

SEGUNDA FASE DE EVALUACIÓN DOCUMENTO DE DECISIÓN

Maíz genéticamente modificado (GM) MON-87427-7 × MON-89Ø34-3 × SYN-IR162-4 × MON-87411-9, que contiene la acumulación de los eventos MON-87427-7, MON-89Ø34-3, SYN-IR162-4 y MON-87411-9. Dicha acumulación presenta resistencia a ciertos insectos del orden Lepidoptera (conferida por MON-89Ø34-3 y SYN-IR162-4) y del orden Coleoptera (otorgada por MON-87411-9) que son detallados en el presente documento; y tolerancia al herbicida glifosato (conferida por MON-87427-7 y MON-87411-9). La solicitud fue presentada por la empresa Monsanto Argentina S.R.L. El presente Documento de Decisión incluye al maíz MON-87427-7 × MON-89Ø34-3 × SYN-IR162-4 × MON-87411-9, a las acumulaciones intermedias de los eventos, y a toda la progenie derivada de los cruzamientos de estos materiales con cualquier maíz no GM.

Sobre la base del análisis de la información presentada por el solicitante y del conocimiento científico disponible, los suscriptos, representantes ante la Comisión Nacional Asesora de Biotecnología Agropecuaria (CONABIA) acuerdan en dar por finalizada la Segunda Fase de Evaluación del maíz GM MON-87427-7 × MON-89Ø34-3 × SYN-IR162-4 × MON-87411-9. De esta evaluación se concluye que los riesgos de bioseguridad derivados de la liberación del mencionado maíz GM en el agroecosistema, en cultivo a gran escala, no son significativamente diferentes de los inherentes al cultivo de maíz no GM.

El maíz MON-87427-7 × MON-89Ø34-3 × SYN-IR162-4 × MON-87411-9, que contiene la acumulación de los cuatro eventos de transformación individuales MON-87427-7, MON-89Ø34-3, SYN-IR162-4 y MON-87411-9, fue obtenido mediante cruzamiento convencional a partir de los eventos parentales. Los eventos MON-89Ø34-3 y SYN-IR162-4 recibieron la aprobación comercial en Argentina en el año 2010 y 2011, respectivamente. Por otro lado, los eventos MON-87427-7 y MON-87411-9 obtuvieron Documentos de Decisión favorables de la CONABIA en 2016 y 2015, respectivamente. Además, la combinación intermedia MON-89Ø34-3 × SYN-IR162-4 fue autorizada en el año 2016 en el contexto de la aprobación comercial del evento MON-89Ø34-3 × DAS-Ø15Ø7-1 × MON-ØØ6Ø3-6 × SYN-IR162-4.

El maíz MON-87427-7 × MON-89Ø34-3 × SYN-IR162-4 × MON-87411-9 ha sido ensayado a campo en Argentina desde 2014. Para tal fin fueron evaluadas por la CONABIA TRES (3) solicitudes de permisos para experimentación y/o liberación confinada al

agroecosistema que han cumplido con la normativa vigente para los OVGM, y han sido autorizados por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca (SAGyP).

El presente Documento de Decisión incluye al maíz MON-87427-7 × MON-89Ø34-3 × SYN-IR162-4 × MON-87411-9, a las acumulaciones intermedias de los eventos, y a toda la progenie derivada de los cruzamientos de estos materiales con cualquier maíz no GM.

I. ORGANISMO VEGETAL GENÉTICAMENTE MODIFICADO (OVGM)

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

2. Denominación de la acumulación de eventos:

MON-87427-7 × MON-89Ø34-3 × SYN-IR162-4 × MON-87411-9

3. Fenotipo aportado por las modificaciones genéticas introducidas

La acumulación de eventos MON-87427-7 × MON-89Ø34-3 × SYN-IR162-4 × MON-87411-9 presenta protección frente a ciertos lepidópteros tales como *Spodoptera frugiperda*, *Helicoverpa zea* y *Diatraea saccharalis*, otorgada por los productos de expresión de los genes *cry1A.105*, *cry2Ab2* (MON-89Ø34-3) y *vip3Aa20* (SYN-IR162-4). Además, el evento MON-87411-9, aporta la proteína Cry3Bb1, así como la expresión de dos copias de una porción del gen *Snf7* de *Diabrotica virgifera* en sentidos opuestos, que confieren protección contra determinados coleópteros como los gusanos de la raíz (*Diabrotica speciosa*).

Por otro lado, la acumulación de eventos presenta tolerancia al herbicida glifosato, resultado de la expresión del gen *cp4 epsps* aportado por los eventos MON-87427-7 y MON-87411-9. Mientras que la proteína CP4 EPSPS producida a partir de este último evento se expresa constitutivamente en todos los tejidos de la planta, aquella generada por el evento MON-87427-7 se sintetiza en todo el vegetal a excepción de ciertos tejidos reproductivos masculinos claves para el desarrollo del polen en el maíz. Como consecuencia de este patrón de expresión tejido-selectivo, en el evento individual se observa un fenotipo de androesterilidad al aplicar glifosato en estadios vegetativos tardíos (a partir de V8 y hasta V13). El maíz MON-87427-7 será usado por las empresas productoras de semillas como línea parental femenina (hembra) receptora del polen (proveniente de la línea masculina) durante la producción de semilla híbrida. En la acumulación de eventos co-existen las 2 copias del gen *cp4 epsps* con ambos patrones de expresión, por lo que la proteína CP4 EPSPS sintetizada a partir de la copia de expresión constitutiva enmascara la de expresión selectiva de la otra copia. De esta forma, no se manifiesta el fenotipo de androesterilidad al aplicar el herbicida sobre dicha acumulación de

eventos. Por esta razón, el maíz MON-87427-7 × MON-89Ø34-3 × SYN-IR162-4 × MON-87411-9 es fenotípicamente equivalente al maíz MON-89Ø34-3 × SYN-IR162-4 × MON-87411-9.

Ensayos confinados y a campo en 5 localidades de la región maicera de Argentina, realizados sobre la acumulación de eventos MON-87427-7 × MON-89Ø34-3 × SYN-IR162-4 × MON-87411-9, demostraron la actividad insecticida de las proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 y Vip3Aa20 sobre lepidópteros blanco y de la proteína Cry3Bb1 y del ARN DvSnf7 sobre coleópteros blanco (Sección I, 3.2.). Además, se comprobó la actividad de la proteína CP4 EPSPS en un ensayo de dosis-respuesta en invernadero. Este consistió en la comparación del nivel de daño entre la acumulación de eventos MON-87427-7 × MON-89Ø34-3 × SYN-IR162-4 × MON-87411-9 y su contraparte convencional al ser tratadas con una dosis de glifosato (1X) en el estadio V5.

3.1. Descripción de los herbicidas

El glifosato es un herbicida sistémico de amplio espectro 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 plantas 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 y características de las mismas

- *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae)

Es una especie de muy bajo impacto económico en Argentina, tanto en su estadio adulto como larval. Los huevos de esta especie son depositados bajo la tierra y las larvas se alimentan de las raíces. Los adultos se alimentan principalmente de polen y hojas, atacando también los frutos de especies hortícolas.

Es una especie polífaga que se alimenta de varias especies vegetales como girasol, soja, cucurbitáceas y algunas malezas. En nuestro país, tiene baja preferencia por el maíz.

Aunque es posible encontrar adultos en el cultivo de maíz, no está asociado con un daño que afecte el rendimiento significativamente. En algunos casos puntuales las larvas de *D. speciosa* pueden producir daños en las raíces de maíz (especialmente en “tardíos”) y otros cultivos, sin llegar a alcanzar repercusiones económicas relevantes.

- *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae)

Es una de las plagas más importantes del cultivo de maíz en la Argentina, conocida como "barrenador del tallo". Tiene un potencial de merma de rendimiento del 10 - 20 % por daño fisiológico, a lo cual deben sumarse las eventuales pérdidas por caída de plantas y espigas. Las disminuciones en el rendimiento son ocasionadas por los daños que provocan las larvas al penetrar en el tallo. Cuando el ataque se produce sobre una planta joven, las larvas pueden dañar el brote terminal provocando su muerte. En plantas más desarrolladas, el efecto directo por la construcción de galerías produce disminución del rendimiento de la planta al cortar los haces vasculares y disminuir la conducción de fotoasimilados a la espiga. Los efectos indirectos consisten en el quebrado de plantas desde la fructificación a la cosecha, el ingreso de diversos patógenos, siendo la podredumbre del tallo (*Fusarium spp.* y *Sclerotium bataticola*) la enfermedad más común, y pérdidas durante la cosecha por caída de espigas como consecuencia del barrenado del pedúnculo y base de las mismas.

De acuerdo con numerosos estudios efectuados en nuestro país, *D. saccharalis* puede completar 3 a 4 generaciones por año en la región pampeana central. Las poblaciones de esta plaga aumentan desde la siembra hasta la cosecha de maíz.

La siembra directa ha posibilitado la mayor supervivencia de las larvas invernantes incrementado el potencial de daño de este insecto. Se ha determinado que en algunos rastrojos de maíz las larvas invernantes de *Diatraea* pueden alcanzar densidades muy elevadas, lo cual representa un alto potencial de infestación de los adultos provenientes de los lotes infestados a los cultivos huéspedes vecinos.

- *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

Es conocida comúnmente como "cogollero del maíz" u "oruga militar tardía". Es una plaga muy importante en los maíces de la zona NOA y NEA y en los maíces tardíos de la región pampeana. Fue declarada "Plaga Nacional" en 1988. El daño ocasionado por las larvas durante los primeros días de desarrollo de la planta puede causar la muerte de la planta si afecta el meristema apical. Durante el período subsiguiente de desarrollo vegetativo el daño generalmente se circunscribe al cogollo. En la última etapa del cultivo, puede afectar la panoja, barbas y granos.

- *Helicoverpa zea* (= *Heliothis zea*) (Lepidoptera: Noctuidae)

Esta plaga tiene impacto en los maíces de siembra tardía en la zona núcleo de la región pampeana. Luego del nacimiento en los estigmas o "barbas", las larvas penetran rápidamente en la parte superior de la espiga para alcanzar así los granos y el marlo tierno

de los que se nutre, escapando no sólo de la acción de parásitos y predadores sino también de los insecticidas que se utilizan para su control. El daño normalmente se limita al extremo apical de la espiga. Esta plaga permite la entrada de diversos agentes patógenos que finalizan con el deterioro de la espiga.

3.3. Mecanismo de acción de los productos de expresión

Los mecanismos de acción de cada una de los productos de expresión responsables de conferir los fenotipos declarados, fueron evaluados en detalle en instancias de la solicitud de liberación comercial de los eventos individuales, resultando en Aprobación Comercial (MON-89Ø34-3 y SYN-IR162-4) y Documentos de Decisión favorables (MON-87427-7 y MON-87411-9). A continuación se detallan brevemente.

a. Proteínas que confieren tolerancia a herbicidas

Las proteínas CP4 EPSPS, aportadas por los eventos MON-87427-7 y MON-87411-9, son enzimas homólogas a la EPSPS endógena de maíz (y otras plantas y microorganismos) pero a diferencia de ésta, poseen 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.

b. Proteínas insecticidas

Las proteínas Cry1A.105 (MON-89Ø34-3), Cry2Ab2 (MON-89Ø34-3), Vip3Aa20 (SYN-IR162-4) y Cry3Bb1 (MON-87411-9) son toxinas con actividad insecticida que provienen de *Bacillus thuringiensis* y actúan sobre ciertas especies del orden Lepidoptera y Coleoptera. Las proteínas Cry se almacenan como cristales paraesporales durante la formación de la espora, mientras que las proteínas Vip son producidas durante la etapa vegetativa de crecimiento (además de la etapa de esporulación) de la bacteria. Además, se sabe que la familia de proteínas Cry no comparte secuencia homóloga con las proteínas Vip.

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 las microvellosidades 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.

En instancias de evaluación de las solicitudes de los eventos individuales, se demostró que el espectro de actividad de las proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 y Vip3Aa20 se

encuentra acotado al orden Lepidóptera sumando de esta manera diferentes modos de acción para las mismas especies blanco y el de Cry3Bb1 al orden Coleóptera.

c. ARNi

El evento MON-87411-9 presenta dos copias contiguas, insertadas en sentidos opuestos, de una porción del gen *Snf7* de *D. virgifera*, el cual es vital para el correcto funcionamiento celular del organismo blanco. Como resultado de la transcripción de la secuencia que contiene ambos fragmentos invertidos, se produce una molécula de ARN que se pliega sobre sí misma, generando un ARN doble cadena (ARNdc) con una secuencia complementaria al ARNm blanco del gen *DvSnf7* (ARN *DvSnf7*). Cuando un maíz portador del evento es ingerido por el coleóptero, el ARNdc pasa junto con el material vegetal a través del tracto digestivo e ingresa en las células del lumen del intestino del insecto. Una vez en el citoplasma, la maquinaria celular procesa al ARNdc en fragmentos de 21 nucleótidos complementarios al gen blanco. La presencia del ARNdc es una señal reconocida, amplificada y transmitida en forma sistémica al resto del organismo culminando con el silenciamiento del gen blanco, mediado por el mecanismo de ARNi, y llevando al insecto blanco a la muerte a partir del quinto día de ingerido el maíz portador del evento MON-87411-9.

4. Modificaciones genéticas introducidas:

4.1. Método de obtención del OVGM

El maíz MON-87427-7 × MON-89Ø34-3 × SYN-IR162-4 × MON-87411-9 es el resultado del cruzamiento convencional de híbridos de maíz conteniendo los eventos individuales MON-87427-7, MON-89Ø34-3, SYN-IR162-4 y MON-87411-9.

Por su parte, todos los eventos parentales han sido obtenidos a través de transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

4.2. Secuencias introducidas

La información referente a todos los eventos parentales ya fue evaluada detalladamente en instancias de las solicitudes de los eventos individuales, resultando en Aprobación Comercial (MON-89Ø34-3 y SYN-IR162-4) y Documentos de Decisión favorables (MON-87427-7 y MON-87411-9).

A continuación, se detallan los elementos genéticos responsables del fenotipo presente en cada uno de los eventos que forman parte de la acumulación objeto de esta solicitud y la proteína o ARN que estos codifican:

Evento	Elemento genético	Proteína / Fragmento de ARN
MON-87427-7	<i>cp4 epsps</i>	CP4 EPSPS
MON-89Ø34-3	<i>cry1A.105</i> <i>cry2Ab2</i>	Cry1A.105 Cry2Ab2
SYN-IR162-4	<i>vip3Aa20</i>	Vip3Aa20
MON-87411-9	<i>cry3Bb1</i> <i>cp4 epsps</i> Región parcial del gen <i>DvSnf7</i>	Cry3Bb1 CP4 EPSPS <i>DvSnf7</i> (ARN)

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

En la acumulación de eventos MON-87427-7 x MON-89Ø34-3 x SYN-IR162-4 x MON-87411-9 se evaluó la presencia e integridad de los insertos y regiones flanqueantes de los eventos parentales por un análisis de reacción en cadena de la polimerasa o PCR (del inglés *Polymerase Chain Reaction*) con primers específicos y posterior secuenciación de los productos de amplificación (MON-87427-7, MON-89Ø34-3 y MON-87411-9) o bien, por *Southern blot* (SYN-IR162-4). Los resultados del análisis molecular confirman que, luego del proceso de cruzamiento convencional que dió origen a dicha acumulación, los insertos y las secuencias flanqueantes correspondientes a los eventos parentales se encuentran presentes e intactos en el genoma del maíz portador de la acumulación de eventos.

Además, la integridad y el número de copias de los insertos, los rearrreglos dentro de los mismos y en sus correspondientes regiones flanqueantes han sido evaluadas oportunamente en instancias de las solicitudes de los eventos individuales resultando en Aprobación Comercial (MON-89Ø34-3 y SYN-IR162-4) y Documentos de Decisión favorables (MON-87427-7 y MON-87411-9).

5. Detección

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

II. EVALUACIÓN DE RIESGO

1. Productos de expresión de las secuencias introducidas

Durante la campaña 2014 se realizaron ensayos a campo en 5 localidades de Estados Unidos con el objetivo de evaluar los niveles de expresión de las proteínas y del ARN DvSnf7 presentes en la acumulación de eventos MON-87427-7 x MON-89Ø34-3 x SYN-IR162-4 x MON-87411-9, en comparación con los eventos parentales según corresponda. (Ver Tablas 1-15).

Se analizaron diferentes muestras provenientes de la mencionada acumulación de eventos y de sus parentales (material de referencia), en distintos estadios del ciclo del cultivo: hoja (V3-V4 y VT), raíz (V3-V4) y forraje (R5), raíz de forraje (R5), polen (R1) y grano (R6). En todos los casos, los resultados de los niveles de expresión se indicaron como los valores promedio (y desvío estándar) a través de las cinco localidades.

Los niveles de expresión de las proteínas se determinaron mediante ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, del inglés *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Los resultados fueron expresados en microgramo (μg) de proteína por gramo (g) de tejido en base al peso seco o al peso fresco.

Tabla 1. Niveles de expresión de la proteína CP4 EPSPS en el maíz MON-87427-7.

Tipo de Tejido	Estadio de Desarrollo ¹	Media (DE) Rango ($\mu\text{g/g pf}$) ²	Media (DE) Rango ($\mu\text{g/g ps}$) ³	LC/LD ⁴ ($\mu\text{g/g pf}$)
Hoja	V3-V4	120(19) 99-180	800(120) 650-1200	0,137/0,071
Hoja	VT	190(19) 150-240	800(79) 620-980	0,137/0,071
Raíz	V3-V4	21(5,4) 12-31	170(44) 97-250	0,068/0,033
Raíz forraje	R5	26(6,4) 12-36	140(33) 63-190	0,068/0,033
Forraje	R5	46(11) 25-70	150(37) 82-230	0,137/0,0700
Polen	R1	< LC (NA) NA-NA ⁵	NA ⁶ (NA) NA-NA	0,137/0,099
Grano	R6	6,0(0,92) 4,3-7,3	6,7(1,0) 4,8-8,2	0,228/0,152

¹ Estadio de desarrollo del maíz en el cual se recolectó la muestra de tejido.

² Nivel de proteína expresado como media aritmética y desvío estándar (DE) como microgramo (μg) de proteína por gramo (g) de tejido fresco (pf). La media, DE y rangos (valores mínimos y máximos) fueron calculados para cada tejido a través de las cinco localidades (n=20).

³ Niveles de proteína expresados como media aritmética y desvío estándar (DE) como microgramo (μg) de proteína por gramo (g) de tejido en base al peso seco (ps). Los valores en peso seco fueron calculados dividiendo los $\mu\text{g/g pf}$ por el factor de conversión a peso seco que fue obtenido de los datos del análisis de humedad.

⁴ LC = límite de cuantificación; LD = límite de detección.

⁵ Para todas las muestras de polen de las 5 localidades, 15 muestras fueron menores al LD, 2 muestras fueron menores al LC, 2 muestras resultaron inconclusas y 1 muestra fue positiva con un nivel de 0,44 $\mu\text{g/g ps}$.

⁶ NA: No Aplica

Tabla 2. Niveles de expresión de la proteína CP4 EPSPS en el maíz MON-87411-9.

Tipo de Tejido	Estadio de Desarrollo ¹	Media (DE) Rango ($\mu\text{g/g pf}$) ²	Media (DE) Rango ($\mu\text{g/g ps}$) ³	LC/LD ⁴ ($\mu\text{g/g pf}$)
Hoja	V3-V4	7,9(1,0) 6,0-9,7	52(6,7) 40-64	0,137/0,071
Hoja	VT	10(0,63) 9,2-12	42(2,6) 38-49	0,137/0,071
Raíz	V3-V4	5,2(1,6) 2,8-8,3	42(13) 23-68	0,068/0,033
Raíz forraje	R5	3,3(1,5) 0,92-6,1	17(7,7) 4,8-31	0,068/0,033
Forraje	R5	3,1(0,87) 1,7-4,9	10(2,9) 5,7-16	0,137/0,0700
Polen	R1	14(1,9) 11-17	22(2,9) 17-27	0,137/0,099
Grano	R6	3,1(0,34) 2,4-3,6	3,5(0,38) 2,7-4,1	0,228/0,152

¹ Estadio de desarrollo del maíz en el cual se recolectó la muestra de tejido.

² Nivel de proteína expresado como media aritmética y desvío estándar (DE) como microgramo (μg) de proteína por gramo (g) de tejido fresco (pf). La media, DE y rangos (valores mínimos y máximos) fueron calculados para cada tejido a través de las cinco localidades (n=20).

³ Niveles de proteína expresados como media aritmética y desvío estándar (DE) como microgramo (μg) de proteína por gramo (g) de tejido en base al peso seco (ps). Los valores en peso seco fueron calculados dividiendo los $\mu\text{g/g pf}$ por el factor de conversión a peso seco que fue obtenido de los datos del análisis de humedad.

⁴ LC = límite de cuantificación; LD = límite de detección.

Tabla 3. Niveles de expresión de la proteína CP4 EPSPS en el maíz MON-87427-7 × MON-89Ø34-3 × SYN-IR162-4 × MON-87411-9.

Tipo de Tejido	Estadio de Desarrollo ¹	Media (DE) Rango ($\mu\text{g/g pf}$) ²	Media (DE) Rango ($\mu\text{g/g ps}$) ³	LC/LD ⁴ ($\mu\text{g/g pf}$)
Hoja	V3-V4	130 (44) 21 - 210	860 (290) 140 - 1400	0,137/0,071
Hoja	VT	220 (31) 160 - 280	920 (130) 670 - 1200	0,137/0,071
Raíz	V3-V4	27 (5,7) 17 - 37	220 (46) 140 - 300	0,068/0,033
Raíz de Forraje	R5	30 (6,6) 17 - 45	150 (34) 90 - 230	0,068/0,033
Forraje	R5	58 (16) 35 - 88	190 (54) 120 - 290	0,137/0,070
Polen	R1	17 (2,7) 13 - 21	26 (4,2) 20 - 32	0,137/0,099
Grano	R6	8,8 (1,2) 5,7 - 11	9,9 (1,3) 6,4 - 13	0,228/0,152

¹ Estadio de desarrollo del maíz en el cual se recolectó la muestra de tejido.

² Nivel de proteína expresado como media aritmética y desvío estándar (DE) como microgramo (μg) de proteína por gramo (g) de tejido fresco (pf). La media, DE y rangos (valores mínimos y máximos) fueron calculados para cada tejido a través de las cinco localidades (n=20).

³ Niveles de proteína expresados como media aritmética y desvío estándar (DE) como microgramo (μg) de proteína por gramo (g) de tejido en base al peso seco (ps). Los valores en peso seco fueron calculados dividiendo los $\mu\text{g/g pf}$ por el factor de conversión a peso seco que fue obtenido de los datos del análisis de humedad.

⁴ LC = límite de cuantificación; LD = límite de detección.

Tabla 4. Niveles de expresión de la proteína Cry1A.105 en el maíz MON-89Ø34-3.

Tipo de Tejido	Estadio de Desarrollo ¹	Media (DE) Rango ($\mu\text{g/g pf}$) ²	Media (DE) Rango ($\mu\text{g/g ps}$) ³	LC/LD ⁴ ($\mu\text{g/g pf}$)
Hoja	V3-V4	27(5,1) 21-37	180(33) 140-240	0,657/0,568
Hoja	VT	18(4,3) 12-30	73(18) 49-120	0,657/0,568
Raíz	V3-V4	4,2(1,2) 2,6-6,3	34(9,5) 21-51	0,329/0,254
Raíz forraje	R5	1,7(0,38) 0,95-2,4	8,8(2,0) 4,9-13	0,329/0,254
Forraje	R5	3,9(1,4) 0,89-6,1	13(4,7) 3,0-20	0,438/0,372
Polen	R1	5,0(0,57) 4,0-6,1	7,8(0,88) 6,2-9,5	1,095/0,412
Grano	R6	1,9(0,28) 1,4-2,5	2,1(0,32) 1,6-2,8	1,095/0,262

¹ Estadio de desarrollo del maíz en el cual se recolectó la muestra de tejido.

² Nivel de proteína expresado como media aritmética y desvío estándar (DE) como microgramo (μg) de proteína por gramo (g) de tejido fresco (pf). La media, DE y rangos (valores mínimos y máximos) fueron calculados para cada tejido a través de las cinco localidades (n=20).

³ Niveles de proteína expresados como media aritmética y desvío estándar (DE) como microgramo (μg) de proteína por gramo (g) de tejido en base al peso seco (ps). Los valores en peso seco fueron calculados dividiendo los $\mu\text{g/g pf}$ por el factor de conversión a peso seco que fue obtenido de los datos del análisis de humedad.

⁴ LC = límite de cuantificación; LD = límite de detección.

Tabla 5. Niveles de expresión de la proteína Cry1A.105 en el maíz MON-87427-7 x MON-89034-3 x SYN-IR162-4 x MON-87411-9.

Tipo de Tejido	Estadio de Desarrollo ¹	Media (DE) Rango ($\mu\text{g/g pf}$) ²	Media (DE) Rango ($\mu\text{g/g ps}$) ³	LC/LD ⁴ ($\mu\text{g/g pf}$)
Hoja	V3-V4	30(7,0) 20-45	200(46) 130-290	0,657/0,568
Hoja	VT	21(8,9) 12-45	88(37) 50-180	0,657/0,568
Raíz	V3-V4	5,2(1,6) 3,2-9,2	42(13) 26-75	0,329/0,254
Raíz de Forraje	R5	1,8(0,38) 1,2-2,5	9,1(2,0) 6,1-13	0,329/0,254
Forraje	R5	4,5(1,4) 1,7-8,1	15(4,6) 5,7-27	0,438/0,372
Polen	R1	4,9(0,67) 3,9-5,9	7,7(1,0) 6,0-9,2	1,10/0,412
Grano	R6	2,0(0,21) 1,6-2,4	2,2(0,23) 1,8-2,7	1,10/0,262

¹ Estadio de desarrollo del maíz en el cual se recolectó la muestra de tejido.

² Nivel de proteína expresado como media aritmética y desvío estándar (DE) como microgramo (μg) de proteína por gramo (g) de tejido fresco (pf). La media, DE y rangos (valores mínimos y máximos) fueron calculados para cada tejido a través de las cinco localidades (n=20).

³ Niveles de proteína expresados como media aritmética y desvío estándar (DE) como microgramo (μg) de proteína por gramo (g) de tejido en base al peso seco (ps). Los valores en peso seco fueron calculados dividiendo los $\mu\text{g/g pf}$ por el factor de conversión a peso seco que fue obtenido de los datos del análisis de humedad.

⁴ LC = límite de cuantificación; LD = límite de detección.

Tabla 6. Niveles de expresión de la proteína Cry2Ab2 en el maíz MON-89Ø34-3.

Tipo de Tejido	Estadio de Desarrollo ¹	Media (DE) Rango ($\mu\text{g/g pf}$) ²	Media (DE) Rango ($\mu\text{g/g ps}$) ³	LC/LD ⁴ ($\mu\text{g/g pf}$)
Hoja	V3-V4	27(3,9) 20-33	170(26) 130-220	0,438/0,081
Hoja	VT	27(5,3) 20-37	110(22) 81-150	0,438/0,081
Raíz	V3-V4	4,7(1,5) 2,4-7,1	39(12) 20-58	0,219/0,056

Raíz forraje	R5	4,8(1,4) 2,1-6,6	25(7,0) 11-34	0,219/0,056
Forraje	R5	9,6(2,6) 6,0-15	32(8,7) 20-49	0,438/0,191
Polen	R1	0,39(0,076) 0,29-0,54	0,61(0,12) 0,45-0,84	0,110/0,055
Grano	R6	1,5(0,28) 0,88-2,0	1,6(0,32) 0,99-2,3	0,219/0,123

¹ Estadio de desarrollo del maíz en el cual se recolectó la muestra de tejido.

² Nivel de proteína expresado como media aritmética y desvío estándar (DE) como microgramo (μg) de proteína por gramo (g) de tejido fresco (pf). La media, DE y rangos (valores mínimos y máximos) fueron calculados para cada tejido a través de las cinco localidades (n=20).

³ Niveles de proteína expresados como media aritmética y desvío estándar (DE) como microgramo (μg) de proteína por gramo (g) de tejido en base al peso seco (ps). Los valores en peso seco fueron calculados dividiendo los $\mu\text{g/g}$ pf por el factor de conversión a peso seco que fue obtenido de los datos del análisis de humedad.

⁴ LC = límite de cuantificación; LD = límite de detección.

Tabla 7. Niveles de expresión de la proteína Cry2Ab2 en el maíz MON-87427-7 x MON-89034-3 x SYN-IR162-4 x MON-87411-9.

Tipo de Tejido	Estadio de Desarrollo ¹	Media (DE) Rango ($\mu\text{g/g}$ pf) ²	Media (DE) Rango ($\mu\text{g/g}$ ps) ³	LC/LD ⁴ ($\mu\text{g/g}$ pf)
Hoja	V3-V4	28(3,3) 21-33	180(21) 140-220	0,438/0,081
Hoja	VT	34(6,2) 24-44	140(26) 99-180	0,438/0,081
Raíz	V3-V4	6,0(2,2) 2,4-9,6	49(18) 19-78	0,219/0,056
Raíz de Forraje	R5	4,9(1,3) 2,1-6,8	26(6,6) 11-35	0,219/0,056
Forraje	R5	13(3,6) 5,4-21	43(12) 18-71	0,438/0,191
Polen	R1	0,37(0,053) 0,29-0,48	0,57(0,083) 0,45-0,75	0,11/0,055
Grano	R6	1,5(0,24) 0,97-1,9	1,6(0,27) 1,1-2,2	0,219/0,123

¹ Estadio de desarrollo del maíz en el cual se recolectó la muestra de tejido.

² Nivel de proteína expresado como media aritmética y desvío estándar (DE) como microgramo (μg) de proteína por gramo (g) de tejido fresco (pf). La media, DE y rangos (valores mínimos y máximos) fueron calculados para cada tejido a través de las cinco localidades (n=20).

³ Niveles de proteína expresados como media aritmética y desvío estándar (DE) como microgramo (μg) de proteína por gramo (g) de tejido en base al peso seco (ps). Los valores en peso seco fueron calculados dividiendo los $\mu\text{g/g}$ pf por el factor de conversión a peso seco que fue obtenido de los datos del análisis de humedad.

⁴ LD = límite de detección, LC = límite de cuantificación.

Tabla 8. Niveles de expresión de la proteína Vip3Aa20 en el maíz SYN-IR162-4.

Tipo de Tejido	Estadio de Desarrollo ¹	Media (DE) Rango ($\mu\text{g/g ps}$) ²	LC/LD ³ ($\mu\text{g/g ps}$)
Hoja	V3-V4	170(25) 140-250	0,075/0,025
Hoja	VT	85(21) 36-110	0,075/0,025
Raíz	V3-V4	77(21) 53-120	0,075/0,025
Raíz forraje	R5	29(6,6) 16-42	0,075/0,025
Forraje	R5	78(16) 58-120	0,075/0,025
Polen	R1	61(4,6) 54-71	0,075/0,025
Grano	R6	44(8,4) 31-58	0,075/0,025

¹ Estadio de desarrollo del maíz en el cual se recolectó la muestra de tejido.

² Niveles de proteína expresados como media aritmética y desvío estándar (DE) como microgramo (μg) de proteína por gramo (g) de tejido en base al peso seco (ps). La media, DE y rangos (valores mínimos y máximos) fueron calculados para cada tejido a través de las cinco localidades (n=20).

³ LC = límite de cuantificación; LD = límite de detección.

Tabla 9. Niveles de expresión de la proteína Vip3Aa20 en el maíz MON-87427-7 x MON-89Ø34-3 x SYN-IR162-4 x MON-87411-9.

Tipo de Tejido	Estadio de Desarrollo ¹	Media (DE) Rango ($\mu\text{g/g ps}$) ²	LC/LD ³ ($\mu\text{g/g ps}$)
Hoja	V3-V4	140 (33) 24 - 180	0,075/0,025
Hoja	VT	88 (11) 67 - 110	0,075/0,025
Raíz	V3-V4	89 (31) 49 - 160	0,075/0,025
Raíz de Forraje	R5	29 (7,5) 20 - 44	0,075/0,025
Forraje	R5	78 (26) 39 - 140	0,075/0,025
Polen	R1	59 (6,2) 50 - 72	0,075/0,025
Grano	R6	42 (6,9) 29 - 55	0,075/0,025

¹ Estadio de desarrollo del maíz en el cual se recolectó la muestra de tejido.

² Niveles de proteína expresados como media aritmética y desvío estándar (DE) como microgramo (μg) de proteína por gramo (g) de tejido en base al peso seco (ps). La media, DE y rangos (valores mínimos y máximos) fueron calculados para cada tejido a través de las cinco localidades (n=20).

³ LC = límite de cuantificación; LD = límite de detección.

Tabla 10. Niveles de expresión de la proteína PMI en el maíz SYN-IR162-4.

Tipo de Tejido	Estadio de Desarrollo ¹	Media (DE) Rango ($\mu\text{g/g ps}$) ²	LC/LD ³ ($\mu\text{g/g ps}$)
Hoja	V3-V4	8,6(1,4) 6,6-11	0,050/0,039
Hoja	VT	8,4(1,9) 4,9-12	0,050/0,039
Raíz	V3-V4	6,0(1,1) 4,2-8,8	0,050/0,039
Raíz forraje	R5	2,3(0,51) 1,5-3,5	0,050/0,039
Forraje	R5	4,7(0,98) 3,4-6,6	0,050/0,039
Polen	R1	2,4(0,23) 1,9-2,7	0,050/0,039
Grano	R6	1,2(0,16) 0,83-1,5	0,050/0,039

¹ Estadio de desarrollo del maíz en el cual se recolectó la muestra de tejido.

² Niveles de proteína expresados como media aritmética y desvío estándar (DE) como microgramo (μg) de proteína por gramo (g) de tejido en base al peso seco (ps). La media, DE y rangos (valores mínimos y máximos) fueron calculados para cada tejido a través de las cinco localidades (n=20).

³ LC = límite de cuantificación; LD = límite de detección.

Tabla 11. Niveles de expresión de la proteína PMI en el maíz MON-87427-7 x MON-89Ø34-3 x SYN-IR162-4 x MON-87411-9.

Tipo de Tejido	Estadio de Desarrollo ¹	Media (DE) Rango ($\mu\text{g/g ps}$) ²	LC/LD ³ ($\mu\text{g/g ps}$)
Hoja	V3-V4	7,8 (2,4) 1,3 - 13	0,050/0,039
Hoja	VT	8,4 (1,9) 5,9 - 13	0,050/0,039
Raíz	V3-V4	5,2 (2,6) 2,3 - 12	0,050/0,039
Raíz de Forraje	R5	2,4 (0,83) 1,3 - 4,3	0,050/0,039
Forraje	R5	4,6 (1,5) 2,4 - 8,5	0,050/0,039
Polen	R1	2,4 (0,25) 1,9 - 3,0	0,050/0,039
Grano	R6	1,2 (0,21) 0,84 - 1,7	0,050/0,039

¹ Estadio de desarrollo del maíz en el cual se recolectó la muestra de tejido.

² Niveles de proteína expresados como media aritmética y desvío estándar (DE) como microgramo (μg) de proteína por gramo (g) de tejido en base al peso seco (ps). La media, DE y rangos (valores mínimos y máximos) fueron calculados para cada tejido a través de las cinco localidades (n=20). NA: No Aplica.

³ LC = límite de cuantificación; LD = límite de detección.

Tabla 12. Niveles de expresión de la proteína Cry3Bb1 en el maíz MON-87411-9.

Tipo de Tejido	Estadio de Desarrollo ¹	Media (DE) Rango ($\mu\text{g/g pf}$) ²	Media (DE) Rango ($\mu\text{g/g ps}$) ³	LC/LD ⁴ ($\mu\text{g/g pf}$)
Hoja	V3-V4	44(6,9) 29-58	290(45) 190-380	0,035/0,006
Hoja	VT	42(12) 10-56	170(48) 42-230	0,035/0,006
Raíz	V3-V4	26(8,0) 12-44	210(65) 100-350	0,035/0,028
Raíz forraje	R5	11(4,6) 4,0-20	58(24) 21-103	0,035/0,028
Forraje	R5	14(4,1) 5,9-21	46(14) 19-70	0,035/0,008
Polen	R1	32(5,1) 23-44	50(8,0) 36-68	0,035/0,018
Grano	R6	5,5(3,5) 3,2-20	6,1(4,0) 3,6-23	0,035/0,007

¹ Estadio de desarrollo del maíz en el cual se recolectó la muestra de tejido.

² Nivel de proteína expresado como media aritmética y desvío estándar (DE) como microgramo (μg) de proteína por gramo (g) de tejido fresco (pf). La media, DE y rangos (valores mínimos y máximos) fueron calculados para cada tejido a través de las cinco localidades (n=20).

³ Niveles de proteína expresados como media aritmética y desvío estándar (DE) como microgramo (μg) de proteína por gramo (g) de tejido en base al peso seco (ps). Los valores en peso seco fueron calculados dividiendo los $\mu\text{g/g pf}$ por el factor de conversión a peso seco que fue obtenido de los datos del análisis de humedad.

⁴ LC = límite de cuantificación; LD = límite de detección.

Tabla 13. Niveles de expresión de la proteína Cry3Bb1 en el maíz MON-87427-7 x MON-89034-3 x SYN-IR162-4 x MON-87411-9.

Tipo de Tejido	Estadio de Desarrollo ¹	Media (DE) Rango ($\mu\text{g/g pf}$) ²	Media (DE) Rango ($\mu\text{g/g ps}$) ³	LC/LD ⁴ ($\mu\text{g/g pf}$)
Hoja	V3-V4	51(5,8) 42-64	340(38) 280-420	0,035/0,006
Hoja	VT	46(8,9) 30-61	190(37) 120-250	0,035/0,006
Raíz	V3-V4	28(8,3) 12-41	230(68) 99-330	0,035/0,028
Raíz de Forraje	R5	12(5,7) 4,6-24	61(29) 24-120	0,035/0,028
Forraje	R5	15(4,5) 9,9-26	51(15) 33-86	0,035/0,008
Polen	R1	31(4,4) 24-39	49(6,9) 37-60	0,035/0,018
Grano	R6	5,0(0,78) 3,1-6,8	5,7(0,88) 3,4-7,6	0,035/0,007

¹ Estadio de desarrollo del maíz en el cual se recolectó la muestra de tejido.

² Nivel de proteína expresado como media aritmética y desvío estándar (DE) como microgramo (μg) de proteína por gramo (g) de tejido fresco (pf). La media, DE y rangos (valores mínimos y máximos) fueron calculados para cada tejido a través de las cinco localidades (n=20).

³ Niveles de proteína expresados como media aritmética y desvío estándar (DE) como microgramo (μg) de proteína por gramo (g) de tejido en base al peso seco (ps). Los valores en peso seco fueron calculados dividiendo los $\mu\text{g/g pf}$ por el factor de conversión a peso seco que fue obtenido de los datos del análisis de humedad.

⁴ LC = límite de cuantificación, LD = límite de detección.

El nivel de expresión del ARN DvSnf7 en la acumulación de eventos MON-87427-7 x MON-89Ø34-3 x SYN-IR162-4 x MON-87411-9 se cuantificó utilizando la metodología comercial QuantiGene® Plex 2.0 (Affymetrix Inc., 2012) usando el ARN DvSnf7_968 producido *in vitro* como sustancia de referencia y el ARN del maíz MON-87411-9 como sustancia de control. Los resultados fueron expresados en microgramo (μg) de ARN por gramo (g) de tejido en base al peso seco o al peso fresco.

Tabla 14. Niveles de expresión del ARN DvSnf7 en el maíz MON-87411-9.

Tipo de tejido	Etapas de desarrollo ¹	Media (DE) Rango ($\mu\text{g/g pf}$) ²	Media (DE) Rango ($\mu\text{g/g ps}$) ³	LD/LC ($\mu\text{g/g pf}$) ⁴
Hoja	V3-V4	18×10^{-3} ($7,4 \times 10^{-3}$) $5,9 \times 10^{-3}$ - 30×10^{-3}	120×10^{-3} (48×10^{-3}) 38×10^{-3} - 199×10^{-3}	$1,3 \times 10^{-4}$ / $5,7 \times 10^{-4}$
Hoja	VT	12×10^{-3} ($2,3 \times 10^{-3}$) $8,0 \times 10^{-3}$ - 18×10^{-3}	51×10^{-3} ($9,3 \times 10^{-3}$) 33×10^{-3} - 74×10^{-3}	$1,1 \times 10^{-4}$ / $4,7 \times 10^{-4}$
Raíz	V3-V4	$2,6 \times 10^{-3}$ ($1,4 \times 10^{-3}$) $0,96 \times 10^{-3}$ - $5,4 \times 10^{-3}$	21×10^{-3} (11×10^{-3}) $7,8 \times 10^{-3}$ - 44×10^{-3}	$0,30 \times 10^{-4}$ / $1,3 \times 10^{-4}$
Forraje	R5	$0,72 \times 10^{-3}$ ($0,19 \times 10^{-3}$) $0,47 \times 10^{-3}$ - $1,2 \times 10^{-3}$	$2,4 \times 10^{-3}$ ($0,63 \times 10^{-3}$) $1,6 \times 10^{-3}$ - $3,9 \times 10^{-3}$	$0,20 \times 10^{-4}$ / $0,89 \times 10^{-4}$
Raíz de Forraje	R5	$0,73 \times 10^{-3}$ ($0,45 \times 10^{-3}$) $0,22 \times 10^{-3}$ - $2,4 \times 10^{-3}$	$3,8 \times 10^{-3}$ ($2,3 \times 10^{-3}$) $1,2 \times 10^{-3}$ - 12×10^{-3}	$0,16 \times 10^{-4}$ / $0,69 \times 10^{-4}$
Polen	R1	$0,038 \times 10^{-3}$ (N/A ⁵) N/A ⁵	$0,059 \times 10^{-3}$ (N/A ⁵) N/A ⁵	$0,069 \times 10^{-4}$ / $0,30 \times 10^{-4}$
Grano	R6	$0,030 \times 10^{-3}$ ($0,010 \times 10^{-3}$) $0,020 \times 10^{-3}$ - $0,058 \times 10^{-3}$	$0,033 \times 10^{-3}$ ($0,011 \times 10^{-3}$) $0,023 \times 10^{-3}$ - $0,065 \times 10^{-3}$	$0,047 \times 10^{-4}$ / $0,20 \times 10^{-4}$

¹ Estadio de desarrollo del maíz en el cual se recolectó la muestra de tejido

² Los niveles de ARN DvSnf7 son expresados como microgramo (μg) de ARN DvSnf7 por gramo (g) de tejido en peso fresco (pf). Las medias, el desvío estándar (DE) y los rangos (valores mínimos y máximos) fueron calculados para cada tejido a través de los 5 sitios (n=20, excepto para el tejido hoja V3-V4 donde n=19 debido a un error en el muestreo; excepto para grano donde n=13 y polen donde n =1, debido a las expresiones de las muestras < LD o < LC).

³ Los niveles de ARN DvSnf7 son expresados como microgramo (μg) de ARN DvSnf7 por gramo (g) de tejido en peso seco (ps). Las medias, el desvío estándar (DE) y los rangos (valores mínimos y máximos) fueron calculados para cada tejido a través de los 5 sitios (n=20, excepto para el tejido hoja V3-V4 donde n=19 debido a un error en el muestreo; excepto para grano donde n=13 y polen donde n =1, debido a las expresiones de las muestras < LD o < LC).

⁴ LD= límite de detección, LC= límite de cuantificación.

⁵ N/A: No aplica para polen ya que el n=1, debido a las expresiones de las muestras < LD o < LC.

Tabla 15. Niveles de expresión del ARN DvSnf7 en el maíz MON-87427-7 x MON-89Ø34-3 x SYN-IR162-4 x MON-87411-9.

Tipo de tejido	Etapa de desarrollo ¹	Media (DE) Rango ($\mu\text{g/g pf}$) ²	Media (DE) Rango ($\mu\text{g/g ps}$) ³	LD/LC ($\mu\text{g/g pf}$) ⁴
Hoja	V3-V4	16×10^{-3} ($3,1 \times 10^{-3}$) $11 \times 10^{-3} - 22 \times 10^{-3}$	105×10^{-3} (20×10^{-3}) $72 \times 10^{-3} - 142 \times 10^{-3}$	$1,4 \times 10^{-4} / 6,3 \times 10^{-4}$
Hoja	VT	12×10^{-3} ($1,6 \times 10^{-3}$) $8,9 \times 10^{-3} - 15 \times 10^{-3}$	48×10^{-3} ($6,6 \times 10^{-3}$) $37 \times 10^{-3} - 62 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-4} / 4,5 \times 10^{-4}$
Raíz	V3-V4	$3,8 \times 10^{-3}$ ($2,1 \times 10^{-3}$) $1,0 \times 10^{-3} - 7,8 \times 10^{-3}$	31×10^{-3} (17×10^{-3}) $8,2 \times 10^{-3} - 64 \times 10^{-3}$	$0,34 \times 10^{-4} / 1,5 \times 10^{-4}$
Forraje	R5	$0,71 \times 10^{-3}$ ($0,20 \times 10^{-3}$) $0,30 \times 10^{-3} - 1,1 \times 10^{-3}$	$2,3 \times 10^{-3}$ ($0,66 \times 10^{-3}$) $1,0 \times 10^{-3} - 3,7 \times 10^{-3}$	$0,21 \times 10^{-4} / 0,92 \times 10^{-4}$
Raíz de Forraje	R5	$0,57 \times 10^{-3}$ ($0,23 \times 10^{-3}$) $0,21 \times 10^{-3} - 1,1 \times 10^{-3}$	$3,0 \times 10^{-3}$ ($1,2 \times 10^{-3}$) $1,1 \times 10^{-3} - 5,9 \times 10^{-3}$	$0,15 \times 10^{-4} / 0,67 \times 10^{-4}$
Polen	R1	N/A ⁵ (N/A) N/A	N/A ⁵ (NA) NA	$0,073 \times 10^{-4} / 0,32 \times 10^{-4}$
Grano	R6	$0,034 \times 10^{-3}$ ($0,011 \times 10^{-3}$) $0,022 \times 10^{-3} -$ $0,060 \times 10^{-3}$	$0,038 \times 10^{-3}$ ($0,012 \times 10^{-3}$) $0,024 \times 10^{-3} -$ $0,067 \times 10^{-3}$	$0,041 \times 10^{-4} / 0,18 \times 10^{-4}$

¹ Estadio de desarrollo del maíz en el cual se recolectó la muestra de tejido

² Los niveles de ARN DvSnf7 son expresados como microgramo (μg) de ARN DvSnf7 por gramo (g) de tejido en peso fresco (pf). Las medias, el desvío estándar (DE) y los rangos (valores mínimos y máximos) fueron calculados para cada tejido a través de los 5 sitios ($n=20$, excepto para grano donde $n=19$ y polen donde $n=0$, debido a las expresiones de las muestras $< \text{LD}$ o $< \text{LC}$).

³ Los niveles de ARN DvSnf7 son expresados como microgramo (μg) de ARN DvSnf7 por gramo (g) de tejido en peso seco (ps). Las medias, el desvío estándar (DE) y los rangos (valores mínimos y máximos) fueron calculados para cada tejido a través de los 5 sitios ($n=20$, excepto para grano donde $n=19$ y polen donde $n=0$, debido a las expresiones de las muestras $< \text{LD}$ o $< \text{LC}$).

⁴ LD= límite de detección, LC= límite de cuantificación.

⁵ N/A: No aplica para polen ya que $n=0$, debido a las expresiones de las muestras $< \text{LD}$ o $< \text{LC}$.

Fuente de las Tablas 1-15: Monsanto.

Los niveles de expresión de las proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2, Vip3Aa20, PMI y Cry3Bb1 y del ARN DvSnf7 en las distintas muestras del maíz MON-87427-7 \times MON-89Ø34-3 \times SYN-IR162-4 \times MON-87411-9 fueron consistentes con los niveles observados en los correspondientes eventos parentales.

En la mayoría de las muestras del evento MON-87411-9, los niveles de expresión de la proteína CP4 ESPS son significativamente inferiores a las del evento MON-87427-7. Consistentemente, los niveles de expresión de esta proteína para dichas muestras de la acumulación de eventos, son similares a aquellos observados en el evento MON-87427-7. Sin embargo, dicho evento no expresa CP4 ESPS en los granos de polen (fenotipo de

androesterilidad), por lo que la proteína detectada en la acumulación de eventos corresponde a la aportada por el evento MON-87411-9.

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

2. Análisis de interacción de los productos de expresión

Se analizó la posibilidad de interacción entre los productos de expresión (las proteínas CP4 EPSPS, Cry1A.105, Cry2Ab2, Vip3Aa20, Cry3Bb1 y el ARN DvSnf7) en la acumulación de eventos considerando los mecanismos de acción y los niveles de expresión de las proteínas y del ARN DvSnf7 presentes en el evento.

En primer lugar, a partir de la literatura científica, se sabe que la proteína que confiere tolerancia a glifosato (CP4 EPSPS) y los productos de expresión insecticidas (Cry1A.105, Cry2Ab2, Vip3Aa20, Cry3Bb1 y ARN DvSnf7) actúan en rutas metabólicas diferentes.

Para el caso de los productos insecticidas, estudios de laboratorio demostraron que las proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 y Vip3Aa20 actúan sobre el mismo orden de insectos (Lepidoptera) mientras que la proteína Cry3Bb1 y el ARN DvSnf7 ejercen su efecto sobre el orden Coleoptera. Asimismo, se comprobó que la presencia simultánea de los productos de expresión en el maíz MON-87427-7 x MON-89Ø34-3 x SYN-IR162-4 x MON-87411-9 no evidenciaron interacción entre los mismos (Sección I, 3).

En cuanto a los niveles de expresión de los productos en la acumulación de eventos (proteínas y ARN DvSnf7), no se observaron cambios relevantes en comparación con los eventos parentales (Sección II, 1).

Estos resultados tomados en conjunto constituyen evidencia consistente para inferir que no existe interacción entre las 5 proteínas y el ARN DvSnf7 expresados en la acumulación de eventos MON-87427-7 x MON-89Ø34-3 x SYN-IR162-4 x MON-87411-9.

3. Formulación de posibles hipótesis de riesgo ambiental.

Cada uno de los eventos parentales fueron evaluados en instancia de solicitudes previas concluyendo en todos los casos que:

- a) son estables genética y fenotípicamente a lo largo de las generaciones;
- b) se transfieren a la progenie siguiendo un patrón de herencia mendeliano simple;

c) no presentan riesgo de transferencia horizontal o intercambio de genes con otros organismos;

d) expresan productos que carecen de potencial tóxico o alergénico;

e) no han generado nuevos ORF que muestren características tóxicas o alergénicas y,

f) no presentan diferencias biológicamente relevantes en comparación a sus homólogos convencionales en lo referente a su comportamiento agronómico, capacidad de supervivencia, establecimiento y diseminación, interacciones agroecológicas, potencial impacto sobre organismos no blanco relevantes para el agroecosistema local, así como tampoco en el perfil composicional.

Como consecuencia de estas evaluaciones, se otorgaron Documentos de Decisión favorables para cada uno de los eventos parentales.

Además, debido a que la acumulación de eventos MON-87427-7 x MON-89Ø34-3 x SYN-IR162-4 x MON-87411-9 fue obtenida por cruzamiento convencional, no existen evidencias para suponer que se hayan modificado alguna de las mismas. Adicionalmente, se ha demostrado la ausencia de interacción entre los productos de expresión en la acumulación de eventos (Sección II, 2).

Finalizado el análisis del conjunto de esta información, no se han identificado hipótesis de riesgo asociadas a la presente acumulación de eventos, lo que constituye evidencia consistente para sostener que el maíz MON-87427-7 x MON-89Ø34-3 x SYN-IR162-4 x MON-87411-9 no presentará efectos adversos sobre el agroecosistema.

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

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

El solicitante desarrolló un plan de manejo de la acumulación de eventos MON-87427-7 x MON-89Ø34-3 x SYN-IR162-4 x MON-87411-9 con el fin de retrasar la selección de resistencia en las especies que ejercen mayor presión sobre el cultivo: *Diatraea saccharalis* y *Spodoptera frugiperda*. El mismo incluyó modelos de simulación predictivos de la durabilidad de la eficacia de acción como consecuencia de la acumulación de eventos empleando refugio estructurado y contemplando dos escenarios posibles respecto a una posible reducción efectiva del mismo debido a aplicaciones de insecticidas para asegurar el

correcto establecimiento del cultivo. Además, tuvo en consideración estudios de eficacia llevados a cabo en laboratorio y a campo (realizados en Argentina).

Por otra parte, el solicitante propone promover el uso de refugio integrado (refugio en la bolsa) como una estrategia alternativa para garantizar el cumplimiento del mismo en aquellas regiones donde *D. saccharalis* se constituye como principal plaga del cultivo (zonas templadas del centro y sur de producción maicera argentina), y donde la presión de *S. frugiperda* es baja o nula. Para tal fin, desarrolló un modelo de simulación para *D. saccharalis* considerando la implementación de refugio integrado.

El solicitante también propone una estrategia de Manejo Integrado de Plagas en la cual se contempla el uso de múltiples herramientas:

- A. Rotación de cultivos
- B. Monitoreo temprano de los lotes y mantenimiento del cultivo libre de malezas hospederas de la plaga.
- C. Tratamiento de semillas según necesidades regionales.
- D. Uso racional de insecticidas en un contexto de manejo integrado de plagas como complemento de la protección otorgada por las nuevas proteínas.
- E. Preservación de los enemigos naturales.
- F. Siembra, tipo y diseño espacial de refugio

Para extender la durabilidad de la eficacia de acción como consecuencia de la acumulación de eventos, se considera necesario implementar un refugio estructurado en bloque, utilizando al menos el 10% de la superficie total con un material no Bt de ciclo igual o similar al cultivo Bt. La siembra debe ser realizada de manera que no haya más de 1500 m continuos de maíz MON-87427-7 x MON-89Ø34-3 x SYN-IR162-4 x MON-87411-9 sin refugio. En caso de aplicar insecticidas, deberá realizarse teniendo en cuenta los principios de Manejo Integrado de Plagas (MIP) considerando el umbral de daño económico para cada plaga, no debiendo utilizarse en el refugio insecticidas microbianos a base de *Bacillus thuringiensis*. Además, se recomienda la implementación de refugio integrado como estrategia aplicable para aquellas regiones donde *D. saccharalis* se constituye como principal plaga del cultivo (zonas templadas del centro y sur de producción maicera), y donde la presión de *S. frugiperda* es baja o nula.

El solicitante desarrollará un Plan de Comunicación y Capacitación para los productores que será definido previo al lanzamiento del evento MON-87427-7 x MON-89Ø34-3 x SYN-IR162-4 x MON-87411-9 e incluirá: demostraciones a campo,

capacitaciones, reuniones con productores, visitas a establecimientos, publicación de información en la página web y entrega de material conteniendo la información antes mencionada, entre otros.

4.2. Procedimientos a seguir ante la posible aparición de resistencia

A. Canales de comunicación disponibles para el productor.

El solicitante se compromete de 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. 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 herencia, 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 ecotipo 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. Trabajar 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. 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.