos hipotéticos

Durante el proceso de obtención del OGM vegetal se podrían generar efectos no intencionales debidos a la inserción, incluyendo la aparición de péptidos hipotéticos. Sin embargo, los efectos no intencionales son descartados durante el proceso de análisis y selección de los diferentes eventos que se realiza tanto a campo, como en invernáculo o laboratorio

La ausencia de efectos no intencionales en el evento DAS1131 que pudieran suponer un riesgo para el agroecosistema, finalmente fue confirmada en los estudios de caracterización agrofenotípica, en los que se analizaron diversos parámetros, como poder germinativo, dormancia de semillas, fenología, fenotipo, comportamiento frente a estreses bióticos y abióticos, determinados en múltiples sitios distribuidos en una amplia variabilidad de condiciones agroclimáticas.

4. Composición centesimal del OGM vegetal

Se realizaron estudios composicionales comparativos a partir de muestras de grano (etapa de crecimiento R6) y forraje (etapa de crecimiento R4) del evento DAS-Ø1131-3 y de su contraparte convencional, obtenidas de ensayos a campo realizados en Estados Unidos y Canadá durante la campaña de 2020. En el mismo se midieron 79 componentes diferentes. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el maíz DAS-Ø1131-3 y el maíz control para 65 de los 72 analitos que fueron analizados a través de los sitios mediante análisis de modelo mixto o prueba exacta de Fisher. Se observó una diferencia estadísticamente significativa, antes del ajuste de FDR, en el análisis a través de sitios entre el maíz DAS-Ø1131-3 y el maíz control para siete analitos (proteína cruda [forraje], carbohidratos [forraje], ácido esteárico [C18:0], manganeso, zinc, calcio e inositol). Todos los valores individuales para estos analitos estuvieron dentro del intervalo de tolerancia, el rango de la literatura y/o el rango de referencia del estudio, lo que indica que el maíz DAS-Ø1131-3 está dentro del rango de variación biológica para estos analitos y las diferencias estadísticas encontradas no son biológicamente significativas. Por lo tanto, se concluye que es improbable que la modificación genética y los productos de expresión resultantes tengan efectos biológicamente relevantes en la composición centesimal de DAS-Ø1131-3 respecto al maíz convencional y que éstos presenten un riesgo para el agroecosistema.

5. Análisis de potenciales efectos adversos sobre el agroecosistema

5.1. Comportamiento agrofenotípico

Se realizaron estudios agrofenotípicos comparativos entre el evento DAS-Ø1131-3 y su contraparte convencional en doce sitios de regiones productoras de maíz representativas del cultivo comercial en Estados Unidos y Canadá durante la campaña de 2020. Se utilizó un

diseño de bloques completos al azar con cuatro bloques en cada sitio. Cada bloque incluyó maíz DAS-Ø1131-3, maíz control isohíbrido convencional y cuatro híbridos de referencia de maíz comercial convencional.

Los parámetros evaluados fueron: stand inicial de plantas (recuento/m²), días a la floración, viabilidad del polen (forma y color a los 0, 30, 60 y 120 minutos)(% de polen con paredes colapsadas), altura de la planta (cm), días a madurez (cm), vuelco (%), stand final de plantas (número/m²), mazorcas caídas (n), rendimiento (bushels/acre), humedad del grano cosechado (%) y peso de 100 granos (g) y evaluaciones de factores bióticos y abióticos.

Se realizó un análisis estadístico interlocalidades (en el que se contempló la interacción genotipo x ambiente para cada una de las variables) y un análisis intralocalidades en comparación con la contraparte no GM. Los valores medios de los parámetros se ubicaron dentro del rango (min-max) de las variedades de referencia y los intervalos de tolerancia. Basado en la evaluación comparativa, el comportamiento agronómico del maíz DAS-Ø1131-3 es similar al de las variedades de referencia no GM.

Por lo expuesto, se concluye que el evento DAS-Ø1131-3 presenta un comportamiento agrofototípico esperado para el cultivo de maíz y no hay evidencias que sugieran que existen efectos no intencionales que puedan resultar en un riesgo para el agroecosistema.

5.2. Capacidad de supervivencia, establecimiento y diseminación

Se llevó a cabo un estudio de poder germinativo y dormición sobre las semillas del evento DAS-Ø1131-3 utilizando el protocolo de la Asociación de Analistas Oficiales de Semillas (AOSA, 2021). Para la prueba de germinación en condiciones cálidas, los rollos fueron transferidos a un ambiente con luz controlada durante 24 horas con una temperatura continua de 25°C y 100% de humedad relativa durante 7 días (ISTA, 2021). Para la prueba de germinación en frío, los rollos fueron transferidos a un ambiente con luz controlada durante 24 horas a una temperatura continua de 10°C y 100% de humedad relativa durante 7 días, seguido de 5 días a una temperatura continua de 25°C y 100% de humedad relativa (ISU Seed Laboratory, 2021). Al final de cada prueba de germinación, se evaluaron las réplicas y se clasificó cada semilla como germinada (normal o anormal) o no germinadas (dura, viva o muerta). Las semillas germinadas fueron consideradas viables. Las semillas no germinadas fueron evaluadas para determinar su viabilidad usando una prueba subjetiva de cloruro de tetrazolio de color (TZ) (AOSA/SCST, 2010).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para los parámetros evaluados entre el evento DAS-Ø1131-3 y su contraparte convencional.

En base a la información analizada, se concluye que el evento DAS-Ø1131-3 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.

5.3. Organismos no blanco

La evaluación de posibles efectos adversos de la proteína Cry1Da2 sobre organismos no blanco pertenecientes a distintos grupos funcionales relevantes para el agroecosistema local, fue realizada en el contexto del análisis de riesgo para la liberación al agroecosistema del evento DAS-Ø1131-3. Se utilizaron como referencia ensayos de laboratorio en los cuales las especies sustitutas fueron expuestas a distintas concentraciones de proteína Cry1Da2. Las mismas fueron: abejas melíferas adultas y larvas (*Apis mellifera*) como polinizador, collembola (*Folsomia candida*) como organismo del suelo, crisopa verde (*Chrysoperla rufilabris*), mariquita rosada (*Coleomegilla maculata*) e himenópteros parásitos (*Pediobius foveolatus*) como organismos depredadores y parasitoides, codorniz cotuí nortea (*Colinus virginianus*) como ave insectívora y ratones (*Mus musculus*) como mamífero granívoro. Sus resultados confirmaron la ausencia de efectos adversos de la proteína Cry1Da2 sobre organismos que cumplen diferentes servicios ecosistémicos.

Tomando como sustento la información presentada, no se identificaron nuevas hipótesis de riesgo asociadas a los organismos que se hallan presentes en el agroecosistema local.

6. Manejo de Resistencia de Insectos (PMRI)

Debido a la característica introducida y en cumplimiento de la Res. 49/21, el solicitante deberá presentar un Plan de Manejo de Resistencia de Insectos para su evaluación por la Coordinación de Innovación y Biotecnología (ClyB) y la CONABIA previamente a la inscripción de cultivares de maíz que contengan al evento DAS-Ø1131-3 en el Registro Nacional de Cultivares (RNC) del Instituto Nacional de Semillas (INASE). La inscripción de los mencionados cultivares quedará supeditada a la evaluación favorable del PMR por parte de la ClyB y la CONABIA.

CONCLUSIÓN

Del análisis de la información presentada en relación al evento DAS-Ø1131-3, se evidencia que este maíz GM no presenta nuevos riesgos o riesgos incrementados respecto del cultivo convencional y, por lo tanto, se concluye que su liberación al agroecosistema es tan segura como la de cualquier maíz convencional.

Esta conclusión de la CONABIA es sobre la bioseguridad del evento DAS-Ø1131-3, 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.