

SEGUNDA FASE DE EVALUACIÓN DOCUMENTO DE DECISIÓN

Algodoneros genéticamente modificados MON-88913-8, MON-15985-7 y MON-15985-7 x MON-88913-8. Este último contiene la acumulación de los eventos MON-88913-8 y MON-15985-7. El evento MON-88913-8 confiere tolerancia a glifosato, mientras que el evento MON-15985-7 confiere resistencia a ciertos insectos pertenecientes al orden Lepidoptera detallados en el presente documento. Este Documento de Decisión incluye a los algodoneos GM MON-88913-8, MON-15985-7, MON-15985-7 x MON-88913-8 y a toda la progenie derivada de los cruzamientos de estos materiales con cualquier *Gossypium hirsutum* no modificado genéticamente. La solicitud fue presentada por la empresa Monsanto Argentina S.R.L.

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 finalizada la Segunda Fase de Evaluación de los algodoneos MON-88913-8, MON-15985-7 y MON-15985-7 x MON-88913-8, concluyendo que los riesgos derivados de la liberación de estos organismos vegetales genéticamente modificados (OVGM) al agroecosistema, en cultivo a gran escala, no difieren significativamente de los inherentes al cultivo de algodón no GM.

El evento MON-15985-7 es producto de la retransformación del evento MON-ØØ531-6 (aprobado anteriormente mediante resolución ex -SAGPyA N° 428/98), mientras que el evento MON-88913-8 fue obtenido por transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

El algodón MON-15985-7 x MON-88913-8 que contiene la acumulación de los eventos de transformación individualmente denominados MON-15985-7 y MON-88913-8, fue obtenido mediante cruzamiento convencional de los parentales conteniendo los eventos de transformación en forma separada.

Los algodoneos GM MON-88913-8, MON-15985-7 y MON-15985-7 x MON-88913-8 han sido ensayados a campo en Argentina desde 2009. Para tal fin fueron evaluadas por la

CONABIA OCHO (8) solicitudes de permisos respectivamente, para experimentación y/o liberación confinada al agroecosistema para los eventos individuales MON-88913-8 y MON-15985-7 y SIETE (7) solicitudes de permiso para MON-15985-7 x MON-88913-8, las que han cumplido con la normativa vigente para los OVGM, y han sido autorizados por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca del ex MAGyP y por la Secretaría de Agregado de Valor del MINISTERIO DE AGROINDUSTRIA.

El presente Documento de Decisión incluye a los algodoneiros GM MON-88913-8, MON-15985-7, MON-15985-7 x MON-88913-8 y a toda la progenie derivada de los cruzamientos de estos materiales con cualquier algodoneiro no GM obtenido en forma convencional.

I. ORGANISMO VEGETAL GENÉTICAMENTE MODIFICADO (OVGM)

1. Nombres común y científico: Algodonero (*Gossypium hirsutum*)

2. Denominación de los eventos:

- **MON-88913-8**
- **MON-15985-7**
- **MON-15985-7 x MON-88913-8**

3. Fenotipo aportado por las modificaciones genéticas introducidas

Evento MON-88913-8

El evento MON-88913-8 contiene el gen *cp4 epsps* originario de *Agrobacterium sp*, cuya expresión le confiere tolerancia a herbicidas a base de glifosato.

La actividad de la proteína CP4 EPSPS se comprobó en un ensayo de dosis-respuesta a la aplicación de glifosato. Este se llevó a cabo en invernadero y consistió en la comparación del nivel de daño entre el evento MON-88913-8 y su contraparte convencional. Asimismo, la característica de tolerancia, también quedó evidenciada en el estudio de composición centesimal (sección II 4.) y de comportamiento agrofenotípico llevado a cabo en Brasil (sección II 5.1.) en donde se realizaron aplicaciones del herbicida mencionado.

Evento MON-15985-7

El evento MON-15985-7 contiene los genes *cry1Ac*, *cry2Ab2*, cuya expresión le confiere resistencia a lepidópteros. Ensayos de laboratorio demostraron la actividad insecticida de las proteínas Cry1Ac y Cry2Ab2 sobre especies de lepidópteros blanco (sección I, 3.2.).

Evento MON-15985-7 x MON-88913-8

El algodón MON-15985-7 x MON-88913-8 es el resultado del cruzamiento convencional de variedades de algodón GM conteniendo los eventos individuales MON-15985-7 y MON-88913-8. Esta acumulación de eventos confiere al algodón tolerancia a herbicidas a base de glifosato (proteína CP4 EPSPS, del evento MON-88913-8) y a ciertos lepidópteros (proteínas Cry1Ac y Cry2Ab2, evento MON-15985-7).

3.1. Descripción del herbicida

El glifosato es un herbicida sistémico de amplio espectro para áreas cultivadas y no cultivadas y no residual. Actúa inhibiendo la enzima cloroplástica 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), la cual se encuentra involucrada en la ruta bioquímica del corismato y compuestos derivados (aminoácidos aromáticos, entre otros). De esta manera, el tratamiento con glifosato priva a las malezas de aminoácidos esenciales y de metabolitos secundarios, como el tetrahidrofolato, la ubiquinona y la vitamina K, necesarios para el crecimiento y normal desarrollo de la planta.

3.2. Especies blanco de las proteínas insecticidas y características de las mismas.

- *Alabama argillacea* (Lepidoptera: Noctuidae)

Es una plaga específica del algodón, comúnmente conocida como “oruga de la hoja”. Es una especie que no inverna en nuestro país, sino que migra desde zonas tropicales. Las larvas se alimentan de las hojas dejando solamente las nervaduras, pueden llegar a comer también brotes y tallos tiernos. Cuando el ataque se da al inicio de apertura de los capullos, provoca la maduración forzada de las cápsulas, afectando la calidad y el

peso. Del costo total de producción del algodón, el control de oruga de la hoja insume el 40%.

- *Helicoverpa gelotopoeon* y *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae)

Conforman el complejo de orugas capulleras. Son especies polífagas que se presentan en el algodón tanto en etapas tempranas como intermedias. Los adultos colocan los huevos individualmente en brotes terminales y en el tercio superior de la planta. El daño en el cultivo es producido por las larvas, se alimentan de hojas tiernas, botones florales y pequeñas cápsulas, en las que hacen un orificio y se introducen allí dentro. El período crítico para el control comprende desde el surgimiento de botones florales hasta la aparición del primer capullo.

- *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera: Gelechiidae)

Es una plaga específica del algodón y la de mayor importancia en la etapa final del mismo. En Argentina tiene entre 5 a 6 generaciones anuales. El período crítico para el control abarca desde la aparición de la primera cápsula hasta la aparición del primer capullo. Las larvas atacan los frutos y hacen túneles a través de la semilla y la fibra en desarrollo, provocando que éstos caigan o no alcancen a madurar. Consecuentemente, se observa disminución en el rendimiento, destrucción de la semilla, disminución de la calidad comercial e industrial y limitación del período de desarrollo del cultivo.

- *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

Es conocida comúnmente como "oruga militar tardía". En este cultivo es considerada una plaga esporádica, pero de potencial impacto económico. Las larvas pueden provocar daño como cortadora (cortando la planta por debajo de los cotiledones al poco tiempo que la misma germina), como defoliadora (alimentándose de brotes y tallos tiernos) y como capullera (dañando los órganos fructíferos).

3.3. Mecanismo de acción de los productos de expresión.

Evento MON-88913-8

La proteína CP4 EPSPS, aportada por el evento MON-88913-8, es una enzima homóloga a la EPSPS endógena de algodón (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.

Evento MON-15985-7

Las proteínas Cry1Ac y Cry2Ab2 son toxinas con actividad insecticida que provienen de *Bacillus thuringiensis* y actúan sobre ciertas especies del orden Lepidoptera.

Las proteínas Cry se almacenan como cristales parasporales durante la formación de la espora.

Una característica importante de estas proteínas es que son inocuas para vertebrados. Su modo de acción depende del reconocimiento de la proteína por receptores altamente específicos presentes en la microvellosidad de las células intestinales de los insectos blanco. Posteriormente, dichas proteínas se insertan en la membrana formando un poro lítico que lleva al insecto a la muerte. Se ha demostrado que el espectro de actividad de las proteínas Cry1Ac y Cry2Ab2 se encuentra acotado al orden Lepidoptera.

4. Modificaciones genéticas introducidas:

4.1. Método de obtención del OVG

Evento MON-88913-8

El evento MON-88913-8 fue obtenido por transformación mediada por *A. tumefaciens*.

Evento MON-15985-7

El evento MON-15985-7 fue generado a través de una retransformación mediada por biobalística de tejidos meristemáticos del evento comercial MON-ØØ531-6.

Evento MON-15985-7 x MON-88913-8

El evento MON-15985-7 x MON-88913-8 fue obtenido por cruzamiento convencional de los eventos parentales MON-15985-7 y MON-88913-8.

4.2. Secuencias introducidas en el evento.

Evento MON-88913-8

A continuación se detallan las secuencias introducidas en el evento MON-88913-8 como se encontraban originalmente en el plásmido PV-GHGT35.

Elemento Genético	Descripción	Función
Borde derecho	Borde derecho del plásmido Ti de <i>A. tumefaciens</i> .	Secuencia requerida para la transferencia del ADN-T al genoma de la célula vegetal.
P-FMV/TSF1	1) P-FMV: secuencia potenciadora del promotor 35S del virus del mosaico de la escrofularia. 2) TSF1: promotor del gen <i>tsf1</i> de <i>A. thaliana</i> (que codifica para el factor EF-1 α).	Promotor quimérico que regula la expresión del gen <i>cp4 epsps</i> en forma constitutiva en plantas.
L-TSF1	Líder (exón 1) del gen <i>tsf1</i> de <i>A. thaliana</i> que codifica para el factor de elongación EF-1 α .	Secuencia líder para el casete <i>cp4 epsps</i> .
I-TSF1	Intrón del gen <i>tsf1</i> de <i>A. thaliana</i> que codifica para el factor de elongación EF-1 α .	Secuencia no codificante para el casete <i>cp4 epsps</i> .
TS-ctp2	Intrón del gen <i>tsf1</i> de <i>A. thaliana</i> que codifica para el factor de elongación EF-1 α .	Dirige la proteína CP4 EPSPS al cloroplasto.
CR-<i>cp4 epsps</i>	Secuencia codificante del péptido de tránsito al cloroplasto del gen <i>epsps</i> de <i>A. thaliana</i> .	Dirige la proteína EPSPS al cloroplasto, el lugar de síntesis de los aminoácidos aromáticos.
T-E9	Secuencia de ADN derivada de <i>P. sativum</i> que contiene la región 3' no traducible del gen <i>e9</i> codificante de la subunidad pequeña de la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa (<i>rbc</i>).	Región 3' no traducible que regula la terminación de la transcripción y contiene señales de poliadenilación.

P-35S/ACT8	1)P-35S: Promotor 35S del virus del mosaico del coliflor (CaMV). 2) ACT8: promotor del gen <i>act8</i> de <i>A. thaliana</i> .	Promotor quimérico que regula la expresión del gen <i>cp4 epsps</i> en forma constitutiva en plantas.
L-ACT8	Secuencia líder del gen <i>act8</i> de <i>A. thaliana</i> .	Secuencia líder para el casete <i>cp4 epsps</i> .
I-ACT8	Intrón y secuencia flanqueante al exón del gen <i>act8</i> de <i>A. thaliana</i>	Secuencia no codificante para el casete <i>cp4 epsps</i> .
TS-<i>ctp2</i>	Secuencia codificante del péptido de tránsito al cloroplasto del gen <i>epsps</i> de <i>A. thaliana</i>	Dirige la proteína CP4 EPSPS al cloroplasto, el lugar de síntesis de los aminoácidos aromáticos.
CR-<i>cp4 epsps</i>	Secuencia codificante de la proteína CP4 EPSPS de <i>Agrobacterium sp.</i> cepa CP4.	Su producto de expresión, la proteína CP4 EPSPS, confiere a la planta tolerancia a glifosato.
T-E9	Secuencia de ADN derivada de <i>P. sativum</i> que contiene la región 3' no traducible del gen <i>e9</i> codificante de la subunidad pequeña de la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa (<i>rbc</i>).	Región 3' no traducible que regula la terminación de la transcripción y obtiene señales de poliadenilación.
Borde izquierdo	Borde izquierdo del plásmido Ti de <i>A. tumefaciens</i> .	Secuencia requerida para la transferencia del ADN-T al genoma de la célula vegetal.

Evento MON-15985-7

La información referente al evento MON-ØØ531-6 que forma parte del evento MON-15985-7 ya fue evaluada oportunamente en instancias de la solicitud de liberación comercial del evento individual, resultando en un Documento de Decisión favorable.

A continuación, se detallan solo las nuevas secuencias introducidas en el evento MON-15985-7 como se encontraban originalmente en el plásmido PV-GHBK11.

Elemento Genético	Descripción	Función
P-e35S	Promotor 35S del virus del mosaico del coliflor (CaMV).	Promotor (constitutivo en planta) con la región del potenciador duplicada para dirigir la expresión del gen <i>iudA</i>
<i>uidA</i>	Secuencia del gen <i>uidA</i> del plásmido pUC19 de <i>E.coli</i> que codifica para la proteína β -D-glucuronidasa (GUS).	Produce una coloración azul sobre tejidos transformados tratados con el sustrato para la enzima codificada por este gen (β -glucuronidasa), permitiendo su selección visual.
NOS 3'	Secuencia 3' no traducible del gen <i>nos</i> (nopalina sintasa) de <i>A. tumefaciens</i> .	Secuencia 3' no traducible que finaliza la transcripción y dirige la poliadenilación para el gen <i>uidA</i> .
P-e35S	Promotor 35S del virus del mosaico del coliflor (CaMV).	Promotor (constitutivo en planta) con la región del potenciador duplicada, que dirige la expresión del gen <i>cry2Ab2</i> .
PetHSP70-leader	Secuencia líder no traducible de la proteína de shock térmico 70 S' de <i>Petunia sp.</i>	Secuencia líder no traducible para el casete con el gen <i>cry2Ab2</i> .
AEPSPS/CTP2	Región N-terminal del péptido de tránsito al cloroplasto del gen <i>epsps</i> de <i>A. thaliana</i> .	Dirige la proteína Cry2Ab2 al cloroplasto.
<i>cry2Ab2</i>	Secuencia sintética del gen <i>cry2Ab2</i> basada en la secuencia original de <i>B. thuringiensis</i> .	Su producto de expresión, la proteína Cry2Ab2, confiere a la planta resistencia frente a lepidópteros.
NOS 3'	Secuencia 3' no traducible del gen <i>nos</i> (nopalina sintasa) de <i>A. tumefaciens</i> .	Secuencia 3' no traducible que finaliza la transcripción y dirige la poliadenilación para el gen <i>cry2Ab2</i> .

4.3. Número de copias, integridad y/o rearrreglos dentro del inserto.

Evento MON-88913-8

Los genes y sus secuencias regulatorias, así como los elementos adicionales detallados en el punto 4.2.1, se encuentran formando parte de un único inserto, el cual se comporta como un locus único. El análisis molecular confirmó que hay una única copia cuya

integridad fue verificada mediante secuenciación de Sanger y *Southern blot*. Se confirmó además, la ausencia de secuencias estructurales del vector que no debían transferirse en el genoma del evento MON-88913-8.

Evento MON-15985-7

Los genes y sus secuencias regulatorias, así como los elementos adicionales detallados en el punto 4.2.2 (pertenecientes al casete *cry2Ab2*) se encuentran formando parte de un único inserto, el cual se comporta como un locus único e independiente del inserto (casete *cry1Ac*) presente en el evento original MON-ØØ531-6, aquí retransformado. El análisis molecular confirmó que el nuevo inserto contiene una sola copia del casete *cry2Ab2*. Su integridad fue analizada mediante los métodos de *Southern blot* y Sanger, identificándose una delección de 66 pb en el extremo 3' que no afecta su funcionalidad.

Por otro lado, se confirmó la ausencia de secuencias no deseadas del vector en el genoma del evento MON-15985-7.

Evento MON-15985-7 x MON-88913-8

Se demostró por medio de análisis de *Southern blot* que durante la obtención del evento acumulado por cruzamiento convencional los insertos provenientes de los eventos parentales se mantuvieron íntegros y conservaron su locus en el genoma.

4.4. Regiones flanqueantes a los insertos

Evento MON-88913-8

Las regiones flanqueantes fueron determinadas mediante la técnica de PCR (del inglés Polymerase Chain Reaction) seguida de secuenciación y análisis bioinformático. La comparación de las secuencias flanqueantes obtenidas contra la base de datos del genoma de algodón convencional, permitió determinar que la inserción del evento MON-88913-8 se produjo en el cromosoma D07.

Asimismo, se identificó una delección de 18pb en el sitio de inserción como consecuencia del proceso de integración del ADN-T.

Por otro lado, no se encontraron evidencias de interrupción de secuencias codificantes de genes funcionales endógenos ni de ORFs luego de la transformación del evento.

Evento MON-15985-7

Las regiones flanqueantes del nuevo inserto fueron determinadas mediante la técnica de PCR seguida de secuenciación y análisis bioinformático. La comparación de estas secuencias contra la base de datos del genoma de algodón convencional, permitió determinar que la nueva inserción del evento MON-15985-7 se produjo en el cromosoma A09.

Por otro lado, no se encontraron evidencias de interrupción de secuencias codificantes de genes funcionales endógenos ni de ORFs luego de la transformación del evento.

Evento MON-15985-7 x MON-88913-8

Dado que el evento acumulado se obtuvo mediante cruzamiento convencional y que los insertos provenientes de los eventos parentales se mantuvieron íntegros y conservaron su locus en el genoma, no se espera que las regiones flanqueantes hayan cambiado en el evento acumulado.

5. Detección del evento.

La presencia de cada uno de los eventos puede ser determinada experimentalmente mediante la técnica de PCR, utilizando oligos específicos para cada evento, a partir de una muestra que contenga ADN de algodón con un mínimo grado de integridad que permita su amplificación.

En particular, para el caso del evento MON-15985-7, la detección se basa en determinar la presencia simultánea de los insertos correspondientes a los casetes *cry1Ac* y *cry2Ab2*, a partir de ADN extraído de una única muestra biológica.

Además se ha desarrollado un método de detección evento-específico basados en la técnica de PCR en tiempo real para la detección en grano y semilla del evento acumulado MON-15985-7 x MON-88913-8.

II. EVALUACIÓN DE RIESGO

1. Estabilidad genética y fenotípica

Evento MON-88913-8

La estabilidad genética del ADN insertado en el evento MON-88913-8 fue corroborada mediante análisis de *Southern blot* a través de 5 generaciones.

Además, se compararon mediante una prueba de Chi-cuadrado las proporciones observadas con las esperadas de acuerdo con los principios mendelianos de herencia en 2 generaciones (R1 y R2). Mientras que en la generación R2 se evaluó la presencia del gen *cp4 epsps* por PCR, en la generación R1 se comprobó la tolerancia a glifosato. Estos análisis de segregación demostraron que, de acuerdo a lo esperado para un inserto integrado en un único locus de forma estable, el gen *cp4 epsps*, se transfiere a la progenie siguiendo un patrón mendeliano simple.

Por otro lado, se comprobó la estabilidad fenotípica del evento MON-88913-8 en los ensayos de; eficacia (ver sección I 3.), composición centesimal (ver sección II 4.), comportamiento agrofenotípico (ver sección II 5.1) y segregación (mediante la aplicación de glifosato en las generaciones R1, R4 y R5).

Evento MON-15985-7

El evento MON-15985-7 contiene dos insertos no ligados, uno correspondiente al evento MON-ØØ531-6, utilizado como germoplasma para la retransformación genética, y otro proveniente de la retransformación mediada por biobalística. La estabilidad genética de ambos insertos fue corroborada de manera independiente para 4 y 5 generaciones respectivamente.

Por otra parte, se analizó la segregación del locus correspondiente al casete *cry2Ab2* en 4 generaciones diferentes (R1, R2, BC1F1 y BC2F2) mediante una prueba de Chi-cuadrado. En dichas generaciones se evaluó la presencia de la proteína Cry2Ab2 mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Estos análisis de

segregación demostraron que, de acuerdo a lo esperado para un inserto integrado en un único locus de forma estable, el casete *cry2Ab2*, se transfiere a la progenie siguiendo un patrón mendeliano simple.

La estabilidad fenotípica se verificó mediante ensayos, de laboratorios y a campo, de eficacia de la actividad insecticida del evento MON-15985-7 contra las especies blanco mencionadas en la sección I, 3.2 en diferentes generaciones avanzadas del cultivo.

Evento MON-15985-7 x MON-88913-8

Teniendo en cuenta que el algodón MON-15985-7 x MON-88913-8 es un evento acumulado obtenido por cruzamiento convencional, no hay razón para suponer que dicho cruzamiento pudiera haber modificado el modelo de segregación genética mendeliana observado en los eventos parentales MON-15985-7 y MON-88913-8.

Por otro lado, se comprobó la estabilidad fenotípica del evento MON-15985-7 x MON-88913-8 en los ensayos de eficacia (ver sección I 3.), composición centesimal (ver sección II 4.), y comportamiento agrofenotípico (ver sección II 5.1).

2. Productos de expresión de las secuencias introducidos

Evento MON-88913-8

Los niveles de expresión de la proteína CP4 EPSPS fueron determinados mediante la técnica de ELISA en hoja joven (primera hoja verdadera expandida), hoja al cuarto nudo (H1), hoja al 50% de floración (H2), hoja a cosecha (H3), raíz, semilla (desmotada y deslintada) y polen (estos tres últimos tejidos también al 50% de floración) de las plantas del evento MON-88913-8 y de la variedad no GM de cuatro localidades de EEUU durante la campaña de 2002 (tabla 1). No se detectó CP4 EPSPS en los tejidos del control isogénico.

Tabla 1. Cantidades promedio ($\mu\text{g/g} \pm \text{SD}$) y rango de CP4 EPSPS en el evento MON-88913-8

Tejido	En base al peso fresco ($\mu\text{g/g pf}$)			En base al peso seco ($\mu\text{g/g ps}$) ¹	
	Media (d.e.) ²	Rango ³	LC / LD	Media (d.e.) ²	Rango ³
Hoja Joven	170 (64)	64 – 260	0,23 / 0,069	970 (460)	270 – 1700
H1	270 (99)	77 – 410	0,23 / 0,069	1400 (540)	480 – 2600
H2	170 (99)	63 – 260	0,23 / 0,069	690 (210)	290 – 1100
H3	160 (61)	66 – 260	0,23 / 0,069	630 (230)	290 – 1100
Raíz	31 (11)	19 – 64	0,23 / 0,073	99 (40)	57 – 200
Semilla	310 (110)	67 – 550	2,7 / 1,7	340 (120)	72 – 580
Polen	4,0 (0,22)	3,8 – 4,3	0,23 / 0,11	n/a ⁴	n/a ⁴

1. Los valores en $\mu\text{g/g ps}$ fueron obtenidos dividiendo los valores en pf por los factores de conversión a peso seco para cada tejido obtenidos a partir de los análisis de humedad (Bookout *et al.*, 2003)
2. La media aritmética y el desvío estándar (d.e.) fueron calculados para cada tipo de tejido a través de las localidades.
3. El rango está representado por los valores mínimos y máximos determinados para cada tipo de tejido a través de las localidades.
4. Debido a la cantidad limitada de muestra de polen, no se pudo determinar el contenido de humedad en este tejido, por lo cual los valores son representados en base al peso fresco solamente.

Fuente: Monsanto.

Evento MON-88913-8, MON-15985-7 y MON-15985-7 x MON-88913-8

Los niveles de expresión de las proteínas CP4 EPSPS, Cry1Ac, Cry2Ab2, NPTII y GUS fueron determinados mediante la técnica de ELISA. Se analizaron muestras en la primera hoja verdadera expandida y semilla (desmotada y deslintada) de plantas portadoras de los eventos individuales (MON-15985-7 y MON-88913-8), el evento acumulado (MON-15985-7 x MON-88913-8) y la variedad no GM (control isogénico) ensayadas en cuatro localidades de EEUU durante la campaña 2004.

Tabla 2. Cantidades promedio ($\mu\text{g/g} \pm \text{SD}$) y rango de CP4 EPSPS.

Material	N ¹	Media (d.e.) ² [rango] ³			
		Hoja		Semilla	
		µg/g pf	µg/g ps ⁴	µg/g pf	µg/g ps ⁴
MON 88913 x MON 15985	12	250 (44) [200 – 320]	1700 (360) [1400 – 2400]	300 (33) [250 – 370]	310 (35) [260 – 390]
MON 88913 x MON 15985(-)	7	190 (66) [61 -260]	1300 (440) [470 - 1900]	320 (36) [270 - 370]	330 (37) [290 - 390]
MON 88913(-) x MON 15985	10	ND ⁵	NA ⁶	ND	NA
MON 88913(-) x MON 15985(-)	10	ND	NA	ND	NA

1. N: Número de muestras analizadas.
2. La media aritmética y el desvío estándar (d.e.) fueron calculados para cada tipo de tejido a través de las localidades.
3. El rango está representado por los valores mínimos y máximos determinados para cada tipo de tejido a través de las localidades
4. Los valores en µg/g ps fueron obtenidos dividiendo los valores en pf por los factores de conversión a peso seco para cada tejido obtenidos a partir de los análisis de humedad (Mozaffar *et al.*, 2005)
5. ND = No detectado. Los límites de detección (LD) para los tejidos de hoja y semilla en el ELISA para la proteína CP4 EPSPS fueron 0,069 y 1,7 µg/g pf, respectivamente
6. NA = No aplicable. El valor de conversión del peso seco (DWCF) no aplicó para las muestras que estaban por debajo del Limite de cuantificación (LC) del ensayo (0,23 y 2,7 µg/g pf para hoja y semilla, respectivamente).

Fuente: Monsanto.

Tabla 3. Cantidades promedio (µg/g ± SD) y rango de Cry1Ac en el evento MON-15985-7, MON-88913-8 y MON-15985-7 X MON-88913-8.

Material	N ¹	Media (d.e.) ² [rango] ³			
		Hoja		Semilla	
		µg/g pf	µg/g ps ⁴	µg/g pf	µg/g ps ⁴
MON 88913 x MON 15985	12	2,1 (0,91) [0,69 – 3,2]	14 (5,9) [4,6 – 2,5]	1,7 (0,29) [1,3 – 2,1]	1,8 (0,30) [1,3 – 2,2]
MON 88913 x MON 15985(-)	7	ND ⁵	NA ⁶	ND	NA
MON 88913(-) x MON 15985	10	1,7 (0,73) [0,81 – 2,9]	11 (4,1) [5,4 -1,9]	1,7 (0,15) [1,5 – 2,0]	1,8 (0,16) [1,6 – 2,1]
MON 88913(-) x MON 15985(-)	10	ND	NA	ND	NA

1 a 4: igual a tabla 10

5. ND = No detectado. Los LD para los tejidos de hoja y semilla en el ELISA para la proteína Cry1Ac fueron 0,033 y 0,037 µg/g pf, respectivamente
6. NA = No aplicable. El valor de conversión del peso seco (DWCF) no aplicó para las muestras que estaban por debajo del LC del ensayo (0,05 y 0,06 µg/g pf para hoja y semilla, respectivamente).

Fuente: Monsanto.

Tabla 4. Cantidades promedio ($\mu\text{g/g} \pm \text{SD}$) y rango de Cry2Ab2.

Material	N ¹	Media (d.e.) ² [rango] ³			
		Hoja		Semilla	
		$\mu\text{g/g pf}$	$\mu\text{g/g ps}^4$	$\mu\text{g/g pf}$	$\mu\text{g/g ps}^4$
MON 88913 x MON 15985	12	22 (8,9) [13 – 40]	150 (65) [91 – 310]	260 (23) [230 – 290]	270 (24) [240 – 300]
MON 88913 x MON 15985(-)	7	ND ⁵	NA ⁶	ND	NA
MON 88913(-) x MON 15985	10	19 (6,9) [13 – 32]	130 (41) [93 -230]	240 (24) [210 – 270]	230 (25) [210 – 290]
MON 88913(-) x MON 15985(-)	10	ND	NA	ND	NA

1 a 4: igual a tabla 10

5. ND = No detectado. Los LD para los tejidos de hoja y semilla en el ELISA para la proteína Cry2Ab2 fueron 0,26 y 1,1 $\mu\text{g/g pf}$, respectivamente

6. NA = No aplicable. El valor de conversión del peso seco (DWCF) no aplicó para las muestras que estaban por debajo del LC del ensayo (1,6 y 1,9 $\mu\text{g/g pf}$ para hoja y semilla, respectivamente).

Fuente: Monsanto.

Tabla 5. Cantidades promedio ($\mu\text{g/g} \pm \text{SD}$) y rango de NPTII.

Material	N ¹	Media (d.e.) ² [rango] ³			
		Hoja ⁵		Semilla	
		$\mu\text{g/g pf}$	$\mu\text{g/g ps}^4$	$\mu\text{g/g pf}$	$\mu\text{g/g ps}^4$
MON 88913 x MON 15985	12	- [<LC ⁶ – 3,3]	- [<LC – 26]	3,2 (0,53) [<LC ⁶ – 4,1]	3,4 (0,56) [<LC – 4,2]
MON 88913 x MON 15985(-)	7	ND ⁷	NA ⁸	ND	NA
MON 88913(-) x MON 15985	10	- [<LC – 3,7]	- [<LC – 20]	2,7 (0,34) [<LC – 3,3]	2,9 (0,35) [<LC – 3,4]
MON 88913(-) x MON 15985(-)	10	ND	NA	ND	NA

1 a 4: igual a tabla 10

5. Solamente una de 12 muestras analizadas de MON 88913 x MON 15985 y una de diez para MON 88913(-) x MON 15985 tenían un nivel de proteína NPTII cuantificable. Por lo tanto, la media y el desvío estándar (d.e.) no pudieron ser calculados para hoja y solo se determinaron para semilla.

6. Los límites de cuantificación (LC) de NPTII en el ELISA para hoja y semilla fueron 3,1 y 2,3 $\mu\text{g/g pf}$, respectivamente.

7. ND = No detectado. Los límites de detección (LD) para los tejidos de hoja y semilla en el ELISA para la proteína NPTII fueron 1,1 y 0,73 $\mu\text{g/g pf}$, respectivamente

8. NA = No aplicable. El valor de conversión del peso seco (DWCF) no aplicó para las muestras que estaban por debajo del límite de cuantificación (LC) del ensayo.

Fuente: Monsanto.

Tabla 6. Cantidades promedio ($\mu\text{g/g} \pm \text{SD}$) y rango de GUS.

Material	N ¹	Media (d.e.) ² [rango] ³			
		Hoja		Semilla	
		$\mu\text{g/g pf}$	$\mu\text{g/g ps}^4$	$\mu\text{g/g pf}$	$\mu\text{g/g ps}^4$
MON 88913 x MON 15985	12	210 (55) [150 – 300]	1400 (250) [1100 – 1800]	120 (20) [86 – 150]	130 (21) [90 – 160]
MON 88913 x MON 15985(-)	7	ND ⁵	NA ⁶	ND	NA
MON 88913(-) x MON 15985	10	170 (55) [110 – 280]	1100 (250) [840 - 1600]	120 (14) [96 – 140]	140 (14) [100 – 150]
MON 88913(-) x MON 15985(-)	10	ND	NA	ND	NA

1 a 4: igual a tabla 10

5. ND = No detectado. Los LD para los tejidos de hoja y semilla en el ELISA para la proteína GUS fueron 3,9 y 3,8 $\mu\text{g/g pf}$, respectivamente

6. NA = No aplicable. El valor de conversión del peso seco (DWCF) no aplicó para las muestras que estaban por debajo del LC del ensayo (5,0 y 4,5 $\mu\text{g/g pf}$ para hoja y semilla, respectivamente).

Fuente: Monsanto.

No se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de las proteínas expresadas en los tejidos del evento acumulado en comparación con los eventos parentales. Por su parte, en el control isogénico no se detectaron las proteínas provenientes de los eventos GM.

3. Análisis del potencial tóxico o alergénico

Con el objetivo de analizar posibles similitudes entre las secuencias de las proteínas introducidas con alérgenos conocidos, se llevaron a cabo las comparaciones recomendadas por la guía del Codex Alimentarius (2003). En primer lugar, se compara la secuencia aminoacídica completa de la proteína, tomando como valor de referencia una identidad de secuencia superior al 35% en un segmento de al menos 80 aminoácidos usando el algoritmo FASTA. En segundo lugar, se utiliza un patrón de búsqueda de epítopes lineales cortos (8 aminoácidos) similares a los presentes en proteínas conocidas como alérgenos. Como comparador se utiliza la base de datos AD_2015 construida a partir de la recopilación de secuencias de proteínas alergénicas, o relacionadas a afecciones celíacas, disponibles en bases de datos de dominio público FARRP (2010) (del Inglés, *Food Allergy Research and Resource Program*).

Por su parte, para el análisis del potencial tóxico se utilizó la herramienta de alineación de secuencias FASTA que compara las secuencias proteicas con bases de datos de toxinas actualizadas. Además, se llevaron a cabo estudios de termoestabilidad y estabilidad en fluido gástrico simulados (FGS).

Por otro lado, se realizó un estudio de análisis completo a través del inserto y las secuencias flanqueantes para identificar posibles nuevos marcos abiertos de lectura (ORFs, del inglés, *open Reading frames*) que pudieran haberse generado como resultado de la inserción. Estos ORF determinados *in silico* son teóricos y no necesariamente implica que dichos péptidos teóricos se sinteticen en las plantas GM *in vivo*.

Los resultados de esta serie de análisis se detallan a continuación.

3.1 Productos de expresión:

Evento MON-88913-8

CP4 EPSPS

El estudio bioinformático para CP4 EPSPS, utilizando los algoritmos mencionados, con la base de datos AD_2010 (base de datos construida por Monsanto a partir de las bases de datos genéticos de dominio público FARRP permite concluir que la proteína CP4 EPSPS no comparte similitud de secuencias con proteínas alergénicas o relacionadas a afecciones celíacas.

El análisis de potencial tóxico para la proteína CP4 EPSPS no presentó alineamientos de relevancia biológica con las bases de datos TOX_2015 y PRT_2015, por lo que no compartiría homología estructural relevante con toxinas conocidas u otras proteínas biológicamente activas que pudiesen presentar efectos adversos.

Por otro lado para el ensayo de estabilidad en FGS más del 95% de la proteína CP4 EPSPS fue digerida y su actividad se vio reducida en un porcentaje mayor al 90%, luego de 15 segundos de incubación.

En cuanto a termoestabilidad el comportamiento de las proteínas es predecible y sigue la tendencia de la desnaturalización normal de las enzimas a elevadas temperaturas.

Estos resultados tomados en conjunto conforman evidencia consistente para inferir que es altamente improbable que CP4 EPSPS tenga características alergénicas o tóxicas. Sumado a ello, CP4 EPSPS es una proteína que posee historial de uso seguro.

Evento MON-15985-7

Cry1Ac, Cry2Ab2, GUS y NPTII

Las comparaciones de FASTA no presentaron alineamientos con secuencias de alérgenos conocidos de acuerdo a los criterios recomendados por la guía del Codex Alimentarius (2003).

Por otro lado para el ensayo de estabilidad en FGS más del 90% de la bioactividad de la proteína Cry1Ac se pierde tras de 5 minutos de incubación y más del 99% de la proteína Cry2Ab2 fue digerida por debajo del límite de detección dentro de los 30 segundos de incubación. La proteína GUS es digerida luego de 15 segundos de incubación, y al menos el 99% de los fragmentos proteicos remanentes son digeridos dentro de los 4 minutos de incubación. Finalmente, NPTII es digerida luego de 10 segundos de incubación, y presenta una reducción de actividad del 99% luego de 2 minutos.

En cuanto a termoestabilidad, el comportamiento de las proteínas aportadas por el evento, es predecible y sigue la tendencia de la desnaturalización normal de las enzimas a elevadas temperaturas.

Estos resultados tomados en conjunto conforman evidencia consistente para inferir que es altamente improbable que Cry1Ac, Cry2Ab2, NPTII o GUS tengan características alergénicas o tóxicas. Sumado a ello, estas proteínas poseen historial de uso seguro.

Evento MON-15985-7 x MON-88913-8

No existen razones para suponer que las características ya evaluadas, para cada una de las proteínas aportadas por los eventos parentales hayan cambiado en el algodón MON-15985-7 x MON-88913-8

3.2. Nuevos péptidos hipotéticos

Evento MON-88913-8

Nueve (9) secuencias aminoacídicas, que podrían ser potencialmente generadas considerando todos los posibles marcos de lectura, fueron identificados en las regiones 5´y 3´ de unión entre el ADN genómico y el ADN-T. Cada uno de estos polipéptidos fue comparado contra una base de datos de alérgenos (AD_2015), toxinas (TOX_2015), y una base de datos de proteínas (PRT_2015). Los resultados del análisis bioinformático señalan que aún en el improbable caso de que cualquiera de los nueve (9) posibles polipéptidos mencionados resultarán traducidos, éstos no poseen similitud o identidad de secuencias con alérgenos, toxinas u otras proteínas con actividad biológica conocida, que permitan suponer que pudieran resultar potencialmente alergénicos, tóxicos o pudiesen tener alguna implicancia para la salud.

Evento MON-15985-7

Se identificaron treinta (30) polipéptidos hipotéticos que abarcan el ADN genómico del algodonoero flanqueante a los insertos en las posiciones 5´ y 3´. Cada uno de estos polipéptidos fue comparado contra una base de datos de alérgenos (AD_ 2015), toxinas (TOX_2015) y una base de datos de secuencias proteicas de (PRT_2015). Los resultados del análisis bioinformático señalan que aún en el improbable caso de que cualquiera de los treinta (30) posibles polipéptidos mencionados resultaran traducidos, éstos no poseen similitud o identidad de secuencias con alérgenos, toxinas u otras proteínas con actividad biológica conocida, que permitan suponer que pudieran resultar potencialmente alergénicos, tóxicos o pudiesen tener alguna implicancia para la salud.

Evento MON-15985-7 x MON-88913-8:

Probada la estabilidad genética del evento acumulado MON-15985-7 X MON-88913-8 (II 1.3) no existe razón para creer que se hayan generado nuevos ORF otros que los presentes y analizados para los eventos parentales.

4. Composición centesimal del OVGM

Eventos MON-88913-8 y MON-15985-7 x MON-88913-8

Se realizó un estudio composicional comparativo entre MON-88913-8 y MON-15985-7 x MON-88913-8, con aplicación de glifosato, y su contraparte convencional siguiendo las recomendaciones de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE). Se determinaron los niveles de diversos componentes en muestras de semillas deslindadas de ensayos a campo realizados en 4 localidades de Estados Unidos durante la campaña 2004. Además, con el objeto de analizar los resultados en el contexto de la variabilidad natural del cultivo del algodón, se incluyeron 11 variedades comerciales no GM de referencia.

Se determinaron los niveles de; proximales (proteína, grasa, cenizas y humedad), fibra de detergente ácido (FDA), fibra de detergente neutro (FDN), fibra cruda, fibra dietaria total (FDT), carbohidratos, calorías, aminoácidos, ácidos grasos, ácidos grasos ciclopropenoides (ácido malválico, estercúlico y dihidroestercúlico), vitamina E, minerales (calcio, cobre, hierro, magnesio, manganeso, fósforo, potasio, sodio y zinc), gossipol (libre y total) y aflatoxinas (B1, B2, G1 y G2).

El estudio mostró diferencias significativas para algunos analitos entre los eventos y sus contrapartes convencionales. No obstante, todos los valores obtenidos se encuentran dentro del intervalo de tolerancia del 99% establecido por las variedades de referencia y/o en los rangos de los valores reportados en la literatura científica. Por lo tanto, las diferencias observadas no son consideradas biológicamente relevantes.

A los fines del presente documento, estos resultados se consideran indicativos de la ausencia de efectos inesperados producto de la transformación genética que puedan resultar en un impacto adverso sobre el agroecosistema.

5. Potencial para producir impactos en el agroecosistema

5.1. Comportamiento agrofenotípico

Eventos MON-88913-8, MON-15985-7 y MON-15985-7 x MON-88913-8

Se realizó un estudio de comportamiento agrofenotípico comparativo entre los eventos MON-88913-8, MON-15985-7 y MON-15985-7 x MON-88913-8 con y sin aplicación de glifosato y sus contrapartes convencionales en 2 localidades de Brasil, con diferentes condiciones ambientales, durante la campaña 2008-2009. Con el objeto de analizar los resultados en el contexto de la variabilidad natural del cultivo del algodón, se incluyeron 8 variedades comerciales no GM de referencia.

Los parámetros evaluados fueron: evolución de etapas fenológicas, recuento inicial y final de plantas, vigor, días a la primera flor, días a 50% de floración, días a primera cápsula abierta, días al 50% de cápsulas abiertas, altura de plantas, madurez fisiológica, peso de semillas con y sin fibras.

Se realizó un análisis estadístico interlocalidades, en el cual se encontraron diferencias significativas entre los eventos MON-88913-8, MON-15985-7 y MON-15985-7 x MON-88913-8 y sus contrapartes convencionales en algunos parámetros. Sin embargo, los valores promedio de dichas características estuvieron dentro del rango registrado para las variedades de referencia a excepción del vigor que se encontró levemente por debajo del límite inferior. No obstante, esta diferencia no fue considerada biológicamente relevante, por lo tanto no implica un riesgo al agroecosistema.

A su vez, se realizó un estudio de comportamiento agrofenotípico comparativo entre los eventos MON-88913-8 y MON-15985-7 x MON-88913-8 con sus contrapartes convencionales en 5 localidades de Estados Unidos bajo diversas condiciones ambientales, durante la campaña 2004. Con el objeto de analizar los resultados en el contexto de la variabilidad natural del cultivo del algodón, se incluyeron 11 variedades comerciales no GM de referencia.

Las características evaluadas fueron: emergencia, vigor, días a 50% de floración, número de nudos por encima de flor blanca y número de nudos por encima de la cápsula abierta, altura de planta, número de nudos en el tallo principal, cápsulas totales, y vegetativas, números de cápsulas retenidas, rendimiento, peso de 100 semillas con fibras, número de semillas por cápsula (maduras e inmaduras), peso de la cápsula, finura, madurez, elongación, solidez, longitud, uniformidad de la fibra y susceptibilidad a plagas.

Se realizó un análisis estadístico interlocalidades, en el cual se encontraron diferencias significativas entre los eventos MON-88913-8 y MON-15985-7 x MON-88913-8 y sus contrapartes convencionales en algunos parámetros. Sin embargo, los valores promedio de dichas características estuvieron dentro del rango registrado para las variedades de referencias y/o intervalo de tolerancia del 99% establecido por las mismas. Por lo tanto, las diferencias observadas no fueron consideradas biológicamente relevantes.

Dada la diversidad de condiciones agroclimáticas evaluadas en las localidades de Estados Unidos y Brasil donde se realizaron los estudios de comportamiento agrofenotípico, los que son aplicables a los efectos de la presente evaluación referida a una posible liberación comercial en la República Argentina.

Asimismo, en nuestro país se realizó un estudio de comportamiento agrofenotípico comparativo entre el evento MON-15985-7 x MON-88913-8 y su contraparte convencional, en 3 localidades bajo diferentes condiciones ambientales durante la campaña 2012-2013. Con el objeto de analizar los resultados en el contexto de la variabilidad natural del cultivo del algodón, se incluyeron 4 variedades comerciales no GM de referencia.

Las características evaluadas fueron: vigor de plántula, stand inicial y final de plantas; días a 50% de floración, días a 50% de cápsulas abiertas, número de cápsulas/planta, peso de las cápsulas en la primera posición; rendimiento (semillas con y sin fibras), porcentaje de fibra, respuesta a factores de estrés abiótico, susceptibilidad a plagas y enfermedades.

En análisis estadístico interlocalidades, no se hallaron diferencias significativas entre el evento MON-15985-7 x MON-88913-8 y su contraparte convencional para ninguno de los parámetros evaluados.

Por otro lado, se evaluaron los posibles impactos de las proteínas Cry1Ac y Cry2Ab2 sobre organismos no blanco pertenecientes a distintos grupos funcionales de artrópodos relevantes para el agroecosistema local. Los estudios realizados en laboratorio (donde los organismos fueron expuestos a diferentes concentraciones de la proteína), confirman la ausencia de actividad en otras especies no relacionadas con los insectos blanco de la tecnología.

Adicionalmente, se realizaron estudios de abundancia de artrópodos no blanco realizados a campo en Argentina y Brasil confirmando la ausencia de actividad en otras especies no relacionadas con los insectos blanco de la tecnología.

Los resultados obtenidos demuestran que los eventos MON-88913-8, MON-15985-7 y MON-15985-7 x MON-88913-8, objetos de la presente solicitud, tienen un comportamiento agronómico equivalente a sus contrapartes convencionales, excepto por las diferencias asociadas a las características intencionalmente introducidas.

Por lo expuesto, se concluye que los eventos MON-88913-8, MON-15985-7 y MON-15985-7 x MON-88913-8 no presentan un comportamiento agrofenotípico inesperado que pueda ser indicativo de efectos no intencionales producto de la transformación genética, o que pueda resultar en un impacto adverso sobre el agroecosistema.

5.2. Capacidad de supervivencia, establecimiento y diseminación

Evento MON-88913-8

Se llevó a cabo un estudio de poder germinativo y dormición sobre las semillas del evento MON-88913-8 (provenientes de 3 localidades de Estados Unidos) comparándolo con su contraparte convencional. Se utilizó el protocolo de la Asociación de Analistas Oficiales de Semillas (AOSA), el cual recomienda una alternancia de temperaturas de 20°C/30°C. Asimismo, se ensayaron 6 regímenes de temperaturas adicionales: 10°C, 20°C, 30°C, 40°C, 10/20°C, y 10/30°C.

Si bien se encontraron diferencias significativas en algunos parámetros, en varios casos los valores promedio de dichas características estuvieron dentro del rango de referencia de variedades comerciales. Por lo tanto, las mismas están contempladas dentro de la variabilidad natural del cultivo del algodón. En los casos restantes, las mismas no son consistentes a través de las localidades y los tratamientos. Por consiguiente, se considera que no presentan relevancia biológica. Por otro lado, no se detectaron diferencias significativas en el porcentaje de semillas duras entre el evento y el control convencional.

Evento MON-15985-7

Se realizó un estudio poder germinativo y dormición sobre las semillas del evento MON-15985-7 (procedentes de 3 localidades de Estados Unidos) en el cual se evaluó la temperatura recomendada por AOSA y 7 tratamientos adicionales: 5°C, 10°C, 20°C, 30°C, 40°C, 5/20°C y 10/20°C. En dicho estudio se compararon las características de germinación y dormición de MON-15985-7 con MON-ØØ531-6 y de MON-15985-7 con su contraparte convencional (DP50).

En ambas comparaciones (MON-15985-7 y MON-ØØ531-6; MON-15985-7 y su contraparte convencional), se encontraron diferencias significativas para algunas de las características evaluadas. No obstante, la mayoría de los valores promedios de dichos parámetros estuvieron dentro del rango de referencias, a excepción del porcentaje de germinación de MON-15985-7 para la temperatura 10°C/20°C que se encontró levemente por encima del límite superior. Sin embargo, dicha diferencia no implica un riesgo al agroecosistema.

Eventos MON-15985-7, MON-88913-8 y MON-15985-7 x MON-88913-8

Se llevó a cabo un estudio de germinación a 25°C sobre las semillas de los eventos MON-88913-8, MON-15985-7, y MON-15985-7 x MON-88913-8 (procedentes de 2 localidades de Brasil) comparándolos con sus contrapartes convencionales. No se observaron diferencias significativas en el análisis interlocalidades de dichas comparaciones.

Estos resultados indican que, en comparación con el algodón convencional, los eventos MON-88913-8, MON-15985-7 y MON-15985-7 x MON-88913-8 no tienen mayor capacidad de sobrevivir sin asistencia humana.

Por lo expuesto en los estudios realizados sobre las semillas de los eventos MON-88913-8, MON-15985-7 y MON-15985-7 x MON-88913-8, se concluye que los genes cuya expresión determinan el fenotipo de resistencia a ciertos insectos del orden Lepidoptera y tolerancia a glifosato, sólo confieren una ventaja selectiva al algodón GM cuando se lo

expone a las plagas y al herbicida mencionado, sin ser ello suficiente para que la planta adquiriera características de maleza.

5.3. Potencial para la transferencia horizontal o intercambio de genes del OVGM con otros organismos

La biología reproductiva de los eventos MON-88913-8, MON-15985-7 y MON-15985-7 x MON-88913-8 no es diferente a la del algodón no GM; además, no existen en el país especies cultivables ni silvestres sexualmente compatibles con este cultivo a excepción de *Gossypium barbadense*. No obstante, hay que tener en cuenta que para que ocurra dicha hibridación, debe existir:

- Sincronización floral;

- Presencia insectos polinizadores (abejorros *-Bombus spp-* y abejas *-Apis mellifera -*) durante período de receptividad estigmática.

- Cercanía entre ambas especies.

Aun así, la probabilidad de que el híbrido entre ambas especies de *Gossypium* se convierta en maleza y pueda dispersarse es baja, debido a la domesticación de estos cultivos.

A partir de la literatura científica disponible hasta el momento, se sabe que no existen casos de transferencia horizontal desde el algodón hacia microorganismos, vectores virales o insectos. Por lo tanto, no existen razones para suponer que esta característica haya cambiado en los eventos MON-88913-8, MON-15985-7 y MON-15985-7 x MON-88913-8.

Por otro lado, las características de los eventos MON-88913-8, MON-15985-7 y MON-15985-7 x MON-88913-8, al igual que cualquier otro algodón no GM, determinan que improbable que pueda transferirse material genético desde los productos derivados hacia otros organismos por transferencia horizontal.

Asimismo, la acción degradadora de las enzimas digestivas sobre los ácidos nucleicos ingeridos con los alimentos y fundamentalmente la ausencia de elementos de conjugación,

transposición u otras formas de movilización que favorezcan la transferencia de genes desde el organismo en cuestión hacia otros organismos, hace que esto sea aún más improbable.

5.4. Patogenicidad para otros organismos

El algodón es reconocido como una planta no patógena para otros organismos, esta característica no se encuentra alterada en los algodones GM comprendidos en este documento.

Por otro lado, si bien algunos de los elementos genéticos contenidos en el algodón MON-88913-8, MON-15985-7 y MON-15985-7 x MON-88913-8 provienen de fitopatógenos, no se encuentran presentes en dichos eventos secuencias que confieran las correspondientes características patogénicas de los organismos de los que provienen. Por lo tanto estos eventos, carecen de riesgos de patogenicidad.

6. Análisis de interacción de los productos de expresión

Mediante el análisis de los mecanismos de acción, niveles de expresión y ensayos de eficacia, se evaluó la posibilidad de interacción entre los nuevos productos de expresión (CP4 EPSPS, Cry1Ac, Cry2Ab2, NPTII y GUS) en el evento MON-15985-7 x MON-88913-8.

En primer lugar, se sabe que las proteínas EPSPS, Cry1Ac, Cry2Ab2, NPTII y GUS son enzimas que actúan en rutas metabólicas diferentes (sección I 3.3).

Además, los ensayos de interacción entre las proteínas insecticidas Cry1Ac y Cry2Ab2 mostraron que las mismas poseen mecanismos de acción independientes, y ejercen un efecto aditivo.

Por otra parte, no se identificaron diferencias significativas en los ensayos de tolerancia glifosato, en el evento MON-15985-7 x MON-88913-8 en comparación con el evento parental MON-88913-8 (sección II 1.2).

En cuanto a los niveles de expresión de las proteínas CP4 EPSPS, Cry1Ac, Cry2Ab2, NPTII y GUS en el evento acumulado, no se observaron cambios significativos en comparación con los eventos parentales (sección II 2).

Estos resultados tomados en conjunto constituyen evidencia consistente para inferir que no existiría interacción entre las proteínas expresadas en el evento acumulado.

7. Plan de Manejo de Resistencia de Insectos (MRI).

7.1. Propuesta de manejo para el retraso de la evolución de resistencia de los insectos:

El solicitante propone un plan de manejo responsable del algodón MON-15985-7 y MON-15985-7 x MON-88913-8 con el fin de retrasar la selección de resistencia de las especies de lepidópteros que ejercen mayor presión sobre el cultivo. El mismo integrará a dicho evento dentro de un Programa de Manejo Integrado de Plagas en el cual se contempla el uso de múltiples herramientas:

- A. Rotación de cultivos
- B. Mantenimiento del cultivo libre de malezas hospederas de plagas.
- C. Uso racional de insecticidas en un contexto de manejo integrado de plagas como complemento de la protección otorgada por las nuevas proteínas.
- D. Preservación de los enemigos naturales.
- E. Siembra, tipo y diseño espacial de refugio.

Para extender la durabilidad de los eventos MON-15985-7 y MON-15985-7 x MON-88913-8 se considera necesario implementar un refugio estructurado en bloque, utilizando al menos el 20% de la superficie total con un material no Bt de ciclo igual o similar al cultivo Bt. La siembra debe ser realizada de modo que el refugio se encuentre a una distancia máxima de 1.600 metros de los eventos MON-15985-7 y MON-15985-7 x MON-88913-8. En caso de aplicar insecticidas se debe considerar el nivel y umbral de daño económico para cada plaga teniendo en cuenta los principios de Manejo Integrado de Plagas (MIP).

El solicitante se compromete a desarrollar un Plan de Comunicación y Capacitación en relación los eventos MON-15985-7 y MON-15985-7 x MON-88913-8 que incluirá:

capacitaciones internas y externas, jornadas técnicas a campo, boletines electrónicos, información disponible en la página web y entrega de material conteniendo la información antes mencionada, entre otros.

7.2. Procedimientos a seguir ante la posible aparición de resistencia

a. Canales de comunicación disponibles para el productor.

El solicitante se compromete a asesorar a los productores ante la suposición de una situación de daño no esperado en el cultivo, a través de los canales de ventas (distribuidores y vendedores) y de personal técnico presente en la zona. Sin perjuicio de lo anterior, ante la confirmación de resistencia en la plaga corresponde la notificación al SINAVIMO (SENASA).

b. Estudios y/o pasos para confirmar la resistencia.

En primer lugar, se confirmará el origen del daño observado, la identidad del material vegetal y la identificación taxonómica de la especie que cause el daño. Posteriormente, se realizará una evaluación de la susceptibilidad contra las dosis diagnóstico previamente establecidas para cada una de las proteínas expresadas u otra metodología también apropiada para estos objetivos. Si se confirmara la supervivencia de los insectos frente a todas las proteínas se deberá estudiar que esta pérdida de susceptibilidad es heredada a las generaciones siguientes. Para cada proteína se realizará un ensayo de heredabilidad de la resistencia, el cual tiene como objetivo evaluar si esta característica perdura en las generaciones siguientes y si su carácter es recesivo o dominante.

c. Acciones a tomar en caso de confirmarse la resistencia de insectos:

- i. Fijar objetivos de la estrategia de contención en función de la ecología y biología de la plaga en cuestión, las características geográficas, ambientales y productivas de la zona en donde se desarrolle la problemática. Asimismo, se deben establecer alternativas para reducir y/o controlar el biotipo resistente de la plaga. Si bien de acuerdo a la problemáticas se pueden desarrollar recomendaciones específicas, se citan sugerencias generales tales como el monitoreo de los cultivos, atención a los umbrales de daño, aplicaciones de insecticidas de ser superado el umbral, y todas las

incluidas dentro de los principios de Buenas Prácticas de Manejo y de Manejo Integrado de Plagas en particular.

ii. Trabajo con clientes y agencias de extensión. Se mantendrá informado de la situación y de las recomendaciones a los involucrados a través de comunicados o presentando información en reuniones y capacitaciones.

iii. Seguimiento de las acciones propuestas a productores. Se realizarán recorridas y monitoreo de las zonas afectadas y reuniones informativas.

iv. Canales de comunicación con agencias regulatorias y gubernamentales pertinentes. Se utilizarán los canales oficiales para la presentación de la información obtenida y las estrategias de manejo planeadas, de acuerdo a las competencias de cada agencia regulatoria y gubernamental involucrada en la problemática.

7. Recomendaciones

En función de las características de los algodones MON-88913-8 y MON-15985-7 x MON-88913-8, subsecuente a la eventual obtención de la autorización para su comercialización y con el fin de retrasar la selección de biotipos de malezas resistentes a glifosato, se recomiendan las siguientes prácticas:

- Rotar cultivos y herbicidas con diferentes mecanismos de acción.
- Identificar las malezas presentes y definir el/los herbicida/s más adecuados para su manejo.
- Seguir las instrucciones del marbete (dosis, momento de aplicación, precauciones respecto al uso, almacenamiento y preparación del producto).
- Realizar monitoreos para verificar la eficacia de control en las malezas. Evitar su reproducción por semilla o proliferación vegetativa.

Dentro de este marco, se aconseja al solicitante comunicar y difundir esta información a través de los canales de distribución, venta, jornadas, entre otros, así como también generar espacios de capacitación a productores y asesores para implementar dichas recomendaciones.

Ante una sospecha de aparición de malezas resistentes, se sugiere que el productor lo informe al solicitante y que este lo asista proponiendo acciones de manejo y/o mitigación.